

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4372521号  
(P4372521)

(45) 発行日 平成21年11月25日(2009.11.25)

(24) 登録日 平成21年9月11日(2009.9.11)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b> 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
<b>C 1 2 M</b> 1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00 A
<b>G O 1 N</b> 33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53 M

請求項の数 3 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-396915 (P2003-396915)	(73) 特許権者	000233055
(22) 出願日	平成15年11月27日(2003.11.27)		日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社
(65) 公開番号	特開2005-151898 (P2005-151898A)		東京都品川区東品川四丁目12番7号
(43) 公開日	平成17年6月16日(2005.6.16)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成18年6月28日(2006.6.28)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100105463
			弁理士 関谷 三男
		(74) 代理人	100102576
			弁理士 渡辺 敏章
		(74) 代理人	100103931
			弁理士 関口 鶴彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子の回収方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多種類の生体分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ微小流路アレイの微小流路に、回収対象である生体分子を含む試料溶液を送液する送液工程と、

該試料溶液に含まれる回収対象である生体分子を、微小流路の下面及び/又は壁面にスポット状に固定され、かつ該生体分子との高い親和性を有するプローブ分子と迅速に結合させる結合工程と、

該結合工程の後、周期的な突起物を有する基板を微小流路アレイ部品から剥がし、該微小流路アレイ部品の微小流路の、回収対象である生体分子を結合しているプローブ分子が固定されている部位を、鋭利な工具を用いて切出す切出工程とを含むことを特徴とする生体分子の回収方法。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の生体分子の回収方法において、

前記切出工程の後、切出した基板の小片に化学的な処理を施し、小片の表面に固定されたプローブ分子と回収対象である生体分子の結合を切断することにより、回収対象である生体分子を回収する工程を含むことを特徴とする生体分子の回収方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の生体分子の回収方法において、

前記微小流路アレイは、軟質樹脂材質でできた第 1 の基板上に微小流路が設けられ、該微小流路の下面及び/又は壁面に多種類のプローブ分子が所望の配列で化学結合によりス

20

ポット状に固定された微小流路アレイ部品と、該微小流路アレイ部品の微小流路にはめ込むことが可能な大きさを有する周期的な突起物を有する第2の基板を張り合わせて製作された、該微小流路に多種類のプローブ分子が固定されたスポットと周期的な突起物を併せ持つことを特徴とする生体分子の回収方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料溶液中に含まれる微量な生体分子回収用アレイ、及び該回収用アレイを用いる生体分子の回収方法に係る。

【背景技術】

【0002】

遺伝子の発現状況を調べる有力な方法として、固体表面上に数多くのDNAプローブを種類毎に区分けして固定したDNAプローブアレイ、又はDNAチップが用いられ始めている。下記特許文献1には、種々のプローブを固定した粒子(プローブ粒子)を一定の順序で整列させたプローブアレイの発明が開示されている。具体的には、各プローブ粒子を充填した細管又は溝を複数本並列に並べ、各細管又は溝から各々粒子の1個ずつを、他の細管又は溝に注入して、種々のプローブ粒子を常に一定の順序で整列させたプローブアレイを作成し、該プローブアレイを用い、粒径の異なる粒子に多量のプローブを結合して、多量の蛍光標識DNAを同時計測している。

【0003】

特許文献1に記載された技術では、各種プローブ分子を表面に固定したビーズをガラスキャピラリなどの流路に所望の順序で配列したキャピラリビーズアレイを製作し、該キャピラリビーズアレイに分析対象である生体分子を含む試料溶液を送液し、分析対象の生体分子を、ビーズの表面に固定されており、かつ該生体分子と高い親和性を有するプローブ分子と結合させることにより、分析対象の生体分子をビーズ表面に固定して分析することが可能である。しかしながら、該技術のキャピラリビーズアレイでは、分析対象の生体分子を固定したビーズを選択的に取り出すことが非常に困難であるため、分析対象の生体分子を選択的に回収することは非常に困難である。そこで、試料溶液中に含まれる分析対象の微量な生体分子を選択的に回収することのできる技術が必要であった。

【0004】

【特許文献1】特開平11-243997号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、試料溶液中に含まれる分析対象となる微量な生体分子を、各種プローブ分子に対する親和性に応じて効率良く、分離・回収するアレイと方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、鋭意研究した結果、微小流路を有し特定の材質からなる微小流路アレイ部品、該アレイ部品と特定の構造の基板を組合せた微小流路アレイ、及び該微小流路アレイを用いた生体分子回収方法によって上記課題が解決されることを見出し、本発明に到達した。

