

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3829491号

(P3829491)

(45) 発行日 平成18年10月4日(2006.10.4)

(24) 登録日 平成18年7月21日(2006.7.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
G O 1 N 27/447 (2006.01)
G O 1 N 27/327 (2006.01)
G O 1 N 33/50 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 27/26 3 O 1 Z
G O 1 N 27/30 3 5 1
G O 1 N 33/50 P

請求項の数 3 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願平10-241330
(22) 出願日 平成10年8月27日(1998.8.27)
(65) 公開番号 特開2000-60554(P2000-60554A)
(43) 公開日 平成12年2月29日(2000.2.29)
審査請求日 平成14年12月19日(2002.12.19)

(73) 特許権者 000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
(74) 代理人 100100310
弁理士 井上 学
(72) 発明者 岡野 和宣
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究
所内
(72) 発明者 神原 秀記
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究
所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プローブチップ、プローブチップ作成方法、試料検出方法、及び試料検出装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プローブを保持するゲルを有し、かつ第1の方向に配置された区画と、
前記区画に配置される第1の電極と、
前記第1の方向に沿って配置される第2の電極と、
前記第1の電極と前記第2の電極との間に配置される第3の電極と、
高周波電界印加手段とを具備し、
前記高周波電界印加手段は、前記第1の電極と前記第2の電極との間、もしくは前記第2の電極と前記第3の電極との間に高周波電界を印加することを特徴とするプローブチップ。

【請求項2】

前記第1の電極と前記第2の電極とは、前記高周波電界印加手段によって高周波電界を印加されることにより、試料を前記区画の中を移動させて、前記ゲルに保持された前記プローブと前記試料とを結合させるものであり、
前記第2の電極と前記第3の電極とは、前記高周波電界印加手段によって高周波電界を印加されることにより、前記ゲルに保持された前記プローブと結合しない前記試料を前記ゲルから移動させるものであることを特徴とする請求項1に記載のプローブチップ。

【請求項3】

前記第1の電極は第1の点電極であり、前記第2の電極は線電極であり、前記第3の電極は第2の点電極であることを特徴とする請求項1に記載のプローブチップ。

10

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA、RNA、及び蛋白質等の検査対象に関する種々の検査項目を一度に検査するプローブチップ（多項目センサー）に関し、特に、プローブチップ、プローブチップ作成方法、及びこれを用いる試料検出方法、試料検出装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

ゲノム計画の進展とともにDNAレベルで生体を理解し、病気の診断や生命現象の理解をしようとする動きが活発化してきた。生命現象の理解や遺伝子の働きを調べるには遺伝子の発現状況を調べることが有効である。この有力な方法として、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プローブアレーあるいはDNAチップが用いられ始めている。

10

【0003】

このDNAチップの作成には、光化学反応と半導体工業で広く使用されているリソグラフィを用いて、区画された多数のセルに設計された配列のオリゴマーを一塩基ずつ合成する方法（従来技術1：Science 251、767-773（1991））、DNAプローブを各区画に一つ一つ植え込む方法（従来技術2：Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93、4613-4918（1996））等の方法がある。

【0004】

チップに固定するプローブ量を多くするために、チップ上にアクリルアミドゲルの膜を形成し、このゲルにプローブを固定する方法も考案されている（従来技術：3 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93、4613-4918（1996））。

20

【0005】

DNAプローブチップに用いられるDNAプローブの固定方法として、ビオチンとアビジンの結合を利用したり、Au（金）表面にSH基を介して固定する方法（従来技術4：Biophysical Journal 71、1079-1086（1996））、ガラス表面に固定する方法（従来技術5：Analytical Biochemistry 247、96-101（1997））、ガラス表面に塗布したアクリルアミドゲルのエレメントマトリックスに固定する方法（従来技術6：Proc Natl. Acad. Sci. USA 93、4913-4918（1996））、等が知られている

30

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

DNA又はその誘導体に限らずRNA又はその誘導体を固体（チップ）表面上に保持することもあるので、以下では、ポリヌクレオチドを固体（チップ）表面上に保持したものをポリヌクレオチドプローブチップと呼ぶことにする。

