(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2005년12월23일
(11) 등록번호 10-0538502
(24) 등록일자 2005년12월16일

(21) 출원번호 10-2001-7011243
(22) 출원일자 2001년09월04일
번역문 제출일자 2001년09월04일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2000/001353
국제출원일자 2000년03월06일
(65) 공개번호 10-2001-0103039
(43) 공개일자 2001년11월17일
(87) 국제공개번호 WO 2000/53736
국제공개일자 2000년09월14일

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 헝가리, 이스라엘, 인도네시아, 인도, 대한민국, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 러시아, 싱가포르, 슬로바키아, 터어키, 미국, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

(30) 우선권주장

JP-P-1999-00059361	1999년03월05일	일본(JP)
JP-P-1999-00084100	1999년03월26일	일본(JP)
JP-P-1999-00084101	1999년03월26일	일본(JP)
JP-P-1999-00083964	1999년03월26일	일본(JP)
JP-P-1999-00093043	1999년03월31일	일본(JP)
JP-P-1999-00093044	1999년03월31일	일본(JP)
JP-P-1999-00215014	1999년07월29일	일본(JP)
JP-P-1999-00240041	1999년08월26일	일본(JP)
JP-P-1999-00298613	1999년10월20일	일본(JP)
JP-P-1999-00324194	1999년11월15일	일본(JP)
JP-P-1999-00346288	1999년12월06일	일본(JP)
JP-P-1999-00346309	1999년12월06일	일본(JP)
JP-P-1999-00346521	1999년12월06일	일본(JP)
JP-P-2000-00055658	2000년03월01일	일본(JP)
JP-P-2000-00057075	2000년03월02일	일본(JP)

(73) 특허권자
미쯔비시 레이온 가부시끼가이샤
일본 도꾜도 미나또꾸 고난 1쪼메 6방 41고

(72) 발명자
아끼따,다까시
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

이또,지호
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

이시마루,데루따

일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

미야우찌,하루꼬
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

무라세,게이
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

다까하시,아쓰시
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

스미,도시노리
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

마에하라,오사무
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

이께다,다다노부
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

오오가미,노부꼬
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

마끼노,다까유끼
일본739-0693히로시마껭오따께시미유끼쪼20방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤쥬오기쥬쯔겡뀨쇼내

유,후지오
일본230-0053가나가와껭요꼬하마시쓰루미꾸다이꼬꾸쪼10방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤가가꾸힝가이하쯔겡뀨쇼내

와따나베,후미아끼
일본230-0053가나가와껭요꼬하마시쓰루미꾸다이꼬꾸쪼10방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤가가꾸힝가이하쯔겡뀨쇼내

우라가끼,도시따까
일본230-0053가나가와껭요꼬하마시쓰루미꾸다이꼬꾸쪼10방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤가가꾸힝가이하쯔겡뀨쇼내

후지이,와따루
일본230-0053가나가와껭요꼬하마시쓰루미꾸다이꼬꾸쪼10방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤가가꾸힝가이하쯔겡뀨쇼내

모리시따,다께하루
일본230-0053가나가와껭요꼬하마시쓰루미꾸다이꼬꾸쪼10방1고미쯔비시레이온가부시끼가이샤가가꾸힝가이하쯔겡뀨쇼내

(74) 대리인 주성민
위혜숙

심사관 : 김희수

(54) 생체 관련 물질 함유 담체

요약

본 발명은 생체 관련 물질이 섬유에 고정화된 생체 관련 물질 고정화 섬유 및 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유 및 상기 섬유의 다발을 포함하는 섬유 배열체 및 그 박편에 관한 것이다.

색인어

생체 관련 물질, 생체 관련 물질 고정화 섬유, 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유, 섬유 배열체 및 그 박편

명세서

기술분야

본 발명은 생체 관련 물질을 함유하는 담체에 관한 것이다. 자세하게는 생체 관련 물질이 고정화된 섬유, 섬유 배열체 및 그 박편에 관한 것이다.

배경기술

최근, 각종 생물에서의 게놈 프로젝트가 진행되고 있고, 인간 유전자를 비롯하여 다수의 유전자와 그의 염기 서열이 급속하게 분명해지고 있다. 서열이 분명해진 유전자의 기능에 대해서는 여러가지 방법으로 조사할 수 있지만, 그 유력한 방법의 하나로 분명해진 염기 서열 정보를 이용한 유전자 발현 해석이 알려져 있다. 예를 들면, 노던 하이브리다이제이션으로 대표되는 각종 핵산:핵산간 하이브리다이제이션 반응이나 각종 PCR 반응을 이용한 방법이 개발되어, 해당 방법에 의해 각종 유전자와 그 생체 기능 발현과의 관계를 조사할 수 있다. 그러나, 이러한 방법에서는 적용 가능한 유전자 수에 제한이 있다. 따라서, 오늘날 게놈 프로젝트를 통해 분명해진 1 개체 레벨이라는 매우 다수의 유전자로 구성되는 복잡한 반응계 전체로 보면, 상기 방법에 의해 유전자의 종합적·계통적 해석을 행하는 것은 곤란하다.

최근에 다수 유전자의 일괄 발현 해석을 가능하게 하는 DNA 마이크로 어레이법 (DNA칩법)이라고 하는 새로운 분석법 내지 방법론이 개발되어 주목을 모으고 있다.

이러한 방법은 모두 핵산:핵산 간 하이브리다이제이션 반응에 기초하는 핵산 검출·정량법이라는 점에서 원리적으로는 종래 방법과 동일하지만 마이크로 어레이 또는 칩이라고 불리는 평면 기반편상에 다수의 DNA 단편이 고밀도로 정렬 고정화된 것이 이용되고 있는 점에 큰 특징이 있다. 마이크로 어레이법의 구체적 사용법으로서는 예를 들면, 연구 대상 세포의 발현 유전자 등을 형광 색소 등으로 표지한 샘플을 평면 기반편상에서 하이브리다이즈시켜 상호 상보적인 핵산 (DNA 또는 RNA) 끼리 결합시켜 그 개소를 형광 색소 등으로 라벨 후, 고해상도 해석 장치에서 고속으로 판독하는 방법을 들 수 있다. 이렇게 해서 샘플 중 각각의 유전자량을 신속하게 추정할 수 있다. 즉, 이 새로운 방법의 본질은 기본적으로는 반응 시료의 미량화와 그 반응 시료를 재현성 좋고 다량·신속·계통적으로 분석, 정량할 수 있는 형태로 배열 정렬하는 기술과의 통합이라고 이해된다.

핵산을 기반상에 고정화하기 위한 기술로서는, 상기 노던법과 마찬가지로 나일론 시트 등의 위에 고밀도로 고정화하는 방법 외에 더욱 밀도를 높이기 위해 유리 등의 기반위에 폴리리진 등을 코팅, 고정화하는 방법, 또는 실리콘 등의 기반위에 단쇄 핵산을 직접 고상 합성하는 방법 등이 개발되어 있다.

그러나, 예를 들면 유리 등의 고체 표면을 화학적 또는 물리적으로 수식한 기반상에 핵산을 스포팅 고정화하는 방법 [Science 270, 467-470(1995)]은 스폿 밀도에서 시트법보다 우수하지만, 스폿 밀도 및 스폿당 고정 가능한 핵산량이 실리콘기반상에서 직접 합성법(미국 특허 5,445,934호, 미국 특허 5,774,305호)와 비교하여 소량이고, 재현이 곤란한 점이 지적되고 있다. 다른쪽, 실리콘 등의 기반위에 포토리소그래피 기술을 이용하여 다종의 단쇄 핵산을 그 자리에서 규칙적으로 고상 합성하는 방법에 관해서는 단위 면적당 합성할 수 있는 핵산 종류수 (스폿 밀도) 및 스폿당의 고정화량 (합성량) 및 재현성 등에서 스포팅법보다 우수하다고 하지만 고정화할 수 있는 화합물의 종류는 포트리소그래피에 의해 제어 가능한 비교적 단쇄 핵산에 한정된다. 그위에 고가 제조 장치와 다단 제조 프로세스에 의해 칩당 큰 비용 절감은 곤란하다. 기타, 미소한 담체상에 핵산을 고상 합성하여 라이브러리화하는 수법으로 미소한 비드를 이용하는 방법이 알려져 있다. 이 방법은 칩법에 의해 장쇄 핵산을 다종·염가로 합성하는 것이 가능하고, 또한 cDNA 등에 의해 장쇄 핵산도 고정 가능하다고 생각된다. 그러나, 칩법과 상이하고 지정된 화합물을 지정 배열 기준으로 재현성 좋게 정렬시킨 것을 제작하는 것은 곤란하다.

또한, 현재 사용되고 있는 마이크로 어레이를 이용하여 유전자 해석을 행할 때 하이브리다이제이션 및 하이브리다이제이션 후의 세정 조작에 장시간을 필요로 한다.

한편, 겔 중에 프로브 핵산을 고정화하여 검체 중인 핵산과의 하이브리다이제이션을 검출하는 시도가 행해지고 있다 (일본 특개평3-47097호, WO98/51823).

핵산을 겔에 고정화하는 시도로서는 예를 들면, 히드록시숙신이미드를 이탈기로서 갖는 공중합체 겔에 아미노화 DNA를 고정화하는 방법 (Polym. Gel. Netw., 4, (2), 111(1996)), 알데히드기를 도입한 폴리아크릴아미드겔에 아미노화 DNA를 결합시키는 방법(Nucleic Acid Res., 24, 3142(1996)), 메실기를 도입한 폴리아크릴아미드겔에 아미노화 DNA를 결합시키는 방법 (ibid), 히드라지드기를 도입한 폴리아크릴아미드겔에 알데히드화한 DNA를 결합시키는 방법 (Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 4913(1996)) 등이 알려져 있다.

또한, 중공 섬유 내에 겔을 충전하는 방법도 시도되고 있다. 이러한 방법으로서는 전기 영동용 모세관 제조에 관한 일본 특개평11-211694호 공보에 기재된 방법 등이 제안되어 있다. 이 방법은 모세관 방사시에 중공부에서 겔을 형성시켜, 모세관을 얻게 된다.

그러나 충전되는 겔은 중합 중에 통상 발생하는 중합 수축에 의해 중공 섬유로부터 박리되어 중공 섬유에서 누락되기 쉽다. 따라서, 겔을 충전한 중공 섬유를 모세관 전기 영동이나 DNA 등의 분석용 마이크로 어레이에 이용하는 것은 곤란했다. 또한, 이 마이크로 어레이 중에 존재하는 겔은 일반적으로 투명하고, 모든 사이트에 겔이 존재하는 것을 확인하는 것은 용이하지 않다. 따라서, 조작성과 실용성 문제에서 보다 우수한 방법이 요망되고 있다.

발명의 상세한 설명

이러한 상황에서 쇄 길이에 상관없이 핵산을 소정의 농도로 고정화할 수 있고, 측정 가능한 형태로 고밀도로 재현하기 좋게 배열화하는 것이 가능하고 염가로 대량 제조에 적응 가능한 새로운 체계적 방법론 확립은 금후 중요성이 증대된다고 생각되는 유전자 해석에 강하게 요구되는 것으로 본 발명이 해결하려고 하는 과제이다.

구체적으로 본 발명이 해결하려고 하는 과제는 나일론 시트나 유리 기반과 같은 이차원 담체상에 미량 스포팅이나 미량 분주에 의한 핵산 배열체 제조법에 비해 핵산 고정화량이 높고, 단위 면적당 배열되는 핵산 분자 종류의 고밀도화가 가능하고, 대량생산에 보다 적합한 배열체, 즉 핵산이 고정화된 이차원적(평면적) 배열체의 제조법 확립이다. 또한, 본 발명이 해결하려고 하는 과제는 실리콘 기반상에의 포토리소그래피와 고상 합성과의 조합에 의한 고밀도 올리고 핵산 배열체 제조법과 비교하여 cDNA를 포함하는 장쇄의 핵산에도 적응 가능하고 제조 비용이 보다 낮은 고정화 핵산 이차원 배열체 제조법의 확립이다.

본 발명자 중의 일부는 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토를 행한 결과, 먼저, 생체 관련 물질 정렬화 프로세스와 고정화 프로세스를 동일한 이차원 담체상에서 행하는 종래법의 발상을 고쳐, 생체 관련 물질의 고정화 프로세스를 일차원 구조체로서의 섬유 위(1개의 섬유 위)에 행하고 계속해서, 생체 관련 물질을 고정화한 복수 개의 섬유가 정연하게 배열된 삼차원 구조체로 한 후, 그 삼차원 구조의 섬유 배열체를 절단 박편화함으로써, 생체 관련 물질 고정화 섬유 이차원 고밀도 배열체 박편이 제작 가능하다는 것을 발견하게 되었다.

이 방법은, 생체 관련 물질을 고정화한 섬유를 어떻게 효율적으로 고밀도로 정연하게 배열할지가 또한 해결하여야 할 중요한 과제이고 그 해결은 특히 공업적 생산에서 크게 유익하다. 그래서, 본 발명자들은 지그(jig)를 사용한 고정밀도 배열 기술을 이용함으로써, 생체 관련 물질 고정화 섬유 이차원 고밀도 배열체를 제작할 수 있음을 발견하였다.

또한, 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토를 행한 결과, 중공 섬유의 중공부에 겔을 충전하기 전에 중공 섬유의 내벽부에 겔 형성성 단량체 용액을 부착시켜 중합하여 겔을 형성시키는 전처리(내벽 처리)를 행함으로써 그 후에 충전하는 겔의 박리를 방지하는 것을 발견했다.

또한, 본 발명자들은 겔에 색소, 예를 들면, 형광 색소를 고정화함으로써 형광 현미경을 이용하여 제조시 및 하이브리다이즈시에 있어서 겔의 충전, 변형, 탈락 상태 등을 쉽게 검출할 수 있음을 발견하였다.

즉, 본원은 이하의 발명을 제공한다.

(1) 본 발명은 생체 관련 물질이 직접 섬유에 고정화된 생체 관련 물질 고정화 중공 섬유, 생체 관련 물질 고정화 다공질 섬유 또는 생체 관련 물질 고정화 다공질 중공 섬유이다. 또한, 본 발명은 생체 관련 물질이, 생체 관련 물질이 고정화된 겔을 통해 섬유에 유지된 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유이다.

겔 유지 섬유로서는 솔리드 섬유, 중공 섬유, 다공질 섬유 또는 다공질 중공 섬유를 들 수 있다. 이러한 경우, 생체 관련 물질 고정화 겔은 솔리드 섬유 표면, 중공 섬유의 중공부, 다공질 섬유의 다공질부 또는 다공질 중공 섬유의 중공부 및 다공질부에 유지된 것이다.

생체 관련 물질로서는 이하의 (a) 내지 (c)의 물질로 이루어지는 군으로 선택된 어느 하나를 들 수 있지만 핵산이 바람직하다.

(a) 핵산, 아미노산, 당 또는 지질

(b) 상기 (a)의 물질 중 1 종류 또는 2 종류 이상의 성분으로 이루어진 중합물

(c) 상기 (a) 또는 (b)의 물질과 상호 작용을 갖는 물질.

여기서 상기 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유에는 또한 색소가 겔을 통해 섬유에 유지된 것도 포함된다.

(2) 또한, 본 발명은 상기 섬유 다발을 포함하는 섬유 배열체이다. 이러한 배열체로서는 섬유 배열체 내의 각 섬유가 규칙적으로 배열된 것을 들 수 있고, 또한, 섬유의 다발이 1 cm^2당 100 개 이상의 섬유를 포함하는 것도 들 수 있다. 이 경우, 생체 관련 물질의 종류가 각 섬유의 전부 또는 일부에서 상이한 것일 수 있다.

(3) 또한, 본 발명은 상기 섬유 배열체의 섬유축과 교차하는 절단면을 갖는 상기 섬유 배열체의 박편이다. 이러한 박편에는 섬유 단위 및 상기 섬유 단위의 좌표 기준 (예를 들면, 박편 중의 2 이상의 마커 섬유 단위)를 포함시킬 수 있다. 또한, 마커 섬유 단위가 염색된 것도 들 수 있다. 본 발명에서는 섬유 단위의 좌표가 좌표 기준에 기초하여 결정되어 있는 박편도 본 발명의 박편에 포함된다.

(4) 또한, 본 발명은 상기 박편 중 각 섬유에 좌표가 부여된 박편의 제조 방법으로서

(a) 섬유 단위를 묶어 고정화한 섬유 배열체를, 상기 섬유 단위의 섬유축과 교차하는 단면에서 차례로 절단하여 연속하는 섬유 배열체 박편 S(1), S(2),…, S (h), …, S(m)을 얻는 공정,

(b) m 개의 박편 중에서 임의의 박편 S(h)를 선택하여, 상기 박편 S(h) 중에 포함되는 각 섬유 단위의 2차원 좌표를 상기 박편 S(h) 중의 좌표 기준에 기초하여 결정하는 공정,

(c) 상기 S(h) 박편에 가까운 위치에 있는 S(i) 박편 중에 포함되는 각 섬유 단위의 2차원 좌표를 공정 (b)에서 얻어진 박편 S(h)의 좌표 데이터 및 상기 박편 S(i) 중의 좌표 기준에 기초하여 결정하는 공정 및

(d) 공정 (b) 및 (c)를 반복하여 상기 섬유 배열체 박편 중 각 섬유 단위의 2차원 좌표를 결정하는 공정을 포함하는 방법이다.

(5) 또한, 본 발명은 상기 박편 중 각 섬유 단위의 위치를 결정하는 방법으로서

(a) 섬유 단위를 묶어 고정화한 섬유 배열체를 상기 섬유 단위의 섬유축과 교차하는 단면으로 차례로 절단하여 연속하는 섬유 배열체 박편 S(1), S(2), …, S (h), ··S(m)를 얻는 공정,

(b) m 개의 박편 중에서 임의의 박편 S(h)를 선택하여 상기 박편 S(h) 중에 포함되는 각 섬유 단위의 2차원 좌표를 상기 박편 S(h) 중의 좌표 기준에 기초하여 결정하는 공정,

(c) 상기 S(h) 박편에 가까운 위치에 있는 S(i) 박편 중에 포함되는 각 섬유 단위 2차원 좌표를 공정 (b)에서 얻어진 박편 S(h)의 좌표 데이터 및 상기 박편 S(i) 중의 좌표 기준에 기초하여 결정하는 공정, 및

(d) 공정(b) 및 (c)를 반복하여 상기 섬유 배열체 박편 중의 각 섬유 단위의 2차원 좌표를 결정하는 공정을 포함하는 상기 방법이다.

(6) 또한, 본 발명은 상기 박편 중 각 섬유 단위의 좌표 데이터를 기록한 컴퓨터 판독 가능한 기록 매체이다.

(7) 또한, 본 발명은 상기 박편 및 기록 매체를 포함하는 검체 검출용 박편 셋트이다.

(8) 또한, 본 발명은 중공 섬유를 복수개 묶어 배열체로 하고, 계속해서 상기 배열체를 구성하는 각 중공 섬유의 내벽부 및 (또는) 중공부에 생체 관련 물질을 도입, 고정화시킨 후, 상기 배열체를 섬유축과 교차하는 방향으로 슬라이스하는 것을 특징으로 하는 상기 박편의 제조 방법이다. 이러한 방법에서 배열체를 구성하는 각 중공 섬유의 내벽부 및(또는) 중공부에의 생체 관련 물질의 고정화는 예를 들면 상기 배열체를 구성하는 각 중공 섬유의 연장 부분의 선단을 생체 관련 물질을 포함하는 액체에 침지하여 상기 액체를 상기 배열체를 구성하는 각 중공 섬유의 중공부에 도입함으로써 행할 수 있다.

(9) 또한, 본 발명은 다공질 중공 섬유를 복수개 묶어 배열체로 하여, 계속해서 상기 배열체를 구성하는 각 다공질 중공 섬유의 내벽부, 중공부 및(또는) 다공질부에 생체 관련 물질을 도입, 고정화시킨 후, 상기 배열체를 섬유축과 교차하는 방향으로 슬라이스하는 것을 특징으로 하는 상기 박편의 제조 방법이다. 이러한 방법에서 배열체를 구성하는 각 다공질 중공 섬유의 내벽부, 중공부 및(또는) 다공질 벽부에의 생체 관련 물질의 고정화는 예를 들면 상기 배열체를 구성하는 각 다공질 중공 섬유의 연장 부분의 선단을 생체 관련 물질을 포함하는 액체에 침지하여 상기 액체를 상기 배열체를 구성하는 각 다공질 중공 섬유의 중공부 및(또는) 다공질부에 도입함으로써 행할 수 있다.

(10) 또한, 본 발명은 목적의 배열 패턴에 따라 배열시킨 섬유 다발에 장력을 제공하여 상기 섬유 다발의 섬유 사이에 수지를 충전하여 상기 섬유 다발을 고정하고 섬유 배열체로 하는 것을 특징으로 하는 섬유 배열체의 제조 방법이다. 이 제조 방법에 있어서 섬유 다발의 배열은

(a) 섬유를 목적한 배열 패턴과 동일 패턴의 구멍을 갖는 여러개의 지그 구멍에 통과시켜,

(b) 상기 지그들의 간격을 넓힘으로써 형성할 수 있다. 또한, 지그로서는 종선 및 횡선을 교차시켜 얻어지는 그물 구조를 구성하는 지지선군, 또는 다공판을 들 수 있다.

(11) 또한, 본 발명은 겔형성성 단량체 (a) 용액을 중공 섬유 내벽부에 부착시킨 후, 상기 단량체를 중합시켜 상기 내벽부에 겔을 형성시키는 것을 특징으로 하는 중공 섬유의 내벽부의 처리 방법이다. 내벽부는 다공질인 것이 바람직하다. 또한, 단량체 (a)로서는 양친매성 단량체를 들 수 있다.

(12) 또한, 본 발명은 상기 내벽부의 처리 방법으로 처리된 중공 섬유의 중공부에 겔형성성 단량체 (b) 용액을 충전하여 상기 단량체를 중합시켜 중공부에 겔을 형성시키는 것을 특징으로 하는 중공 섬유의 중공부에 겔을 충전하는 방법, 및 이와 같이 하여 겔이 충전된 섬유의 제조 방법이다. 단량체 (b)로서는 아크릴아미드를 주성분으로 하는 것을 들 수 있다.

(l3) 또한, 본 발명은 수식된 핵산이 글리시딜기를 통해 결합 및 고정화된 핵산 고정화 고분자 겔이다. 수식된 핵산으로서는 말단을 아미노화한 것을 들 수 있다. 또한, 고분자 겔로서는 글리시딜(메트)아크릴레이트, 중합성 단량체(예를 들면 아크릴아미드) 및 가교제와의 공중합체 겔을 들 수 있다.

(14) 또한, 본 발명은 글리시딜(메트)아크릴레이트와 수식된 핵산을 반응시킨 후, 얻어지는 반응산물에 중합성 단량체 및 가교제를 첨가하여 중합시키는 것을 특징으로 하는 상기 핵산 고정화 고분자 겔의 제조 방법 또는, 글리시딜(메트)아크릴레이트, 중합성 단량체 및 가교제와의 공중합체 겔에 수식된 핵산을 작용시키는 것을 특징으로 하는 상기 핵산 고정화 고분자 겔의 제조 방법이다. 수식된 핵산으로서는 말단을 아미노화한 것을 들 수 있고 중합성 단량체로서는 아크릴아미드를 들수 있다.

(15) 또한, 본 발명은 핵산 성분, 다가아민 성분 및 적어도 2종류 이상의 중합성 단량체 성분을 포함하는 핵산 고정화 고분자 겔이다. 여기서 중합성 단량체 성분의 적어도 1종류가 글리시딜기를 갖는 중합성 단량체, 예를 들면 글리시딜(메트)아크릴레이트인 것이 바람직하다. 또한, 핵산 성분으로서는 말단을 아미노화한 것을 들 수 있다.

(16) 또한, 본 발명은 핵산 성분, 다가아민 성분 및 적어도 2종류 이상의 중합성 단량체 성분을 포함하는 용액을 중합하는 것을 특징으로 하는 상기 핵산 고정화 고분자 겔의 제조 방법 또는, 핵산 성분 및 적어도 2종류 이상의 중합성 단량체 성분을 포함하는 용액을 중합한 후, 얻어지는 중합체를 다가 아민 성분에 의해 가교하는 것을 특징으로 하는 상기 핵산 고정화 고분자 겔의 제조 방법이다.

(17) 또한, 본 발명은 생체 관련 물질(예를 들면, 핵산)이 프로브로서 담체에 결합된 상기 섬유 배열체의 박편을 사용하는 검체의 검출 방법에 있어서 자유 확산이외의 방법에 의해 시료를 상기 박편 중에 이동시켜서 하이브리드 형성시켜 생체 관련 물질 프로브와 결합하지 않은 시료를 칩 중에서 제거하는 것을 특징으로 하는 검출 방법이다. 자유 확산 이외의 방법으로서는 섬유 배열체 박편 양면에 전압을 거는 것에 의해 시료를 칩 중에 이동시키는 방법, 섬유 배열체 박편의 한 면에 흡수성 물질을 배치함으로써, 반대측에 배치한 시료를 상기 박편 중에 이동시키는 방법 등이 채용된다. 상기 검출 방법에 있어서 시료는 형광 라벨되어 있는 것이 바람직하다. 또한, 담체로서는 수용성 고분자 겔 (예를 들면, 폴리아크릴아미드를 주성분으로 하는 겔)을 들 수 있고 상기 담체는 중공 섬유의 중공부에 유지된다.

본 명세서는 본원의 우선권의 기초인 일본 특허출원 평11-59361호, 평11-84100호, 평11-84101호, 평11-83964호, 평11-93043호, 평11-93044호, 평11-215014호, 평11-240041호, 평11-298613호, 평11-324194호, 평11-346288호, 평11-346309호, 평11-346521호, 2000-55658호 및 2000-57075호의 명세서 및(또는) 도면에 기재된 내용을 포함한다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은, 신규 마이크로 어레이에 관한 것이다. 이 발명은 생체 관련 물질을 고정화한 섬유, 또는 생체 관련 물질을 고정화한 겔을 섬유의 표면, 중공부 또는 공극부에 유지하는 섬유, 및 그 배열체를 제작하여 이것을 배열체의 섬유축과 교차하는 방향으로 절단함으로써 박편을 얻는 것이다. 이 박편은, 고정화된 핵산의 이차원 고밀도 배열체, 즉 마이크로 어레이이다.

1. 생체 관련 물질

본 발명에서 솔리드 섬유, 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유에 직접 고정화하는 대상이 되는 생체 관련 물질, 또는 겔에 고정화하는 대상이 되는 생체 관련 물질로서는 데옥시리보핵산 (DNA)이나 리보핵산 (RNA), 펩티드핵산 (PNA)) 등의 핵산, 또는 아미노산, 단백질, 당질 (다당류 등), 지질 등을 들 수 있다.

(1) 핵산

생체 관련 물질로서 핵산을 이용하는 경우에는 쇄 길이는 어느 것이라도 좋다. 또한, 상기 핵산은 시판된 것일 수도 있고 생세포등에서 얻어지는 것일 수도 있다. 생세포로부터의 DNA 또는 RNA의 제조는 공지된 방법 예를 들면, DNA의 추출에 대해서는, 블린(Blin) 등의 방법 (Blin et al., Nuc1eic Acids Res. 3: 2303(1976)) 등에 의해, 또한, RNA의 추출에 대해서는 파발로로(Favaloro) 등의 방법 (Favaloro et al., Methods Enzymo1. 65:718(1980)) 등에 의해 행할 수 있다. 고정화하는 핵산으로서는 또한 쇄상 또는 환상의 플라스미드 DNA나 염색체 DNA, 이것을 제한 효소에 의해 또는 화학적으로 절단한 DNA 단편, 시험관내에서 효소 등에 의해 합성된 DNA 또는, 화학 합성한 올리고뉴클레오티드 등을 이용할 수도 있다.

본 발명에서는 핵산을 그대로 중공 섬유에 고정화할 수도 있고 또한, 핵산에 화학적 수식을 실시한 유도체나 필요에 따라 변성시킨 핵산을 고정화할 수도 있다.

핵산의 화학적 수식에는 아미노화, 비오틴화, 데곡시게닌화 등이 알려져 있고 [Current Protocols In Molecular Biology, Ed.: Frederick M. Ausubel et a1. (1990), 탈이소토프실험프로토콜 (1) DIG 하이브리다이제이션 (슈준샤)], 본 발명에서는 이러한 수식법을 채용할 수가 있다. 일례로서 핵산에의 아미노기 도입에 관해서 설명한다.

아미노기를 갖는 지방족 탄화 수소쇄와 단일쇄 핵산과의 결합 위치는 특별히 한정되지 않고, 핵산의 5' 말단 또는 3' 말단뿐만 아니라 핵산의 쇄 중 (예를 들면, 인산디에스테르 결합 부위 또는 염기 부위)일 수도 있다. 이 단일쇄 핵산 유도체는 일본 특공평3-74239호 공보, 미국 특허 4,607,025호, 미국 특허 4, 789,737호 등에 기재된 방법에 따라서 제조할 수 있다. 이 방법 이외에도 예를 들면, 시판의 아미노기 도입용 시약[예를 들면, 아미노링크 II(상표명), PE바이오시스템즈쟈판사, Amino Modifiers (상표명); 클론텍사] 등을 사용하고, DNA의 5' 말단의 인산에 아미노기를 갖는 지방족 탄화 수소쇄를 도입하는 공지의 방법 (Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983))에 따라서 제조할 수 있다.

(2) 아미노산

본 발명에서 섬유에 고정화하는 대상이 되는 아미노산은 단백질, 폴리펩티드 또는펩티드를 구성하는 아미노산의 어느 하나를 의미한다. 아미노산의 길이는 특별히 한정되지 않고 임의로 선택할 수 있다. 예를 들면, 아미노산 수 2 내지 10개의 펩티드, 11개 이상의 폴리펩티드 또는 단백질 등을 들 수 있다.

이러한 물질은 통상 펩티드 합성 등에 의해 얻을 수 있다. 예를 들면, 아지드법, 산클로라이드법, 산무수물법, 혼합산 무수물법, DCC법, 활성에스테르법, 카르보이미다졸법, 산화환원법, 효소 합성법 등을 들 수 있다. 또한, 그 합성은 고상 합성법 및 액상 합성법의 어느 하나를 적용할 수 있다.

축합 방법이나 보호기의 이탈로서는 공지된 어느 하나의 수법을 이용할 수도 있다 (예를 들면, Bodanszky, M and M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966), Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965), 이즈미야 가즈오, 펩티드 합성의 기초와 실험, 마루젠 (1975) 등).