【0007】

即ち、第1に、本発明は、微小流路アレイ部品の発明であり、第1の基板として、鋭利な工具で容易に切断可能な軟質樹脂等の軟質材料を選択し、該第1の基板上に微小流路が設けられ、該微小流路の下面及び/又は壁面に多量のプローブ分子が所望の配列で化学結合によりスポット状に固定された構造を有する。軟質樹脂等の材質を選択することによって、プローブ分子と結合した生体分子を所定の部位毎に切断・分離して回収でき、以後の検査・分析に用いることが出来る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 8 】

第2に、本発明は、上記微小流路アレイ部品と第2の基板を張り合わせて製作された生体分子回収用微小流路アレイの発明であり、鋭利な工具で容易に切断可能な軟質樹脂材質等の軟質材料でできた第1の基板上に微小流路が設けられ、該微小流路の下面及び/又は壁面に多種類のプローブ分子が所望の配列で化学結合によりスポット状に固定された微小流路アレイ部品と、該微小流路アレイ部品の微小流路にはめ込むことが可能な大きさを有する周期的な突起物を有する第2の基板を張り合わせて製作されている。該微小流路に多種類のプローブ分子が固定されたスポットと、周期的な突起物を併せ持つ生体分子回収用微小流路アレイである。微小流路に周期的な突起物を配置することで、該微小流路に送液される生体分子を含む試料溶液を攪拌し、乱流をもたらす、プローブ分子との結合効率の向上を図る。又、アレイ部品と第2の基板の両者を張り合わせるにより、生体分子回収アレイの構造を単純化し、製作コストを低下させることが出来る。

10

## 【 0 0 0 9 】

微小流路に配置される突起物の形状は特に限定されない。円筒状、角柱、円錐、板状物、波型の壁面又は上面等であって、これら突起物が液流の障害となって微小流路に送液される試料溶液を攪拌し、乱流をもたらす作用を奏するものが好ましく例示される。

## 【 0 0 1 0 】

第3に、本発明は、上記の、多種類の生体分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ微小流路アレイを用いる生体分子の回収方法の発明であり、該微小流路アレイの微小流路に回収対象である生体分子を含む試料溶液を送液し、該微小流路にある周期的な突起物により試料溶液を効率よく攪拌・乱流化し、該試料溶液に含まれる回収対象である生体分子を、微小流路の下面及び/又は壁面にスポット状に固定され、かつ該生体分子との高い親和性を有するプローブ分子と迅速に結合させる。該微小流路にある周期的な突起物により、該微小流路に送液される生体分子を含む試料溶液を攪拌し、乱流をもたらす、プローブ分子との結合効率の向上を図る。

20

## 【 0 0 1 1 】

第4に、本発明は、上記の生体分子の回収方法において後処理工程を含む発明であり、該試料溶液に含まれる回収対象である生体分子を、微小流路の下面及び/又は壁面にスポット状に固定され、かつ該生体分子との高い親和性を有するプローブ分子と迅速に結合させた後、周期的な突起物を有する基板を微小流路アレイ部品から剥がし、該微小流路アレイ部品の微小流路の、回収対象である生体分子を結合しているプローブ分子が固定されている部位を、鋭利な切り出し刃等の工具を用いて切出す。切り出されたプローブ分子が固定されている小片は、従来のビーズと同様の方法で、フローメーター等を用いて蛍光測定等に付すことが出来る。この際、切出し順序は特定されていることから、ビーズのように所定の順序・配列に並べ替える必要がない。又、本発明によれば、求める部位のみを切出して測定に供することも容易である。

30

## 【 0 0 1 2 】

第5に、本発明は、上記の第4の発明の生体分子の回収方法において、微小流路アレイ部品の微小流路の、回収対象である生体分子を結合しているプローブ分子が固定されている部位を、鋭利な切り出し刃等の工具を用いて切出し、切出した基板の小片に化学的な処理を施し、小片の表面に固定されたプローブ分子と回収対象である生体分子の結合を切断することにより、回収対象である生体分子を回収する。これにより、所定の生体分子のみを効率良く回収出来る。

40

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 1 3 】

本発明によれば、試料溶液中に含まれる微量な生体高分子を、容易かつ確実に、各種のプローブ分子に対する親和性に応じて分離し、回収することが可能であり、ライフサイエンス分野の研究・開発に携わるユーザにとって非常に有効なツールを提供することが可能である。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