【0007】

従来技術1、2の何れのDNAチップの作成方法も制作に手間と時間がかかり、製作費が高価になるという問題があり、特に、プローブアレーが密集した微細な部分からなるDNAチップの製作には一層手間と時間がかかるという問題がある。即ち、一般のユーザーが簡単に作成できない不便さがある。

40

【0008】

一般に、DNAチップを使用する検査では、狭いチップ表面に保持したプローブに多量の溶液を接触させて、溶液中の目的DNAをプローブと会合させる必要があるため、ハイブリダイゼーションの速度が遅いという重大な問題がある。特に、プローブに対して目的とするDNAの長さが長くなると、保持されたプローブに対してDNAが相補になるような配列方向から接近する必要があるため、ハイブリダイゼーションの速度が遅くなる問題がある。

【0009】

また、固体（チップ）表面の面積が限られているため、保持できるプローブ量は、fmo

50

1の桁であり、限界があり、良く似た配列のDNAが多量に存在すると、微量の特定の目的とするDNAを検出する場合の妨害になることが多いという問題がある。プローブ量が少ないと、良く似た配列のDNAが固体表面のプローブを占有してしまふ擬陽性ハイブリダイゼーションが起きやすくなる問題がある。以上説明した問題のため、従来技術1、2のDNAチップを用いた計測では、長時間を要し、高感度が得られない。

【0010】

従来技術3では、チップのゲル中の試料DNAの拡散が、ハイブリダイゼーションの速度の律速段階となるという問題がある。また、従来技術3では、固体(チップ)表面上に形成したゲルを化学処理しプローブが結合できるように加工して、プローブが均一に保持された作成の再現性の良いポリヌクレオチドプローブチップを一般のユーザーが作るには熟練を要するという問題がある。

10

【0011】

従来技術のチップで各区画からの蛍光を同時検出するためには、エキスパンダで広げたレーザービームをカメラ側の同一面から照射する必要があり、各区画に照射されるレーザー光密度が低下するため高出力レーザーが必要であった。また、チップ表面で反射し検出器に直接入るレーザー光がバックグラウンドとなり高感度検出が困難であった。このため、従来技術のチップを使用する場合、レーザー顕微鏡でスキャンする方法が一般的であり、計測に長時間を必要とする問題があった。更に、従来技術のチップの各区画に捕捉されたDNAを、区画毎に分離しサイズ毎に回収することは、困難であった。

【0012】

20

本発明は上記した問題を解決するためになされたもので、本発明の目的は、簡単に、望むポリヌクレオチドプローブチップを密集した状態で作成でき、製造コストも安価なチップの作成方法を提供することにある。また、チップ表面でのハイブリダイゼーション速度を改善し短時間で計測が可能であり、高感度かつ擬陽性ハイブリダイゼーションの少ない、安価なポリヌクレオチドプローブチップ、及び、ポリヌクレオチドプローブチップの各区画に捕捉されたDNA断片を、区画毎に分離しサイズ毎に回収可能なポリヌクレオチド検出法、ポリヌクレオチド検出装置を提供することにある。

【0013】**【課題を解決するための手段】**

各々異なるポリヌクレオチドプローブが保持された複数の区画が配置される本発明のポリヌクレオチドプローブチップは以下の特徴を有している。

30

【0014】

(A) 各区画のポリヌクレオチドプローブがゲルに保持されており、電気泳動により試料ポリヌクレオチドを各区画のゲル中を移動させて、ゲル中のポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ、ポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの衝突確立を高めている。これにより、ハイブリダイゼーションの速度を上げている。また、ゲルに保持されるプローブ量を多くできる。

【0015】

(B) 実際に使用する上では、各々異なるポリヌクレオチドプローブが保持された複数の区画が配置されるポリヌクレオチドプローブチップに、蛍光標識した試料ポリヌクレオチドを添加し各区画のゲル中を電気泳動により移動させ、ゲル中のポリヌクレオチドプローブと特定ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる。ポリヌクレオチドプローブチップの各区画のゲル中に捕捉された蛍光標識ポリヌクレオチドを検出することにより、各区画に捕捉された特定ポリヌクレオチドを検出できる。