반응 후는 통상의 정제법, 예를 들면 용매 추출, 증류, 칼럼크로마토그래피, 액체크로마토그래피, 재결정 등을 조합시켜 목적한 펩티드를 정제할 수 있다. 또한, 생체내에서 추출·정제함으로써 얻을 수도 있다.

(3) 지질

본 발명에서 지질이란 분자 중에 장쇄 지방산 또는 유사의 탄화수소쇄를 지니고 생물체 내에 존재하거나 생물에 유래하는 물질을 의미하고 중성 지질, 리포단백질, 인지질, 당지질 등을 말한다. 중성 지질로서는, 지방산, 왁스, 아실글리세롤, 스테롤, 도리콜, 담즙산 등을 들 수 있다. 리포단백질로서는 킬로미크론, VLDL, IDL, LDL, HDL 등을 들 수 있다. 인지질로서는 디아실형 글리세롤인지질 (포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린 등), 에테르형글리세롤 인지질, 스핑고미에린, 포스포노리피드 등을 들 수 있다. 당지질로서는, 중성 당지질 (세라미드모노헥소시드, 세라미드디헥소시드 등), 산성 당지질 (강글리옥시드, 술파티드 등)을 들 수 있다.

이러한 지질은 고속액체크로마토그래피, 가스크로마토그래피, 박층크로마토그래피 등을 단독 또는 적절하게 조합함으로써 조직 또는 세포로부터 추출할 수 있다. 또한, 시판품을 사용할 수도 있고 효소 반응에 의한 합성을 할 수도 있다.

(4) 당

당으로서는 단체인 단당류, 단당이 여러개 (2 내지 10 개) 축합된 올리고당, 또한 다수의 단당으로 이루어지는 다당류를 들 수 있고 당 단백질도 포함된다.

상기 당으로서는 예를 들면, 프로테오글리칸, 글리고사미노글리칸 등 또는, γ-글루타밀트랜스펩타제, 뮤틴, 글리코호린 등의 당 단백질을 들 수 있다.

당의 제조는 렉틴 칼럼을 이용한 친화성-크로마토그래피, CsCl 침강평형원심법, 존 속도침강 원심법, 액체크로마토그래피, 소수성칼럼크로마토그래피, 면역침강법 등을 단독 또는 적절하게 조합시킴으로써 행할 수 있다. 또한, 시판품을 사용할 수도 있다.

(5) 중합체

본 발명에서 사용할 수 있는 생체 관련 물질은 상기 (1) 내지 (4)의 물질을 1종류 또는 2종류 이상을 조합시켜 중합한 것도 포함된다. 예를 들면, 한 종류의 아미노산으로 이루어진 호모폴리펩티드, 일정 배열의 반복 구조를 갖는 공중합체 (아미노산공중합체) 등을 들 수 있다. 이러한 중합체를 얻기 위해서는 동일 종류의 핵산 또는 펩티드들을 중합하는 방법, 종류가 다른 핵산 또는 펩티드를 중합하는 방법 등이 채용된다.

(6) 상호 작용하는 물질

본 발명에서는 상기 (1) 내지 (5)의 물질과 상호 작용하는 물질도 사용하는 것이 가능하다. 상호 작용이란 어떤 물질이 특정한 다른 물질과 결합 또는 회합함으로써 복합체를 형성하는 작용을 의미한다. 예를 들면, 항원과 항체와의 반응, 핵산과 안티센스핵산과의 반응, 비오틴과 스트렙트아비진과의 반응 등을 들 수 있다. 그리고, 상기 상호 작용하는 물질 중 어느 하나를 섬유에 고정화한다.

2. 섬유

(1) 섬유의 종류

본 발명에서 생체 관련 물질의 고정화에 이용할 수 있는 섬유로서는 솔리드섬유, 중공 섬유, 다공질 섬유, 다공질 중공 섬유 등을 들 수 있다. 이러한 섬유는 합성 섬유, 반합성 섬유, 재생 섬유 및 천연 섬유의 어느 하나를 사용할 수 있다.

합성 섬유의 대표예로서는 나일론6, 나일론66, 방향족 폴리아미드 등 폴리아미드계의 각종 섬유, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리부틸렌테레프탈레이트, 폴리젖산, 폴리글리콜산 등의 폴리에스테르계의 각종 섬유, 폴리아크릴로니트릴 등의 아크릴계의 각종 섬유, 폴리에틸렌이나 폴리프로필렌 등의 폴리올레핀계의 각종 섬유, 폴리비닐알콜계의 각종 섬유, 폴리염화비닐리덴계의 각종 섬유, 폴리염화비닐계 섬유, 폴리우레탄계의 각종 섬유, 페놀계 섬유, 폴리불화비닐리덴이나 폴리테트라플루오로에틸렌 등으로 이루어진 불소계 섬유, 폴리알킬렌파라옥시벤조에이트계의 각종 섬유 등을 들 수 있다.

반합성 섬유의 대표예로서는 디아세테이트, 트리아세테이트, 키틴, 키토산 등을 원료로 한 셀룰로오스계 유도체계 각종 섬유, 프로믹스로 호칭되는 단백질계의 각종 섬유 등을 들 수 있다.

재생 섬유의 대표예로서는 비스코스법이나 구리-암모니아법, 또는 유기 용매법에 의해 얻어지는 셀룰로오스계의 각종 재생 섬유(레이온, 큐프라, 폴리노직 등) 등을 들 수 있다.

천연 섬유의 대표예로서는 면, 아마, 모시, 황삼 등의 식물 섬유, 양모, 비단 등의 동물 섬유, 석면 등의 광물 섬유 등을 들 수 있다. 이러한 식물 섬유는 중공형의 섬유 형태를 표시하기 때문에 본 발명에 이용할 수 있다.

무기 섬유의 대표예로서는 유리 섬유, 탄소 섬유 등을 들 수 있다.

또한, 천연섬유 이외의 중공 섬유는 특수한 노즐을 사용하여 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리올레핀 등은 용융 방사법이 바람직하고 노즐로서는 말굽형이나 C형 노즐, 2중관 노즐 등을 사용할 수 있다.

본 발명에서는 연속된 균일한 중공부를 형성시킬 수 있다는 점에서 2중관 노즐을 이용하는 것이 바람직하다.

용융 방사를 할 수 없는 합성 고분자, 반합성 섬유 또는 재생 섬유에 사용되는 고분자 방사는 용제 방사가 바람직하게 이용된다. 이 경우도, 용융 방사와 같이 2중관 노즐을 이용하여 중공부에 코어재로서 적절한 액체를 충전하면서 방사함으로써 연속한 중공부를 갖는 중공 섬유를 얻을 수 있다.

(2) 섬유의 형태

본 발명에서 사용 대상이 되는 섬유는 특히 그 형태가 규정되는 것은 없고, 솔리드 섬유, 중공 섬유, 다공질 섬유 및 다공질 중공 섬유의 어느 하나를 의미하는 것이다. 솔리드는 섬유 내부가 공동이 아니고 섬유 구성 성분이 가득찬 상태를 의미하며 중공이란 섬유 내부가 공동으로 관형 또는 스트로형인 상태를 의미하고 다공질은 섬유에 무수히 존재하는 공극 (간극)을 의미한다. 단면 형상은 원형 단면뿐만 아니라, 편평 단면이나 중공 단면 등의 이형 단면일 수도 있다. 형태는 특별히 겔을 보다 강고하게 고정화하는 관점에서 중공 또한 다공질인 것이 바람직하다.

또한, 본 발명에 사용하는 섬유는 모노필라멘트일 수도 있고 멀티필라멘트일 수도 있다. 또한, 단섬유를 방적한 방적사일 수도 있다. 또한, 멀티필라멘트나 방적사의 섬유를 이용하는 경우에는 생체 관련 물질의 고정에, 단섬유 사이의 공극 등을 이용하는 것도 가능하다.

본 발명에 이용하는 섬유는 무처리 상태로 이용할 수도 있지만 필요에 따라 반응성 관능기를 도입한 것일 수도 있고 또한, 플라즈마 처리나 γ선, 전자선 등의 방사선 처리를 실시한 것일 수도 있다.

또한, 의료용 이외의 섬유 예를 들면, 폴리메틸메타크릴레이트나 폴리스티렌등의 투명 비정질 고분자를 주재료로 한 광학 섬유 등도 이용할 수 있다.

본 발명에 있어서 다공질 섬유를 이용하는 경우, 다공질 섬유는 용융 방사법 또는 용액 방사법에 연신법, 미크로상분리법, 추출법등의 공지된 다공화 기술을 조합시킴으로써 얻을 수 있다.

본 발명에 이용하는 다공질 섬유의 다공도는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 섬유의 단위 길이 부근에 고정화되는 생체 관련 물질의 밀도를 높인다는 관점에서 비표면적이 커질수록 높은 다공도인 것이 바람직하다. 다공질 섬유 재료의 다공도는 특별히 한정되는 것은 아니지만 섬유 재료 단위 길이 부근에 고정화되는 생체 관련 물질의 밀도를 높인다는 관점에서는 비표면적이 커질수록 또한 섬유의 강도를 희생하지 않는 정도로 높은 다공도인 것이 바람직하다. 예를 들면, 공극율 20 내지 80 %인 것이 바람직하고 30 내지 60 %인 것이 보다 바람직하다.

본 발명에 이용하는 다공질 섬유의 구멍의 크기는 생체 관련 물질의 고정화 및 그 후의 하이브리다이제이션이 가능하면 특별히 한정되는 것은 아니지만 섬유의 단위 길이 부근에 고정화되는 생체 관련 물질의 밀도를 높인다는 관점에서 보다 작은 쪽이 바람직하다.

시판되고 있는 정밀 여과, 초여과를 목적으로 한 다공질 중공사막, 다공질인 중공사막의 외부 표면에 무공성의 균질막을 피복한 역침투막, 가스분리막, 다공질층 중간에 무공성 균질층을 끼운 막 등을 다공질 섬유 재료로 이용할 수 있다.

본 발명에 이용되는 다공질 중공 섬유의 구조는 생체 관련 물질이 고정화된 겔 충전이 가능하면 특별히 제한은 되지 않지만 다공질 중공 섬유의 외부 표면으로부터 내부 표면까지 구멍이 연통된 삼차원 그물 구조, 피브릴형인 것에 의해 구성된 연통된 구멍을 갖는 구조, 손가락형 구조, 독립 기포 구조, 일부가 연통한 기포 구조인 것을 이용할 수 있고 특히 삼차원 그물 구조, 피브릴형인 것에 의해 구성되는 구조가 바람직하다. 또한, 구멍의 크기는 대개 0.01 ㎛ 내지 수십 ㎛ 정도까지 이용할 수 있고 다공질층의 한 표면에서 다른 표면에 걸쳐 균일한 구멍 직경일 수도 있고, 다공질층의 두께 방향으로 구멍 직경의 변화가 있는 대칭/비대칭인 경사 구조를 갖는 다공질체일 수도 있다. 또한, 그 공극률 및 비표면적은 생체 관련 물질을 고정화한 겔을 보다 강고하게 유지한다는 관점에서 다공질 중공 섬유로서의 취급성을 손상하지 않는 정도이면 높을수록 바람직하다.

따라서, 시판되는 정밀여과, 초여과를 목적으로 한 다공질 중공사막, 다공질인 중공사막의 외부 표면에 무공성인 균질막을 피복한 역침투막, 가스분리막, 다공질층 중간에 무공성 균질층을 끼운 막등을 이용할 수 있다.

3. 섬유에의 생체 관련 물질의 고정화

본 발명은 (1) 생체 관련 물질이 고정화된 섬유 (이하, 「생체 관련 물질 고정화 섬유」라 함), (2) 생체 관련 물질을 겔에 고정화하여, 그 고정화 겔을 유지하는 섬유 (이하,「생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유」라 함)를 제공한다. 대상이 되는 섬유는 (1)에서는 중공 섬유, 다공질 중공 섬유 및 다공질 섬유이고, (2)에서는 중공 섬유, 솔리드 섬유 및 다공질 중공 섬유이다.

이하, 각각의 섬유에 관해서 생체 관련 물질의 고정화 방법에 관해서 설명한다.

섬유에 생체 관련 물질을 고정화하는 경우에는 섬유와 생체 관련 물질과의 사이에서의 각종 화학적 또는 물리적인 상호 작용, 즉 섬유가 갖는 관능기와 생체 관련 물질을 구성하는 성분 사이의 화학적 또는 물리적인 상호 작용을 이용할 수 있다. 또한, 다공질 섬유, 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유에 대해서는 배열체를 구성하는 섬유의 중공부 또는 다공질부에 생체 관련 물질을 포함하는 액체를 도입한 후, 섬유의 중공부 또는 다공질부 내벽면 등에 존재하는 관능기와 생체 관련 물질을 구성하는 성분 사이의 상호 작용을 이용하여 이러한 섬유에 생체 관련 물질을 도입할 수 있다.

무수식의 생체 관련 물질을 섬유에 고정화하는 경우에는 생체 관련 물질과 섬유를 작용시킨 후, 베이킹이나 자외선 조사에 의해 고정할 수 있다.

아미노기로 수식된 생체 관련 물질을 섬유에 고정화하는 경우에는 글루타르알데히드나 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(EDC) 등의 가교제를 이용하여 섬유의 관능기와 결합시킬 수 있다. 또한, 예를 들면 열 처리, 알칼리 처리, 계면활성제 처리등을 행함으로써 고정화된 생체 관련 물질을 변성시킬 수 있다. 또는, 세포, 균체 등의 생재료로부터 얻어진 생체 관련 물질을 사용하는 경우는 불필요한 세포 성분 등을 제거하는 처리를 행할 수도 있다. 또, 이러한 처리는 각각 실시할 수도 있고 동시에 실시할 수도 있다. 또한, 생체 관련 물질을 포함하는 시료를 섬유에 고정화하기 전에 적절하게 실시할 수도 있다.

중공 섬유 및 다공질 중공 섬유인 경우, 중공 부분에 생체 관련 물질을 고정화할 수 있는 것이 특징이다. 단, 본 발명에서는 내벽부에 고정화할 수 있는 외에 그 섬유의 외벽부에도 생체 관련 물질을 고정할 수 있다. 따라서, 섬유 단면에서 보면 외벽부 및 내벽부의 양쪽에 고정화가 가능하고, 단위 단면적 당 생체 관련 물질 고정량이 통상의 섬유에 비해 커질 수 있다는 것이 특징이다. 또한, 내벽부에만 생체 관련 물질을 고정한 경우는 배열체를 제작(후술) 할 때에 사용하는 접착제가 부착되지 않기 때문에 고정화된 생체 관련 물질을 유효하게(접착제의 영향을 받지 않고 정확하게) 프로브로서 사용할 수 있다.

다공질 섬유에 생체 관련 물질을 고정화하는 방법으로서 생체 관련 물질을 포함하는 시료를 다공질 섬유에 작용시킬 수 있다. 다공질 섬유인 경우, 비표면적이 큰 다공질부에 생체 관련 물질을 고정화할 수 있는 것이 특징이다. 따라서, 단위 단면적당 생체 관련 물질 고정량이 통상의 섬유에 비해 커질 수 있는 것이 특징이다.

생체 관련 물질의 고정화는 물, 완충액, 생리식염수 등에 용해 또는 현탁하여 행할 수 있다. 생체 관련 물질의 용매는 해당 생체 관련 물질의 물리적 또는 화학적 성질에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 용액 또는 현탁액 중에는 필요에 따라 안정화제 등이 포함될 수도 있다.

생체 관련 물질을 포함하는 시료를 섬유에 작용시킬 때의 온도는 5 ℃ 내지 95 ℃가 바람직하고 15 ℃ 내지 60 ℃가 더욱 바람직하다. 처리 시간은 통상 5분내지 24 시간이고 1 시간 이상이 바람직하다.

생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유(솔리드 섬유, 중공 섬유. 다공질 섬유, 다공질 중공 섬유)를 제작하는 방법은 특별히 제한되지 않지만 ,섬유와 겔의 사이에서 각종 화학적 또는 물리적인 상호 작용, 즉 섬유가 갖고 있는 관능기와 겔을 구성하는 성분 사이의 화학적 또는 물리적인 상호 작용을 이용할 수 있다. 예를 들면, (1) 단량체, 개시제, 및 말단에 비닐기를 갖는 생체 관련 물질을 공중합한 것과 가교제를 혼합한 액체에 섬유를 침지하여 겔화하는 방법, (2) 단량체를 개시제로 중합한 것과, 가교제와, 생체 관련 물질을 혼합한 액체에 섬유를 침지하여 겔화하는 방법, (3) 단량체를 개시제로 중합한 것과, 가교제와, 담체 (고분자 입자, 무기 입자 등)에 생체 관련 물질을 결합한 결합물을 혼합한 액체에 섬유를 침지하여 겔화하는 방법, (4) 생체 관련 물질을 고정화한 아가로스 등을 가열 용해하여 섬유를 침지하여, 냉각 겔화시키는 방법 등을 들 수 있다.

또한, 상술한 방법에서 생체 관련 물질을 포함하는 액체에 섬유를 침지하는 대신, 중공 섬유, 다공질 중공 섬유 등의 경우, 상기 액체를 이들 섬유의 중공부, 다공질부 등에 주입 또는 흡인함으로써 충전한 후 겔화시킬 수도 있다.

본 발명에서는 생체 관련 물질 고정화겔 유지 중공 섬유를 작성할 수 있는 것이 특징이지만 중공부에 유지한 것과 동일하게 그 섬유의 외벽부에도 유지할 수 있다. 따라서, 상기와 마찬가지로 섬유 단면에서 보면 외벽부 및 중공부의 양쪽에 고정화가 가능하고 단위 단면적당 생체 관련 물질 고정량이 통상의 섬유에 비교하여 커질 수있는 것이 특징이다. 또한, 중공부에만 생체 관련 물질 고정화 겔을 유지한 경우는 배열체를 제작 (후술)할 때에 사용하는 접착제가 부착되지 않기 때문에 유효하게 (접착제의 영향을 받지 않고 정확하게) 고정화 생체 관련 물질 프로브로서 사용할 수 있다.

또한, 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 다공질 중공 섬유는 그 중공부 뿐만 아니라 다공질부까지 겔이 충전됨으로써, 생체 관련 물질이 고정화된 겔과 다공질 중공 섬유와의 접촉 면적이 크고 복잡하게 뒤얽힌 형상이 되므로 생체 관련 물질이 고정화된 겔이 강고하게 다공질부에 유지되게 된다.

상술된 방법에 의해 얻어진 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유는 겔이 파괴되지 않는 한 적당한 처리를 할 수 있다. 예를 들면, 열처리, 알칼리처리, 계면활성제 처리 등을 행함으로써 고정화된 생체 관련 물질을 변성시킨다. 또한, 세포, 균체 등의 생재료로부터 얻어진 생체 관련 물질을 사용하는 경우, 불필요한 세포 성분 등을 제거한다. 그리고, 처리 후의 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유를 생체 관련 물질을 검출하는 재료로 이용할 수 있다. 또한, 이러한 처리는 별도로 실시할 수도 있고 동시에 실시할 수도 있다. 또한, 생체 관련 물질을 포함하는 시료를 중공 섬유 내부에 유지하기 전에 적절하게 실시할 수도 있다.

상기와 같이 제조된 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유는 본 발명의 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유 배열체를 구성하는 기본 단위로 할 수 있다.

본 발명에 사용할 수 있는 겔의 종류는 특별히 제한되지 않지만 예를 들면, 아크릴아미드, N,N-디메틸아크릴아미드, N-이소프로필아크릴아미드, N-아크릴로일아미노에톡시에탄올, N-아크릴로일아미노프로판올, N-메틸올아크릴아미드, N-비닐피롤리돈, 히드록시에틸메타크릴레이트, (메트)아크릴산, 알릴덱스트린 등의 단량체의 한 종류 또는 두 종류 이상과 메틸렌비스(메트)아크릴아미드, 폴리에틸렌글리콜디(메트)아크릴레이트 등과의 다관능성 단량체를 예를 들면, 수성 매체중에서 공중합한 겔을 이용할 수 있다. 기타 본 발명에 사용할 수 있는 겔로서, 예를 들면 아가로스, 알긴산, 덱스트란, 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜 등의 겔 또는 이들을 가교한 겔을 사용할 수 있다.

본 발명에서는 중합성 단량체나 다가 아민을 겔 원료로 사용할 수 있고 그 종류는 특별히 제한되지 않으며 예를 들면, 글리시딜기를 갖는 단량체를 사용할 수 있다.

글리시딜기를 갖는 중합성 단량체로서는 예를 들면, 글리시딜(메트)아크릴레이트 등을 들 수 있다. 다른 중합성 단량체로서는 예를 들면 아크릴아미드, N,N-디메틸아크릴아미드, N-이소프로필아크릴아미드, N-아크릴로일아미노에톡시에탄올, N-아크릴로일아미노프로판올, N-메틸올아크릴아미드, N-비닐피롤리돈, 히드록시에틸메타크릴레이트, (메트)아크릴산, 알릴덱스트린 등을 들 수 있다. 다가 아민으로서는 예를 들면, 에틸렌디아민, 디아미노프로판, 디아미노부탄, 디아미노펜탄, 헥사메틸렌디아민, 디에틸렌트리아민, 트리에틸렌테트라민, 테트라에틸렌펜타민, 펜타에틸렌헥사민, 디에틸아미노프로필아민 등을 들 수 있다.

생체 관련 물질로서 예를 들면 핵산을 글리시딜기를 통해 겔에 고정화하는 경우 (예를 들면 핵산의 말단기로의 비닐기의 도입을 글리시딜기를 통해 행하는 경우), 미리 핵산을 수식해 둘 필요가 있다. 수식에 대해서는 글리시딜기와 반응하는 것이면 특별히 제한되지 않는다.

핵산의 일반적인 화학적 수식으로서는, 아미노화, 비오틴화, 디곡시게닌화 등이 알려져 있지만 [Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al. (1990), 탈이소토프실험프로토콜(1) DIG 하이브리다이제이션 (슈준샤)], 본 발명에서는 이들 중 어떠한 수식법도 채용할 수 있다. 일례로서 핵산에의 아미노기 도입에 관해서 설명한다.

아미노기를 갖는 지방족 탄화 수소쇄와 단일쇄 핵산과의 결합 위치는 특별히 한정되지 않고 핵산의 5' 말단 또는 3' 말단만이 아니라 핵산 쇄 중 (예를 들면, 인산디에스테르 결합 부위 또는 염기 부위) 일 수도 있지만 핵산의 5' 말단 또는 3' 말단에서 결합하는 것이 바람직하다. 이 단일쇄 핵산 유도체는 특공평3-74239호 공보, 미국 특허 4,667,025호, 미국 특허 4,789,737호 등에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다. 이 방법 이외에도 예를 들면, 시판된 아미노기 도입용 시약 [예를 들면, 아미노링크 Ⅱ(상표명); PE 바이오시스템즈쟈판사, Amino Modifiers (상표명): 클론텍사] 등을 사용하거나 또는 DNA의 5' 말단의 인산에 아미노기를 갖는 지방족 탄화 수소쇄를 도입하는 주지의 방법 (Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983))에 따라 제조할 수 있다.

본 발명에서는 생체 관련 물질을 그대로 겔에 고정화할 수도 있고 또한, 생체 관련 물질에 화학적 수식을 실시한 유도체나 필요에 따라 변성시킨 생체 관련 물질을 고정화할 수도 있다. 생체 관련 물질의 겔 고정화에는 겔에 물리적으로 포괄하는 방법이나, 겔 구성 성분으로의 직접적인 결합을 이용할 수도 있고 생체 관련 물질을 일단 고분자체나 무기 입자 등의 담체에 공유 결합 또는 비공유 결합에 의해 결합시켜, 그 담체를 겔에 고정화할 수도 있다.

예를 들면, 핵산의 말단기에 비닐기를 도입하여 (WO 98/39351), 아크릴아미드 등의 겔 구성 성분과 공중합시킬 수 있다. 공중합에서는 단량체, 다관능성 단량체 및 중합 개시제와 함께 공중합하는 방법, 단량체 및 중합 개시제와 함께 공중합한 후, 가교제로 겔화하는 방법 등이 있다.

또한, 아가로스를 브롬화시안법으로 이미드카르보네이트화해 두고 말단아미노화한 핵산의 아미노기와 결합시키고 나서 겔화할 수도 있다. 이 때, 핵산 고정화한 아가로스와 다른 겔 (예를 들면 아크릴아미드겔 등)과의 혼합 겔로 할 수도 있다.

섬유에 겔을 유지시키기 위해서는 겔 구성 성분인 아크릴아미드 등의 단량체, 다관능성 단량체, 개시제 및 생체 관련 물질 성분을 포함하는 액체에 섬유를 침지하여 중합, 겔화시킬 수 있다. 이 때, 생체 관련 물질은 상기와 같이 겔 구성 성분인 아크릴아미드 등의 단량체나 고분자 입자, 무기 입자등의 담체에 결합시켜 두는 것이 바람직하다.

겔화는 다관능성 단량체의 존재하에 공중합시키는 방법 외에 다관능성 단량체의 비존재하에 공중합시킨 후 가교제를 이용하여 행할 수도 있다.

기타, 생체 관련 물질을 고정화한 아가로스 등을 가열 용해하여, 섬유를 침지하고 냉각 겔화시키는 방법 등을 들 수 있다.

또한, 중공 섬유 및 다공질 중공 섬유인 경우, 상기의 각 성분을 포함하는 액체에 섬유를 침지하는 대신, 상기 액체를 이들 섬유의 중공부 및(또는) 다공질부에 주입 또는 흡인함으로써 충전한 후, 겔화시킬 수도 있다.

이 경우의 고정화는 생체 관련 물질 및 상기 단량체 및 중합 개시제를 포함하는 용액을 중공 섬유 등의 중공부에 도입 후, 중합 겔화시킴에 따라 행할 수 있다.

삼차원 배열체 내의 각각의 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유에 고정화되어 있는 생체 관련 물질의 종류는 각각 다른 종류의 생체 관련 물질로 하는 것이 가능하다. 즉, 본 발명에 따르면 고정화된 생체 관련 물질의 종류와 배열의 순서에 관해서는 목적에 따라서 임의로 설정하는 것이 가능하다.

본 발명에서는 상기 겔의 구성 성분에 색소를 혼합할 수도 있다.

본 발명에 사용이 가능한 색소는 주로 천연색소, 합성염료로 분류된다. 천연색소의 대표예 로서는 프라본유도체, 칼콘유도체, 안트라퀴논유도체, 인디고유도체 등을 들 수 있다. 합성 염료의 대표예로서는 아조염료, 안트라퀴논염료, 인디고이드염료, 디페닐메탄염료, 트리페닐염료, 크산텐염료, 아크리딘염료 등을 들 수 있다. 특히, 상기 염료색소에는 형광을 갖는 색소도 존재한다.

본 발명에 이용할 수 있는 형광 색소 종류는 형광을 발하는 색소라면 특별히 한정되지 않지만 예를 들면, 로다민, TexasRed, 형광물질, 형광물질이소티오시아네이트(FITC), 오레곤 그린(0regon Green), 퍼시픽 블루(Pacific Blue), R-피코에리트린, 로돌 그린(Rhodol Green), 쿠마린 유도체, 아미노 메틸 쿠마린 등을 들 수 있다.

본 발명에 이용되는 색소의 고정화 방법은 색소를 그대로 겔에 고정화할 수도 있고 또한, 색소에 화학적 수식을 실시한 유도체나, 필요에 따라서 변성시킨 색소를 고정화시킬 수도 있다. 색소의 겔로의 고정화에는 겔에 물리적으로 포괄하는 방법이나, 겔 구성 성분으로의 직접적인 결합을 이용할 수도 있고 색소를 일단 고분자 입자나 무기 입자 등의 담체에 공유 결합 또는 비공유 결합에 의해 결합시켜 그 담체를 겔에 고정화할 수도 있다. 예를 들면, 색소에 중합성기를 도입하여 아크릴아미드 등의 겔의 구성 성분과 공중합시킬 수 있다.

예를 들면, 색소를 겔 구성 성분에 직접적으로 결합시키기 위해서는, Polyscience 사 제품의 형광물질 디메타크릴레이트나 1-피레닐메틸 메타크릴레이트 등을 이용하여 아크릴아미드 등의 겔 구성 성분과 공중합시키는 방법, 아미노기를 갖는 색소 유도체를 글리시딜메타크릴레이트(GMA) 와 반응시킴에 따라 중합성 비닐기를 도입하고 아크릴아미드 등의 겔 구성 성분과 공중합시키는 방법, 또한, 겔에 음이온성 단량체를 도입하여 양이온성 색소를 이온 결합시키는 방법 등을 예로 들 수 있다.

본 발명에서는 특히, 특정한 파장의 형광 색소를 고정화함으로써, 형광 표지한 검체를 이용하여 하이브리다이제이션을 행하는 경우에 검출 파장에서의 겔의 고도한 투명성을 손상시키지 않고 겔의 시각인지성을 부여할 수 있다.

생체 관련 물질의 고분자 겔의 고정화는 고분자 겔과 생체 관련 물질을 혼합함으로써 행할 수 있다. 반응율 또는 반응 속도를 고려하여 염기 등의 촉매를 이용하는 것도 가능하다.

고정화 온도는 0 내지 100 ℃가 바람직하고 20 내지 80 ℃가 바람직하다.

수식된 생체 관련 물질의 고분자 겔의 고정화는 고분자 겔과 수식된 생체 관련 물질을 혼합함으로써 행할 수 있다. 반응율 또는 반응 속도를 고려하여 염기 등의 촉매를 이용하는 것도 가능하다.

고정화 온도는 0 ℃ 내지 100 ℃가 바람직하고 또한 20 ℃ 내지 80 ℃가 바람직하다.

그 밖의 방법으로서는 고분자 입자나 무기 입자 등의 담체에 핵산을 결합하여 상기 입자를 상기의 겔에 포괄 고정화하는 방법을 들 수 있다. 예를 들면, 비오틴화한 핵산과 아비딘화한 아가로스비즈(시그마사 제품 아비딘화 아가로스 등)을 반응시킴으로써 핵산이 고정화된 아가로스 비즈를 얻을 수 있다. 핵산 고정화 아가로스비즈는 아크릴아미드 겔 등에 포괄 고정화할 수 있다.

또한, 겔이나 담체에의 결합에서는 글루타르알데히드나 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(EDC) 등의 가교제를 이용하여 결합시킬 수도 있다.

