

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3786248号
(P3786248)

(45) 発行日 平成18年6月14日(2006.6.14)

(24) 登録日 平成18年3月31日(2006.3.31)

(51) Int. Cl.

F I

CO7C 233/01	(2006.01)	CO7C 233/01	
CO1B 31/02	(2006.01)	CO1B 31/02	1 O 1 Z
CO1B 33/02	(2006.01)	CO1B 33/02	Z
CO3C 23/00	(2006.01)	CO3C 23/00	Z
CO7C 231/02	(2006.01)	CO7C 231/02	

請求項の数 1 (全 6 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平11-320945 (22) 出願日 平成11年11月11日(1999.11.11) (65) 公開番号 特開2001-139532(P2001-139532A) (43) 公開日 平成13年5月22日(2001.5.22) 審査請求日 平成12年10月27日(2000.10.27) 審判番号 不服2004-3118(P2004-3118/J1) 審判請求日 平成16年2月17日(2004.2.17)</p>	<p>(73) 特許権者 390003193 東洋鋼板株式会社 東京都千代田区四番町2番地12 (73) 特許権者 598025382 高橋 浩二郎 広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号 (73) 特許権者 591091135 株式会社日本パーカーライジング広島工場 広島県広島市南区出島1丁目34番26号 (74) 代理人 100100103 弁理士 太田 明男 (72) 発明者 丹花 通文 山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼板株式会社技術研究所内 最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 化学修飾を施した基体およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固体支持体表面を塩素化し、次いでアミノ化して該固体支持体表面に第1級アミノ基を形成させ、該第1級アミノ基に、ジカルボン酸にカルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドあるいはp-ニトロフェノールを反応させて得られるものであるN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化したジカルボン酸あるいはp-ニトロフェノール活性化エステル化したジカルボン酸を反応させることを特徴とする一方の末端にN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基あるいはp-ニトロフェノールエステル基からなる活性化エステル基が結合した炭化水素基の他方の末端を、固体支持体表面にアミド結合を介して固定化させたことを特徴とする化学修飾を施した基体の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分子生物学分野、生化学関連分野において有用な、核酸又は蛋白を固定化可能な化学修飾を施した基体に関するものである。例えば、DNAを固体支持体表面に固定化して保存し、必要なときに取り出してポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase chain reaction; PCR)によりDNAのセグメントを増幅して、DNAを解析するという全く新しい発想の基で成し遂げられたものである。

【0002】

20

【従来の技術】

遺伝子解析は分子生物学、生化学の分野で有用であり、近年では病気の発見等医療分野でも利用されている。

【0003】

遺伝子解析において、近年DNAチップが開発され解析速度が著しく速くなった。しかし従来のDNAチップはスライドガラス或いはシリコン基板表面にポリリジン等の高分子を塗布し、その後にDNAを固定する方法である。また、フォトリソグラフ等の半導体技術を用いてガラス基板上にオリゴヌクレオチドを合成する方法が用いられている。

【0004】

しかし、スライドガラス或いはシリコン基板表面にポリリジン等の高分子を塗布してDNAを固定する方法では、DNAの固定化状態が不安定であり、ハイブリッド形成工程や洗浄工程において、DNAが剥離するといった問題が生じる。また、半導体技術を用いたDNAチップは、製造工程の煩雑さから非常に高価であるという問題がある。

このような問題点を解決するためには、固体支持体表面にDNAを高密度で且つ強固に固定化する必要がある。

【0005】

また、従来、固体支持体の表面を化学修飾した基体が知られている。しかし、カルボン酸等にDNAを結合させるには、カルボン酸の活性化が必要となるため、基板の化学修飾だけでは不十分である。

【0006】

本発明は、DNAの解明やDNA保存を効率的に行うことができ、分子生物学分野、生化学分野等において有用な化学修飾を施した基体を提供しようとするものを目的とするものである。また、本発明は、DNA或いは蛋白を安定に固定化するための基体を提供することを目的とするものである。

【0007】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討の結果、固体支持体表面を化学修飾してN-ヒドロキシスクシンイミドエステル或いはp-ニトロフェノールエステル等の活性化エステル基を含む炭化水素基を有する基体が、DNA等を安定して固定可能なことを見だし、本発明に到達した。

すなわち、

請求項1に記載の化学修飾を施した基体の製造方法は、固体支持体表面を塩素化し、次いでアミノ化して該固体支持体表面に第1級アミノ基を形成させ、該第1級アミノ基に、ジカルボン酸にカルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、およびp-ニトロフェノールを反応させて得られるものであるp-ニトロフェノール活性化エステル化したジカルボン酸を反応させることを特徴とする一方の末端にN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基あるいはp-ニトロフェノールエステル基からなる活性化エステル基が結合した炭化水素基の他方の末端を、固体支持体表面にアミド結合を介して固定化させたことを特徴とする。