40

【0016】

試料ポリヌクレオチドを予め標識するのではなく、先ず、ポリヌクレオチドプローブチップに試料ポリヌクレオチドを添加し各区画のゲル中を電気泳動により移動させて、ゲル中のポリヌクレオチドプローブと特定ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ、次に、ポリヌクレオチドプローブチップの各区画のゲル中でポリヌクレオチドがハイブリダイズしたポリヌクレオチドプローブに、DNAポリメラーゼを用いた伸張反応で蛍光標したdNT

50

Pや蛍光標した ddNTPを取り込ませて標識することにより、各区画に捕捉された特定ポリヌクレオチドを検出できる。

【0017】

更に、mRNA発現プロファイル計測のように、試料として塩基配列が未知のDNA(cDNA)断片を検出するには、10塩基乃至60塩基からなる実質的に共通な塩基配列からなる部分とその3'末端に断片識別用の任意の2塩基乃至3塩基の組み合わせからなるポリヌクレオチドプローブが保持されたポリヌクレオチドプローブチップを使用する。ポリヌクレオチドプローブチップに試料ポリヌクレオチドを添加し各区画のゲル中を電気泳動により移動させて、ポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせハイブリッドを形成する。ハイブリッドの検出は、蛍光標識 ddNTP、又は蛍光標識 ddNTPをDNAポリメラーゼを用いて、ポリヌクレオチドプローブの伸張鎖に取り込むことにより行なう。ポリヌクレオチドプローブの3'末端の識別用の任意の2塩基乃至3塩基とハイブリダイズした試料ポリヌクレオチドのみが、蛍光標識の存在により検出される。あるいは、ポリヌクレオチドプローブにハイブリダイズした試料ヌクレオチドの相補鎖合成をポリヌクレオチドプローブプライマーとして行ない、変性させて1本鎖の伸長相補鎖を得る。次に、1本鎖伸長相補鎖に相補な蛍光標識プローブをハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした試料の種類と有無を検出する。

10

【0018】

(C)；各区画のポリヌクレオチドプローブがゲルに保持されており、電気泳動により試料ポリヌクレオチドを各区画のゲル中を移動させて、ゲル中のポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせることは、電極をチップに配置する構造により可能となる。ハイブリダイゼーションの速度を上げて、特定ポリヌクレオチドの捕捉率を向上させるには、電極を切換えて試料ポリヌクレオチドを複数回にわたり上記の同一ゲル中を移動させてハイブリダイゼーションの効率を向上できる。

20

【0019】

(D)ポリヌクレオチドプローブチップの基板面の各区画の各々に光検出用の素子が配置又は形成されたポリヌクレオチドプローブチップを用いて、基板面に平行な方向から各ゲルをレーザー照射することにより、複数の区画のゲルからの蛍光を同時に検出可能となる。このポリヌクレオチドプローブチップは、微小フォトダイオードアレイが形成された基板から構成され、各フォトダイオードの上部は特定の波長範囲の光(蛍光標識から発する蛍光)を通過する金属蒸着膜が形成され、金属蒸着膜の上部に絶縁層を介して透明電極が形成されており、透明電極の面にDNAプローブが固定される。ポリヌクレオチドプローブチップの面には、各フォトダイオードに流れる電流を検出する配線が形成される。レーザー光が全反射するように、ポリヌクレオチドプローブチップの上面から反射面を持つ反射板を押し付けて、各区画のゲルの面に反射板が押し付けられた状態で、レーザー光を照射するので、レーザー光は基板面と反射板の間で全反射を繰り返しながら進み、実質的に基板面に平行な方向から各区画のゲルを照射する。

30

【0020】

(E)ポリヌクレオチドプローブチップの作成方法としては、反応残基を有するゲル前駆体とゲル前駆体の反応残基と結合する残基を有する複数種のポリヌクレオチドプローブからなるプローブセットと、複数の区画を有するチップを予め準備し、ポリヌクレオチドプローブセットから選んだ任意のプローブの種類毎にゲル前駆体と混合し、ポリヌクレオチドプローブチップの異なる区画に添加しゲル化させて調製することにより、カスタムデザインのポリヌクレオチドプローブを保持できる。ゲル前駆体として、アクリルアミド及び誘導体を使用できる。ゲル前駆体の反応残基と結合する残基を有するポリヌクレオチドプローブとして、アクリル基等の活性ビニル基を有するポリヌクレオチドプローブを使用できる。