생체 관련 물질 고정화 고분자 겔은 고정화된 생체 관련 물질을 프로브로서 검체와 반응시켜 하이브리다이제이션을 행함으로써 검체 중에서 생체 관련 물질과 상호 작용을 갖는 물질 검출에 사용할 수 있다. 예를 들면, 겔에 핵산을 고정화하면 해당 핵산과 상보적인 배열을 갖는 핵산을 검출할 수 있다.

이와 같이 하여 형성된 각종 형태의 섬유(실시예 참조)를 도 1의 A 내지 F에 나타낸다.

4. 섬유 배열체의 제조

고밀도로 생체 관련 물질이 고정화된 섬유 배열체의 박편을 얻도록 섬유를 배열시키기 위해서는 각각의 섬유 외부 직경은 가는 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에서는 생체 관련 물질의 고정화는 1 cm^2당 lOO 이상의 고 밀도이지만, 이것을 달성하기 위해서는 1개의 섬유의 외부 직경은 대개 1 mm 이하인 것이 필요하다. 예를 들면, 외부 직경이 500 ㎛ 정도의 다공질 중공사막을 이용하면 1 cm^2당 4OO 이상의 생체 관련 물질이 고정화된 다공질 중공 섬유 배열체의 박편을 얻을 수 있고 중공 섬유 방사 기술을 응용하여 외부 직경이 30 ㎛ 정도인 다공질 중공 섬유를 제조하여 이것을 이용하면 1 cm^2 당 1OOOOO 이상의 생체 관련 물질이 고정화된 다공질 중공 섬유 배열체의 박편을 얻는 것이 가능하다.

상기와 같이 제조된 생체 관련 물질 고정화 섬유 (솔리드 섬유, 중공 섬유, 다공질 섬유, 다공질 중공 섬유 및 이들의 겔 유지 섬유)는 본 발명의 섬유 배열체를 구성하는 기본 단위로 할 수 있다. 그리고, 이러한 생체 관련 물질 고정화 섬유를 집속한 후에 접착하여 섬유 배열체 (삼차원 배열체)로 하는 것이 가능하다.

또한, 생체 관련 물질 및 색소가 고정된 겔을 유지하는 섬유는 수속한 후에 밀착하여 생체 관련 물질 및 색소 고정화 겔 유지 섬유 배열체로 하는 것이 가능하다.

상기 삼차원 배열체를 섬유축과 교차하는 방향, 바람직하게는 섬유축에 대해 수직 방향으로 절단함으로써 생체 관련 물질 고정화 섬유 배열체 단면 (도 2)을 갖는 박편 (도 3)을 얻을 수 있다C

이 때, 생체 관련 물질 고정화 섬유를 규칙적으로 배열하여 수지 접착제 등으로 접착함으로써 예를 들면, 종횡으로 생체 관련 물질 고정화 섬유가 정연하게 규칙적으로 배열한 섬유 배열체를 얻을 수 있다. 섬유 배열체의 형상은 특별히 한정되는 것은 아니지만 통상은 섬유를 규칙적으로 배열시킴으로써 정사각형 또는 직사각형으로 형성된다.

「규칙적으로」는 일정한 크기의 프레임 중에 포함되는 섬유의 갯수가 일정하게 순서대로 배열되는 것을 말한다. 예를 들면, 직경 1 mm의 섬유를 다발로 하여 단면이 세로 1O mm, 가로 1O mm의 정사각형이 되게 배열시키는 경우는 그 정사각

형형의 테두리 안 (1 cm^2)에서 1 변에 포함되는 섬유수를 10개로 하여, 이 10개의 섬유를 한열로 묶어 1층의 시트로 한 후, 이 시트가 10층이 되도록 중첩한다. 그 결과 세로로 10개, 가로로 10개, 합계 100개의 섬유를 배열시킬 수 있다. 단, 섬유를 규칙적으로 배열시키는 수법은 상기와 같이 시트를 중층시키는 것에 한정되는 것은 아니다.

이 경우에 특정한 생체 관련 물질이 고정화된 섬유의 위치가 미리 결정된 상태로 배열하는 것이 바람직하지만, 반드시 그와 같이 배열시킬 필요는 없다. 그 이유는 배열체를 형성한 단계에서는 특정한 생체 관련 물질을 고정화한 섬유가 어떤 위치에 존재할지가 불분명해서 배열체의 단면을 절단한 후, 일단 하이브리다이제이션 수법 등을 이용하여 단면에서의 생체 관련 물질의 배치 위치를 결정함으로써 특정한 생체 관련 물질이 고정된 섬유의 위치를 확인할 수 있기 때문이다. 따라서, 이 수법을 이용하여 한번, 박편내에 배치된 복수 종류의 생체 관련 물질의 위치를 결정하면 동일 배열체로부터 얻어지는 박편은 전부 동일한 위치 배치이기 때문에 동일 배열체로부터 얻어지는 모든 박편의 생체 관련 물질의 위치 배치를 알 수 있다.

또한, 본 발명에 있어서 다발로 할 섬유의 갯수는 1OO 개 이상, 바람직하게는 1,000 내지 10,000,000개이며, 목적에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 단, 배열체에서의 섬유의 밀도가 1 cm^2 당 1OO 내지 1,OOO,OOO 개가 되도록 제조하는 것이 바람직하다. 그리고, 고밀도에 생체 관련 물질이 고정화된 섬유 배열체의 박편을 얻도록 섬유를 배열시키기 위해서는 섬유의 굵기는 가는 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에서는 섬유 하나의 굵기는 1 mm 이하인 것이 필요하다.

본 발명에서 직경 50 ㎛의 모노필라멘트를 이용한 경우, 1 cm 당 200 개의 섬유를 배열시킬 수 있기 때문에 1 cm^2의 정사각형 내에 배열시킬 수 있는 섬유 갯수는 40,000개이다. 따라서, 이 경우는 1 cm^2 당 최고 40,000 종류의 생체 관련 물질을 고정화할 수 있다.

예를 들면, 외부 직경이 500 ㎛ 정도인 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 모노필라멘트를 사용하면 고정화 배열체 단면 1 cm^2 당 4O0 이상의 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유가 배열된 삼차원 구조체를 얻을 수 있다. 또한, 중공 섬유 방사 기술을 응용하여 외부 직경이 30 ㎛ 정도인 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유를 제조하여 이것을 이용하면 고정화 배열체 단면 1 cm^2 당 1OO,OOO 개 이상의 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유가 배열된 삼차원 구조체를 얻는 것이 가능하다.

모노필라멘트는 예를 들면, 시판되는 낚시줄의 경우 50 내지 900 ㎛ 굵기의 실이다. 또한 최근의 방사 기술에 따르면 1 dtex (폴리에틸렌테레프탈레이트의 경우, 직경 약 14 ㎛이 됨)의 모노필라멘트도 제조가 가능하고 더욱 가는 섬유 (극세 섬유 또는 초극세 섬유)의 제조도 가능하다 (직경 1 내지 10 ㎛).

한편, 멀티필라멘트로서는 83 dtex/36 필라멘트나 82 dtex/45 필라멘트 등을 그대로 이용할 수도 있다.

각 섬유 배열체 내의 각각의 섬유 내부에 고정화되어 있는 생체 관련 물질의 종류는 각각 다른 종류의 생체 관련 물질로 하는 것이 가능하고 또한, 동일한 생체 관련 물질이 고정화된 섬유로부터 임의의 갯수의 섬유를 선택하여 그 선택된 섬유를 묶어 적절하게 배열시키는 것도 가능하다. 즉, 본 발명에 따르면 고정화된 생체 관련 물질의 종류와 배열의 순서에 관해서는 목적에 따라서 임의로 설정하는 것이 가능하다.

본 발명에서는 배열체를 구성하는 각 섬유에 대해서 수지로 고정하지 않는 연장 부분을 설치하고 이 선단 부분을 생체 관련 물질을 포함하는 액조에 침지함으로써 해당 액체를 배열체를 구성하는 각 섬유에 도입하는 것이 가능해진다 (「6. 섬유 내벽 처리」의 항 참조).

상기 배열체를 구성하는 각 중공 섬유 또는 각 다공질 중공 섬유에 대하여 수지로 고정하지 않은 연장 부분은 배열체의 한 단, 바람직하게는 양끝에 설치함으로써 생체 관련 물질을 포함하는 액체를 도입하는 이외에 필요에 따라 여러가지 처리를 행할 수 있다. 예를 들면, 열 처리, 알칼리 처리, 계면활성제 처리등을 행함으로써 배열체를 구성하는 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 내부 벽면 등에 고정화된 생체 관련 물질을 변성시키거나 세포, 균체 등의 생재료로부터 얻어진 생체 관련 물질을 사용하는 경우는 불필요한 세포 성분 등을 제거할 수 있다. 또한 이러한 처리는 별도로 실시할 수도 있고 동시에 실시할 수도 있다. 또한, 생체 관련 물질을 포함하는 시료를 배열체를 구성하는 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유에 고정화하기 전에 적절하게 실시할 수도 있다.

5. 지그를 이용한 섬유 배열체 제조

본 발명은 지그를 이용하여 섬유가 3차원 배열된 구조를 갖는 섬유 배열체를 제조하는 것도 가능하다.

본 발명의 섬유 배열체는 섬유를 하나씩 통과시킬 수 있는 소구멍을 갖는 도구로서 배열 패턴이 다수의 소구멍으로 형성된 것(「지그」라 함)에 섬유를 통해 섬유 다발을 작성하여 그 섬유 다발에 장력을 제공한 상태로 섬유 간극에 수지를 충전하여 고정화함으로써 제작할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 지그를 관통하는 소구멍은 소정의 패턴으로 배열시킨 것을 들 수 있다. 예를 들면, 원형 구멍을 세로 및 가로로 정렬시킨 것 (도 4), 또는 세로선과 가로선으로 이루어진 지지선군으로 구분하여 그물을 구성하는 공간을 갖는 것을 들 수 있다 (도 5).

도 4에 도시한 바와 같이 소정의 패턴을 형성하여 도려낸 소구멍을 갖는 지그 (다공판)을 이용하는 경우는 섬유 (12)를 지그 (11) 구멍에 통과시킨 후, 상기 지그들의 간격을 넓힌다. 단, 지그 (11) 구멍 위치를 이웃하는 지그 구멍 위치와 정합시키기 위해 가지런히 하여 서로 접하도록 배치시키는 것이 바람직하다. 또는 도 5에 도시한 바와 같이, 세로선과 가로선으로 구성되는 지지선군 (21)의 하나의 구획에 섬유를 통과시켜 섬유 다발로 하여 지그들의 간격을 넓히는 것도 가능하다. 그리고, 섬유에 장력을 제공하여, 장력을 제공한 상태로 섬유사이에 수지를 충전하여 상기 섬유 다발을 고정하여 섬유 배열체를 얻는다.

이 경우에도 삼차원 배열체로 하는 섬유 갯수는 100개 이상, 바람직하게는 1,000 내지 10,000,000개이고, 목적에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 단, 배열체에서의 섬유 밀도가 1cm^2 당 1OO 내지 l,0OO,OOO 개가 되도록 제조하는 것이 바람직하다. 그리고, 고밀도로 섬유를 배열시키기 위해서는 섬유의 외부 직경은 가는 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에서 섬유 1개의 외부 직경은 1 mm 이하, 바람직하게는 3OO 내지 10 ㎛ 이다. 예를 들면, 외부 직경 50 ㎛의 모노필라멘트를 이용한 경우, 1 cm 당 200개의 섬유를 배열시킬 수 있기 때문에 1 cm^{2}의 정사각형 내에 배열시킬 수 있는 섬유 갯수는 40,OO0개이다. 따라서, 이 경우는 1 cm^2 당 최고 40,OOO 종류의 생체 관련 물질을 고정화할 수 있다. 한편, 멀티필라멘트에서는 83 dtex/36 필라멘트나 82 dtex/45 필라멘트 등을 그대로 이용하는 것도 가능하다. 또한, 외부 직경이 300 ㎛ 정도인 다공질 섬유, 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 모노필라멘트를 이용하면 고정화 배열체 단면 1 cm^2 당 1,OOO 개 이상의 섬유가 배열된 삼차원 배열체를 얻을 수 있다.

섬유의 배열을 규제하는 지그로서 섬유 배열 패턴과 동일 패턴의 구멍을 갖는 다공판을 이용하는 경우, 섬유 배열체내의 섬유끼리의 거리는 상기 지그의 구멍피치 (구멍의 중심과 그 이웃의 구멍의 중심과의 거리)와 동일해진다.

또한, 지그의 각 구멍 직경은 사용하는 섬유 외부 직경의 100 % 이상 125 % 이하가 바람직하고, 배열 규제력과 배열 작업 난이도를 고려하면 105 %가 가장 바람직하다.

이러한 다공판의 제조법으로서는 포토에칭 가공이 가장 염가이고 대량으로 정밀도 좋게 제조할 수 있다는 점에서 바람직하다. 이 경우, 가공에 알맞는 판두께는 각 구멍사이의 빈틈 치수의 200 % 이하, 바람직하게는 100 % 이하이다. 판의 재질은 통상 스테인레스, 구리 또는 구리 합금이 이용되지만 본 발명에서는 재료 강도와 가공 비용 및 재료비 면에서 스테인레스 강판(SUS 304재료)가 가장 적합하다.

지그로서 종횡으로 뻗은 지지선군을 사용하면 섬유의 배열 패턴과 동일 형태또는 서로 유사한 형태로 확대 또는 축소가 가능한 그물을 구성할 수 있다. 또한, 다공판을 이용하는 경우에 비해 배열 규제력을 향상시켜 배열 작업 난이도를 쉽게 하는 것이 가능하다.

구체적으로는 지지선을 섬유축에 대해 직교하는 2 방향에, 1 방향당 생체 관련 물질 고정화 섬유 배열수 플러스 하나씩 배치하여 생체 관련 물질 고정화 섬유 배열수 분의 그물을 구성한다 (도 5). 지지선의 양끝은 직선 운동 기구를 갖는 지지단으로 한다. 지지선군으로 구성된 그물은 각 지지선이 서로 인접하는 지지선에 대해 평행 이동하는 것으로 확대, 축소시킬 수 있다. 그물을 확대시키면 섬유의 배열 작업은 매우 간단해져서 모든 섬유를 배열한 후, 그물을 축소하는 것으로 지그와 섬유의 사이에 간극이 발생하지 않는 상태가 되고 매우 정밀한 배열 규제가 가능하다. 즉, 섬유 배열체 내의 섬유끼리의 거리는 최대 지지선의 직경 또는 폭까지 축소 가능하다.

이와 같은 지그를 직렬로 2개 또는 필요에 따라 2개 이상, 구멍 또는 그물의 위치를 가지런히 하여 서로 접하도록 배치하고 지그의 구멍 또는 그물을 꿰매도록 섬유를 통해 배열 작업을 행한다. 지그로서 지지선군을 사용하는 경우는 전부 또는 일부의 배열 작업 종료 후에 그물을 축소하여 소정의 그물 크기로 조절한다.

그 후, 상기 지그들의 간격을 넓힌다. 이 작업은, 상기 그물 조절 작업 전 또는 그물 조절 작업과 동시에 행할 수도 있다. 간격은 특별히 규정되지 않고 적절하게 설정할 수 있다. 간격을 넓게 하면 삼차원 배열체의 장척품을 성형할 수 있고 박편으로 절단하는 등의 후속 공정에서의 손실을 적게 함에 따라 제조 비용을 작게 할 수 있다. 단, 간격을 과도하게 채용한 경우 스팬 중앙 부근에서 섬유의 구속력이 저하되어 배열이 흐트러질 우려가 있기 때문에 그와 같은 혼란이 발생하지 않는 정도로 적절하게 조절한다. 또한, 스팬 중앙 부근의 배열 규제를 강화할 목적으로 지그의 갯수를 적절하게 추가할 수도 있다.

계속해서, 지그를 통과시킨 모든 섬유에 장력을 걸고 그 상태에서 섬유의 간극에 수지를 충전하여 고정화한다. 장력은 섬유의 단면 형상이나 재질, 즉 탄성 계수나 신장률 등에 의해 다르지만 섬유가 느슨하지 않고 또한 파단하지 않는 정도로 한다. 그리고, 섬유를 이완 없이 뻗은 상태를 유지하기 위해 장력을 유지한다. 그 방법으로서는 모든 섬유를 스프링으로 인장하는 방법, 에어 축구로 비접촉 흡인하는 방법, 섬유를 적절하게 점착테이프로 모아 지그에 접착하는 방법, 중력을 이용하는 방법 등을 들 수 있다.

본 발명에 있어서 사용할 수 있는 지지선으로서는 장력에 의해 쉽게 파단하지 않는 재질이면 특별히 한정되지 않고, SUS304 와이어나 낚시줄 등을 들 수 있다.

또한, 본 발명에 있어서 섬유 다발을 고정화하는 수지는 각 섬유 사이의 공극으로의 충전이 용이해지도록 저점도 액형을 나타내고 충전 및 경화가 상온에서 이루어지는 것, 예를 들면, 우레탄 수지 등의 2액 반응 경화성 수지가 바람직하다.

6. 섬유의 내벽 처리

본 발명은 중공 섬유의 내벽부(내벽 표면 및 내벽 표면에서 외벽 표면까지의 영역도 포함함)에 겔을 형성시키는 처리 방법이다.

이 처리는 중공 섬유의 내벽부에 겔 형성성 단량체 (a) 용액을 부착시킨 후, 상기 단량체를 중합시켜 겔을 상기 내벽부에 형성시키는 것을 특징으로 하는 것이다. 본 발명에서 이러한 처리를 내벽 처리라 한다. 여기서 단량체 용액 (a)이란 내벽 처리에 사용하기 위한 용액을 의미하고 내벽 표면에서 내벽 내부에 침입하여 내벽 표면에서 외벽 표면까지의 영역에 걸쳐 침투하는 것이 가능한 것이다. 따라서, 본 발명에서 내벽부란 내벽 표면 외, 단량체가 내벽 표면에서 내부에 침입할 수 있는 부분, 즉 내벽 표면에서 외벽 표면까지의 영역도 포함되는 의미이다.

이러한 내벽 처리를 행함으로써 그 후, 섬유의 중공부에 겔을 충전했을 때에 겔이 중공 섬유 내벽부에 물리적 또는 화학적으로 고정된다. 또한, 본 발명은 상기의 방법으로 처리된 중공 섬유 (즉 겔이 내벽부에 형성된 중공 섬유)의 중공부에 겔 형성성 단량체 (b) 용액을 충전하여 해당 단량체를 중합함으로써 중공부에 겔을 충전시키는 방법이 제공된다. 본 발명에서 단량체(b) 용액은 내벽부가 처리된 중공 섬유의 중공부에 충전하여 겔을 형성시키기 위해 사용하는 용액을 의미한다. 또한, 중공 섬유의 중공부가 상기 충전 방법에 의해 충전된 섬유의 제조 방법도 제공된다. 이와 같이 하여 얻어진 섬유는 모세관 전기 영동이나 DNA 등의 분석용 마이크로 어레이에의 이용에 적합한 것이다.

본 발명에서 내벽 처리의 대상이 되는 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 대표예로서는 나일론 6, 나일론 66, 방향족폴리아미드 등의 폴리아미드계의 각종 섬유, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리부틸렌테레프탈레이트, 폴리젖산, 폴리글리콜산 등의 폴리에스테르계의 각종 섬유, 폴리아크릴로니트릴 등의 아크릴계의 각종 섬유, 폴리에틸렌이나 폴리프로필렌 등의 폴리올레핀계의 각종 섬유, 폴리메타크릴산 메틸 등의 폴리메타크릴레이트계의 각종 섬유, 폴리비닐알콜계의 각종 섬유, 폴리 염화비닐리덴계의 각종 섬유, 폴리염화비닐계 섬유, 폴리우레탄계의 각종 섬유, 페놀계 섬유, 폴리불화비닐리덴이나 폴리테트라플루오로에틸렌 등으로 이루어진 불소계 섬유, 폴리알킬렌파라옥시벤조에이트계의 각종 섬유 등을 들 수 있다.

그러나, 모세관 전기 영동에서는 모세관 외부보다 검출광을 조사할 필요가 있다. 따라서, 모세관 전기 영동용 중공 섬유로서 사용하기 위해서는 투명성 재료가 바람직하고 폴리메타크릴산 메틸로 대표되는 메타크릴레이트계 수지를 재료로 하는 중공 섬유 또는 모세관(이후 중공 섬유라 총칭함)를 이용하는 것이 바람직하다.

사용되는 다공질 중공 섬유 구조는 섬유의 외부 표면으로부터 내부 표면까지 구멍이 연통된 삼차원 그물 구조, 피브릴형인 것에 의해 구성된 연통된 구멍을 갖는 구조, 손가락형 구조, 독립기포 구조, 또는 일부가 연통된 기포 구조인 것 등을 들 수 있다.

또한, 정밀여과, 초여과를 목적으로 한 다공질 중공 섬유 또한, 외부 표면에 무구멍성의 균질막을 피복한 역침투막, 가스분리막, 다공질층 중간에 무구멍성인 균질층을 끼운 막 등으로 처리된 다공질 중공 섬유도 이용할 수 있다. 본 발명의 중공

섬유는 외부 직경이 2 mm 이하, 바람직하게는 1 mm 이하, 더욱 바람직하게는 0.05 mm 내지 0.5 mm 이다. 또한, 내부 직경은 0.03 mm 이상이 바람직하고 0.03 mm 내지 0.08 mm이 보다 바람직하다. 모세관 전기 영동용의 중공 섬유로서는 비교적 두께가 두꺼운 중공 섬유가 취급이 용이하다는 점에서 바람직하다. 또한, DNA 등의 분석용 마이크로 어레이로서 본 발명에 있어서 겔이 충전된 섬유 (겔 충전 섬유)를 이용할 수 있다. 이 경우는 겔 충전 섬유에 프로브 DNA를 고정하고 여러개의 섬유를 배열하여 수지로 굳혀, 섬유축에 직각으로 슬라이스하여 섬유 배열체 박편 (마이크로 어레이)을 제조한다. 이러한 용도로 사용하는 마이크로 어레이에는 단위 면적당 섬유의 갯수가 많이 존재할 필요가 있고 섬유 외부 직경은 가는 것이 바람직하고 0.5 mm 이하, 더욱 바람직하게는 0.05 mm 내지 0.3 mm이다. 또한, 섬유 배열법으로서는 배열의 규칙성을 유지할 필요가 있다. 따라서, 배열 단계에서 섬유에 장력을 부여하기 위해 탄성율이 높은 재료, 예를 들면 방향족 폴리아미드나 메타크릴산메틸 등의 메타크릴계 수지를 소재로 하는 섬유를 이용하는 것이 바람직하다.

본 발명은 중공부에 충전하는 겔과 내벽부를 물리적 또는 화학적으로 결합시켜 중공부에 충전되는 겔을 안정적으로 고정화하는 것을 목적으로 하고 있다. 따라서, 이용하는 중공 섬유의 내벽부가 적어도 다공질을 형성하는 경우 내벽부는 내벽 처리용의 겔형성성 단량체 (a) 용액이 내벽 표면에서 내부에 쉽게 침투가능한 구조인 것이 바람직하다. 또한, 중공 섬유의 내벽부가 다공질을 형성하지 않는 경우 내벽부는 상기 단량체 또는 단량체 용액이 중공 섬유를 구성하는 소재를 어느 정도 팽윤시켜 그 내벽부에 침투 가능한 구조인 것이 바람직하다. 그 후, 상기 단량체를 중합시킴으로써 내벽부에 고착한 겔의 형성이 달성된다.

본 발명의 겔 충전 섬유는 전기 영동 또는 DNA 등의 분석을 용도로 하고 있기 때문에 중공부에 충전되는 겔로서는 물과의 친화성이 높은 폴리아크릴아미드를 주성분으로 하는 겔이 이용된다. 따라서, 내벽부 처리용 겔형성성 단량체 (a)는 중공 섬유 소재 및 중공부에 충전되는 겔의 양자에 친화성이 있는 양친매성의 단량체가 바람직하다.

이러한 단량체 (a)로서는 (메트)아크릴아미드계 단량체, 또는(메트)아크릴레이트계 단량체 등을 들 수 있다. 아크릴아미드계 단량체의 예로서는 N-메틸(메트)아크릴아미드, N,N-디메틸(메트)아크릴아미드, N-에틸-N-메틸(메트)아크릴아미드, N,N-디에틸(메트)아크릴아미드, N-n-프로필(메트)아크릴아미드, N-이소프로필(메트)아크릴아미드, N-t-부틸(메트)아크릴아미드, N-s-부틸(메트)아크릴아미드, N-n-부틸(메트)아크릴아미드, N-메틸-N-이소프로필(메트)아크릴아미드, N-메틸-N-n-프로필(메트)아크릴아미드, N-에틸-N-이소프로필(메트)아크릴아미드, N-에틸-N-n-프로필(메트)아크릴아미드, N,N-디-n-프로필(메트)아크릴아미드 등이 예시된다. 또한, (메트)아크릴레이트계 단량체의 예로서는 모노메틸아미노에틸(메트)아크릴레이트, 모노메틸아미노프로필(메트)아크릴레이트, 디메틸아미노에틸(메트)아크릴레이트, 디메틸아미노프로필(메트)아크릴레이트, 디에틸아미노에틸(메트)아크릴레이트, 디프로필아미노에틸(메트)아크릴레이트, 디이소프로필아미노에틸(메트)아크릴레이트, 디에틸아미노프로필(메트)아크릴레이트, 디프로필아미노프로필(메트)아크릴레이트, 디이소프로필아미노프로필(메트)아크릴레이트, 메틸에틸아미노에틸(메트)아크릴레이트, 메틸에틸아미노프로필(메트)아크릴레이트, 히드록시메틸(메트)아크릴레이트, 2-히드록시에틸(메트)아크릴레이트, 3-히드록시프로필(메트)아크릴레이트 등을 들 수 있다. 이러한 단량체는 단독으로도 사용 가능하지만 2종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 또한, 필요에 따라 하기의 중공부에 충전하는 겔과 화학적인 결합을 일으킬 수 있는 관능기를 갖는 단량체도 병용할 수 있다. 이러한 단량체로서는 상기 수산기를 갖는 단량체 이외에 카르복실산기나 에폭시기를 갖는 (메트)아크릴산이나 글리시딜메타크릴레이트, 그라프트 교차제인 메타크릴산알릴 등이 예시된다.

또한, 겔 형성에 필요한 가교제로서는 2관능성 이상의 아크릴아미드계 단량체를 들 수 있지만 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드, N,N'-(1,2-디히드록시에틸렌)-비스아크릴아미드, N,N'-디알릴타르타르디아미드, N,N'-시스타민-비스아크릴아미드, 또는 N-아크릴로일트리스(히드록시메틸)아미노메탄 등이 바람직하다.

또한, 이들 단량체는 통상 단량체 및 가교제를 용해하고 중공 섬유의 내벽부로부터 내부에 침투 가능한 액체인 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 알코올류, 아세톤 등의 용액으로서 이용된다.

중합개시제로서는 사용하는 용매에 용해가능한 아조계, 과산화물계, 레독스계 등의 개시제를 이용할 수 있다. 예를 들면, 2, 2'-아조비스이소부티로니트릴, 2,2'-아조비스(2-메틸부티로니트릴)이소부티로니트릴, 과산화벤조일, 또는 과산화벤조일-디메틸아닐린계 등을 들 수 있다.

내벽부 처리 정도는 단량체 용액에서의 단량체 농도 또는 가교제 농도 등으로 변화할 수 있다. 단량체 농도는 80 % 이하의 범위가 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 내지 50 %의 범위가 바람직하다. 또한, 가교제 농도는 단량체 농도에 대해 0.5 내지 50 %가 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 내지 30 %의 범위이다.

다음에 구체적인 처리 방법에 관해서 설명한다.

우선, 내벽부의 처리 방법에 관해 설명한다. 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 선단을 단량체 및 가교제를 포함하는 용액에 침지하여 흡입하고 상기 단량체 액체를 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 내벽 및(또는) 다공질부에 도입하여 중합함으로써 내벽 표면 및 내벽 내부에 겔을 형성한다.

중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 내벽부를 처리할 때 단량체 (a) 용액을 흡인에 의해 중공 섬유 내에 충전하여 내벽부에 부착시킨 후, 부착하지 않고 중공부에 잔존하는 것을 방출시켜 중합을 행한다.

다음으로 내벽 처리에서 얻어진 중공 섬유의 중공부에 겔 형성성 단량체 (b) 용액을 충전하는 방법에 관해 설명한다. 충전하는 겔형성성 단량체 (b) 용액은 아크릴아미드를 주성분으로 하는 단량체 용액을 사용할 수 있다. 용제로서 메탄올, 에탄올 등의 알코올, 물 등이 사용된다. 겔 형성성 단량체 (b) 용액에 혼합되는 단량체로서는 통상 아크릴아미드가 사용되며, 이것과 공중합가능한 상기(메트)아크릴아미드계, (메트)아크릴레이트계 등의 단량체를 들 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 이 경우, 단량체 농도로서는 단량체 용액 전체량에 대해 2 내지 20 %의 범위가 바람직하고 수용액에 가교제와 중합 개시제를 첨가하여 중합된다. 중공 섬유의 중공부에 단량체 용액을 충전하는 방법은 진공 흡인법이 일반적이지만 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명에서는 다공질 섬유, 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유를 이용하는 경우 바람직하게는 도 6에 도시한 바와 같이 수지로 고정한 섬유 배열체 (31)와, 수지로 고정하지 않은 섬유 부분 (연장 부분) (32)을 설치하여, 이 선단 부분 (32)을 생체 관련 물질을 포함하는 용기 (33)에 침지함으로써 상기 액체를 각 섬유의 중공부 또는 다공질부에 도입할 수 있다 (또한, 선단 부분 (32)은 연속면 (34)을 거쳐 용기(33)에 계속됨).

즉, 수지로 고정하지 않은 섬유 부분 (32)이 수지로 고정한 섬유 배열체 (31)로부터 연장되기 때문에 상기 섬유 부분 (32)을, 생체 관련 물질을 포함하는 용기 (33)에 침지한 후, 침지부와는 반대측 (수지로 고정한 섬유측)으로부터 흡인하면 섬유 배열체 (31) 내의 섬유의 중공부에 생체 관련 물질이 흡입되어지고 생체 관련 물질을 도입할 수 있다.

삼차원 배열체 내의 각 섬유에 고정화되는 생체 관련 물질의 종류는 각각 다른 종류로 하는 것이 가능하다.