【0008】**【発明の実施の形態】**

本発明の基体は、固体支持体の表面に特定の化学修飾を施したことを特徴とするものである。本発明における化学修飾とは、炭化水素基の末端に活性エステル基が結合した基を、固体支持体表面にアミド結合を介して固定化することをいう。このような化学修飾によって、DNA等或いは蛋白を基体の表面に固定しやすくなる。

【0009】

炭化水素基は、炭素数0~12、中でも0~6のものが好ましい。

例えば、蟻酸、酢酸、プロピオン酸などのモノカルボン酸；シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸などのジカルボン酸；トリメリット酸等の多価カルボン酸等があげられる。中でもシュウ酸、コハク酸が好ましい。

10

20

30

40

50

【0010】

炭化水素基の末端に結合する活性エステル基としては、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル或いは p - ニトロフェノールエステルが好ましい。

【0011】

このような化学修飾は、固体支持体にアミド結合を介して炭化水素基の末端に活性エステル基が結合した基を固定化することである。

例えば活性エステル基が N - ヒドロキシスクシンイミドエステル基の場合には、塩素ガス中で固体支持体に紫外線照射して表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、適当な酸クロリドを用いてカルボキシル化し、末端のカルボキシル基をカルボジイミド或いはジシクロヘキシルカルボジイミドおよび N - ヒドロキシスクシンイミドと脱水縮合することにより行うことができる。

10

この方法を採用する場合の脱水縮合について一例を挙げて説明すると、表面を化学修飾し、カルボキシル基を有する状態の固体支持体をカルボジイミドあるいはジシクロヘキシルカルボジイミド、および N - ヒドロキシスクシンイミド或いは p - ニトロフェノールを溶解した 1, 4 - ジオキササン溶液中に浸漬させ、洗浄後乾燥する。このようにして、N - スクシンイミドエステル基や p - ニトロフェノールエステル基を末端に有する炭化水素基が結合した基体を得られる。

【0012】

また、上記の方法より好ましい方法として、特に、あらかじめダイヤモンド等の固定支持体（基板）上に形成された第 1 級アミノ基に、活性化ジエステルの一方のエステル基を脱水縮合させることにより形成されることが望ましい。

20

【0013】

活性化ジエステルとは、上記した活性エステル基を 2 つ有しているものをいう。エステル基は活性化ジエステル中の両端に位置していることが好ましく、炭素数 0 ~ 12、好ましくは 0 ~ 6 のものが好ましい。エステル基を除いた骨格部分は直鎖状飽和脂肪酸が好ましい。

【0014】

活性化ジエステルを用いた方法として、同様に塩素化し、次いでアミノ化後、このアミノ基に対し、予めシュウ酸（ジカルボン酸）を N - ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化して得られる活性化エステルを反応させ、所望の基体を得る方法が挙げられる。

30

【0015】

この方法における N - ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化とは、ジカルボン酸をカルボジイミド 2.5 mg/ml および N - ヒドロキシスクシンイミド 1.5 mg/ml を溶解した 1, 4 - ジオキササン溶液（3 mm 角ダイヤモンド 1 枚に対し 100 μl とする量）に溶解して 15 分間反応させ、活性化ジエステルを得るものである。この活性化エステルをアミノ基を付しておいて固体支持体に結合させ、化学修飾を完了する。

この方法は、本発明者らがはじめて開発したものである。固体支持体表面を活性化エステル基で化学修飾した状態の商品とすることにより、ユーザーはそれを用いて容易に DNA を直に固体支持体表面にアミド結合により固定化することができる。

【0016】

シュウ酸ジクロリドは入手困難であるが、シュウ酸を N - ヒドロキシスクシンイミド活性化エステルにすることで容易に固体支持体表面を化学修飾できる。

40

【0017】

本発明において上記のような化学修飾を行う固体支持体としては、ダイヤモンド、金、銀、銅、アルミニウム、タングステン、モリブデン等の金属；上記金属とセラミックスとの積層体；ポリカーボネート、フッ素樹脂等のプラスチック等が挙げられる。

その他の材料でも、化学的に安定な材料であれば使用でき、例えば、グラファイト、ダイヤモンドライクカーボンが挙げられる。また、プラスチックと上記金属、セラミックス、ダイヤモンド等との混合体でもよい。

【0018】

50

これらのうち、熱伝導性の点からダイヤモンドが好ましい。ダイヤモンドは熱伝導性に優れており、急速な冷却が可能であるため、PCR等の加熱冷却を繰り返すヒートサイクル時間を効果的に短縮できる。

本発明の基体の熱伝導率は、 $0.1 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上、好ましくは $0.5 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上、特好ましくは $1.0 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上であることが好ましい。 $1.0 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上とすることにより、DNAを本発明の基体の化学修飾部分に固定化させてPCR等を行う場合、加熱・冷却の追従性に優れているからである。