40

【0021】

勿論、一つの区画に保持するポリヌクレオチドプローブは1種である必要はなく分析の目的によっては必要に応じて複数種を組み合わせる一つの区画に保持することも可能である

50

。反応残基を有するゲル前駆体とゲル前駆体の反応残基と結合する残基を有する複数種のポリヌクレオチドプローブからなるプローブセットと、複数種の区画を有するチップを予め準備し、ポリヌクレオチドプローブセットから選んだ複数の任意のプローブからなる複数のプローブグループをグループ毎にゲル前駆体と混合し、ポリヌクレオチドプローブチップの異なる区画に添加しゲル化させて調製することによりカスタムデザインのポリヌクレオチドプローブを簡単に調製できる。これらの調製法を用いれば、予め一定量のプローブを溶液状態で取り扱い、ゲルに保持するので、均一で再現性の高いポリヌクレオチドプローブチップを調製可能である。本発明のポリヌクレオチドプローブのポリヌクレオチドプローブチップへの保持方法は、従来技術4、5、6の方法とは全く異なる。

【0022】

本発明によれば、用途に応じて必要な種類のポリヌクレオチドプローブを簡単にポリヌクレオチドプローブチップに並べることができる。ゲル前駆体の反応残基と結合する残基を有する各々のポリヌクレオチドプローブは、DNA合成機で調製したアミノ基を有するポリヌクレオチドとN-アクリロキシスクシイミドとアリルグリシジルエーテルとアクロレインとを反応させ、ゲル濾過法やエタノール沈殿法で反応生成物を回収するだけで調製できるため安価であり、ポリヌクレオチドプローブチップ自身も安価に作成できる。各々のポリヌクレオチドプローブは保存が可能である。

【0023】

本発明の一構成を要約すると、反応残基を有するゲル前駆体とゲル前駆体の反応残基と結合する残基を有する複数種のポリヌクレオチドプローブからなるポリヌクレオチドプローブセットから選んだ任意のプローブを種類毎にゲル前駆体と混合し、種類毎にポリヌクレオチドプローブチップ1の異なる小穴に添加しゲル化させて調製し、試料DNAをゲル内で電気泳動により強制的に移動させる。その後、レーザーをチップ側面から入射し、チップ全面から出る蛍光を一括して高感度2次元検出器で検出する。この結果、ハイブリダイゼーション効率が高く、高感度高速にDNA検出ができるDNA検出用のポリヌクレオチドプローブチップ及び検査方法を提供できる。

【0024】

【発明の実施の形態】

以下本発明を図面を参照して実施例を用いて詳細に説明する。

【0025】

(第1の実施例)

図1は、本発明によるポリヌクレオチドプローブチップの一例を示し、図1(a)はポリヌクレオチドプローブチップの斜視図、図1(b)は一部拡大図である。ポリヌクレオチドプローブチップ1はプラスチックからなり、表面が疎水性処理された疎水性部分5に囲まれ平坦な底面を持つ凹部と、上部及び下部の端が開口する複数の小穴(小穴が形成される区画)2が凹部の底面に格子状に配列して形成される。疎水性部分5と凹部の底面との間には、表面が親水性処理された親水性部分4が形成される。小穴2の上部の開口は0.5mm×0.5mm、上部と下部の開口間の距離は1mmである。小穴2の開口部の形状は正方形に限らず、矩形、円形等の任意の形状でも良い。小穴2は0.5mmの隔壁3を介してx、y方向に配置され、16×16のマトリクスを構成している。即ち、各小穴2の中心は、1mmの間隔をおいて2次元に配置されている。

【0026】

小穴2の上部の開口の面積は下部の開口の面積より小さくして、ゲルを保持することが可能である。即ち、小穴2には、上部の開口から下部の開口に向けてテーパをつけてあり、ゲルを形成したときのゲル保持を容易にすることもできる。疎水性部分5と親水性部分4により試料溶液を容易に、ゲルが保持される小穴2を持つ凹部に保持できる。