생체 관련 물질을 포함하는 시료를 섬유에 작용시킬 때의 온도는 5 ℃ 내지 95 ℃가 바람직하고 15 ℃ 내지 60 ℃가 더욱 바람직하다. 처리 시간은 통상 5분 내지 24 시간이고 1 시간 이상이 바람직하다.

7. 섬유 배열체의 박편

본 발명에서는 상기의 생체 관련 물질 고정화 섬유 배열체 또는 생체 관련 물질 및 색소 고정화 겔 유지 섬유 배열체를 섬유축과 교차하는 방향, 바람직하게는 섬유축에 대해 수직방향으로 절단함으로써 임의로 배열된 생체 관련 물질 고정화 중공 섬유 배열체 단면을 갖는 박편을 얻을 수 있다. 이 때의 절단 방법으로서는 예를 들면, 미크로톰을 이용하여 배열체로부터 박편을 추출하는 방법 등을 들 수 있다. 박편의 두께에 관해서는 임의로 조정할 수 있지만 통상 1 내지 5,000 ㎛, 바람직하게는 10 내지 2,000 ㎛이다.

이와 같이 하여 얻어진 박편은 예를 들면, 형광 현미경으로 관찰함으로써 겔의 변형, 탈락 등의 형상을 쉽게 관찰할 수 있다.

본 발명에서는 상술한 바와 같이 섬유에 장력을 부여하는 공정이 포함되기 때문에, 이용되는 섬유로서는 탄성율이 높은 섬유가 바람직하고 예를 들면 메틸메타크릴레이트계 섬유, 방향족 폴리아미드 섬유 등이 바람직하게 이용된다.

얻어진 생체 관련 물질 고정화 중공 섬유 배열체 단면 또는 생체 관련 물질 고정화 다공질 중공 섬유 배열체 단면을 갖는 박편 (생체 관련 물질 배열 박편)에는 상기 배열체를 구성하는 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 수에 따른 생체 관련 물질이 존재한다. 박편의 단면적당 생체 관련 물질 수에 관해서는 이용하는 중공 섬유 또는 다공질 중공 섬유의 외부 직경 등을 적절하게 선택함으로써 박편 단면적 1 cm^2 당 100 개 이상의 생체 관련 물질이 고정화된 박편을 제작하는 것이 가능하고 박편 단면적 1 cm^2 당 1,OOO 개 이상의 생체 관련 물질이 고정화된 박편을 제작하는 것도 가능하다.

또한, 동일 배열체로부터 얻어지는 박편의 생체 관련 물질의 위치 배열은 전부 동일하기 때문에 동일 배열체로부터 얻어지는 모든 박편의 생체 관련 물질의 위치 배치를 알 수 있다.

섬유에 고정화된 생체 관련 물질이 예를 들면 핵산인 경우 상기 박편을, 검체와 반응시켜 하이브리다이제이션을 행함으로써, 상기 핵산을 프로브로서 검체 중에 존재하는 특정한 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있다.

8. 좌표 부착 섬유 배열체 박편, 각 섬유 단위 좌표의 결정 및 좌표 데이터를 기록한 기록 매체

본 발명은 섬유 배열체 박편 중에 포함되는 각 섬유 단위의 위치가 좌표로서 결정되어 있는 섬유 배열체 박편을 제공한다. 본 발명에서는 용어를 이하와 같이 정의한다. 섬유 배열체란 섬유의 집속물을 말한다. 섬유 배열체 박편이란 섬유 배열체를 절단함으로써 얻어지는 박편을 말한다. 섬유 단위란 절단 후의 섬유 배열체 박편 중의 각 섬유를 말한다. 좌표란 섬유 배열체 박편의 위치를 X 좌표 및 Y 좌표에 의해서 나타내는 수치를 말한다.

본 발명의 섬유 배열체 박편은 섬유를 집속, 접착, 고정화한 섬유 배열체를 절단함으로써 제조할 수 있다. 본 발명에 이용되는 섬유는 상기 섬유 유래의 섬유 단위를 포함하는 섬유 배열체 박편이 사용 목적에 따라 어떠한 기능 (예를 들면, 특정한 물질을 검출하는 기능)을 완수하는 것과 같은 역할을 담당하는 것으로 상기 목적을 달성하기 위해 각 섬유에는 염료, 화학적으로 활성인 관능기, 리간드, 핵산이나 단백질 (예를 들면 항체)과 같은 화학 물질을 결합 또는 담지 (이하, 결합 및 담지를 통합하여 고정이라 함)시키거나 또한 전기적, 자기적인 물리적 상호 작용을 미치게 하는 전하 등을 고정시킬 수 있다.

이하, 본 발명의 바람직한 실시 형태의 하나로서 각 섬유 단위의 위치가 좌표로서 결정되어 있다. 생체 관련 물질 고정화 섬유 배열체 박편에 관해서 자세히 설명한다.

섬유 배열체로부터 추출된 박편 중 각 섬유 단위는 섬유 배열체 제조 과정에서 각 섬유 기본 단위의 스치기나 굴곡 등에 의해 각 박편 사이에서 서로 조금씩 엇갈림이 발생할 수 있다. 상기 섬유 배열체 박편을 사용하여 샘플 중의 생체 관련 물질의 종류나 양을 분석하는 경우에는 섬유 배열체 박편 중 각 섬유 단위를 기계적으로 인식·검출하기 위해 박편상에서 각 섬유 단위의 위치가 미리 결정되어 있는 것을 원하게 된다. 이러한 동일한 섬유 배열체로부터 얻어진 박편사이의 섬유 단위 위치의 어긋남은 섬유가 연속적인 사행에 의해 생기는 경우가 대부분이다. 그래서, 다음과 같이 각 박편 중 2개의 다른 위치에 좌표 기준을 설정하여 상기 좌표 기준에 기초함으로써 각 박편상의 모든 섬유 단위의 좌표를 결정할 수 있다.

(1) 좌표기준

좌표 기준은 섬유 배열체의 섬유축 방향에 연속한 표시이고 또한 상기 표시로부터 설정되는 좌표의 오차가 작은 것이면 한정되지 않고, 다양한 타입의 것을 이용할 수 있다. 구체적으로는 섬유 배열체 박편 중에 존재하는 임의의 섬유 단위, 섬유 배열체 측면에 매직 잉크 등을 이용하여 쓰여진 선, 섬유 배열체 측면에 칼날 등을 이용하여 새겨넣은 홈 등을 좌표 기준으로 채용할 수 있다. 이러한 좌표 기준은 한 장의 섬유 배열체 박편상에 1000 섬유 단위당 2 내지 10개, 가장 바람직하게는 한 장의 섬유 배열체 박편상에 2개 설치할 수 있다.

예를 들면, 좌표 기준으로 섬유 배열체 박편 중에 존재하는 섬유 단위를 이용하는 경우에는 현미경으로 빛과 바람직하게 반응하여 그 소재가 쉽게 알 수 있는 염료 (예를 들면 형광 염료 등)로 염색한 섬유 (이하, 마커 섬유라 함)를 섬유 배열체 박편 제조시에 섬유 배열체 내에 미리 포함되게 함으로써 마커 섬유 단위가 들어 있는 섬유 배열체 박편을 제조할 수 있다.

(2) 각 섬유 단위 좌표의 결정

섬유 배열체 박편 중의 각 섬유 단위의 좌표는 이하와 같이 하여 결정할 수 있다. 즉, 우선 상기 7에 있어서 추출된 박편을 추출 순서대로 번호를 붙여 S (1), S(2), …, S(h), …, S(m)로 한다. 이 박편의 임의의 박편을 선택하여 그것을 S(h)로 한다. 우선 이 S(h)에 포함되는 n 개의 섬유의 박편에서 좌표를 결정한다. 개개의 좌표 결정법은 나중에 상술하지만, n 개의 생체 관련 물질을 고정화한 섬유가 박편에 있다고 한다면 개개의 생체 관련 물질과 하이브리다이제이션 반응 등을 일으키는 복수의 어떠한 표지체를 부가한 생체 관련 물질을 이용하여 결정할 수 있다. 그 경우의 좌표는 박편내에 존재하는 좌표 기준을 이용할 필요가 있고, 박편내에 포함되는 n 개의 섬유의 좌표는 이 기준 좌표로 규정된다. 일단, S(h)의 좌표가 결정되면 그것을 기초로 박편에 위치적으로 가까운 다음 박편 S(i)에서 n 개의 섬유의 좌표가 마찬가지로 박편 S(i) 내의 기준 좌표를 기초로 결정된다. 결정법은 후술하지만 이미 결정되어 있는 S(h) 박편 중의 n 개의 섬유의 좌표 데이터를 이용한다. 이 경우 S(i)는 S(h)에 가장 근접하고 즉 그 양쪽으로 인접한 박편인 것이 바람직하다는 것이 상기 설명에서 분명해졌다. 마찬가지로 하여 S(i)에 가까운 박편 S(j)의 좌표가 S(j) 내에 설치된 좌표 기준을 기초로 S(i) 박편에 포함되는 n 개의 좌표 데이터를 기초로 결정된다. 이와 같이 하여 얻어진 박편 m 개의 모든 좌표를 결정할 수 있다.

그런데, 섬유 배열체의 섬유축 방향으로 2개의 연속된 좌표 기준이 되는 표시를 갖는 섬유 배열체로부터, 설명을 간단히 하기 위해 연속해서 2장의 박편을 추출한 경우에 관해서 생각한다.

또한, 각 박편 중의 섬유 단위는 유한의 면적을 갖지만 그 중심부를 대표하여 점으로서 생각한다. 최초로 추출한 박편내의 좌표 기준을 기초로 최초로 추출한 박편 중의 모든 섬유 단위마다 2차원 좌표를 결정한다. 좌표 판독은 XY 좌표가 판독 가능한 XY 스테이지 부착 투영 현미경 등으로 판독할 수 있다. 좌표 결정은 최초로 추출한 박편내의 2개의 좌표 기준을 P1, P2로 하고 각각 XY 스테이지 부착 투영 현미경으로 판독한 좌표를 (P1X, P1Y), (P2X, P2Y)로 하여, 최초로 추출한 박편 중의 임의의 섬유 단위를 A1로 하고 동일하게 XY 스테이지 부착 투영 현미경으로 판독한 좌표를 (A1X, A1Y)라고 하면 박편내의 P1, P2를 기준으로 한 좌표계에서의 A1 섬유 단위의 좌표(B1X, B1Y)는 다음 수학식 1 및 2로부터 구할 수 있다.

수학식 1

$$\begin{pmatrix} B1X \\ B1Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(-\theta 1) & -\sin(-\theta 1) \\ \sin(-\theta 1) & \cos(-\theta 1) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A1X - P1X \\ A1Y - P1Y \end{pmatrix}$$

수학식 2

$$\theta 1 = \tan^{-1}\left(\frac{P2Y - P1Y}{P2X - P1X}\right)$$

여기서 XY 스테이지 부착 투영 현미경으로 판독하는 임의의 섬유 단위의 좌표는 섬유 단위 단면의 무게 중심 위치가 바람직하다.

마찬가지로 최초로 추출한 박편 중의 모든 섬유 단위의 좌표를 XY 부착 투영 현미경으로 판독하면 박편내의 P1, P2를 기준으로 한 좌표계에서의 모든 섬유 단위의 좌표를 얻을 수 있다.

2번째로 추출한 박편에 대해서는 박편을 얇게 추출하면 추출된 박편내의 좌표 기준을 기초로 한 좌표계에서는 최초로 추출한 박편과 2번째로 추출한 박편의 박편중 동일 섬유 단위의 2차원 좌표는 근접한 값이 되기 때문에 2번째로 추출한 박편 속 섬유 단위 중으로부터 용이하게 최초로 추출한 박편 속과 동일한 섬유 단위를 찾아 내기 시작하여 2번째로 추출한 박편내의 좌표 기준을 기초로 한 좌표계에서 그 섬유 단위의 2차원 좌표를 결정할 수 있다. 예를 들면, 최초로 추출한 박편 내의 좌표 기준을 기초로 한 임의의 섬유 단위 A1의 좌표를 (B1X, B1Y)로 한다. 또한, 2번째로 추출한 박편내 2개의 좌표 기준을 P3, P4로 하여 XY 스테이지 부착 투영 현미경으로 판독한 좌표를 P3에 대해서는 (P3X, P3Y), P4에 대해서는 (P4X, P4Y)라 하면 최초로 추출한 박편 중의 임의의 섬유 단위 A1에 대응하는 2번째로 추출한 박편 중의 섬유 단위 (A1과 동일 섬유 단위)의 XY 스테이지 부착 투영 현미경상에서의 좌표 (C1X, C1Y)는 만일 마커 섬유 단위와 섬유 단위 A1이 첫번째 박편과 두번째 박편에 평행하게 이동하고 있었다면 다음 수학식 3 및 4와 같이 나타낸다.

수학식 3

$$\begin{pmatrix} C1X \\ C1Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\theta 2) & -\sin(\theta 2) \\ \sin(\theta 2) & \cos(\theta 2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B1X \\ B1Y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} P3X \\ P3Y \end{pmatrix}$$

수학식 4

$$\theta 2 = \tan^{-1}\left(\frac{P4Y - P3Y}{P4X - P3X}\right)$$

그리고, XY 스테이지 부착 투영 현미경의 XY 좌표를 (C1X, C1Y)에 맞추면 그 근방에 최초로 추출된 박편 중의 섬유 단위 A1에 대응하는 2번째로 추출된 박편 중의 섬유 단위를 쉽게 찾아 낼 수 있다. 이와 같이 찾아 낸 2번째의 박편에서 A1 섬유 단위가 정확한 좌표를 XY 스테이지상에 그 좌표 (A2X, A2Y)를 구하고 상술한 1번째 박편에서 요구한 바와 같이 상기 수학식 1, 2를 이용하여 2번째 박편의 좌표 기준 P3, P4의 좌표를 기초로 그 좌표 (B2X, B2Y)가 결정된다. 같은 조작으로 2번째의 박편에 포함되는 모든 섬유 단위의 좌표가 1번째로 포함되는 섬유 단위의 좌표 데이터를 기초로 결정된다. 또한 별도의 방법으로 2번째 박편의 임의의 섬유 단위의 좌표를 2번째 박편내의 좌표 기준을 기초로, 상기 수학식 1, 2를 이용하여 결정하고 이 2번째 박편의 임의의 섬유 단위의 좌표와 1번째 박편내의 좌표 기준을 기초로 결정된 1번째 박편중의 섬유 단위의 좌표로 가장 가까운 것을 동일 섬유 단위로 결정하는 것도 가능하다.

마찬가지로, 3번째로 추출한 박편내의 좌표 기준과 2번째로 추출한 박편내의 좌표 기준을 기초로 하여 2번째로 추출한 박편 중의 섬유 단위의 2차원 좌표를 구한다. 얻어지는 2차원 좌표로부터 2번째로 추출된 박편 중의 모든 섬유 단위에 대응하는 (즉, 최초로 추출된 박편 중의 모든 섬유 단위에 대응함), 3번째로 추출된 박편 중의 모든 섬유 단위의 2차원 좌표를 3번째로 추출된 박편내의 좌표 기준을 기초로 하여 결정할 수 있다. 이하, 동일하게 반복하면 섬유 배열체가 스치거나, 또는 섬유 배열체 내의 섬유가 굴곡이 있거나 얽힌 경우에도 섬유 배열체로부터 추출되는 박편 내의 좌표 기준을 기초로 한 섬유 배열체로부터 추출되는 박편 중의 모든 섬유 단위의 2차원 좌표를 결정할 수 있다. 따라서, 최초로 추출한 박편 중의 섬유 단위를 특정하면 섬유 배열체로부터 추출된 모든 박편 중의 섬유 단위의 특정과 섬유 배열체로부터 추출된 박편내의 좌표 기준을 기초로 한 섬유 배열체로부터 추출된 박편 중의 모든 섬유 단위마다 2차원 좌표를 결정할 수 있다.

상기의 설명은 인접하는 박편에 대해 박편의 좌표 데이터를 하기 박편의 좌표 결정에 이용하는 2개의 방법을 설명했지만 반드시 인접한 박편의 좌표 데이터를 이용할 필요는 없다. 특히 섬유 다발 중의 배열이 비교적 양호한 경우, 여러개의 박편으로 좌표를 상기 수법으로 결정하여 그 사이의 박편에 대해서는 이미 좌표가 결정된 2장의 박편의 좌표 데이터로부터 내삽법으로 그 좌표를 구하는 것도 가능하다.

(3) 섬유 배열체 박편 중의 각 섬유 단위의 좌표 데이터를 기록한 컴퓨터 판독 가능한 기록 매체

상기에서 결정된 각 섬유 배열체 박편 중의 섬유 단위의 좌표 데이터는 컴퓨터 판독 가능한 기록 매체로 기록하여 이용할 수 있다. 구체적으로는 좌표 데이터로서는 섬유 배열체 박편마다 좌표 기준에 기초하여 결정한 좌표를 표로 한 것을 들 수 있다. 또한 이용할 수 있는 기록 매체로서는 자기 디스크, 플로피디스크, 자기테이프, CD-ROM, IC카드, RAM 등을 들 수 있다. 이러한 좌표 데이터는 섬유 배열체 박편의 측정 전에 검출기에 연동하는 컴퓨터에 등록해 둠으로써 어느 섬유 단위가 어느 생체 관련 물질 프로브에 대응하는지를 자동적으로 인식시킬 수 있다.

9. 섬유 배열체 박편 및 섬유 단위 좌표 데이터 기록 매체 셋트

본 발명에서는 상기 7에서 얻어진 섬유 배열체 박편 및 상기 섬유 배열체 박편 중의 각 섬유 단위의 좌표 데이터를 기록한 상기 8에서 얻어진 기록 매체를 포함하는 생체 관련 물질 검출용 섬유 배열체 박편 셋트를 제작할 수 있다. 예를 들면, 100장의 대장균 유전자형 해석용 핵산 섬유 배열체 박편과 상기 섬유 배열체 박편의 개개의 박편중의 각 섬유 단위의 위치의 좌표가 표로 되어 기록되어 있는 자기 디스크를 1셋트로 한 대장균 유전자형 해석용 섬유 배열체 박편 셋트를 제공할 수 있다.

10. 하이브리다이제이션 및 검체의 검출

본 발명의 박편은 고정화된 생체 관련 물질을 프로브로서 검체와 반응시켜 하이브리다이제이션을 행함으로써 검체 중의 특정한 물질 (생체 관련 물질과 상호 작용하는 물질)의 검출에 이용할 수 있다.

본 발명에서 말하는 프로브는 넓은 뜻으로는 검체 중에 존재하는 단백질이나 저분자 화합물 등의 검체 시료측 생체 관련 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 고정 생체 관련 물질을 가리킨다. 또한 본 발명에서 말하는 프로브는 좁은 의미로는 검출하여야 할 유전자의 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖는 핵산을 가리킨다. 즉, 본 발명의 박편을 검체와 반응시켜 하이브리다이제이션을 행하여 프로브와 상보적인 검체 중에 존재하는 핵산과의 하이브리드를 형성시켜 이 하이브리드를 검출함으로써 목적했던 염기 서열을 갖는 검체 중의 핵산을 검출할 수 있다.

고정화된 핵산과 하이브리드를 형성하는 핵산이나 고정화된 핵산과 특이적으로 결합하는 각종 생체 성분의 검출에는 공지된 수단을 이용할 수 있다. 예를 들면, 검체 중의 생체 관련 물질에 형광 물질, 발광 물질, 라디오 이소토프 등의 표지체를 작용시켜 이 표지체를 검출할 수 있다. 이들 표지체의 종류나 표지체의 도입 방법 등에 관해서는 아무런 제한이 없고 종래 공지된 각종 수단을 이용할 수 있다.

상기 수단에 의해 하이브리드를 완성시킨 박편은 형광 현미경으로 검품할 수 있다.

따라서, 본 발명의 박편의 이용법으로서는 고정화된 핵산 (프로브)와 하이브리드를 형성하는 핵산을 검출하기 위한 이용에 한정되지 않고 고정화된 핵산과 특이적으로 결합하는 단백질이나 저분자 화합물 등의 각종 시료 (예를 들면 생체 성분 등)을 검출하기 위해 이용하는 것도 가능하다.

본 발명에 있어서의 프로브 함유물의 종류, 형태는 본 발명의 방법이 적용되는 것이면 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서의 생체 관련 물질 프로브란 예를 들면, 데옥시리보핵산 (DNA), 리보핵산 (RNA), 펩티드핵산, 단백질 (효소, 항체 등), 항원, 다당류 등을 들 수 있다.

본 발명에서 프로브와 검체의 하이브리드의 형성은 자유 확산에 의해서라기보다 물리적 또는 화학적인 처리를 실시하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 검체가 전하를 갖고 있으면 전압을 걸어 검체와 프로브의 하이브리다이제이션을 효율좋게 행할 수 있다. 또한, 박편의 한쪽 면(겉 또는 속면)에 흡수성 물질 (예를 들면, 여과지, 스폰지, 흡수성 수지 등)을 접촉시키면 다른쪽 면에서 흡수성 물질을 향해 물이 이동하기 때문에 하이브리드의 형성을 쉽게 할 수 있고 특히 박편을 구성하는 섬유가 중공 섬유인 경우는 보다 효율적이다.

본 발명에서 검체와 프로브의 하이브리다이제이션을 행할 때, 본 발명의 박편 (생체 관련 물질 칩이라 함)의 양면에 전압을 거는 경우에는 예를 들면, 서브마린형 영동조 (도 7) 또는 블로팅 장치 (도 8) 등을 사용하는 것이 가능하다. 단지, 장치는 이에 한정되는 것은 아니다. 검체는, 여과지나 막질에 흡착시키거나, 아크릴아미드나 아가로스와 같은 고분자 중합체에 포괄시켜 생체 관련 물질 칩에 밀착시킨다. 다음으로 전압을 일정시간 건 후, 하이브리다이즈한 장소를 검출기로 특정한다. 또한, 생체 관련 물질 칩의 한 면에 흡수성 물질을 배치함으로써, 상대면에 배치한 검체를 상기 칩 중에 이동시켜 결합 반응을 행할 때 상기 흡수성 물질은 스폰지, 종이 등을 이용할 수 있다.

이하에 세포 유래의 전체 RNA의 검출을 예로서 구체적으로 설명한다.

(1) 세포로부터 전체 RNA의 제조

세포로부터의 전체 RNA의 제조는 통상법 [예를 들면 Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 참조]에 따라 행할 수 있다. 또한, 시판되는 키트 (예를 들면 RNeasy Total RNA KIT (Quiagen 사 제품))를 이용해서도 행할 수 있다.

상기에서 얻어진 전체 RNA는 형광 물질, 방사성 물질 등으로 검출 가능하도록 표지한다. 형광 표지인 경우, 형광 물질로서 예를 들면, 형광물질 (FITC), 술포로다민 (TR), 테트라메틸로다민 (TRITC) 등을 이용할 수 있다.

(2) 하이브리다이제이션

상기 7에서 제작한 섬유 배열체 박편에 상기와 마찬가지로 제조한 표지 전체 RNA를 하이브리다이즈시킨다. 하이브리다이제이션의 조건은 섬유 배열체 박편상의 고정화 프로브의 종류 등에 의해 최적화할 필요가 있다. 즉, 섬유 배열체 박편상의 프로브가 상동성이 높은 염기 서열만 하이브리다이즈하는 조건을 설정할 필요가 있다. 예를 들면, 하이브리다이제이션을 섬유 배열체 박편의 표지 전체 RNA 용액에의 침지에 의해 행할 경우, 하이브리다이제이션 및 세정에서의 용액의 염 농도 (예를 들면 NaCl, 시트르산 3나트륨의 농도 등), 온도, 시간 등을 프로브가 상동성이 높은 염기 서열로만 하이브리다이즈하기 위해 설정한다. 여기서 염 농도가 낮을수록 또는 온도가 높을수록, 상동성이 높은 하이브리드 형성을 촉진할 수 있다.

(3) 검출

하이브리다이제이션에 의해, 섬유 배열체 박편상에 형성된 이중쇄는 RI 또는 형광 이미지 스캐너로 해석한다. 이 때, 섬유 배열체 박편상의 각 섬유 단위의 위치는 상기 8에서 얻어진 각 섬유 단위의 좌표 데이터에 기초하여 인식한다. 섬유 배열체 박편상의 형광 강도는 형광 레이저 현미경과 CCD 카메라 및 컴퓨터를 연결한 장치로 자동적으로 측정할 수 있다. 스캐너는 각 섬유 단위의 직경이 약 10 내지 500 ㎛에서, 스폿사이의 거리가 약 10 내지 1000 ㎛ 정도인 스폿을 정량적으로 식별할 수 있는 것이 바람직하다. 또한 , 복수 종류의 표지에 대응할 수 있는 것, 광범위하고 고속으로 스캔이 가능한 것, 기판이 미크로인 왜곡에 대응 가능한 오토포커스 기능을 갖는 것이 바람직하다. 이러한 기능을 구비한 스캐너로서는 예를 들면 GMS 418 어레이 리더 (Array Reader, Micro Systems 사 (GMS)사 제조) 등을 들 수 있다. 또한, 데이터 해석에 이용하는 소프트는 변이나 다형의 해석과 같이 부분적으로 중복한 서열의 올리고뉴클레오티드가 다수 포함되는 복잡한 해석에도 대응할 수 있는 것이 바람직하다.

도면의 간단한 설명

도 1의 A 내지 F는 핵산 고정화 섬유 (중공 섬유, 다공질 섬유, 다공질 중공 섬유, 겔 유지 중공 섬유, 겔 유지 다공질 섬유, 겔 유지 다공질 중공 섬유)를 도시하는 모식도이다.

도 2는 2종의 핵산 고정화 섬유로 이루어진 핵산 고정화 섬유 배열체를 도시하는 모식도이다.

도 3은 핵산 고정화 섬유 배열체의 박편을 표시하는 모식도이다. 핵산 고정화 섬유 배열체를 섬유축에 대해 수직방향으로 절단한 단면을 도시한다.

도 4는 지그로서 다공판을 이용한 경우의 섬유 배열체를 제조하는 방법을 도시하는 모식도이다.

도 5는 지그로서 그물을 구성하는 지지선군을 이용한 경우의 섬유 배열체를 제조하는 방법을 도시하는 도식도이다.

도 6은 중공 섬유 배열체의 내부에 생체 관련 물질을 도입하는 공정의 모식도이다.

도 7은 서브마린형 영동조를 도시한 도면이다.

도 8은 블로팅 장치를 도시한 도면이다.

도 9는 프로브 제작을 위해 합성한 올리고뉴클레오티드의 위치를 도시한 도면이다.

<부호의 설명>

11 다공판

12 중공 섬유

21 지지선군

22 중공 섬유

31 중공 섬유 배열체 (수지로 고정)

32 수지로 고정되지 않은 중공 섬유

33 생체 관련 물질이 들어간 용기

34 연속면

실시예

본 발명을 이하의 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 단지, 본 발명은 이들 실시예에 의해 그 기술적 범위가 한정되는 것은 아니다.

<참고예 1> 중공 섬유의 전처리 (1)

나일론 제조 중공 섬유 (외부 직경 약 300 ㎛) 약 1 m의 중공부에 실온의 포름산 (순도 99 %) 0.1 ㎖을 주입하여 10초간 유지하였다. 다음으로 중공부에 실온의 물을 다량으로 주입하여 충분히 세정 후, 건조하고, 나일론제 중공 섬유의 전처리를 하였다.

<참고예 2> 중공 섬유의 전처리 (2)

포름산 (순도 99 %) 대신에, 황산의 10 % 에탄올 용액을 이용한 것 외에는 실시예 1과 마찬가지로 나일론제 중공 섬유의 전처리를 행하였다.

<참고예 3> 5' 말단에 아미노기 또는 비오틴을 갖는 올리고뉴클레오티드의 제조

이하에 표시한 올리고뉴클레오티드 (프로브 A, 프로브 B)를 합성하였다.

프로브 A: GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (서열번호 1)

프로브 B: GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (서열번호 2)

올리고뉴클레오티드의 합성은 PE 바이오시스템사의 자동 합성기 DNA/RNA 합성기 (모델 394)를 이용하여 행하고, DNA 합성의 최종 공정으로 아미노링크 Ⅱ(상표명) (어플라이드바이오시스템사)를 이용하여 각각의 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 $NH_2(CH_2)_6$-를 도입하여 아미노화한 프로브 및 비오틴아미다이드를 이용하여 비오틴화한 프로브를 제조하였다. 이들은, 일반적 수법에 의해 탈보호 및 정제하여 사용했다.

<실시예 1> 핵산 고정화 중공 섬유 제작 (1)

참고예 1 및 참고예 2에서 전처리한 나일론제 중공 섬유에 대해 참고예 3에서 제작한 것에 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 및 프로브 B)를 각각, 이하의 방법에 의해 중공 섬유 내부에 고정화하였다.

1O mM 인산칼륨용액 (pH 8) 완충액에 참고예 3에서 제작한 것에 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드 (0.1 내지 30 mM)를 가한 용액을, 참고예 1 및 실시예 2에서 전처리한 나일론제 중공 섬유에 주입한 후, 20 ℃에서 철야 반응을 행하였다. 반응 후, 10 mM 인산칼륨용액 (pH 8) 완충액, 1M 인산칼륨용액 (pH 8) 완충액, 1M KCl 용액, 물에서, 중공 섬유를 세정하고 올리고뉴클레오티드가 중공 섬유 내벽면에 고정화된 핵산 고정화 중공 섬유를 얻었다 (도 1의 A). 도 1의 A에서 (1)은 프로브 A가 고정된 중공 섬유, (2)는 프로브 B가 고정된 중공 섬유를 나타낸다. 또한, 도 2의 섬유 다발 중 흰 동그라미(○)로 표시한 섬유는 프로브 A가 고정화된 것을, 검정 동그라미(●)으로 표시한 섬유는 프로브 B가 고정된 것을 나타낸다.

<실시예 2> 핵산 고정화 중공 섬유의 제작 (2)

참고예 1 및 참고예 2에서 전처리한 나일론제 중공 섬유에 대하여, 참고예 3에서 제작한 것에 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 및 프로브 B)를 각각 이하의 방법에 의해 중공 섬유 내부에 고정화하였다.