【0019】

ダイヤモンド基板の素材として、合成ダイヤモンド、高圧形成ダイヤモンド、或いは天然のダイヤモンド等のいずれも使用できる。また、それらの構造が単結晶体或いは多結晶体のいずれでも差し支えない。生産性の観点よりマイクロ波プラズマCVD法などの気相合成法を用いて製造されたダイヤモンドを用いることが好ましい。

10

【0020】

本発明の基体の形成方法は公知の方法で行うことができる。例えば、マイクロ波プラズマCVD法、ECRCVD法、IPC法、直流スパッタリング法、ECRスパッタリング法、イオンプレーティング法、アークイオンプレーティング法、EB蒸着法、抵抗加熱蒸着法などが挙げられる。また、金属粉末やセラミック粉末等に樹脂をバインダーとして混合して結合形成したものが挙げられる。また、金属粉末やセラミック粉末等の原料をプレス成形機を用いて圧粉したものを高温で焼結したのもあげられる。

【0021】

本発明の基体の基板表面は意図的に粗面化されていることが望ましい。このような粗面化表面は基体の表面積が増えて多量のDNA等を固定させることに好都合であるからである。基体の形状は平板状、糸状、球状、多角形状、粉末状など特に問わない。

20

さらに、このダイヤモンド基板は、ダイヤモンドと他の物質との複合体（例えば、2層からなる基板）であってもよい。

【0022】

【実施例】

以下実施例により本発明を説明する。

実施例 1

塩素ガス中で3mm角のCVDダイヤモンドに紫外線照射して表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、酸クロリドを用いてクロロホルム中で還流してカルボキシル化した。

30

この表面が修飾された固体支持体を、カルボジイミド 2.5 mg/ml およびN-ヒドロキシスクシンイミド 1.5 mg/ml を溶解した1,4-ジオキサン溶液（3mm角ダイヤモンド1枚に対し $100 \mu\text{l}$ となる量）中に15分間浸漬させ、末端カルボキシル基を脱水縮合した。反応終了後水洗し、さらに、1,4-ジオキサン溶液で洗浄後乾燥し、化学修飾された基体を得た。

【0023】

実施例 2

塩素ガス中で3mm角のシリコン基板に紫外線照射して表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化後、このアミノ基に対し、予めシュウ酸（ジカルボン酸）をN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化して得られる活性化ジエステルを反応させた。

40

N-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル化は、以下のようにして行った。シュウ酸をカルボジイミド 2.5 mg/ml およびN-ヒドロキシスクシンイミド 1.5 mg/ml を溶解した1,4-ジオキサン溶液（3mm角ダイヤモンド1枚に対し $100 \mu\text{l}$ となる量）に溶解して15分間反応させ、活性化ジエステルを得た。この活性化ジエステルを予めアミノ基を付しておいた固体支持体に結合させ、化学修飾を施した基体を得た。

【0024】

上記に示す実施例1と実施例2で作成した基体を用いて、20merのオリゴヌクレオチ

50

ドを固定した後、相補的な配列を持つ蛍光標識プローブとハイブリッド形成し、蛍光光度計を用いてオリゴヌクレオチド固定化量を見積もった。その結果、実施例 1 では 3 mm 角の基板 1 枚あたり 38 pmol、実施例 2 では 3 mm 角の基板 1 枚あたり 35 pmol であり、いずれもオリゴヌクレオチドが高密度に固定していることが明らかになった。

【 0 0 2 5 】

【 発 明 の 効 果 】

本発明の化学修飾を施した基体は、化学修飾がされ活性化エステル基を有しているため、DNA 等核酸を安定して固定化できるので、PCR を行うにあたり有利である。また、本発明の製造方法により、DNA 等を安定して固定化できる基体を効率よく生産できる。特にカルボジイミドおよび N - ヒドロキシスクシンイミドを用いて、N - ヒドロキシスクシンイミド活性化して得られるジエステルを用いることにより、酸クロリドの存在化クロロホルム中で還流操作をすることなく、固体支持体表面に活性化エステル基を化学修飾することができる。また、この状態で商品とすることで、ユーザーは容易に DNA を固定化することができる。

フロントページの続き

- (72)発明者 岡村 浩
山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼板株式会社技術研究所内
- (72)発明者 高木 研一
山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼板株式会社技術研究所内
- (72)発明者 高橋 浩二郎
広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号
- (72)発明者 高井 修
広島県広島市南区宇品東2丁目2番29号 株式会社日本パーカーライジング広島工場テクノセンター内
- (72)発明者 高木 誠
福岡県福岡市博多区昭南町3丁目4番29号
- (72)発明者 竹中 繁織
福岡県古賀市舞の里4-23-21

合議体

- 審判長 西川 和子
審判官 原田 隆興
審判官 木村 敏康

- (56)参考文献 国際公開第99/40173号パンフレット(WO, A1)
国際公開第97/23497号パンフレット(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C233/01
C01B31/02
C01B33/02
C03C23/00
C07C231/02