【0027】

ポリヌクレオチドプローブチップの側面にはレーザー導入用の光学研磨したレーザー導入部6が形成される。レーザーは各小穴2の側面部を照射する。プラスチックの材質として、400nmから650nmのレーザー光をよく透過し、光学的に透明なポリメタクリル

10

20

30

40

50

酸メチル (PMMA) を用いる。なお、図 1 (a) に図示しない、レーザーを得るレーザー光源、蛍光標識から発する蛍光を検出する高感度冷却 CCD カメラは図 6 に示す。

【0028】

次に、各小穴 2 の内面 (小穴の側面部面) の表面処理について説明する。小穴 2 の内面は内部にゲルを形成した時に、小穴 2 の内部にゲルを確実に保持するために、酸素プラズマによるエッチングにより小穴 2 の内面に分子レベルの凹凸形状を形成してある。

【0029】

図 2 は、ポリヌクレオチドプローブチップのゲルが保持される小穴の内面の表面処理を説明する図である。直鎖脂肪属化合物の一部にアクリル基を導入した試薬 22 を、各小穴 2 の内面 21 (小穴の側面部面) に塗布して、各小穴 2 の内面 21 に活性アクリル基を導入した状態 23 を得る。第 1 の実施例では、各小穴 2 にアクリルアミドゲルを保持するが、この時、各小穴 2 の内面 21 に活性アクリル基とアクリルアミドゲルとの間が連結される。試薬 22 は、直接プラスチックの表面と化学結合しないが、試薬 22 の分子内の直鎖脂肪部分の疎水結合により、試薬 22 はプラスチックの表面に固定される。

【0030】

図 3 は、ポリヌクレオチドプローブチップにポリヌクレオチドプローブを保持する方法を説明する図である。異なる 256 種類のプローブを準備する。5' 末端にアミノ残基 31 を持つ各ポリオリゴヌクレオチドプローブ 30 をホスホアミダイト法で合成して用いる。各プローブ 10 μM の水溶液にアクロレイン 32 を 2 mM の濃度になるように混合する。30 分間 20 °C で反応させた後、セファデックス G 25 によるゲル濾過で未反応のアクロレインを除去する。この操作でポリヌクレオチドプローブ 30 のアミノ残基 31 とアクロレイン 32 のアルデヒド基が反応し、5' 末端に活性アクリル基が導入されたポリヌクレオチドプローブ 33 が得られる。真空乾燥した後、5' 末端にアクリル基が導入されたポリヌクレオチドプローブを 10 μM の濃度の水溶液の状態、-20 °C、ヘリウム雰囲気下で保存する。

【0031】

ゲル前駆体にはアクリルアミドモノマーと N、N'-メチレンビスアクリルアミドの 39 : 1 の混合液を用いる。0.015% 過硫酸アンモニウムを含む 1.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 2.5 μL (マイクロリットル)、アクリル基を導入したポリヌクレオチドプローブ (10 μM) 0.5 μL、15% のアクリルアミド 1.5 μL の混合液に 40 nM の N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン 0.5 μL を加えて、直ちにチップの小穴 2 に滴下する。重合反応はヘリウム雰囲気下で行なう。

【0032】

ラジカル重合反応は、酸素やプラスチック表面そのものが原因で重合阻害を起こす。この重合阻害を防止し、微細な部位に於ける気泡の発生を防ぐため、ヘリウム雰囲気で行なう。ヘリウム置換による重合阻害の完全な防止は不可能であるが、小穴 2 にはテーパーをつけてあるので小穴 2 に確実にゲルを保持できる。ヘリウム置換は、小穴内での気泡の発生を防止するためである。