참고예 3에서 제작한 것에 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드의 용액 (핵산 농도 10 ㎍/㎖, 용매로서 0.1M $MgCl_2$을 포함하는 인산완충액-생리식염수를 사용)의 2500 ㎕과, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) -카르보디이미드(EDC) O.O6 g를 혼합한 용액을 참고예 1 및 참고예 2에서 전처리한 나일론 중공 섬유에 주입하였다. 그 후, 1/15 mol/ℓ 인산염 완충액 (pH 8.0)으로 세정하여, 동완충액 5 ㎖에 침지하였다. 이것에, EDC 0.12 g를 첨가하여 실온에서 3시간 진탕한 후, 1/15 mo1/ℓ 인산염 완충액 (pH 8.0)에서 한번 더 세정하여, 올리고뉴클레오티드가 중공 섬유의 내벽면에 고정화된 핵산 고정화 중공 섬유를 얻었다.

<실시예 3> 핵산 고정화 섬유 배열체의 제작

실시예 1에서 얻은 프로브 A가 고정화된 나일론 섬유(참고예 1의 전처리를 행한 것, 길이 2O cm) 2O개를 테플론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양끝을 고정하였다. 이것에, 폴리우레탄 수지접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하여, 폴리우레탄 수지가 충분히 굳은 후 이것을 테플론판 위에서 박리하여 프로브 A가 고정화된 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 한편, 프로브 B가 고정화된 섬유에 관해서도 동일 조작에 의해 시트형물을 얻었다. 계속해서, 이러한 시트형물을 도 2의 배열이 되도록 20매 적층하여, 상기 접착제를 사용하여 접착하고 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유가 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 섬유 배열체를 얻었다.

참고예 2에 의해 표면 처리를 행한 섬유 각각에 대해서도 같은 조작에 의해 핵산 고정화 섬유 배열체를 얻었다.

또한, 실시예 2에서 얻어진 핵산 고정화 섬유에 관해서도 상기와 같이 하여 핵산 고정화 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 4> 핵산 고정화 섬유 배열체의 제작

실시예 1에서 얻은 프로브 A가 고정화된 표면 처리가 다른 2종의 나일론 중공 섬유 (길이 20 cm) 20개를 각각 테플론판상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하여, 양끝을 고정하였다. 이것에, 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하여, 폴리우레탄 수지가 충분히 굳어진 후, 이것을 테플론판상으로부터 박리하여 프로브 A가 고정화된 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 한편, 프로브 B가 고정화된 섬유에 관해서도 동일한 조작을 행하였다.

다음으로, 표면 처리의 동일 섬유끼리에 관해 프로브 A가 고정화된 섬유로 이루어진 시트형물, 프로브 B가 고정화된 섬유로 이루어진 시트형물 및 섬유 배열체의 일렬을 구성하는 섬유 중 일부를 프로브 B가 고정화된 섬유, 잔여분 일부를 프로브 A가 고정화된 섬유로 한 시트형물을 제작하였다. 이러한 시트형물을 도 2에 도시한 바와 같이 20매 적층하여, 상기 접착제를 사용하여 접착하고 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유가 규칙적으로 사각으로 배열된 2종의 핵산 고정화 섬유 배열체를 얻었다 (도 3).

또한, 실시예 2 및 3에서 얻어진 핵산 고정화 중공 섬유에 관해서 상기와 같이 하여 4종의 핵산 고정화 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 5> 핵산 고정화 섬유 배열체의 박편의 제작

실시예 4에서 얻어진 핵산 고정화 섬유 배열체를 섬유축으로 직각 방향으로미크로톰을 이용하여 100 ㎛의 두께로 절단함으로써 종횡 각각 20개씩 총 400 개의 섬유 단면이 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 섬유 배열체의 박편을 얻었다 (도 3).

<참고예 4> 시료 핵산의 표지

시료 핵산의 모델로서, 참고예 3에서 합성한 올리고뉴클레오티드 (프로브 A, 프로브 B)의 배열 일부에 상보적인 올리고뉴클레오티드(C,D)를 합성하였다.

올리고뉴클레오티드 C: GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (서열번호 3)

올리고뉴클레오티드 D: CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (서열번호 4)

이러한 올리고뉴클레오티드의 5' 말단을 참고예 3과 동일하게 하여 아미노링크 Ⅱ(상표명) (PE바이오시스템즈 쟈판사)를 이용하여 각각의 올리고뉴클레오티드의 5'말단에 $NH_2(CH_2)_6$-를 도입한 후, 하기와 같이 하여 디곡시게닌 (DIG: Digoxigenin, 로슈·다이아그노스틱스 가부시끼 가이샤)로 표지하였다.

말단 아미노화된 올리고뉴클레오티드를 각각 100 mM 붕산 완충액 (pH 8.5)에 최종 농도 2 mM이 되도록 녹였다. 등량의 디곡시게닌-3-0-메틸카르보닐-ε-아미노카프론산-N-히드록시-숙신이미드 에스테르 (26 mg/㎖ 디메틸포름아미드용액)을 첨가하여, 실온에서 하루를 방치하였다.

상기 용액의 양을 100 ㎕로 조정하고, 2 ㎕의 글리코겐(로슈·다이아그노스틱스 가부시끼 가이샤) 10 ㎕의 3M 아세트산나트륨 (pH 5.2), 300 ㎕의 냉에탄올을 첨가하여, 15,000 rpm에서 15분간 원심에 의해 침전을 회수하였다. 침전에 500 ㎕의 70 % 에탄올을 첨가하여 15,000 rpm에서 5분간 원심에 의해 침전을 다시 튜브의 바닥에 모았다. 침전을 풍건하여 100 ㎕의 10 mM 트리스(Tris)-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA에 녹였다.

이렇게 해서 얻어진 DIG 표지 올리고뉴클레오티드를 시료 핵산의 모델로 이용하였다.

<실시예 6> 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유의 제작 (1)

참고예 3에서 얻어진 5' 말단에 비오틴기를 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이하의 조성으로 이루어지는 수용액을 제작했다.

아크릴아미드 3.7 중량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.3 중량부

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 중량부

비오틴화 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B) 0.005 중량부

아비딘화 아가로스 (6 %) 현탁액 1.0 중량부

본 용액을 참고예 1 및 참고예 2에서 전처리한 나일론제 중공 섬유 (외부 직경 300 마이크론)의 중공부에 주입한 후, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기에 옮기고, 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

그 결과, 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B)가 비오틴-아비딘 결합을 통해 고정화된 겔을 내부에 유지한 중공 섬유를 얻을 수 있었다 (도 1의 B). 도 1의 B에서 (1)은 프로브 A가 고정된 겔을 유지하는 중공 섬유, (2)는 프로브 B가 고정화된겔을 유지하는 중공섬유를 나타낸다. 또한, (3) 및(4)의 섬유 다발 중 흰 동그라미(○)로 표시한 섬유는 프로브 A가 고정화된 것을, 검정 동그라미(●)로 표시한 섬유는 프로브 B가 고정된 것을 나타낸다.

<실시예 7> 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유의 제작 (2)

나일론제 중공 섬유 대신, 표면을 친수화 처리한 폴리에틸렌제 중공 섬유 (외부 직경 약 300 ㎛, 폴리에틸렌비닐알콜 공중합체로 표면을 피복)를 이용하여, 실시예 1과 동일한 방법에 의해, 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유를 얻었다.

<실시예 8> 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유 배열체의 제작

실시예 6에서 얻은 프로브 A 고정화 겔을 유지 하는 나일론 중공 섬유(참고예 1의 표면 처리를 행한 것, 길이 20 cm) 20개를 테플론판상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하여 양끝을 고정하였다. 이것에, 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하여, 폴리우레탄 수지가 충분히 굳어진 후 이것을 테플론판상에서 박리하여, 프로브 A 고정화 겔을 유지하는 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 한편, 프로브 B 고정화 겔을 유지하는 중공 섬유에 관해서도 같은 조작에 의해 시트형물을 얻었다. 계속해서, 이러한 시트형물을 도 2의 배열이 되게 20매 적층하여 상기 접착제를 사용하여 접착하고 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유가 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유 배열체를 얻었다.

참고예 2에 의해 표면 처리를 행한 섬유에 대해서도 동일한 조작에 의해 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유 배열체를 얻었다.

또한 실시예 7에서 얻어진 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유에 관해서도 상기와 같이 하여 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 9> 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유 배열체의 박편 제작

실시예 8에서 얻어진 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유 배열체를 섬유축에 직각 방향으로 미크로톰을 이용하여 100 ㎛의 두께로 절단함으로써 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유 단면이 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 겔 유지 중공 섬유 배열체의 박편을 얻었다 (도 3).

<실시예 10> 핵산 고정화 겔 유지 섬유의 제작

참고예 3에서 얻어진 5' 말단에 비오틴기를 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이하의 조성으로 구성된 수용액을 제조하였다.

아크릴아미드 3.7 중량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.3 중량부

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 중량부

비오틴화 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B) 0.005 중량부

아비딘화 아가로스 (6 %) 현탁액 1.0 중량부

본 용액에 25 tex의 방적사 2개를 합사한 면사 (미리 메틸에틸케톤으로 세정한 후, 건조)를 침지한 후, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기로 옮겨 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

그 결과, 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B)가 비오틴-아비딘 결합을 통해 고정화된 겔을 유지한 섬유를 얻을 수 있었다 (도 1의 C). 도 1의 C에서 (1)은 프로브 A를 고정화한 핵산 고정화 겔 유지 섬유, (2)는 프로브 B를 고정화한 핵산 고정화 겔 유지 섬유를 나타낸다.

<실시예 11> 핵산 고정화 겔 유지 섬유 배열체의 제작

실시예 10에서 얻은 프로브 A가 고정화된 겔을 유지하는 섬유 20개를 테플론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 프로브 A가 고정화된 핵산 고정화 겔 유지 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 한편, 프로브 B가 고정화된 핵산 고정화 겔 유지 섬유에 대해서도 동일한 조작에 의해 시트형물을 얻었다. 이어서, 이들 시트형물을 도 2의 배열이 되도록 20장 적층하여 상기 접착제로 접착하고, 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유가 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 12> 핵산 고정화 겔 유지 섬유 배열체의 박편 제작

실시예 11에서 얻어진 핵산 고정화 겔 유지 섬유 배열체를 섬유축에 직각 방향으로 미크로톰을 사용하여 100 ㎛의 두께로 절단함으로써 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유 단면이 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 겔 유지 섬유 배열체 박편을 얻었다 (도 3).

<실시예 13>

표면이 친수화 처리된 시판되고 있는 나일론제 다공질 중공사막 (중공사 외경 약 0.6 mm)을 참고예 3에 의해 합성한 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 B; 단 최종 단계에서 아미노기의 도입을 행하지 않은 것) 수용액 (핵산 농도 10 mg/ℓ)에 침지하고, 공기 중에서 건조 후 80 ℃로 1시간 베이킹하여 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 B)가 고정화된 다공질 나일론 중공사막을 얻었다 (도 1의 D). 도 1의 D에서 (1)은 프로브 A가 고정화된 다공질 나일론 중공사, (2)는 프로브 B가 고정화된 다공질 나일론 중공사를 나타낸다.

<실시예 14>

참고예 3에 의해 얻은 5' 말단에 아미노기를 갖는 25 ㎖의 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 B) 용액 (핵산 농도 10 mg/ℓ. 용매로서 0.1 mol/ℓ 염화마그네슘을 포함하는 인산 완충액 (pH=8.0)을 사용) 과, 0.6 g의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드, 0.05 g의 실시예 1에서 사용한 나일론제 다공질 중공사막을 5 ㎖의 물에 침지한 것을 혼합하고, 실온에서 10분간 방치하였다.

이것을 50 mmol/ℓ 인산 완충액 (pH=8.0)으로 세정한 후, 동일한 완충액 50 ㎖에 침지하였다. 여기에 1.2 g의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드를 첨가하여 실온에서 3시간 침투시킨 후, 50 mmol/ℓ 인산 완충액 (pH=8.0)으로 세정하여 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 B)가 고정화된 다공질 나일론 중공사막을 얻었다 (도 1의 D). 도 1의 D에서 (1)은 프로브 A를 다공질부에 고정화한 핵산 고정화 다공질 중공 섬유, (2)는 프로브 B를 다공질부에 고정화한 핵산 고정화 다공질 중공 섬유를 나타낸다.

<실시예 15>

2 ㎖의 N,N-디메틸포름아미드에 1 g의 브롬화시안을 용해하였다. 이것을 길이 약 20 cm의 다공질 셀룰로스 섬유 5 g을 포함하는 수용액에 첨가하고, pH가 10.5 내지 11.5로 유지되도록 5 mol/ℓ의 수산화나트륨 수용액을 첨가하면서 15 내지 20 ℃에서 10 내지 20분간 방치하였다. 반응 후, 약 15배량의 냉수로 세정하고, 마지막으로 10 mmol/ℓ의 인산 완충액 (pH=8.0)으로 세정하였다.

얻어진 다공질 셀룰로스 섬유를 포함하는 10 mmol/ℓ 인산 완충액에 참고예 3에서 조정한 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 B) (0.1 내지 30 mmol/ℓ)를 첨가하여 20 ℃에서 하룻밤 방치하고 반응시켰다. 반응 종료 후, 10 mmol/ℓ 인산 완충액 (pH=8.0), 1 mmol/ℓ의 인산 완충액 (pH=8.0), 1 mol/ℓ의 염화칼륨 수용액, 물로 순차 세정하고, 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 B)가 고정화된 다공질 셀룰로스 섬유를 얻었다 (도 1의 D(3) 및 (4)). 도 1의 D에서 (3)은 프로브 A를 다공질부에 고정화한 핵산 고정화 다공질 섬유, (4)는 프로브 B를 다공질부에 고정화한 핵산 고정화 다공질 섬유를 나타낸다.

<실시예 16>

실시예 13에 의해 얻은 프로브 A가 고정화된 다공질 중공 섬유 20개를 테플론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고, 핵산 고정화 다공질 섬유를 접착하였다. 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 핵산 고정화 다공질 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다.

프로브 B가 고정화된 핵산 고정화 다공질 중공 섬유에 대해서도 프로브 A 때와 동일한 조작에 의해 시트형물을 얻었다. 이어서, 이들 시트형물을 도 2의 배열이 되도록 20장 적층하고, 폴리우레탄 수지 접착제로 접착하여 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유가 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 다공질 섬유 배열체를 얻었다.

또한, 실시예 14 및 15에서 얻어진 다공질 섬유에 대해서도 상기와 동일한 조작을 행하여 핵산 고정화 다공질 섬유 배열체를 얻었다 (도 2).

<실시예 17>

실시예 16에서 얻은 2종의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 핵산 고정화 다공질 섬유 배열체를 미크로톰을 사용하여 0.1 mm의 두께로 절단하고, 종횡 각 20개씩 총 400개의 핵산 고정화 다공질 섬유의 단면이 규칙적으로 배열된 박편을 얻었다 (도 3). 박편에는 1 cm^2당 약 220의 밀도로 핵산이 고정화되어 있었다.

<실시예 18> 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유의 제작

참고예 3에서 얻어진 5' 말단에 비오틴기를 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이하의 조성으로 구성된 수용액을 제조하였다.

아크릴아미드 3.7 중량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.3 중량부

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 중량부

비오틴화 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B) 0.005 중량부

아비딘화 아가로스 (6 %) 현탁액 1.0 중량부

본 용액에 폴리에틸렌제 다공질 섬유 (외경 200 ㎛)를 침지한 후, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기로 옮겨 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

그 결과, 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B)가 비오틴-아비딘 결합을 통해 고정화된 겔을 다공질 섬유의 공극 부분에 유지한 섬유를 얻을 수 있었다 (도 1의 E). 도 1의 E에서 (1)은 프로브 A를 다공질부에 고정화한 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유, (2)는 프로브 B를 다공질부에 고정화한 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유를 나타낸다.

<실시예 19> 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유 배열체의 제작

실시예 18에서 얻은 프로브 A 또는 프로브 B가 고정화된 겔을 유지하는 다공질 섬유 20개를 테플론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 프로브 A가 고정화된 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 한편, 프로브 B가 고정화된 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유에 대해서도 동일한 조작에 의해 시트형물을 얻었다. 이어서, 이들 시트형물을 도 2의 배열이 되도록 20장 적층하여 상기 접착제로 접착하고, 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유가 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 20> 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유 배열체의 박편 제작

실시예 19에서 얻어진 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유 배열체를 섬유축에 직각 방향으로 미크로톰을 사용하여 100 ㎛의 두께로 절단함으로써, 종횡 각각 20개씩 총 400개의 섬유 단면이 규칙적으로 사각으로 배열된 핵산 고정화 겔 유지 다공질 섬유 배열체 박편을 얻었다 (도 3).

<실시예 21>

이하의 조성으로 이루어지는 수용액 A를 조정하고, 이 수용액 A에 무공질 중간층을 갖는 폴리에틸렌제 다공질 중공사막 MHF200TL (미쯔비시 레이온 가부시끼 가이샤 제조, 외경 290 ㎛, 내경 200 ㎛)을 침지한 후, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기로 옮겨 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

얻어진 다공질 중공사막의 중공부 및 무공질 중간층보다 내측의 다공질층에는 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B)가 비오틴-아비딘 결합을 통해 고정화된 겔이 유지되어 있었다 (도 1의 F). 도 1의 F에서 (1)은 프로브 A가 겔에 고정화된 핵산 고정화겔을 유지하는 다공질 중공 섬유, (2)는 프로브 B가 겔에 고정화된 핵산 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유를 나타낸다.

수용액 A

아크릴아미드 3.7 질량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.3 질량부

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 질량부

비오틴화 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B) 0.005 질량부

아비딘화 아가로스 (6 %) 현탁액 1.O 질량부

<실시예 22>

실시예 21에 의해 얻은 프로브 A 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유 20개를 테플론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고, 핵산 고정화 다공질 중공 섬유를 접착하였다. 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다.

한편, 프로브 B 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유에 대해서도 동일한 조작에 의해 시트형물을 얻었다.

이어서, 이들 시트형물을 도 2의 배열이 되도록 20장 적층하고, 상기 접착제로 접착하여 종횡 각각 20개씩 총 400개의 핵산 고정화 다공질 섬유가 사각으로 규칙적으로 배열된 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다 (도 3).

<실시예 23>

실시예 22에서 얻은 2종의 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 및 B)를 포함하는 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 미크로톰을 사용하여 0.1 mm의 두께로 절단하고, 종횡 각각 20개씩 총 400개의 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유의 단면이 규칙적으로 배열된 박편을 얻었다 (도 3). 이 박편에는 1 cm^2당 약 1100의 밀도로 핵산이 고정화되어 있었다.

<실시예 24> 다공질 중공 섬유의 제작

이하의 조성으로 이루어지는 수용액 A를 조정하고, 이 수용액 A에 무공질 중간층을 갖는 폴리에틸렌제 다공질 중공사막 MHF200TL (미쯔비시 레이온 가부시끼 가이샤 제조, 외경 290 ㎛, 내경 200 ㎛)을 침지한 후, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기로 옮겨 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

얻어진 다공질 중공사막의 중공부 및 무공질 중간층보다 내측의 다공질층에는 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B)가 비오틴-아비딘 결합을 통해 고정화된 겔이 유지되어 있었다 (도 1의 D). 도 1의 D에서 (1)은 프로브 A가 겔에 고정화된 핵산 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유, (2)은 프로브 B가 겔에 고정화된 핵산 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유를 나타낸다.

수용액 A

아크릴아미드 3.7 질량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.3 질량부

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 질량부

비오틴화 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 또는 프로브 B) 0.005 질량부

아비딘화 아가로스 (6 %) 현탁액 1.0 질량부

<실시예 25> 다공질 중공 섬유 배열체의 제작

실시예 24에 의해 얻은 프로브 A 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유 20개를 테플론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고, 핵산 고정화 다공질 중공 섬유를 접착하였다. 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다.

한편, 프로브 B 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유에 대해서도 동일한 조작에 의해 시트형물을 얻었다.

이어서, 이들 시트형물을 도 2의 배열이 되도록 20장 적층하고, 상기 접착제로 접착하여 종횡 각각 20개씩 총 400개의 핵산 고정화 다공질 섬유가 사각으로 규칙적으로 배열된 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다 (도 2).

<실시예 26> 핵산 고정화 박편의 제작

실시예 25에서 얻은 2종의 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 및 B)를 포함하는 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 미크로톰을 사용하여 0.1 mm의 두께로 절단하고, 종횡 각각 20개씩 총 400개의 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유의 단면이 규칙적으로 배열된 박편을 얻었다 (도 3). 이 박편에는 1 cm^2당 약 1100의 밀도로 핵산이 고정화되어 있었다.

<실시예 27> 핵산 고정화 박편의 제작 및 핵산 검출

(1) 염색체 DNA의 제조

로도코커스·로도크로우스 J1주를 영양 배지 (글루코스 15 g, 효모 엑기스 1 g, 글루타민산나트륨 10 g, KH_2P0_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/ℓ, pH 7.2) 100 ㎖에서 30 ℃로 3일 배양하고 집균하였다. 이 균체로부터 염색체 DNA를 제조하고, PCR 주형에 사용하였다. 또한, 로도코커스·로도크로우스 J1주는 FERM BP-1478로서 공업 기술원 생명 공학 공업 기술 연구소 (이바라끼껭 쯔꾸바시 히가시 1쪼메 1방 3고)에 기탁되어 있다.

(2) 프로브의 제작

프로브 제작을 위해 합성한 올리고뉴클레오티드의 위치를 도 9에 나타내었다. 올리고뉴클레오티드 A (서열번호 1)는 올리고뉴클레오티드 B (서열번호 2)의 약 400 염기 상류에 위치하고 있으며, 올리고뉴클레오티드 E (서열번호 5)는 올리고뉴클레오티드 A로부터 400 염기, 올리고뉴클레오티드 F (서열번호 6)는 올리고뉴클레오티드 B로부터 600 염기 하류에 위치하고 있다.

올리고뉴클레오티드 E: GCTCAAGCGC GATTTCGGTT TCGACATCCC C (서열번호 5)

올리고뉴클레오티드 F: CATGTCGCGT CGTTGTTGGA CGAAGCGGTA (서열번호 6)

올리고뉴클레오티드 A, B의 5' 말단을 아크릴아미드 수식 (W098/39351) 한 올리고뉴클레오티드 (5' 말단에 아크릴아미드가 결합된 올리고뉴클레오티드) (와꼬 쥰야꾸에 위탁 합성)를 합성하여 PCR에 사용하였다.

PCR은 한쪽의 프라이머를 다른쪽보다 과잉량 존재시키는 비대칭(Asymmetric) PCR을 행하고, 프라이머 농도를 5' 아크릴아미드 수식 올리고뉴클레오티드 A:올리고뉴클레오티드 E=100:1 또는 5' 아크릴아미드 수식 올리고뉴클레오티드 B:올리고뉴클레오티드 F=100:1로 제조하였다. 그 밖의 조건은 Ex-Taq (다까라 슈조)의 사양 설명서에 따라 TaKaRa PCR 열사이클러(Thermal Cycler) PERSONAL을 사용하여 행하였다. 반응은 100 ㎕에서 행하고 온도 조건은 93 ℃에서 30초, 65 ℃에서 30초, 72 ℃에서 2분을 40 사이클 행하였다.

이 PCR에 의해 약 400 (프로브 G: 서열번호 7), 600 염기 (프로브 H: 서열번호 8)의 5' 아크릴아미드 수식된 프로브 DNA를 증폭하였다.

(3) 핵산 고정화 박편의 제작

핵산 고정화 박편은 실시예 24 내지 26과 동일하게 하여 제작하였다. 단, 핵산의 겔에 대한 고정화에는 공정 2에서 제작한 아크릴아미드 수식된 프로브 DNA를 사용하였다. 이에 따라, 수용액 A의 조성은 이하와 같이 변경하였다.

수용액 A

아크릴아미드 3.7 질량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.3 질량부

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 질량부

프로브 G (또는 프로브 H) 0.005 질량부

얻어진 다공질 중공사막의 중공부 및 무공질 중간층보다 내측의 다공질층에는 프로브 G 또는 H가 고정화된 겔이 유지되어 있었다.

이와 같이 하여 얻어진 프로브 G 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유 5개를 프론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고, 핵산 고정화 다공질 중공 섬유를 접착하였다. 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 프로브 H에 대해서도 동일한 것을 얻었다. 또한, 핵산을 고정화하지 않은 동일한 시트형물을 제작하였다 (블랭크).

이어서, 이들 시트형물을 블랭크, 프로브 G, 블랭크, 프로브 H, 블랭크의 순서로 5장 적층하고, 상기 접착제로 접착하여 종횡 각각 5개씩 총 25개의 핵산 고정화 다공질 섬유가 사각으로 규칙적으로 배열된 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다.

(4) 형광 표지 검체의 제작

프로브 G에만 하이브리다이즈되는 검체 제작에는 올리고뉴클레오티드 E와 올리고뉴클레오티드 A를 사용하여 PCR을 행하고, 약 400 염기의 검체 I을 제조하였다. 프로브 H에만 하이브리다이즈되는 검체 제작에는 올리고뉴클레오티드 F와 올리고뉴클레오티드 B를 사용하여 PCR을 행하고, 약 600 염기의 검체 J를 제조하였다.

검체를 형광 표지하기 위해서 올리고뉴클레오티드 E, F의 5' 말단이 Cy5로 라벨된 것 (Cy5-올리고뉴클레오티드 E, Cy5-올리고뉴클레오티드 F)을 합성하고 (아마샴 파마시아 바이오테크사, OlidoExpress), PCR에 사용하였다. PCR은 프라이머의 농도를 Cy5-올리고뉴클레오티드 E:올리고뉴클레오티드 A=100:1 또는 Cy5-올리고뉴클레오티드 F:올리고뉴클레오티드 B=100:1로 제조하고, 그 밖에는 Ex-Taq (다까라 슈조)의 사양 설명서에 따라 TaKaRa PCR 열 사이클러 PERSONAL을 사용하여 행하였다. 반응은 100 ㎕에서 행하고, 온도 조건은 93 ℃에서 30초, 65 ℃에서 30초, 72 ℃에서 2분을 40 사이클 행하였다. 이 PCR에 의해 약 400 (검체 I: 서열번호 9), 600 염기 (검체 J: 서열번호 10)의 DNA를 증폭하였다.

반응 종료액은 SUPEC-02 (다까라 슈조)를 사용하여 미반응 프라이머를 제거하고, GFX PCR DNA 및 겔 밴드 정제 키트 (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, 아마샴 파마시아 바이오테크)에 의해 회수하였다.

(5) 하이브리다이제이션

상기 공정 (3)에서 얻은 핵산 고정화 박편을 하이브리다이제이션용 백에 넣어 하이브리다이제이션 용액을 넣고, 45 ℃에서 30분간 프리-하이브리다이제이션을 행하였다. 이어서, 형광 표지 검체를 첨가하여 45 ℃에서 15시간 하이브리다이제이션을 더 행하였다.

하이브리다이제이션 종료 후, 핵산 고정화 박편을 미리 보온해 둔 50 ㎖의 0.1xSSC, 0.1 % SDS 용액으로 옮겨 진탕하면서 45 ℃로 20분간의 세정을 3회 행하였다. 그 후, 0.5 xSSC로 치환하여 형광 검출기 (형광 현미경)로 관찰하였다. 그 결과, 핵산 고정화 박편 중의 프로브 G를 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 I가, 프로브 H를 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 J가 특이적으로 하이브리다이제이션되는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 28> 핵산 고정화 박편의 제작 및 핵산 검출

(1) 효모 (JCM7255) 염색체 DNA의 제조

사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) (JCM7255)를 YPD 배지 (글루코스 20 g, 효모 엑기스 10 g, 폴리펩톤 20 g/ℓ pH6.0) 100 ㎖에서 30 ℃로 1일 배양하고 집균하였다. 이 균체로부터 염색체 DNA를 제조하고, PCR 주형에 사용하였다.

(2) 프로브의 제작

효모 유전자군으로부터 임의로 4종의 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 선별하고, 그 ORF를 PCR로 증폭하였다. 4종의 프로브 (서열번호 11, 12, 13, 14) 와 PCR에 사용한 올리고의 관계를 표 1에 나타내었다.

[표 1]

프로브	PCR용 프라이머		검체
프로브 K (서열번호 11)	올리고뉴클레오티드 O (서열번호 15)	올리고뉴클레오티드 S (서열번호 19)	올리고뉴클레오티드 W (서열번호 23)
프로브 L (서열번호 12)	올리고뉴클레오티드 P (서열번호 16)	올리고뉴클레오티드 T (서열번호 20)	올리고뉴클레오티드 X (서열번호 24)

프로브 M (서열번호 13)	올리고뉴클레오티드 Q (서열번호 17)	올리고뉴클레오티드 U (서열번호 21)	올리고뉴클레오티드 Y (서열번호 25)
프로브 N (서열번호 14)	올리고뉴클레오티드 R (서열번호 18)	올리고뉴클레오티드 V (서열번호 22)	올리고뉴클레오티드 Z (서열번호 26)

올리고뉴클레오티드 중 올리고 O, P, Q, R은 5' 말단을 아크릴아미드 수식한 올리고뉴클레오티드이고, 합성에 의해 얻었다 (제조는 와꼬 쥰야꾸에 위탁). PCR은 한쪽의 프라이머를 다른쪽보다 과잉량 존재시키는 비대칭 PCR을 행하고, 프로브 K를 증폭하는 경우에는 프라이머의 농도를 5' 아크릴아미드 수식 올리고뉴클레오티드 O:올리고뉴클레오티드 P=100:1로 제조하였다. 그 밖의 조건은 Ex-Taq (다까라 슈조)의 사양 설명서에 따라 TaKaRa PCR 열 사이클러 PERSONAL을 사용하여 행하였다. 반응은 100 ㎕에서 행하고, 온도 조건은 93 ℃에서 30초, 65 ℃에서 30초, 72 ℃에서 2분을 40 사이클 행하였다. 이 PCR에 의해 약 600 (프로브 K: 서열번호 11)의 5' 아크릴아미드 수식된 프로브 DNA를 증폭하였다. 동일한 방법으로 프로브 L, M, N을 제조하였다.

(3) 핵산 고정화 박편의 제작

핵산 고정화 박편은 실시예 24 내지 26과 동일하게 하여 제작하였다. 단, 핵산의 겔에 대한 고정화에는 공정 2에서 제작한 아크릴아미드 수식된 프로브 DNA를 사용하였다. 이에 따라, 수용액 A의 조성은 이하와 같이 변경하였다.

수용액 A

아크릴아미드 3.7 질량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.3 질량부

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 질량부

프로브 K (또는 프로브 L, M, N) 0.005 질량부

이와 같이 하여 얻어진 프로브 K 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유 7개를 프론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고, 핵산 고정화 다공질 중공 섬유를 접착하였다. 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 프로브 L, M, N에 대해서도 동일한 것을 얻었다. 또한, 핵산을 고정화하지 않은 동일한 시트형물을 제작하였다 (블랭크).