50

## 【 0 0 1 4 】

以下、図面を用いて本発明の実施の形態を詳細に説明する。

図 1 ~ 図 3 は、多種類のプローブ分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ流路構造物の製作方法を示す模式図であり、図 4 は、多種類のプローブ分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ微小流路アレイの模式図である。

## 【 0 0 1 5 】

図 1 は第 1 の基板 1 の斜視図と、その平面図、側面図を示す。軟質樹脂など、鋭利な工具で容易に切断することのできる材質でできた第 1 の基板 1 の上に微小流路 2 を製作し、微小流路の下面及び / 又は壁面 ( 図 1 の場合は下面 ) に、多種類のプローブ分子を所望の配列で化学結合により固定したスポット 3 を製作する。また、図 2 は周期的な突起物 4 を有する第 2 の基板 5 の斜視図と、その正面図、側面図を示す。図 3 は、上記第 1 の基板 1 の微小流路 2 に第 2 の基板 5 をはめ込んだ状態と、はめ込む様子の斜視図を示す。図 4 は上記第 1 の基板 1 の微小流路 2 に第 2 の基板 5 をはめ込んだ状態の斜視図とその断面図を示す。上記第 1 の基板 1 の微小流路 2 にはめ込むことが可能な大きさであって、周期的な突起物 4 ( 図 2、3 の場合は円筒状突起物 ) を有する基板 5 を張り合わせて、多種類のプローブ分子を固定したスポット 3 と周期的な突起物 4 を併せ持つ微小流路アレイが製作される。なお、スポット 3 と突起物 4 の位置関係は、特に限定されず、両者を対応させて設けても良く、対応関係なしでも良い。

10

## 【 0 0 1 6 】

図 5 は、微小流路アレイ 6 に、回収対象である生体分子を含む試料溶液を送液する模式図である。図 1 ~ 4 で説明した微小流路アレイ 6 に、回収対象である生体分子 7 を含む試料溶液 8 を送液し、微小流路アレイ 6 の微小流路にある周期的な突起物により試料溶液 8 を効率よく攪拌し、試料溶液 8 に含まれる回収対象である生体分子 7 を、微小流路の壁面にスポット状に固定されており、かつ該生体分子 7 との高い親和性を有するプローブ分子と迅速に結合させる。

20

## 【 0 0 1 7 】

図 6 と図 7 は、微小流路アレイからプローブ分子及び生体分子を回収する方法を示す模式斜視図と、その平面図、断面図である。微小流路アレイに、回収対象である生体分子 7 を含む水溶液を送液し、該生体分子 7 を、微小流路の壁面にスポット状に固定されており、かつ生体分子 7 との高い親和性を有するプローブ分子 9 と結合させた後、周期的な突起物を有する第 2 の基板を微小流路アレイから剥がす。微小流路アレイにある微小流路 2 の第 1 の基板の回収対象である生体分子 7 を結合しているプローブ分子 9 が固定されているスポット 3 が含まれる部位を、鋭利な切出刃 10 を用いて切出し、生体分子 7 を結合したプローブ分子 9 を表面に保持している小片 11 を得る。切出した小片 11 は、図 7 に示すように、第 1 の基板を貫通させて外部に取り出しても良く、切出刃 10 に付着したものを剥がしても良い。

30

## 【 0 0 1 8 】

図 8 は、微小流路アレイから切出した小片から、回収対象である生体分子を回収する操作を示す模式図である。図 8 において、該流路構造物から切出された小片 11 はその表面にプローブ分子 9 を保持しており、プローブ分子 9 には回収対象である生体分子 7 が結合している。この小片 11 に化学的な処理を施すことにより、プローブ分子 9 と回収対象である生体分子 7 の結合を切断することにより、回収対象である生体分子 7 を回収することが可能である。

40

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 1 9 】

本発明によれば、容易かつ確実に、試料溶液中に含まれる微量な生体高分子を、各種のプローブ分子に対する親和性に応じて分離し、回収することが可能であり、ライフサイエンス分野の研究・開発に携わるユーザにとって有効なツールとなる。本発明は、生命科学の発展、医療診断や医薬品の開発に貢献する。

## 【 図面の簡単な説明 】

50

【 0 0 2 0 】

【図1】多種類のプローブ分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ微小流路アレイの製作方法を示す模式図。