【0033】

反応液は毛細管現象で一定量、小穴 2 に充填されゲル化する。N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン以外の溶液を全てのプローブについて調製しておき、N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミンを加えて直ちに小穴 2 に滴下することにより、効率よくポリヌクレオチドプローブチップを得ることができる。あるいは、N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン以外の試薬、即ち、アクリルアミド、N、N'-メチレンビスアクリルアミド、及び過硫酸アンモニウムを含むトリス緩衝液と、アクリル基を導入したポリヌクレオチドプローブとを混合した溶液を調製しておき、この溶液をポリヌクレオチドプローブチップ表面に滴下して小穴に充填する。次いで、ガス化又は霧化 (ミスト化) した N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミンで、ポリヌクレオチドプローブチップを暴露して、重合反応を開始させて、ポリヌクレオチドプローブチップを簡単に作成できる。以上説明した方法により、ポリヌクレオチドプローブ 30 は 34 に示す

10

20

30

40

50

ように、ポリアクリルアミドゲル鎖（ゲルマトリックス）35に固定される。ポリアクリルアミドゲル鎖（ゲルマトリックス）35は、小穴2の内面21（小穴の側面部面）に固定される。

【0034】

図4は、ポリヌクレオチドプローブチップと電気泳動電極の位置関係を示す平面図である。図4に示すように、ポリヌクレオチドプローブチップ1の下面（小穴2の下部開口側）は、電極42が配置される電極槽41の中に設置される。ポリヌクレオチドプローブチップ1の上面（小穴2の上部開口側）に滴下された試料液面（又は中）にメッシュ状の電極43が設置される。極性を切替える手段（スイッチ）44により極性が選択されて、電極42と電極43との間に電圧が印加される。

10

【0035】

作製したポリヌクレオチドプローブチップを用いて、実際に各種DNA断片の計測に用いた一例について説明する。第1の実施例では、8.7kbのヒトDNAクローンを制限酵素Hsp92II（4塩基認識酵素でCATGを認識し、CATGの4塩基3'突出末端を形成する）で切断した断片群（以下、8.7kbDNA断片群と略記）を試料として用い、断片群から種々断片が別々に検出できることを示す。ここでは、以下に示す配列番号1、及び配列番号2のプローブを用いて、配列番号1、及び配列番号2のプローブに相補なDNA断片を検出した例について説明する。

【0036】

配列番号1のプローブ：

5' TCTCACACCCAGCTGTCCCAAGACCGTTTTGC3'

配列番号2のプローブ：

5' AATACAGGCATCCTTCACTACATTTTCCCT3'

配列番号1、及び配列番号2のプローブはポリヌクレオチドプローブの異なる小穴2に保持される。その他の小穴2には、8.7kbDNA断片群に相補結合しないプローブが保持される。配列番号1、及び配列番号2のプローブに相補な断片のみが混合物から検出できるか否かでポリヌクレオチドプローブチップの有効性を確認する。以下に具体的な実施内容について説明する。

20

【0037】

（試料調製）

モデル試料として8.7kbのヒト由来DNAクローンを制限酵素で切断して、3'末端に配列番号3の配列を持つDNA（アダプター）配列を結合したDNA断片混合物52を用意する。まず、この8.7kbのDNAを制限酵素Hsp92IIで切断して、断片の3'両末端に、配列番号3の既知配列を持ち、3'末端が、蛍光体（スルホローダミン101（SR101））で標識されたDNAをDNAリガーゼで連結する。

30

【0038】

配列番号3のDNA（アダプター）：

5' - ACTGGCCGTCGTTT - 3'

配列番号3のDNA（アダプター）の5'末端には、ライゲーション反応用のリン酸基が結合している。即ち、400fmolのヒト由来DNAクローンを10nMのMgCl₂、15nMのKClを含む10nMのTris-HCl（pH7.4）溶液に溶解し、40ユニットのHsp92II（Promega、UK）を加え37°C、2時間反応させて完全に切断する。エタノール沈殿でDNAを回収した後、アルカリホスファターゼで5'末端のリン酸基を除去する。蛍光体で3'末端が標識され5'末端にリン酸基を有する配列番号3のアダプター（20pmol）と、配列番号3のDNAと相補結合可能な配列番号4の既知配列を持つDNA（ヘルパーオリゴマー）（20pmol）を、400fmolの切断DNA断片混合物に添加し40μLとし、ライゲーションハイ（TOYOBO）20μLを添加して、16°Cで1時間ライゲーション反応を行なう。