이어서, 이들 시트형물을 블랭크, 프로브 K, 프로브 L, 블랭크, 프로브 N, 프로브 M, 블랭크의 순서로 7장 적층하고, 상기 접착제로 접착하여 종횡 각각 7개씩 총 49개의 핵산 고정화 다공질 섬유가 사각으로 규칙적으로 배열된 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다.

(4) 형광 표지 검체의 제작

각각의 프로브에만 하이브리다이즈되는 검체 W (서열번호 23) 및 Z (서열번호 26)는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단이 Cy5로 라벨된 것을, 검체 X (서열번호 24) 및 Y (서열번호 25)는 5' 말단이 Cy3으로 라벨된 것을 합성 (아마샴 파마시아 바이오테크사, OlidoExpress) 하여 사용하였다.

(5) 하이브리다이제이션

공정 3에서 얻은 핵산 고정화 박편을 하이브리다이제이션용 백에 넣어 하이브리다이제이션 용액을 넣고, 45 ℃에서 30분간 프리-하이브리다이제이션을 행하였다. 이어서, 형광 표지 검체를 첨가하여 45 ℃에서 15시간 하이브리다이제이션을 더 행하였다.

하이브리다이제이션 종료 후, 핵산 고정화 박편을 미리 보온해 둔 50 ㎖의 0.1xSSC, 0.1 % SDS 용액으로 옮겨 진탕하면서 45 ℃에서 20분간의 세정을 3회 행하였다. 그 후, 0.5 xSSC로 치환하여 형광 검출기 (형광 현미경)로 관찰하였다.

그 결과, 핵산 고정화 박편 중의 프로브 K를 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 W가, 프로브 L을 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 X가, 프로브 M을 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 Y가, 프로브 N을 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 Z가 특이적으로 하이브리다이제이션되는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 29>

(1) 하이브리다이제이션

실시예 5, 9, 12, 17, 20, 23, 26에서 제작한 핵산 고정화 박편을 하이브리다이제이션용 백에 넣어 이하의 조성으로 이루어지는 하이브리다이제이션 용액을 넣고, 45 ℃에서 30분간 하이브리다이제이션을 행하였다.

참고예 4에서 얻어진 DIG 표지 DNA를 첨가하여 45 ℃에서 15시간 하이브리다이제이션을 행하였다.

하이브리다이제이션 용액 조성:

5xSSC (0.75M 염화나트륨, 0.075M 시트르산나트륨, pH 7.0)

5 % 블록킹 시약 (로슈·다이아그노스틱스 가부시끼 가이샤)

0.1 % N-라우로일잘코신나트륨

0.02 % SDS (라우릴 황산나트륨)

50 % 포름아미드

(2) 검출:

하이브리다이제이션 종료 후, 핵산 고정화 박편을 미리 보온해 둔 50 ㎖의 0.1xSSC, 0.1 % SDS 용액으로 옮겨 진탕하면서 20분간의 세정을 45 ℃에서 3회 행하였다.

DIG 완충액 1을 첨가하고 실온에서 진탕하면서 SDS를 제거하였다. 이것을 다시 반복한 후, DIG 완충액 2를 첨가하여 1시간 진탕하였다. 완충액을 제거한 후, DIG 완충액 2에 10000분의 1 양의 항 DIG 알칼리포스파타제 표지 항체 용액을 첨가한 용액 10 ㎖를 첨가하고, 30분간 천천히 진탕시킴으로써 항원 항체 반응을 행하였다. 이어서, 0.2 % 트윈(Tween) 20을 포함하는 DIG 완충액 1에서 15분간 2회 진탕함으로써 세정하고, 계속해서 DIG 완충액 3에 3분간 침지하였다. DIG 완충액 3을 제거한 후, AMPPD를 포함하는 DIG 완충액 3 ㎖를 첨가하여 10분간 평형화하였다.

수분을 제거하고 새로운 하이브리다이제이션용 백으로 옮겨 37 ℃에서 1시간 방치한 후, X선 필름용 바인더에 X선 필름과 함께 끼워 필름을 감광시켰다.

그 결과, 모두 프로브 A가 배치된 장소에는 올리고뉴클레오티드 C가 결합되고, 프로브 B가 배치된 장소에는 올리고뉴클레오티드 D가 결합되는 것이 확인되었다.

DIG 완충액 1: 0.1 M 말레산, 0.15 M 염화나트륨 (PH 7.5)

DIG 완충액 2: DIG 완충액 1에 0.5 % 농도로 블록킹 시약을 첨가한 것

DIG 완충액 3: 0.1 M 트리스-염산 (pH 9.5), 0.1 M 염화나트륨, 0.05 M 염화마그네슘

블록킹 시약: 항 DIG 알칼리포스파타제 표지 항체 용액 및 AMPPD는 DIG 검출 (Detection) 키트 (로슈·다이아그노스틱스 가부시끼 가이샤) 중의 시약이다.

<실시예 30> 섬유 배열체 박편의 제작

섬유 단위별로 식별이 가능하도록 섬유 단위로서 오렌지색, 핑크색, 엷은 녹색, 청색, 녹색, 청녹색, 적색, 갈색, 백색, 황색으로 염색된 섬유 굵기가 약 0.25 (mm) 인 10개의 섬유를 준비하고, 오렌지색, 핑크색 섬유를 좌표 기준으로서 약 10 mm 각, 길이 50 mm의 플라스틱 용기 중에 그 10개의 섬유를 적당한 간격으로 매달아 폴리우레탄 수지 접착제를 플라스틱 용기에 충전·경화시켜 섬유 배열체를 제작하였다.

이 섬유 배열체를 플라스틱 용기에서 꺼내 섬유 배열체를 섬유축에 직각 방향으로 미크로톰을 사용하여 0.25 mm의 두께로 잘라내고, 섬유 배열체 박편을 얻었다.

<실시예 31> 섬유 단위 좌표의 결정

이하와 같이 하여 섬유 단위 좌표를 결정하였다. 즉, 우선 실시예 30에서 얻어진 섬유 배열체 박편을 절단한 순서대로 1, 2, 3, …, m으로 번호를 붙였다. 섬유 배열체로부터 절단된 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표를 결정하기 위해, 절단된 박편 중 1번째부터 5번째까지를 XY 좌표를 해독할 수 있는 XY 스테이지가 설치된 투영 현미경 (Nikon PROFILER PROJECTOR V-12 확대 배율 100배) 위에 놓고, 육안으로 1번째로 잘라낸 박편 중의 섬유 단위별 단면의 무게 중심 위치의 XY 스테이지 상에서의 좌표를 해독하고, 1번째 박편의 좌표 기준 좌표를 기초로 식 1, 2에 의해 1번째 박편의 좌표 기준을 기초로 한 1번째 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표를 구하였다. 구한 좌표를 표 2에 나타내었다.

[표 2]

1번째 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표

1번째 박편 좌표 기준의 섬유 단위	X (mm)	Y (mm)		
오렌지색 (P1)	4.147	7.894		
핑크색 (P2)	12.084	7.744		
θ1 (라디안)	-0.0189			
섬유 단위	1번째 박편 중의 섬유 단위의 XY 스테이지 상에서의 좌표		1번째 박편 중의 섬유 단위의 좌표 기준을 기초로 한 좌표	
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
엷은 녹색	6.636	4.056	2.561	-3.790
청색	6.062	5.182	1.966	-2.675
녹색	5.266	8.840	1.101	0.967
청녹색	9.792	4.100	5.716	-3.687
적색	9.866	4.998	5.773	-2.787
갈색	10.876	7.463	6.736	-0.304
백색	8.044	9.870	3.859	2.049
황색	8.800	10.480	4.603	2.673

2번째로 잘라낸 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표를 결정하기 위해, 2번째로 절단한 박편을 XY 스테이지가 설치된 투영 현미경 위에 놓고, 1번째로 잘라낸 박편 중의 섬유 단위마다의 1번째 박편의 좌표 기준을 기초로 한 좌표 데이타로부터 식 3, 4에 의해 1번째 박편 중의 섬유 단위와 동일하게 2번째 박편 중의 섬유 단위의 XY 스테이지 상에서의 좌표를 구하고, 그 좌표 위치로 XY 스테이지를 이동시켰다. 이 때, 그 좌표 위치에 가장 가까운 섬유 단위가, 섬유 단위색에서 1번째 박편 중의 섬유 단위와 동일한 것을 확인할 수 있었다. 그 좌표 위치에 가장 가까운 섬유 단위 단면의 무게 중심 위치의 XY 스테이지 상의 좌표를 해독하고, 2번째 박편의 좌표 기준을 기초로 식 1, 2에 의해 2번째 박편의 좌표 기준을 기초로 한 1번째 박편 중의 섬유 단위와 동일하게 2번째 박편 중의 섬유 단위의 2차원 좌표를 구하였다. 구한 좌표를 표 3에 나타내었다. 표

3으로부터도 알 수 있는 바와 같이, 계산에 의해 구한 각 섬유 단위의 좌표와 투영 현미경을 사용하여 육안 관측에 의해 구한 각 섬유 단위의 좌표는 서로 유사하며, 상기 방법에 의해 매우 정확하게 각 섬유 단위의 좌표를 추측할 수 있는 것을 알았다.

[표 3]

2번째 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표

2번째 박편 좌표 기준의 섬유 단위	X (mm)	Y (mm)				
오렌지색 (P3)	3.893	19.277				
핑크색 (P4)	11.738	20.350				
θ2 (라디안)	0.1359					
섬유 단위	식(3),(4)에 의해 산출한 1번째박편 중의 섬유단위에 상당하는 계산 좌표		2번째박편 중의 섬유 단위의 XY 스테이지 상에서의 좌표		2번째박편 중의 섬유 단위의 좌표 기준을 기초로 한 좌표	
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
엷은 녹색	6.944	15.869	6.910	15.870	2.527	-3.784
청색	6.203	16.893	6.160	16.885	1.922	-2.677
녹색	4.853	20.384	4.830	20.351	1.074	0.937
청녹색	10.056	16.399	10.004	16.421	5.668	-3.658
적색	9.990	17.298	9.943	17.306	5.727	-2.773
갈색	10.608	19.889	10.545	19.858	6.669	-0.326
백색	7.439	21.830	7.443	21.819	3.862	2.037
황색	8.092	22.550	8.052	22.492	4.556	2.622

마찬가지로, 2번째로 잘라낸 박편 중의 섬유 단위의 좌표 데이타로부터 3번째로 잘라낸 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표를 구할 수 있었다.

동일한 조작을 반복하여 m번째 박편 중에 포함되는 섬유 단위의 2차원 좌표를 구할 수 있었다. 이 때, 모든 박편에서도 동일한 섬유 단위이면 n-1번째로 잘라낸 박편 중의 섬유 단위의, n-1번째 박편의 좌표 기준을 기초로 한 좌표 데이타로부터 식 3, 4에 의해 구한 XY 스테이지 상에서의 좌표와, n번째 박편 중의 XY 스테이지 상에서의 좌표 위치가 가장 가까운 섬유 단위가, 섬유 단위색에서 n-1번째 박편 중의 섬유 단위와 동일한 것을 확인할 수 있었다. 또한, n-1번째로 잘라낸 박편 중의 n-1번째 좌표 기준을 기초로 한 섬유 단위의 좌표와, n 번째로 잘라낸 박편 중의 n 번째 좌표 기준을 기초로 한 섬유 단위의 좌표가, 가장 가까운 것이 동일 섬유 단위인 것도 확인할 수 있었다. 표 4, 5 및 6에 각각 3, 4, 5번째로 잘라낸 박편 중의 섬유 단위의 좌표를 나타내었다.

[표 4]

3번째 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표

3번째 박편 좌표 기준의 섬유 단위	X (mm)	Y (mm)				
오렌지색 (P3)	4.66	30.414				
핑크색 (P4)	12.575	30.399				
θ2 (라디안)	-0.0019					
섬유 단위	식(3),(4)에 의해 산출한 2번째박편 중의 섬유단위에 상당하는 계산 좌표		3번째박편 중의 섬유 단위의 XY 스테이지 상에서의 좌표		3번째박편 중의 섬유 단위의 좌표 기준을 기초로 한 좌표	
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)

엷은 녹색	7.180	26.625	7.190	26.629	2.537	-3.780
청색	6.577	27.733	6.626	27.742	1.971	-2.668
녹색	5.736	31.349	5.730	31.339	1.068	0.927
청녹색	10.321	26.745	10.315	26.736	5.662	-3.667
적색	10.382	27.630	10.389	27.638	5.734	-2.765
갈색	11.329	30.076	11.325	30.026	6.666	-0.375
백색	8.526	32.444	8.522	32.385	3.858	1.978
황색	9.221	33.027	9.212	32.992	4.547	2.587

[표 5]

4번째 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표

4번째 박편 좌표 기준의 섬유 단위	X (㎜)	Y (㎜)				
오렌지색 (P3)	15.506	7.738				
핑크색 (P4)	23.356	7.173				
θ2 (라디안)	-0.0719					
섬유 단위	식(3),(4)에 의해 산출한 3번째박편 중의 섬유단위에 상당하는 계산 좌표		4번째박편 중의 섬유 단위의 XY 스테이지 상에서의 좌표		4번째박편 중의 섬유 단위의 좌표 기준을 기초로 한 좌표	
	X (㎜)	Y (㎜)	X (㎜)	Y (㎜)	X (㎜)	Y (㎜)
엷은 녹색	17.765	3.785	17.721	3.789	2.493	-3.780
청색	17.280	4.935	17.240	4.939	1.930	-2.667
녹색	16.638	8.586	16.623	8.549	1.056	0.889
청녹색	20.890	3.674	20.846	3.700	5.616	-3.644
적색	21.027	4.568	20.969	4.583	5.675	-2.755
갈색	22.128	6.885	22.059	6.853	6.600	-0.412
백색	19.496	9.434	19.417	9.392	3.782	1.930
황색	20.227	9.992	20.177	9.977	4.498	2.569

[표 6]

5번째 박편 중의 섬유 단위별 2차원 좌표

5번째 박편 좌표 기준의 섬유 단위	X (㎜)	Y (㎜)				
오렌지색 (P3)	15.78	18.445				
핑크색 (P4)	23.575	18.323				
θ2 (라디안)	-0.0156					
섬유 단위	식(3),(4)에 의해 산출한 4번째박편 중의 섬유단위에 상당하는 계산 좌표		5번째박편 중의 섬유 단위의 XY 스테이지 상에서의 좌표		5번째박편 중의 섬유 단위의 좌표 기준을 기초로 한 좌표	
	X (㎜)	Y (㎜)	X (㎜)	Y (㎜)	X (㎜)	Y (㎜)
엷은 녹색	18.213	14.627	18.195	14.662	2.474	-3.745
청색	17.668	15.748	17.634	15.768	1.896	-2.648
녹색	16.850	19.317	16.845	19.346	1.051	0.918
청녹색	21.338	14.713	21.297	14.715	5.575	-3.643

적색	21.412	15.602	21.375	15.624	5.638	-2.733
갈색	22.372	17.929	22.309	17.904	6.537	-0.439
백색	19.592	20.316	19.581	20.301	3.771	1.915
황색	20.318	20.943	20.297	20.881	4.478	2.506

<실시예 32> 섬유 단위 좌표를 행하게 한 컴퓨터 해독이 가능한 기록 매체

실시예 31에서 결정된 각 섬유 배열체 내의 각각의 섬유 단위의 좌표 데이타를 퍼스널 컴퓨터 (닛본 덴끼사 제조 PC9821 형)를 사용하여 텍스트 형식으로 플로피 디스크에 기록하였다. 얻어진 좌표 정보 기록 디스크로부터 상기 퍼스널 컴퓨터를 사용하여 데이타를 해독했더니, 입력했을 때의 형태대로 섬유 단위의 좌표 데이타를 출력할 수 있었다.

<실시예 33>

중공 섬유 배열체의 제작 (1):

1 cm^2 사방으로 종횡 각각 20개씩 총 400개의 구멍이 규칙성있게 사각으로 배열된 섬유 가이드판 2장을 준비하고, 이 섬유 가이드판의 각 구멍에 나일론제 중공 섬유 (외경 약 300 ㎛, 길이 약 50 cm) 400개를 통과시킴으로써 중공 섬유 배열체를 얻었다.

2장의 섬유 가이드판의 간격을 20 cm로 하고, 그 사이를 폴리우레탄 수지에 의해 고정화함으로써 양단에 수지로 고정화되지 않은 부분을 갖는 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 34>

중공 섬유 배열체의 제작 (2):

나일론제 중공 섬유 대신에 폴리에틸렌-비닐 알콜 공중합체로 내표면을 친수화 처리한 폴리에틸렌제 중공 섬유 (외경 약 300 ㎛, 길이 약 50 cm)를 사용하여 실시예 33과 동일한 방법에 의해 양단에 수지로 고정화되지 않은 부분을 갖는 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 35>

다공질 중공 섬유 배열체의 제작:

나일론제 중공 섬유 대신에 무공질 중간층을 갖는 폴리에틸렌제 다공질 중공사막 MHF200TL (미쯔비시 레이온 가부시끼가이샤 제조, 외경 290 ㎛, 내경 200 ㎛, 길이 약 50 cm)을 사용한 것 이외는, 실시예 33과 동일하게 하여 양단에 수지로 고정화되지 않은 부분을 갖는 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 36>

중공 섬유의 내표면 처리 (1):

실시예 33에서 얻어진 중공 섬유 배열체를 구성하는 각 중공 섬유의 중공부에, 수지로 고정화되지 않은 한쪽의 섬유 부분에서 포름산을 도입하여 1분간 유지하였다. 이어서, 중공부에 실온의 물을 다량 도입하여 충분히 세정하고, 그 후 건조함으로써 나일론제 중공 섬유의 전처리를 행하였다.

<실시예 37>

중공 섬유의 내표면 처리 (2):

포름산 대신에 황산의 10 % 에탄올 용액을 사용한 것 이외는 실시예 36과 동일하게 하여 나일론제 중공 섬유의 전처리를 행하였다.

<실시예 38>

중공 섬유 배열체로의 생체 관련 물질의 도입 및 고정화 (1):

실시예 33에서 제작한 중공 섬유 배열체에 대하여 실시예 36 및 37에 의해 각 구성 중공 섬유의 내표면 처리를 행한 후, 생체 관련 물질의 일례로서 참고예 3에서 합성한 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드 (프로브 A 및 프로브 B)를 이하의 방법에 의해 중공 섬유 배열체를 구성하는 각 중공 섬유 내부에 도입하여 고정화하였다.

중공 섬유 배열체의 한쪽단으로부터, 인산칼륨 용액 완충액에 참고예 1에서 합성한 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드를 첨가한 용액을 도입한 후, 20 ℃에서 하룻밤 유지하였다.

그 후, 인산칼륨 용액 완충액, 염화칼륨 용액, 물로 중공 섬유 내부를 세정하고, 올리고뉴클레오티드가 중공 섬유 내벽면에 고정화된 핵산 고정화 중공 섬유 배열체를 얻었다.

이 때, 프로브 A 및 프로브 B의 올리고뉴클레오티드는 중공 섬유 배열체에서의 배열이 도 2와 같이 되도록 도입하고 고정화하였다.

<실시예 39>

중공 섬유 배열체로의 생체 관련 물질의 도입 및 고정화 (2):

실시예 34에서 제작한 중공 섬유 배열체를 사용하여 실시예 38과 동일한 방법에 의해 올리고뉴클레오티드가 중공 섬유 내벽면에 고정화된 핵산 고정화 중공 섬유 배열체를 얻었다.

이 때에도 중공 섬유 배열체에서의 프로브 A 및 프로브 B의 올리고뉴클레오티드의 배열은 실시예 38과 동일하다.

<실시예 40>

생체 관련 물질 고정화 섬유 배열체 박편의 제작:

실시예 38 및 39에서 얻어진 생체 관련 물질 고정화 중공 섬유 배열체를 각각의 섬유축에 직각 방향으로 미크로톰을 사용하여 약 100 ㎛의 두께로 박편을 절단함으로써, 종횡 각각 20개씩 총 400의 올리고뉴클레오티드가 규칙적으로 사각으로 배열된 생체 관련 물질 고정화 섬유 배열체 박편을 얻었다 (도 3).

<실시예 41>

(1) 하이브리다이제이션:

실시예 40에서 제작한 각각의 올리고뉴클레오티드가 규칙적으로 사각으로 배열된 생체 관련 물질 서열 시트를 하이브리다이제이션용 백에 넣고, 이하의 조성으로 이루어지는 하이브리다이제이션 용액을 넣어 45 ℃에서 30분간 프리-하이브리다이제이션하였다.

참고예 4에서 얻어진 DIG 표지 DNA를 첨가하여 45 ℃에서 15시간 하이브리다이제이션하였다.

하이브리다이제이션 용액 조성:

5xSSC (0.75 M 염화나트륨, 0.075 M 시트르산나트륨, PH 7.0)

5 % 블록킹 시약 (로슈·다이아그노스틱스 가부시끼 가이샤)

0.1 % N-라우로일잘코신나트륨

0.02 % SDS (라우릴 황산나트륨)

50 % 포름아미드

(2) 검출:

하이브리다이제이션 종료 후, 올리고뉴클레오티드가 규칙적으로 사각으로 배열된 생체 관련 물질 서열 박편을 미리 보온해 둔 50 ㎖의 0.1xSSC, 0.1 % SDS 용액으로 옮겨 진탕하면서 20분간의 세정을 45 ℃에서 3회 행하였다.

DIG 완충액 1을 첨가하고 실온에서 진탕하면서 SDS를 제거하였다. 이것을 다시 반복한 후, DIG 완충액 2를 첨가하여 1시간 진탕하였다. 완충액을 제거한 후, DIG 완충액 2에 10000분의 1 양의 항 DIG 알칼리포스파타제 표지 항체 용액을 첨가한 용액 10 ㎖를 첨가하고, 30분간 천천히 진탕시킴으로써 항원 항체 반응을 행하였다. 이어서, 0.2 % 트윈 20을 포함하는 DIG 완충액 1에서 15분간 2회 진탕함으로써 세정하고, 계속해서 DIG 완충액 3에 3분간 침지하였다. DIG 완충액 3을 제거한 후, AMPPD를 포함하는 DIG 완충액 3 ㎖를 첨가하여 10분간 평형화하였다.

수분을 제거하고 새로운 하이브리다이제이션용 백으로 옮겨 37 ℃에서 1시간 방치한 후, X선 필름용 바인더에 X선 필름과 함께 끼워 필름을 감광시켰다.

그 결과, 모든 생체 관련 물질 서열 박편이 프로브 A가 배치된 장소에는 올리고뉴클레오티드 C가 결합되고, 프로브 B가 배치된 장소에는 올리고뉴클레오티드 D가 결합되는 것이 확인되었다.

DIG 완충액 1: 0.1 M 말레산, 0.15 M 염화나트륨 (PH 7.5)

DIG 완충액 2: DIG 완충액 1에 0.5 % 농도로 블록킹 시약을 첨가한 것

DIG 완충액 3: 0.1 M 트리스-염산 (pH 9.5), 0.1 M 염화나트륨, 0.05 M 염화마그네슘

블록킹 시약: 항 DIG 알칼리포스파타제 표지 항체 용액 및 AMPPD는 DIG 검출 키트 (로슈·다이아그노스틱스 가부시끼 가이샤) 중의 시약이다.

<실시예 42>

중공 섬유 배열체의 제작 (1):

직경 0.32 mm의 구멍이 10 mm^2 사방으로 0.5 mm의 피치로 종횡 각 2O개씩 총 400개 배열된 두께 0.1 mm의 다공판 2장을 사용하고, 그 다공판의 모든 구멍에 나일론제 중공 섬유 (외경 0.3 mm, 길이 500 mm) 400개를 통과시킴으로써 중공 섬유 배열체를 얻었다.

2장의 섬유 가이드판의 간격을 50 mm로 하고, 그 사이를 폴리우레탄 수지에 의해 고정화함으로써 양단에 수지로 고정화되지 않은 부분을 갖는 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 43>

중공 섬유 배열체의 제작 (2):

나일론제 중공 섬유 대신에 폴리에틸렌-비닐알콜 공중합체로 내표면을 친수화 처리한 폴리에틸렌제 중공 섬유 (외경 0.3 mm, 길이 500 mm)를 사용하고, 실시예 42와 동일한 방법에 의해 양단에 수지로 고정화되지 않은 부분을 갖는 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 44>

중공 섬유 배열체의 제작 (3):

나일론제 중공 섬유 대신에 폴리메틸메타크릴레이트제 중공 섬유 (외경 0.3 mm, 길이 500 mm)를 사용하고, 실시예 42와 동일한 방법에 의해 양단에 수지로 고정화되지 않은 부분을 갖는 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 45>

다공질 중공 섬유 배열체의 제작:

나일론제 중공 섬유 대신에 무공질 중간층을 갖는 폴리에틸렌제 다공질 중공사막 MHF200TL (미쯔비시 레이온 가부시끼 가이샤 제조, 외경 0.29 mm, 내경 0.2 mm, 길이 500 mm)을 사용한 것 이외는, 실시예 42와 동일하게 하여 양단에 수지로 고정화되지 않은 부분을 갖는 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 46>

폴리에틸렌성 다공질 중공사막 MHF20OTL (미쯔비시 레이온 가부시끼 가이샤 제조, 외경 290 ㎛, 내경 200 ㎛)을 25개 묶어, 그 일단부는 중공사막의 중공부가 개구된 상태가 되도록 우레탄 수지로 굳혔다. 반응 용기 내에서 이하의 조성으로 이루어지는 에탄올 용액 A를 이 블럭의 중공 섬유 내에 흡인시켜 충전하였다. 그 후, 반응 용기 내의 압력을 상압에서 약간 감압하여 중공부의 에탄올 용액 A의 일부를 방출하였다. 다시 반응 용기 내를 상압으로 되돌리고, 질소 분위기하 70 ℃에서 3시간 중합함으로써 처리하였다. 중합 종료 후, 진공 건조기 내에서 하룻밤 건조함으로써 에탄올을 제거하였다.

에탄올 용액 A

N,N-디메틸아크릴아미드 19 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 1 질량부

2,2'-아조비스이소부티로니트릴 0.1 질량부

에탄올 80 중량부

<실시예 47>

이하의 조성으로 이루어지는 에탄올 용액 B를 조정하고, 실시예 46과 동일하게 하여 중공 섬유 내의 처리를 행하였다.

에탄올 용액 B

N,N-디메틸아크릴아미드 10 질량부

2-히드록시에틸 (메트)아크릴레이트 9 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 1 질량부

2,2'-아조비스이소부티로니트릴 0.1 질량부

에탄올 80 중량부

<실시예 48>

이하의 조성으로 이루어지는 에탄올 용액 C를 조정하고, 실시예 46과 동일하게 하여 중공 섬유 내의 처리를 행하였다.

에탄올 용액 C

N,N-디메틸아크릴아미드 38 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 2 질량부

2,2'-아조비스이소부티로니트릴 0.2 질량부

에탄올 60 중량부

<실시예 49>

이하의 조성으로 이루어지는 에탄올 용액 D를 조정하고, 실시예 46과 동일하게 하여 중공 섬유 내의 처리를 행하였다.

에탄올 용액 D

N,N-디메틸아크릴아미드 19 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 1 질량부

과산화벤조일 0.1 질량부

에탄올 80 중량부

<실시예 50>

이하의 조성으로 이루어지는 에탄올 용액 E를 조정하고, 실시예 46과 동일하게 하여 중공 섬유 내의 처리를 행하였다.

에탄올 용액 E

N,N-디메틸아크릴아미드 19 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 1 질량부

2,2'-아조비스이소부티로니트릴 0.1 질량부

에탄올 80 중량부

<실시예 51>

폴리메타크릴산메틸성 중공 섬유 (외경 300 ㎛, 내경 180 ㎛)를 25개 묶어, 그 일단부는 중공 섬유의 중공부가 개구된 상태가 되도록 우레탄 수지로 굳혔다. 이하의 조성으로 이루어지는 에탄올 용액 F를 조정하고, 실시예 46과 동일하게 하여 중공 섬유 내의 처리를 행하였다.

에탄올 용액 F

N,N-디메틸아크릴아미드 19 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 1 질량부

2,2'-아조비스이소부티로니트릴 0.1 질량부

에탄올 80 중량부

<실시예 52>

실시예 46에서 중공 섬유 내에 처리를 행한 블럭을 사용하여 처리 효과를 확인하였다. 각 중공 섬유 내에서 하기의 방법으로 아크릴아미드 겔의 중합을 행한 후, 블럭을 중공 섬유축에 직각 방향으로 슬라이스하여 두께 약 750 ㎛의 박편을 얻었다. 이 박편을 수중에 넣어 38 ℃에서 하룻밤, 50 ℃에서 1시간 진탕하였다. 진탕 후, 박편을 관찰하고 25개의 중공 섬유 전체에 아크릴아미드 겔이 충전되어 있는 것을 확인하였다.

<아크릴아미드 겔의 중합>

이하의 조성으로 이루어지는 수용액 G를 조정하고, 반응 용기 내에서 실시예 46에서 실시예 51까지 제작한 블럭의 중공 섬유 내로 흡인시켜 충전하였다. 수용액 충전 후, 질소 분위기하에서 70 ℃로 3시간 중합하였다.

수용액 G

아크릴아미드 9 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 1 질량부

2,2'-아조비스(2-메틸프로피온아미딘)

디히드로클로라이드 (V-50) 0.1 질량부

물 90 중량부

<실시예 53>

실시예 47에서 중공 섬유 내에 처리를 행한 블럭을 사용하고, 실시예 52와 동일한 방법으로 처리 효과를 확인하였다. 조작 후, 박편을 관찰하고 25개의 중공 섬유 전체에 아크릴아미드 겔이 충전되어 있는 것을 확인하였다.

<실시예 54>

실시예 48에서 중공 섬유 내에 처리를 행한 블럭을 사용하고, 실시예 52와 동일한 방법으로 처리 효과를 확인하였다. 조작 후, 박편을 관찰하고 25개의 중공 섬유 전체에 아크릴아미드 겔이 충전되어 있는 것을 확인하였다.

<실시예 55>

실시예 49에서 중공 섬유 내에 처리를 행한 블럭을 사용하고, 실시예 52와 동일한 방법으로 처리 효과를 확인하였다. 조작 후, 박편을 관찰하고 25개의 중공 섬유 전체에 아크릴아미드 겔이 충전되어 있는 것을 확인하였다.