【図2】多種類のプローブ分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ微小流路アレイの製作方法を示す模式図。

【図3】多種類のプローブ分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ微小流路アレイの製作方法を示す模式図。

【図4】多種類のプローブ分子を固定したスポットと周期的な突起物を併せ持つ微小流路アレイの模式図。

【図5】本発明の微小流路アレイに、回収対象である生体分子を含む試料溶液を送液する

10

模式図。

【図6】微小流路アレイからプローブ分子及び生体分子を回収する方法の模式図。

【図7】微小流路アレイからプローブ分子及び生体分子を回収する方法の模式図。

【図8】微小流路アレイから切出した小片から、回収対象である生体分子を回収する操作

の模式図。

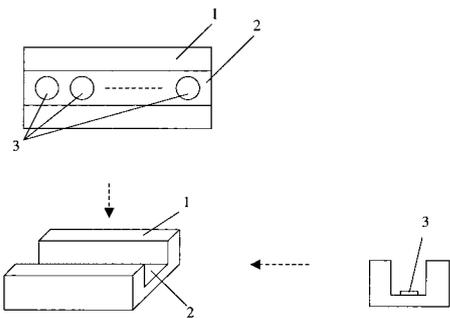
【符号の説明】

【 0 0 2 1 】

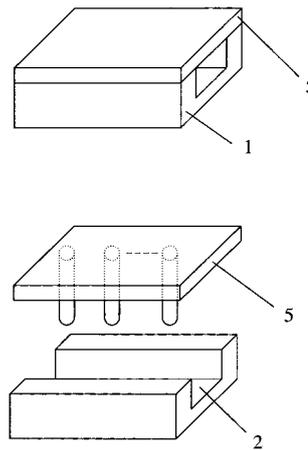
1：流路を有する第1の基板、2：流路、3：プローブ分子が固定されているスポット、4：突起物、5：突起物を有する第2の基板、6：微小流路アレイ、7：生体分子、8：生体分子を含む試料溶液、9：プローブ分子、10：切出刃、11：小片。

20

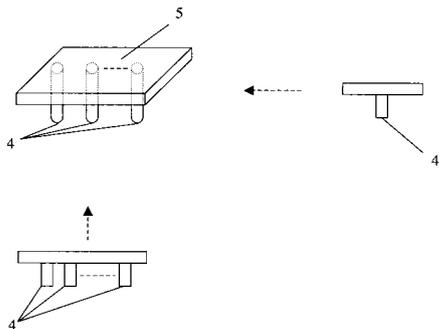
【図1】



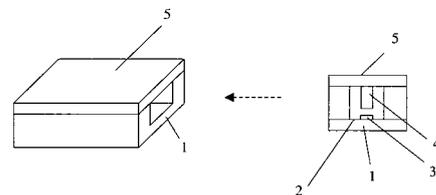
【図3】



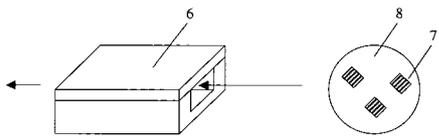
【図2】



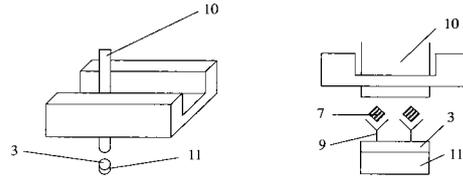
【図4】



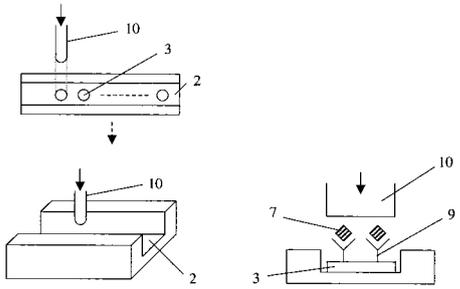
【図5】



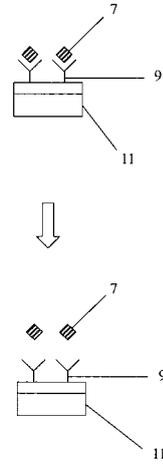
【図7】



【図6】



【図8】



---

フロントページの続き

(72)発明者 小木 修

東京都品川区東品川4丁目12番7号 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特表2002-520621(JP,A)

米国特許出願公開第2003/0087292(US,A1)

米国特許出願公開第2003/0026740(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00-15/90

C12M 1/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)