<실시예 56>

실시예 50에서 중공 섬유 내에 처리를 행한 블럭을 사용하고, 실시예 52와 동일한 방법으로 처리 효과를 확인하였다. 조작 후, 박편을 관찰하고 25개의 중공 섬유 전체에 아크릴아미드 겔이 충전되어 있는 것을 확인하였다.

<실시예 57>

실시예 51에서 중공 섬유 내에 처리를 행한 블럭을 사용하고, 실시예 52와 동일한 방법으로 처리 효과를 확인하였다. 조작 후, 박편을 관찰하고 25개의 중공 섬유 전체에 아크릴아미드 겔이 충전되어 있는 것을 확인하였다.

<비교예 1>

중공 섬유의 내벽이 미처리된 폴리에틸렌성 다공질 중공사막 MHF200TL (미쯔비시 레이온 가부시끼 가이샤 제조, 외경 290 ㎛, 내경 200 ㎛)을 25개 묶고, 그 일단부는 중공사막의 중공부가 개구된 상태가 되도록 우레탄 수지로 굳혔다.

<비교예 2>

이하의 조성으로 이루어지는 에탄올 용액 G를 조정하고, 실시예 46과 동일하게 하여 중공 섬유 내의 처리를 행하였다.

에탄올 용액 G

N,N-디메틸아크릴아미드 86 질량부

N,N'-메틸렌비스아크릴아미드 4 질량부

2,2'-아조비스이소부티로니트릴 0.45 질량부

에탄올 10 중량부

<비교예 3>

비교예 1에서 제작한 블럭을 사용하고, 실시예 46과 동일한 방법에 의해 처리 효과를 관찰하였다. 블럭을 슬라이스하여 박편을 얻을 때, 25개의 중공 섬유 중 4개에서 겔 탈락이 관찰되었다. 박편을 진탕한 후에는 총 12개의 중공 섬유에서 겔 탈락이 관찰되었다.

<비교예 4>

비교예 2에서 제작한 블럭을 사용하고, 실시예 46과 동일한 방법에 의해 처리 효과를 관찰하고자 했지만, 중공 섬유 내부가 처리용 겔에 의해 막혀 아크릴아미드 수용액을 주입할 수 없었다.

<참고예 5>

(a) 메타크릴레이트기를 갖는 올리고뉴클레오티드 프로브의 제조

이하에 나타낸 올리고뉴클레오티드 (프로브 A, 프로브 B)를 합성하였다.

프로브 A: GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (서열번호 1)

프로브 B: GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (서열번호 2)

올리고뉴클레오티드의 합성은 PE 바이오시스템즈사의 자동 합성기 DNA/RNA 합성기 (모델 394)를 사용하여 행하고, DNA 합성의 최종 과정에서 아미노 링크 II (상품명) (어플라이드 바이오 시스템사)를 사용하여 각각의 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 $NH_2(CH_2)_6$-을 도입하여 아미노화한 프로브를 제조하였다. 이들은 일반적인 방법에 의해 탈보호 및 정제하여 사용하였다.

얻어진 프로브 A 또는 B (500 nmol/㎖) 5 ㎕ 및 글리시딜메타크릴레이트 (GMA) 0.5 ㎕를 혼합하여 70 ℃에서 2시간 반응시켜 메타크릴레이트기를 갖는 올리고뉴클레오티드 프로브를 조정하고, 물 190 ㎕를 첨가하여 100 nmol/㎖의 메타크릴레이트기를 갖는 프로브 (GMA 변성 프로브 A 및 GMA 변성 프로브 B) 용액을 얻었다.

(b) 시료 핵산의 모델 제조

시료 핵산의 모델로서 (a)에서 합성한 올리고뉴클레오티드 (프로브 A, 프로브 B)의 서열 일부에 상보적인 올리고뉴클레오티드 (C, D)를 합성하였다.

올리고뉴클레오티드 C: GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (서열번호 3)

올리고뉴클레오티드 D: CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (서열번호 4)

올리고뉴클레오티드의 합성은 (a) 과 동일하게 행하고, 올리고뉴클레오티드 C의 5' 말단에 Cy3을, 올리고뉴클레오티드 D의 5' 말단에 Cy5를 도입한 형광 표지 시료 핵산의 모델을 제조하였다. 이들은 일반적인 방법에 의해 탈보호 및 정제하여 사용하였다.

(c) 섬유 배열체의 제조

폴리에틸렌제 다공질 중공사막 MHF20OTL (미쯔비시 레이온 가부시끼 가이샤 제조, 외경 290 ㎛, 내경 200 ㎛) 5개를 테플론판 상에 서로 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교(주) 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고, 중공 섬유를 접착하였다. 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 이것을 테플론판 상에서 박리하고, 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 이들 시트형물을 5장 적층하여 상기 접착제로 접착하고, 종횡 각각 5개씩 총 25개의 중공 섬유가 사각으로 규칙적으로 배열된 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다.

<실시예 58>

(1) 형광 표지 올리고뉴클레오티드의 합성

참고예 5(a) 와 동일하게 하여 5' 말단에 형광물질 이소티오시아네이트 (FITC)를 도입한 GCAT 배열의 올리고뉴클레오티드를 합성하였다.

(2) 메타크릴레이트기를 갖는 형광 색소의 제조

(1)에서 얻어진 5' 말단에 FITC를 갖는 올리고뉴클레오티드 (500 nmol/㎖) 50 ㎕ 및 글리시딜메타크릴레이트 5 ㎕, 디메틸포름아미드 (DMF) 5 ㎕를 혼합하여 70 ℃에서 2시간 반응시켜 메타크릴레이트기를 갖는 형광 색소를 제조하고, 물 190 ㎕을 첨가하여 100 nmol/㎖의 메타크릴레이트기를 갖는 형광 색소 (GMA 변성 FITC) 용액을 얻었다.

(3) 생체 관련 물질 고정화 겔 유지 섬유 배열체의 제조

표 7의 구성으로 이루어지는 중합체 1 내지 3을 조정하여 참고예 5(c)에서 얻어진 배열체의 소정의 열의 중공 섬유 중공부에 충전하고, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기로 옮겨 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

<단량체액 및 중합 개시제액의 조정>

하기의 질량비로 혼합하여 단량체액 및 개시제액을 제조하였다.

a) 단량체액

아크릴아미드 0.76 질량부

메틸렌비스아크릴아미드 0.04 질량부

물 4.2 질량부

b) 개시제액

2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.01 질량부

물 4.99 질량부

<중합액의 제조>

상술한 단량체액 a), 개시제액 b) 및 참고예 5(a)에서 제조한 GMA 변성 프로브 A 또는 GMA 변성 프로브 B, (2)에서 제조한 GMA 변성 FITC를 표 7에 나타낸 체적비로 혼합하여 중합액 1 내지 3을 제조하였다. 얻어진 중합액을 참고예 (c)에서 얻어진 중공 섬유 배열체의 소정열의 중공 섬유 중공부에 충전하고, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기로 옮겨 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

[표 7]

	중합액 1	중합액 2	중합액 3
단량체액	500 ㎕	500 ㎕	500 ㎕
개시제액	500 ㎕	500 ㎕	500 ㎕
GMA 변성 FITC (100 nmol/㎖)	5 ㎕	5 ㎕	5 ㎕
GMA 변성 프로브 A (100 nmol/㎖)	0	50 ㎕	0
GMA 변성 프로브 B (100 nmol/㎖)	0	0	50 ㎕
배열체 서열번호	1,3,5	2	4

(4) 슬라이스 및 겔의 충전 상태 관찰

(3)에서 얻어진 배열체로부터 미크로톰을 사용하여 500 ㎛의 박편을 절단하였다. 이 박편을 형광 현미경 (니콘 제조 형광 현미경 E400)으로 FITC용 필터 (여기 파장역 465 내지 495 nm, 형광 파장역 515 내지 555 nm)를 사용하여 관찰했더니 겔의 충전 상태를 쉽게 관찰할 수 있었다.

(5) 하이브리다이제이션

(4)에서 얻어진 박편을 하이브리다이제이션용 백에 넣어 이하의 조성으로 이루어지는 하이브리다이제이션 용액을 넣고, 45 ℃에서 30분간 프리-하이브리다이제이션을 행하였다.

<하이브리다이제이션 용액 조성>

5xSSC (0.75 mol/ℓ 염화나트륨, 0.075 mol/ℓ 시트르산나트륨, Ph 7.0)

5 % 블록킹 시약 (로슈·다이아그노스틱스 가부시끼 가이샤)

0.1 % N-라우로일잘코신나트륨

0.02 % SDS (라우릴 황산나트륨)

50 % 포름아미드

이어서, 참고예 5(b)에서 제조한 형광 표지 시료 핵산의 모델을 50 pmol/㎖의 농도가 되도록 첨가하고, 45 ℃에서 15시간 하이브리다이제이션하였다.

하이브리다이제이션 종료 후, 핵산 고정화 박편을 미리 보온해 둔 50 ㎖의 0.1xSSC, 0.1 % SDS 용액으로 옮겨 진탕하면서 45 ℃에서 20분간의 세정을 3회 행하였다.

(6) 검출

(5)에서 얻어진 하이브리다이제이션 후의 칩을 CY3용 필터 (여기 파장 P역 535 nm, 반값폭 50 nm, 형광 파장 피크 610 nm, 반값폭 75 nm)로 관찰했더니, GMA 변성 FITC의 형광에 방해되지 않고, 배열체 서열번호 2만이 형광을 발생하는 화상을 얻을 수 있었다. 이어서, (4) 와 동일하게 형광 현미경으로 FITC용 필터를 사용하여 관찰하고, CY3용 필터로 형광이

관찰되지 않은 서열번호에 대해서도 겔이 모든 중공사에 충전되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 CY5용 필터(여기 파장 P역 620 nm, 반값폭 60 nm, 형광 파장 피크 700 nm, 반값폭 75 nm)로 관찰했더니 GMA 변성 FITC 형광에 방해되지 않고 배열체 서열번호 4만이 형광을 발생하는 화상을 얻을 수 있었다. 이상의 결과로부터 박편 중의 프로브 A를 고정화한 단면부에만 올리고뉴클레오티드 C가, 프로브 B를 고정화한 단면부에만 올리고뉴클레오티드 D가 특이적으로 하이브리다이제이션되는 것을 확인할 수 있었고, 또한 동시에 하이브리다이제이션 조작 과정에서의 겔 탈락 및 변형이 없는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 59>

실시예 58에서의 GMA 변성 FITC를 Polysciences, Inc사 제조 형광물질 디메타크릴레이트로 바꾼 것 이외는 동일한 조건으로 섬유 배열체 박편을 얻었다. 이 박편을 형광 현미경으로 관찰했더니 겔의 충전 상태를 쉽게 관찰할 수 있었다. 또한 실시예 58과 동일하게 하이브리다이제이션을 행하고, 형광물질 형광에 의해 CY3 및 CY5의 형광 검출이 방해되지 않는 것과, 하이브리다이제이션 조작 과정에서의 겔 탈락 및 변형이 없는 것을 확인할 수 있었다.

<비교예 5>

GMA 변성 FITC를 사용하지 않고 실시예 58과 동일한 방법으로 박편을 얻었다. 이 박편을 CY3용 필터를 사용하여 현미경으로 관찰했더니 배열체 서열번호 2만이 형광을 발생하는 화상을 얻을 수 있었고, 배열체 서열번호 2 이외의 열의 겔 탈락 등 충전 상태를 관찰하는 것은 곤란하여 형광을 발생하지 않는 열이 하이브리드를 형성하고 있지 않은가, 겔이 탈락되어 있는가를 쉽게 판단할 수 없었다.

<실시예 60>

(1) 5' 말단에 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드의 제작

이하에 나타낸 올리고뉴클레오티드 (프로브 A, 프로브 B)를 합성하였다.

프로브 A: GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (서열번호 1)

프로브 B: GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (서열번호 2)

올리고뉴클레오티드의 합성은 자동 합성기 DNA/RNA 합성기 (모델 394) (PE 바이오 시스템즈사 제조)를 사용하여 행하고, DNA 합성의 최종 과정에서 아미노 링크 II (어플라이드 바이오 시스템사 제조)를 사용하여 각각의 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 $NH_2(CH_2)_6$-를 도입하여 아미노화한 프로브를 제조하였다. 이들은 일반적인 방법에 의해 탈보호 및 정제하여 사용하였다.

(2) 핵산 고정화 고분자 겔의 제작

(1)에서 얻어진 프로브 A 또는 B (500 nmol/㎖) 5 ㎕ 및 글리시딜메타크릴레이트 5 ㎕를 혼합하여 70 ℃에서 2시간 반응시켰다. 여기에 단량체 혼합 수용액 (아크릴아미드 47.5 % w/w 및 메틸렌비스아크릴아미드 2.5 % w/w를 포함하는 수용액) 50 ㎕, 물 450 ㎕ 및 10 % 아조비스이소부티로니트릴 수용액 5 ㎕를 첨가하여 70 ℃에서 2시간 중합 반응을 행하고, 핵산 고정화 고분자 겔을 제작하였다. 제작한 핵산 고정화 고분자 겔은 5 mm의 두께로 절단하여 검출 조작을 행하였다.

(3) 시료 핵산의 표지

시료 핵산의 모델로서 (1)에서 제작한 프로브 A 및 B의 서열 일부에 상보적인 올리고뉴클레오티드 C 및 D를 합성하였다.

올리고뉴클레오티드 C: GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (서열번호 3)

올리고뉴클레오티드 D: CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (서열번호 4)

이러한 올리고뉴클레오티드의 5' 말단을 (1) 과 동일하게 하여 아미노 링크 II (PE 바이오 시스템즈 재팬사 제조)를 사용하여 각각의 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 $NH_2(CH_2)_6$-를 도입한 후, 이하와 같이 하여 디곡시게닌 (DIG: Digoxigenin, 로슈·다이아그노스틱스사 제조)으로 표지하였다.

말단 아미노화된 올리고뉴클레오티드를 각각 최종 농도가 2 mM가 되도록 100 mM 붕산 완충액 (pH 8.5)에 용해하였다. 등량의 디곡시게닌-3-0-메틸카르보닐-ε-아미노카프론산-N-히드록시-숙신이미드 에스테르 (26 mg/㎖ 디메틸포름아미드 용액)을 첨가하여 실온에서 하룻밤 정치하였다.

용량을 100 ㎕로 조정하고, 2 ㎕의 글리코겐 (로슈·다이아그노스틱스사 제조), 10 ㎕의 3M 아세트산나트륨 (pH 5.2), 300 ㎕의 냉에탄올을 첨가하여 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 침전을 회수하였다. 또한, 침전에 500 ㎕의 70 % 에탄올을 첨가하여 15,000 rpm으로 5분간 원심 분리하고 침전을 회수하였다. 침전을 풍건하고 100 ㎕의 10 mM 트리스(Tris)-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA에 용해하였다. 이와 같이 하여 얻어진 DIG 표지 올리고뉴클레오티드를 시료 핵산의 모델로서 사용하였다.

(4) 하이브리다이제이션

(2)에서 제작한 핵산 고정화 고분자 겔 절편을 하이브리다이제이션용 백에 넣고, 하기의 조성으로 이루어지는 하이브리다이제이션 용액을 넣어 45 ℃에서 30분간 하이브리다이제이션하고, (3)에서 얻어진 DIG 표지 DNA를 첨가하여 45 ℃에서 15시간 하이브리다이제이션하였다.

하이브리다이제이션 용액 조성;

5XSSC

5 % 블록킹 시약 (DIG 검출 키트 중의 시약)

0.01 % N-라우로일잘코신나트륨

0.02 % SDS (라우릴 황산나트륨)

50 % 포름아미드

(5) 검출

하이브리다이제이션 종료 후, 핵산 고정화 고분자 겔 절편을 미리 보온해 둔 50 ㎖의 0.1xSSC, 0.1 % SDS 용액으로 옮겨 진탕하면서 45 ℃에서 20분간의 세정을 3회 행하였다.

이어서, DIG 완충액 1 (0.1 M 말레산, 0.15 M 염화나트륨 (pH 7.5))을 첨가하고, 실온에서 진탕하면서 SDS를 제거하였다. 이것을 다시 반복한 후, DIG 완충액 2 (DIG 완충액에 0.5 % 농도로 블록킹 시약을 첨가한 것)를 첨가하여 1시간 진탕하였다. 완충액을 제거한 후, 10^{-4} 양의 항 DIG 알칼리포스파타제 표지 항체 (DIG 검출 키트 시약)를 포함하는 DIG 완충액 2 10 ㎖를 첨가하여 30분간 천천히 진탕시킴으로써 항원 항체 반응을 행하였다. 이어서, 0.2 % 트윈 20을 포함하는 DIG 완충액 1에서 15분간 2회 진탕함으로써 세정하고, 계속해서 DIG 완충액 3 (0.1 M 트리스-염산 (pH 9.5), 0.1 M 염화나트륨, 0.05 M 염화마그네슘)에 3분간 침지하였다. DIG 완충액 3을 제거한 후, CDP-Star (로슈·다이아그노스틱스사 제조)를 포함하는 DIG 완충액 3 ㎖를 첨가하였다.

수분을 제거하고 새로운 하이브리다이제이션용 백에 옮겨 X선 필름용 바인더에 X선 필름과 함께 끼워 필름을 감광시켰다.

그 결과, 프로브 A의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 C가 결합하고, 또한 프로브 B의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 D가 결합되는 것이 확인되었다.

<실시예 61>

(1) 글리시딜기 함유 고분자 겔의 제작

아크릴아미드 4.65 중량부, 메틸렌비스아크릴아미드 0.25 중량부, 글리시딜메타크릴레이트 0.1 중량부로 이루어진 수용액에 아조비스이소부티로니트릴을 0.1 % 농도가 되도록 첨가하고, 70 ℃에서 2시간 반응시켜 고분자 겔을 제작하였다.

(2) 핵산 고정화 고분자 겔의 제작

(1)에서 제작한 고분자 겔을 10 mm 각의 두께로 절단하고, 실시예 60의 (1)의 방법으로 제작한 프로브 A 또는 B (500 nmol/㎖) 100 ㎕를 혼합하여 70 ℃에서 2시간 반응시켜 핵산 고정화 고분자 겔을 제작하였다. 제작한 핵산 고정화 고분자 겔은 5 mm의 두께로 절단하고, 실시예 60의 (3), (4), (5) 와 동일한 조작으로 검출을 행하였다.

그 결과, 프로브 A의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 C가 결합하고, 또한 프로브 B의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 D가 결합되어 있는 것이 확인되었다.

<실시예 62>

(1) 5' 말단에 아미노기를 갖는 올리고뉴클레오티드의 제작

이하에 나타낸 올리고뉴클레오티드 (프로브 A, 프로브 B)를 합성하였다.

프로브 A: GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (서열번호 1)

프로브 B: GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (서열번호 2)

올리고뉴클레오티드의 합성은 자동 합성기 DNA/RNA 합성기 (모델 394) (PE 바이오 시스템즈사 제조)를 사용하여 행하고, DNA 합성의 최종 과정에서 아미노 링크 II (어플라이드 바이오 시스템사 제조)를 사용하여 각각의 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 $NH_2(CH_2)_6$-를 도입하여 아미노화한 프로브를 제조하였다. 이들은 일반적인 방법에 의해 탈보호 및 정제하여 사용하였다.

(2) 핵산 고정화 고분자 겔의 제작

(1)에서 얻어진 프로브 A 또는 B (500 nmol/㎖) 5 ㎕ 및 글리시딜메타크릴레이트 5 ㎕를 혼합하여 70 ℃에서 2시간 반응시켰다. 여기에 50 % 아크릴아미드 수용액 50 ㎕, 10 % 에틸렌디아민 수용액 10 ㎕ 및 물 450 ㎕, 10 %의 아조비스이소부티로니트릴 수용액 5 ㎕를 첨가하여 70 ℃에서 2시간 중합 반응을 행하고, 핵산 고정화 고분자 겔을 제작하였다. 제작한 핵산 고정화 고분자 겔은 5 mm의 두께로 절단하여 검출 조작을 행하였다.

(3) 시료 핵산의 표지

시료 핵산의 모델로서 (1)에서 제작한 올리고뉴클레오티드 (프로브 A, 프로브 B)의 서열 일부에 상보적인 올리고뉴클레오티드 (C, D)를 합성하였다.

올리고뉴클레오티드 C: GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (서열번호 3)

올리고뉴클레오티드 D: CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (서열번호 4)

이들 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 (1) 과 동일하게 하여 아미노 링크 II (PE 바이오 시스템즈 재팬사 제조)를 사용하여 $NH_2(CH_2)_6$-를 도입한 후, 이하와 같이 하여 디곡시게닌 (DIG: Digoxigenin, 로슈·다이아그노스틱스사 제조)으로 표지하였다.

말단 아미노화된 올리고뉴클레오티드를 각각 최종 농도가 2 mM가 되도록 100 mM 붕산 완충액 (pH 8.5)에 용해하였다. 등량의 디곡시게닌-3-0-메틸카르보닐-ε-아미노카프론산-N-히드록시-숙신이미드 에스테르 (26 mg/㎖ 디메틸포름아미드 용액)을 첨가하여 실온에서 하룻밤 정치하였다.

용량을 100 ㎕로 조정하고, 2 ㎕의 글리코겐 (로슈·다이아그노스틱스사 제조), 10 ㎕의 3M 아세트산나트륨 (pH 5.2), 300 ㎕의 냉에탄올을 첨가하여 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 침전을 회수하였다. 또한, 침전에 500 ㎕의 70 % 에탄올을 첨가하여 15,000 rpm으로 5분간 원심 분리하고 침전을 회수하였다. 침전을 풍건하고 100 ㎕의 10 mM 트리스-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA에 용해하였다. 이와 같이 하여 얻어진 DIG 표지 올리고뉴클레오티드를 시료 핵산의 모델로서 사용하였다.

(4) 하이브리다이제이션

(2)에서 제작한 핵산 고정화 고분자 겔 절편을 하이브리다이제이션용 백에 넣고, 이하의 조성으로 이루어지는 하이브리다이제이션 용액을 넣어 45 ℃에서 30분간 하이브리다이제이션하고, (3)에서 얻어진 DIG 표지 DNA를 첨가하여 45 ℃에서 15시간 하이브리다이제이션하였다.

(하이브리다이제이션 용액 조성)

5XSSC

5 % 블록킹 시약 (DIG 검출 키트 중의 시약)

0.01 % N-라우로일잘코신나트륨

0.02 % SDS (라우릴 황산나트륨)

50 % 포름아미드

(5) 검출

하이브리다이제이션 종료 후, 핵산 고정화 고분자 겔 절편을 미리 보온해 둔 50 ㎖의 0.1XSSC, 0.1 % SDS 용액으로 옮겨 진탕하면서 45 ℃에서 20분간의 세정을 3회 행하였다.

이어서, DIG 완충액 1 (0.1 M 말레산, 0.15 M 염화나트륨 (pH 7.5))을 첨가하여 실온에서 진탕하면서 SDS를 제거하였다. 이것을 다시 반복한 후, DIG 완충액 2 (DIG 완충액에 0.5 % 농도로 블록킹 시약을 첨가한 것)를 첨가하여 1시간 진탕하였다. 완충액을 제거한 후, 10^{-4} 양의 항 DIG 알칼리포스파타제 표지 항체 (DIG 검출 키트 시약)를 포함하는 DIG 완충액 2 10 ㎖를 첨가하여 30분간 천천히 진탕시킴으로써 항원 항체 반응을 행하였다. 이어서, 0.2 % 트윈 20을 포함하는 DIG 완충액 1에서 15분간 2회 진탕함으로써 세정하고, 계속해서 DIG 완충액 3 (0.1 M 트리스-염산 (pH 9.5), 0.1 M 염화나트륨, 0.05 M 염화마그네슘)에 3분간 침지하였다. DIG 완충액 3을 제거한 후, CDP-Star (로슈·다이아그노스틱스사 제조)를 포함하는 DIG 완충액 3 ㎖를 첨가하였다.

수분을 제거하고 새로운 하이브리다이제이션용 백에 옮겨 X선 필름용 바인더에 X선 필름과 함께 끼워 필름을 감광시켰다.

그 결과, 프로브 A의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 C가 결합하고, 또한 프로브 B의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 D가 결합되는 것이 확인되었다.

<실시예 63>

(1) 글리시딜기 함유 고분자 겔의 제작

아크릴아미드 4.88 중량부, 에틸렌디아민 0.02 중량부, 글리시딜메타크릴레이트 0.1 중량부로 이루어지는 수용액에 아조비스이소부티로니트릴을 0.1 % 농도가 되도록 첨가하고, 70 ℃에서 2시간 반응시켜 고분자 겔을 제작하였다.

(2) 핵산 고분자 겔의 제작

고분자 겔을 10 mm 각의 두께로 절단하고, 실시예 62(1)의 방법으로 제작한 프로브 A 또는 B (500 nmol/㎖) 100 ㎕를 혼합하여 70 ℃에서 2시간 반응시키고, 핵산 고정화 고분자 겔을 제작하였다. 또한, 프로브 B에 대해서도 동일하게 조작하여 핵산 고정화 고분자 겔을 제작하였다. 제작한 핵산 고정화 고분자 겔은 5 mm의 두께로 절단하고, 실시예 62의 (3) 내지 (5) 와 동일한 조작으로 검출하였다.

그 결과, 프로브 A의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 C가 결합하고, 또한 프로브 B의 겔 절편에는 올리고뉴클레오티드 D가 결합되는 것이 확인되었다.

<실시예 64>

(1) 염색체 DNA의 제조

로도코커스·로도크로우스 J-1 (FERM BP-1478)을 영양 배지 (글루코스 15 g, 효모 엑기스 1 g, 글루타민산나트륨 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/ℓ, pH 7.2) 100 ㎖에서 30 ℃로 3일 배양하고 집균하였다. 이 균체로부터 염색체 DNA를 제조하고, PCR 주형에 사용하였다.

(2) 프로브의 제작

프로브 제작을 위해 합성한 올리고뉴클레오티드의 위치를 도 9에 나타내었다. 올리고뉴클레오티드 A (서열번호 1)는 올리고뉴클레오티드 B (서열번호 2)의 약 400 염기 상류에 위치하고 있으며, 올리고뉴클레오티드 E (서열번호 5)는 올리고뉴클레오티드 A로부터 400 염기, 올리고뉴클레오티드 F (서열번호 6)는 올리고뉴클레오티드 B로부터 600 염기 하류에 위치하고 있다. PCR에는 올리고뉴클레오티드 A 및 B의 5' 말단을 아크릴아미드 수식한 올리고뉴클레오티드 (와꼬 쥰야꾸에 위탁 합성)를 사용하였다. PCR은 한쪽의 프라이머를 과잉량 존재시키는 비대칭 PCR를 행하였다. 프라이머 농도는 5' 아크릴아미드 수식 올리고뉴클레오티드 A-올리고뉴클레오티드 E (100:1) 또는 5' 아크릴아미드 수식 올리고뉴클레오티드 B-올리고뉴클레오티드 F (100:1)로 제조하였다. 그 밖의 조건은 Ex-Taq (다까라 슈조 가부시끼 가이샤 제조)의 사양 설명서에 따라 TaKaRa PCR 열 사이클러 PERSONAL을 사용하여 행하였다. 반응은 100 ㎕에서 행하고, 온도 조건은 93 ℃에서 30초, 65 ℃에서 30초, 72 ℃에서 2분을 40 사이클 행하였다. 이 PCR에 의해 약 400 염기 (프로브 G: 서열번호 7) 및 600 염기 (프로브 H: 서열번호 8)의 5' 아크릴아미드 수식된 프로브 DNA를 증폭하였다.

(3) 핵산 고정화 박편의 제작

이하의 조성으로 이루어지는 수용액 A (아크릴아미드 3.7 질량부, 메틸렌비스아크릴아미드 0.3 질량부, 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)이염산염 0.1 질량부, 프로브 G 또는 프로브 H 0.005 질량부)를 제조하였다. 이 수용액 A에 무공질 중간층을 갖는 폴리에틸렌제 다공질 중공사막 MHF200TL (미쯔비시 레이온 가부시끼 가이샤 제조, 외경 290 ㎛, 내경 200 ㎛)을 침지한 후, 내부가 수증기로 포화된 밀폐 유리 용기로 옮겨 80 ℃에서 4시간 방치함으로써 중합 반응을 행하였다.

얻어진 다공질 중공사막의 내측 다공질층에는, 중공부 및 무공질 중간층보다도 프로브 G 또는 H가 고정화된 겔이 유지되어 있었다. 이 방법으로 얻어진 프로브 G 고정화 겔을 유지하는 다공질 중공 섬유 5개를 프론판 상에 중첩되지 않게 밀착시켜 배열하고 양단을 고정하였다. 여기에 폴리우레탄 수지 접착제 (닛본 폴리우레탄 고교 가부시끼 가이샤, 콜로네이트 4403, 닛포란 4223)를 얇게 도포하고, 핵산 고정화 다공질 중공 섬유를 접착하였다. 폴리우레탄 수지가 충분하게 굳어진 후, 테플론판 상에서 박리하고, 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 프로브 H에 대해서도 동일하게 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유가 일렬로 배열된 시트형물을 얻었다. 또한, 블랭크로서 핵산을 고정화하지 않은 동일한 시트형물을 제작하였다.

이어서, 이들 시트형물을 블랭크, 프로브 G, 블랭크, 프로브 H, 블랭크의 순서로 5장 적층하여 상기 접착제로 접착하고, 종횡 각각 5개씩 총 25개의 핵산 고정화 다공질 섬유가 사각으로 규칙적으로 배열된 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 얻었다. 이와 같이 하여 얻어진 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유 배열체를 미크로톰을 사용하여 0.1 mm의 두께로 절단하고, 종횡 각 20개씩 총 400개의 핵산 고정화 겔을 유지한 다공질 중공 섬유의 단면이 규칙적으로 배열된 박편을 얻었다.

(4) 형광 표지 검체의 제작

검체 핵산의 모델로서 이하와 같은 검체 DNA를 제작하고, 하이브리다이제이션에 사용하였다. 프로브 G에만 하이브리다이즈되는 검체 제작에는 올리고뉴클레오티드 E와 올리고뉴클레오티드 A를 사용하여 PCR을 행하고, 약 400 염기의 검체 I (서열번호 9)을 제조하였다. 프로브 H에만 하이브리다이즈되는 검체 제작에는 올리고뉴클레오티드 F와 올리고뉴클레오티드 B를 사용하여 PCR을 행하고, 약 600 염기의 검체 J (서열번호 10)를 제조하였다.

검체를 형광 표지하기 위해서 올리고뉴클레오티드 E 및 F의 5' 말단이 Cy5로 라벨된 것 (Cy5-올리고뉴클레오티드 E, Cy5-올리고뉴클레오티드 F)을 합성하고 (아마샴 파마시아 바이오테크사, OlidoExpress), PCR에 사용하였다. PCR은 프라이머 농도를 Cy5-올리고뉴클레오티드 E-올리고뉴클레오티드 A (100:1) 또는 Cy5-올리고뉴클레오티드 F-올리고뉴클레오티드 B (100:1)로 제조하고, 그 밖에는 Ex-Taq (다까라 슈조 가부시끼 가이샤 제조)의 사양 설명서에 따라 TaKaRa PCR 열 사이클러 PERSONAL을 사용하여 행하였다. 반응은 100 ㎕에서 행하고, 온도 조건은 93 ℃에서 30초, 65 ℃에서 30초, 72 ℃에서 2분을 40 사이클 행하였다. 이 PCR에 의해 검체 I 및 검체 J의 DNA를 증폭하였다. 반응 종료액은 SUPEC-02 (다까라 슈조)를 사용하여 미반응 프라이머를 제거하고, GFX PCR DNA 및 겔 밴드 정제 키트 (아마샴 파마시아 바이오테크)에 의해 회수하였다.

(5) 하이브리다이제이션

회수한 형광 표지 검체 2 ㎕를 여과지 (PhastTransfer Filter Paper: 아마샴 파마시아 바이오테크)에 스폿하여 실시예 64(3)에서 얻어진 DNA 고정화 박편의 한쪽면에 밀착시키고, 도 7에 나타낸 장치를 사용하여 5 V로 2시간 전압을 가함으로써 하이브리다이제이션과 세정을 행하고, 형광 검출기 (형광 현미경)로 관찰하였다.

그 결과, 핵산 고정화 박편 중의 프로브 G를 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 I가, 프로브 H를 고정화한 다공질 섬유 단면부에만 검체 J가 특이적으로 하이브리다이제이션되는 것을 확인할 수 있었다.

본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특허 및 특허 출원을 그대로 참고하여 본 명세서에 도입하기로 한다.

서열표 프리 텍스트

서열번호 1: 합성 DNA

서열번호 2: 합성 DNA

서열번호 3: 합성 DNA

서열번호 4: 합성 DNA

서열번호 5: 합성 DNA

서열번호 6: 합성 DNA

서열번호 15: 5' 말단에 아크릴아미드가 결합된 합성 DNA

서열번호 16: 5' 말단에 아크릴아미드가 결합된 합성 DNA

서열번호 17: 5' 말단에 아크릴아미드가 결합된 합성 DNA

서열번호 18: 5' 말단에 아크릴아미드가 결합된 합성 DNA

서열번호 23: 5' 말단이 Cy5로 라벨된 합성 DNA

서열번호 24: 5' 말단이 Cy3으로 라벨된 합성 DNA

서열번호 25: 5' 말단이 Cy3으로 라벨된 합성 DNA

서열번호 26: 5' 말단이 Cy5로 라벨된 합성 DNA

산업상 이용 가능성

본 발명에 의해 생체 관련 물질을 고밀도로 견고하게 고정화시킨 생체 관련 물질 고정화 고분자 재료를 얻을 수 있다. 또한, 고정화 공정을 이차원 평면상에서 행하지 않고 일차원 구조체로서의 섬유 상에서 분리, 독립하여 행함으로써 쇄 길이에 상관없이 핵산의 정량적 고정이 가능해지고, 정렬화 공정에 각종 섬유 부형 기술 내지 직물 제작 기술을 도입함으로써 고밀도화가 가능하며, 그 결과 얻어지는 삼차원 구조체로서의 섬유 다발로부터 목적하는 이차원 배열체를 제작하기 위해 종래법에는 없는 절편화 프로세스가 새롭게 도입되었는데, 그에 따라 스폿팅법과 같은 오차가 많은 미량 분주 조작이 불필요해져 연속 절편화를 가능하게 함으로써 작은 면적에 다종 다수의 핵산을 고정화한 박편을 다량으로 쉽게 얻을 수 있다. 이에 따라 유전자 구조 해석 등을 이용한 임상 검사 및 식품 검사 등의 분야에서 유용하다.

또한, 본 발명에 의해 중공 섬유의 내벽부 처리 방법, 중공 섬유의 중공부에 겔을 충전하는 방법 및 겔이 충전된 섬유의 제조 방법이 제공된다.

본 발명에 의해 충전한 섬유 내부의 겔은 중공 섬유 내벽부에 물리적으로 고정됨으로써 탈락되지 않고, 이와 같이 제조된 겔을 충전한 섬유는 모세관 전기 영동 및 DNA 분석용 마이크로 어레이 등의 제조로 이용이 가능하다. 특히, 모세관 전기 영동에서는 겔과 모세관 내벽부의 계면이 견고하게 결합되어 있으며, DNA 등의 영동 용질의 내벽부에서 쇼트 패스가 없어져 균일한 밴드를 형성한 영동을 행할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
삭제

청구항 2.
삭제

청구항 3.
삭제

청구항 4.
삭제

청구항 5.
삭제

청구항 6.
삭제

청구항 7.
삭제

청구항 8.
삭제

청구항 9.
삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.
삭제

청구항 12.
삭제

청구항 13.
삭제

청구항 14.
삭제

청구항 15.

이하의 (a) 또는 (b)의 물질로 이루어지는 군에서 선택되는 생체 관련 물질이 섬유전체에 고정된 섬유 다발을 포함하는 섬유 배열체를, 섬유축과 교차하는 방향으로 절단하여 얻어진 생체 관련 물질 고정화 박편:

(a) 핵산, 아미노산, 당 또는 지질;

(b) 상기 (a)물질 중 1 종류 또는 2 종류 이상의 성분으로 이루어지는 중합물.

청구항 16.
삭제

청구항 17.
삭제

청구항 18.
삭제

청구항 19.
삭제

청구항 20.
삭제

청구항 21.
삭제

청구항 22.
삭제

청구항 23.
삭제

청구항 24.

(1) 복수개의 섬유를 묶어 섬유배열체로 하는 공정;

(2) 상기 섬유 배열체의 각 섬유에 이하의 (a) 또는 (b)의 물질로 이루어지는 군에서 선택되는 생체 관련 물질을 도입, 고정하는 공정; 및

(3) 상기 섬유 배열체를 섬유축과 교차하는 방향으로 슬라이스하는 공정

을 포함하는 생체 관련 물질 고정화 박편의 제조방법:

(a) 핵산, 아미노산, 당 또는 지질;

(b) 상기 (a)물질 중 1 종류 또는 2 종류 이상의 성분으로 이루어지는 중합물.

청구항 25.
삭제

청구항 26.
삭제

청구항 27.
삭제

청구항 28.

(1) 이하의 (a) 또는 (b)의 물질로 이루어지는 군에서 선택되는 생체 관련 물질이 직접 고정화된 섬유를, 목적하는 배열 패턴에 따라 배열하는 공정;

(2) 상기 섬유 다발에 장력을 부여하는 공정; 및

(3) 상기 섬유 다발의 섬유 사이에 수지를 충전하여 상기 섬유 다발을 고정하는 공정

을 포함하는 섬유 배열체의 제조방법:

(a) 핵산, 아미노산, 당 또는 지질;

(b) 상기 (a)물질 중 1 종류 또는 2 종류 이상의 성분으로 이루어지는 중합물.

청구항 29.

제28항에 있어서, 상기 장력을 부여하는 공정이

(1) 섬유를 목적하는 패턴과 동일한 패턴의 구멍을 갖는 복수개의 지그(jig) 구멍에 통과시키는 공정; 및

(2) 상기 지그간의 간격을 넓히는 공정

을 포함하는 섬유 배열체의 제조방법.

청구항 30.

제29항에 있어서, 상기 지그가 종사 및 횡사를 교차시켜 얻어지는 그물 구조를 구성하는 지지선군, 또는 다공판인 것을 특징으로 하는 섬유 배열체의 제조방법.

청구항 31.
삭제

청구항 32.
삭제

청구항 33.
삭제

청구항 34.
삭제

청구항 35.
삭제

청구항 36.
삭제

청구항 37.
삭제

청구항 38.
삭제

청구항 39.
삭제

청구항 40.
삭제

청구항 41.
삭제

청구항 42.
삭제

청구항 43.
삭제

청구항 44.
삭제

청구항 45.
삭제

청구항 46.
삭제

청구항 47.
삭제

청구항 48.
삭제

청구항 49.
삭제

청구항 50.
삭제

청구항 51.
삭제

청구항 52.
삭제

청구항 53.
삭제

청구항 54.
삭제

청구항 55.
삭제

청구항 56.
삭제

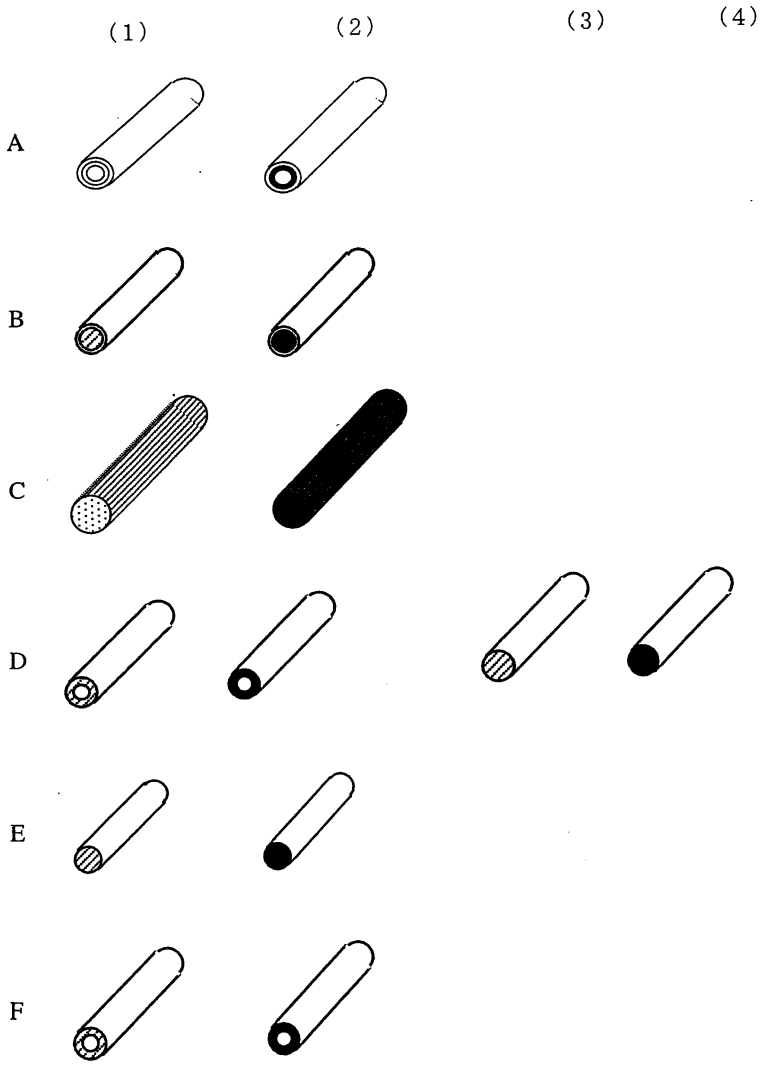
청구항 57.
삭제

청구항 58.
삭제

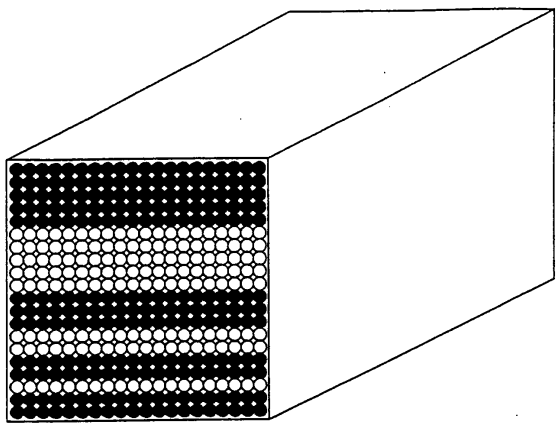
청구항 59.
삭제

도면

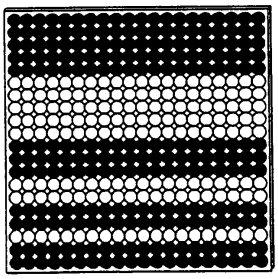
도면1



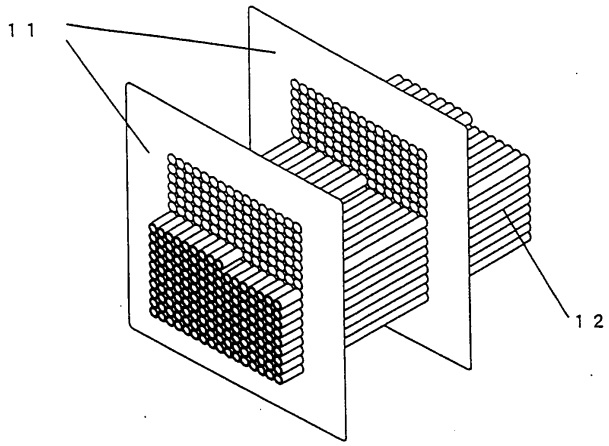
도면2



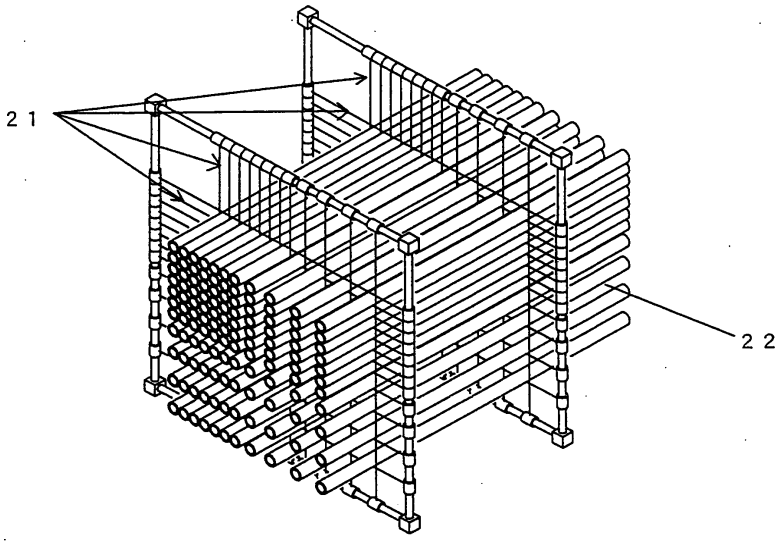
도면3



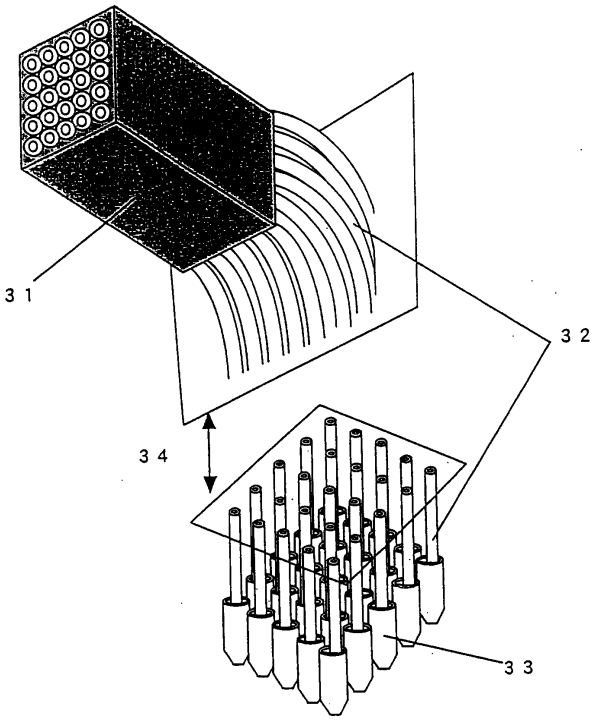
도면4



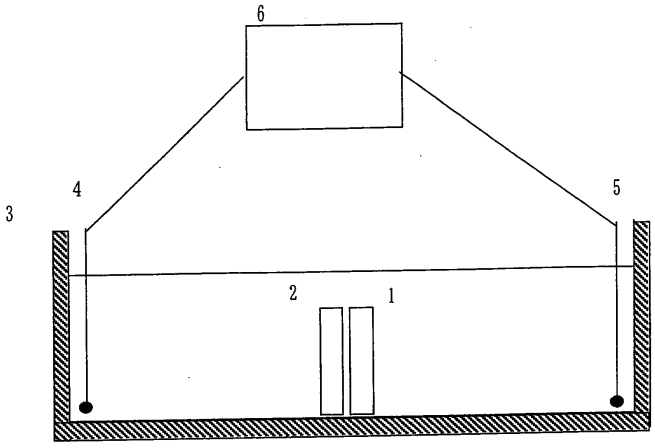
도면5



도면6

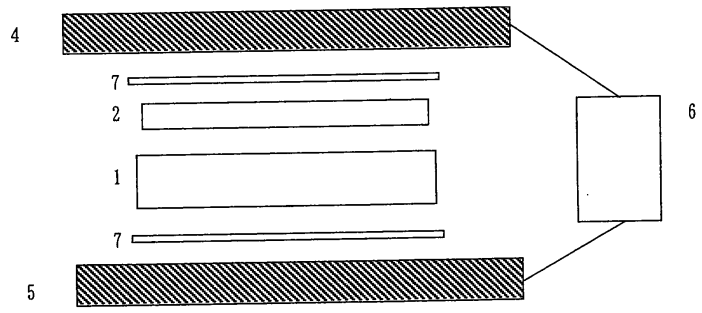


도면7



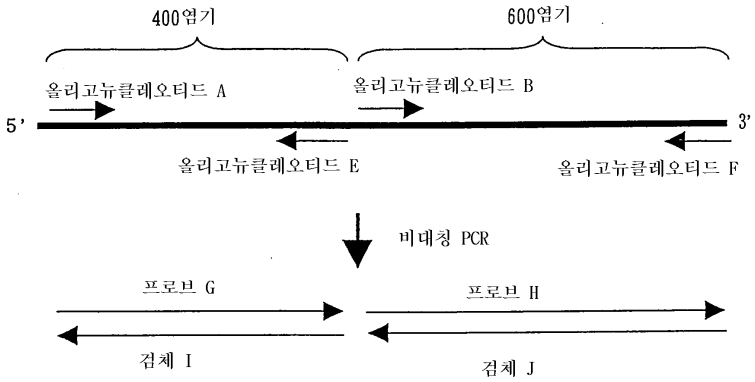
1. DNA 고정화 박편 2. 검체 3. 영동조 4. 음극 5. 양극
6. 직류 전류 7. 여과지 8. 전해액조

도면8



1. DNA 고정화 박편 2. 검체 3. 영동조 4. 음극 5. 양극
6. 직류 전류 7. 여과지

도면9



<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.
<120> A fiber carrying biologically related substances
<130> PH-789-PCT
<140>
<141>
<150> JP99/59361
<151> 1999-03-05
<150> JP99/84100
<151> 1999-03-26
<150> JP99/84101
<151> 1999-03-26
<150> JP99/83964
<151> 1999-03-26
<150> JP99/93043
<151> 1999-03-31
<150> JP99/93044
<151> 1999-03-31
<150> JP99/215014
<151> 1999-07-29
<150> JP99/240041

<151> 1999-08-26
<150> JP99/298613
<151> 1999-10-05
<150> JP99/324194
<151> 1999-11-15
<150> JP99/346288
<151> 1999-12-06
<150> JP99/346309
<151> 1999-12-06
<150> JP99/346521
<151> 1999-12-06
<150> JP2000/55658
<151> 2000-03-01
<150> JP2000/57075
<151> 2000-03-02
<160> 26
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 1
gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctc 33
<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 2
gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag 32
<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 3
gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg 28
<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 4
ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc 27
<210> 5
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 5
gctcaagcgc gatttcggtt tcgacatccc c 31
<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 6
catgtcgcgt cgttgttgga cgaagcggta 30
<210> 7
<211> 388
<212> DNA
<213> Rhodococcus rhodochrous
<400> 7
gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctcatcacgc ccgccgcggt cgaccgagtc 60
gtttcgtact acgagaacga gatcggcccg atgggcggtg ccaaggtcgt ggccaagtcc 120
tgggtggacc ctgagtaccg caagtggctc gaagaggacg cgacggccgc gatggcgtca 180
ttgggctatg ccggtgagca ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg 240
catcacgtgg tggtgtgcac tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tggtctcccg 300
cccgcctggt acaagagcat ggagtaccgg tcccgagtgg tagcggaccc tcgtggagtg 360
ctcaagcgcg atttcggttt cgacatcc 388
<210> 8
<211> 611
<212> DNA
<213> Rhodococcus rhodochrous
<400> 8
gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc agctccgaaa tccgctacat cgtcatcccg 60
gaacggccgg ccggcaccga cggttggtcc gaggaggagc tgacgaagct ggtgagccgg 120
gactcgatga tcggtgtcag taatgcgctc acaccgcagg aagtgatcgt atgagtgaag 180
acacactcac tgatcggctc ccggcgactg ggaccgccgc accgccccgc gacaatggcg 240
agcttgtatt caccgagcct tgggaagcaa cggcattcgg ggtcgccatc gcgctttcgg 300
atcagaagtc gtacgaatgg gagttcttcc gacagcgtct cattcactcc atcgctgagg 360
ccaacggttg cgaggcatac tacgagagct ggacaaaggc gctcgaggcc agcgtggtcg 420
actcggggct gatcagcgaa gatgagatcc gcgagcgcat ggaatcgatg gccatcatcg 480
actgacatcc cctgtgtctc catctagcag cagtgcgggc gtaccccgac ggtgctgagc 540
cgacggggta cgcccgcact tcatcaatga cggtggttcc taatttggct cggtggatac 600
tgatctcgcg g 611
<210> 9
<211> 388
<212> DNA
<213> Rhodococcus rhodochrous
<400> 9
ggatgtcgaa accgaaatcg cgcttgagca ctccacgagg gtccgctacc actcgggacc 60
ggtactccat gctcttgtac caggcgggcg ggagaccaag caccggccac ggatagcacg 120
aacacagagt gcacaccacc acgtgatgcg tttgggagtc gttgaagacc gccgaaattt 180
ggtgtgcctg ctcaccggca tagcccaatg acgccatcgc ggccgtcgcg tcctcttcga 240
gccacttgcg gtactcaggg tccacccagg acttggccac gaccttggca ccgcccatcg 300
ggccgatctc gttctcgtag tacgaaacga ctcggtcgac cgcggcgggc gtgatgagcc 360

ctcgctcgta cagcaaggtt tcgatcgc 388
<210> 10
<211> 611
<212> DNA
<213> Rhodococcus rhodochrous
<400> 10
ccgcgagatc agtatccacc gagccaaatt aggaaccacc gtcattgatg aagtgcgggc 60
gtaccccgtc ggctcagcac cgtcggggta cgcccgcact gctgctagat ggagacacag 120
gggatgtcag tcgatgatgg ccatcgattc catgcgctcg cggatctcat cttcgctgat 180
cagccccgag tcgaccacgc tggcctcgag cgcctttgtc cagctctcgt agtatgcctc 240
gcaaccgttg gcctcagcga tggagtgaat gagacgctgt cggaagaact cccattcgta 300
cgacttctga tccgaaagcg cgatggcgac cccgaatgcc gttgcttccc aaggctcggt 360
gaatacaagc tcgccattgt cgcggggcgg tgcggcggtc ccagtcgccg ggagccgatc 420
agtgagtgtg tcttcactca tacgatcact tcctgcggtg tgagcgcatt actgacaccg 480
atcatcgagt cccggctcac cagcttcgtc agctcctcct cggaccaacc gtcggtgccg 540
gccggccgtt ccgggatgac gatgtagcgg atttcggagc tgctgtccca aaccctgacc 600
tccacctcat c 611
<210> 11
<211> 651
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 11
caaccaacca caactacata cacatacata cacaatggtc gctcaagttc aaaagcaagc 60
tccaactttt aagaaaactg ccgtcgtcga cggtgtcttt gacgaagtct ccttggacaa 120
atacaagggt aagtacgttg tcctagcctt tattccattg gccttcactt tcgtctgtcc 180
aaccgaaatc attgctttct cagaagctgc taagaaattc gaagaacaag gcgctcaagt 240
tcttttcgcc tccactgact ccgaatactc ccttttggca tggaccaata tcccaagaaa 300
ggaaggtggt ttgggcccaa tcaacattcc attgttggct gacaccaacc actctttgtc 360
cagagactat ggtgtcttga tcgaagaaga aggtgtcgcc ttgagaggtt tgttcatcat 420
cgacccaaag ggtgtcatta gacacatcac cattaacgat ttgccagtcg gtagaaacgt 480
tgacgaagcc ttgagattgg ttgaagcctt ccaatggacc gacaagaacg gtactgtctt 540
gccatgtaac tggactccag gtgctgctac catcaagcca accgttgaag actccaagga 600
atacttcgaa gctgccaaca aataagacgc ttgcagagtt gtctaaatga c 651
<210> 12
<211> 586
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 12
caaagcatac ctaataacaa tataatccca taatgctagc cctagctgat aacattctac 60
gtataataaa tttcctattt ttggttattt ccatcggttt aatcagttcg ttgttaaaca 120
cccaacatag gcacagctcc agagtaaact actgtatgtt tgcttgtgca tatggtatat 180
tcaccgattc attgtacggt gtctttgcca acttcattga accattggca tggccactag 240
ttttgttcac actggacttt ttgaactttg tgttcacttt cactgccggt acagtgttgg 300
ccgttggtat cagagctcac tcatgtaaca acagctcata cgttgacagt aacaagatta 360
ctcaaggttc cggtaccaga tgtagacaag ctcaagccgc tgttgcattc ctctacttct 420
cttgtgccat ctttttggct aagaccctga tgtctgtttt caacatgatc tccaatggtg 480
cctttggttc tggttctttc tccaagagaa gaagaactgg ccaagtcggt gttccaacca 540
tttcccaagt ctaattgaag cgcaccaact taaattttac gccact 586
<210> 13
<211> 1105
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 13
aagaaacatc cctcatacta ccacacatat gccaactcta gtaaatggac caagaagaga 60
ctctaccgaa gggtttgata ccgatatcat cactcttcct agattcataa tcgagcacca 120
gaagcaattt aagaacgcta ctggtgattt cacattagta ctgaatgcct tgcaattcgc 180
gttcaaattt gtatctcaca ccatcagacg tgctgaattg gttaacttgg ttgggttagc 240
aggcgcttcc aacttcactg gtgaccagca aaagaagttg gacgttctag gtgatgaaat 300
atttatcaat gccatgaggg ctagtgggat catcaaggtc cttgtatctg aagaacagga 360
agacttgatc gtttttccca caaacacggg ctcatacgca gtgtgttgtg atcctattga 420
tggctcctca aatttggacg ccggtgtctc cgttggaact atcgcgtcta tattcagact 480
gctaccagac tcatcaggta ctataaacga cgtactgaga tgtggtaaag aaatggtagc 540
cgcttgctat gccatgtacg gatcctctac gcatctagta ttgacattgg gtgatggagt 600
tgatgggttt accttagaca caaacttggg cgaattcatc ttgactcatc ctaacttaag 660
aattccgcct caaaaggcca tctactcaat taatgaaggt aacaccctct actggaacga 720
gactataaga acatttattg agaaagtcaa acaaccccaa gcagacaaca acaacaagcc 780
tttctcggct aggtatgttg gatccatggt tgctgatgtt cacaggacgt ttctttacgg 840
tggccttttc gcataccctt gcgacaagaa gagccccaac ggaaaactga ggttgcttta 900
tgaggccttc ccaatggctt tcttaatgga acaagcaggg ggaaaagcgg tcaacgatcg 960
cggagagaga atcttggatt tggtgccaag tcatatccat gacaaatctt ctatttggtt 1020
gggttcttca ggtgaaattg acaaattttt agaccatatt ggcaagtcac agtagttcaa 1080
tgatcgcctt cttttcttat tttct 1105
<210> 14
<211> 670
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 14
ctaagaaaac cacgatcaaa caaataaatc agcaatgggt gcctacaaat atttggaaga 60
attgcaaaga aagaagcaat ctgatgtttt gagattcttg caaagagtca gagtctggga 120
atacagacaa aagaatgtca ttcacagagc cgctagacca actagaccag acaaggctag 180
aagattgggt tacaaagcta agcaaggttt cgttatctac cgtgtcagag ttagacgtgg 240
taacagaaag agacctgttc caaagggtgc tacttacggt aagccaacta accaaggtgt 300
caatgaattg aaataccaaa gatccttgag agctaccgct gaagaaagag ttggtcgtcg 360
tgccgctaac ttgagagtct tgaactccta ctgggttaac caagattcta cttacaagta 420
cttcgaagtt atcttggtcg accctcaaca caaggctatc agaagagatg ctcgttacaa 480
ctggatctgt gacccagttc acaagcaccg tgaagctaga ggtttgactg ccactggtaa 540
gaaatccaga ggtatcaaca agggtcacaa attcaacaac accaaggctg gtagaagaaa 600
gacctggaag agacaaaaca ctttgtcctt gtggagatac agaaaataag ctggttgatg 660
gaaaatataa 670
<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus
<400> 15
caaccaacca caactacata cacatac 27
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus
<400> 16

ctaagaaaac cacgatcaaa c 21
<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus
<400> 17
aagaaacatc cctcatacta ccacac 26
<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus
<400> 18
ctaagaaaac cacgatcaaa c 21
<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 19
gtcatttaga caactctgca agcgt 25
<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 20
ttatattttc catcaaccag c 21
<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 21
agaaaataag aaaagaaggc gatca 25
<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 22
ttatattttc catcaaccag c 21
<210> 23
<211> 40
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA labelled with Cy5 at 5' terminus
<400> 23
gaacttgagc gaccattgtg tatgtatgtg tatgtagttg 40
<210> 24
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA labelled with Cy3 at 5' terminus
<400> 24
atcagctagg gctagcatta tgggattata ttgttattag 40
<210> 25
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA labelled with Cy3 at 5' terminus
<400> 25
gtccatttac tagagttggc atatgtgtgg tagtatgagg 40
<210> 26
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA labelled with Cy5 at 5' terminus
<400> 26
atttgtaggc acccattgct gatttatttg tttgatcgtg 40