40

【0039】

配列番号4のDNA（ヘルパーオリゴマー）：

50

5' - A A A C G A C G G C C A G T C A T G - 3'

配列番号4のDNA(ヘルパーオリゴマー)の3'末端はリン酸化されている。これにより、各DNA断片の3'末端にのみアダプター配列が導入され、同時に各断片の3'末端が蛍光体53(スルホローダミン101)で標識される。

【0040】

ライゲーション反応は、DNA断片の3'末端のOH酸基と、配列番号3のDNAの5'末端のリン酸基との間を連結する反応である。ここで示した方法は、配列番号4のDNAの3'末端は、リン酸基で修飾されているため配列番号3と配列番号4のDNA間のライゲーションが抑えられる上、DNA断片の5'末端のリン酸基を除去してあるためDNA断片間の再結合を防止できる。このため確実に配列番号3のDNAを導入できる。このようにして調製した蛍光標識DNA断片混合物52を希釈し0~1nMの各種濃度の試料として用いる。

10

【0041】

次に、オリゴヌクレオチドプローブチップによるDNA断片の検出について述べる。オリゴヌクレオチドプローブチップに試料溶液250μLを滴下すると、約2mmの厚さの液相ができる。

【0042】

図4に示す電極42を正極、電極43を負極として、20Vの電界を印加し、10秒後に極性を反転させ逆電位を10秒印加するサイクルを10回繰り返して、DNA断片を各小穴内のゲルに保持したポリヌクレオチドプローブにハイブリダイズさせる。次に、電極42を正極、電極43を負極として、20Vの電界を印加してはハイブリダイズしなかったDNA断片を除去する。

20

【0043】

図5は、図1に示すオリゴヌクレオチドプローブチップの動作を説明する図である。矢印を持つ直線50は電気泳動により蛍光標識DNA断片混合物52が移動する電気泳動方向を示す。隔壁3により仕切られる小穴54、55に、各々異なるポリオリゴヌクレオチドプローブ56(配列番号1のプローブ)、57(配列番号2のプローブ)が固定される。蛍光標識DNA断片混合物52がポリアクリルアミドゲル中を通過すると、ポリオリゴヌクレオチドプローブ56に相補な塩基配列58を持つ蛍光標識DNA断片が小穴54に、ポリオリゴヌクレオチドプローブ57に相補な塩基配列59を持つ蛍光標識DNA断片が小穴54に、それぞれ60に示すように捕捉される。その他の蛍光標識DNA断片61は、小穴54、55に捕捉されずに小穴を通り抜ける。

30

【0044】

反応の終了したポリヌクレオチドプローブチップの光学研磨した面(図1に示すレーザー導入部6)に、594nmのHe-Neレーザーを照射する。レーザーは走査して照射しても良いし、広げて一度の照射しても良い。レーザーは各小穴を照射する。蛍光体53(スルホローダミン101)から発する蛍光を605nm~660nmの光を透過する蒸着フィルターを通して、ポリヌクレオチドプローブチップの上面又は下面から高感度冷却CCDカメラで計測する。

【0045】

図6は、ポリヌクレオチドプローブチップ上に検出された蛍光標識DNA断片の位置を示す図である。図6に示すように、配列番号1、及び配列番号2のプローブ56、57を各々保持した小穴54、55で蛍光が検出できる。プローブ56、57以外のその他のプローブが固定された小穴61では、小穴54、55での検出される蛍光強度の1/20以下の蛍光しか検出されない。図6には、図1(a)に図示しない、レーザー122を得るレーザー光源122、高感度冷却CCDカメラ124を示す。

40

【0046】

図7は、ポリヌクレオチドプローブチップによるDNA断片の検量線の例を示す図である。図7は、種々濃度のDNA断片濃度に対して得られる蛍光強度を測定して得られる。71は配列番号1のプローブを保持した小穴56から得られた蛍光強度(相対強度)、72

50

は配列番号2のプローブを保持した小穴57から得られた蛍光強度(相対強度)、73は図6の小穴61の位置から得られた蛍光強度で非特異吸着由来のバックグラウンドの蛍光強度(相対強度)を表わす。

【0047】

(第2の実施例)

本発明のポリヌクレオチドプローブチップの他の形態について述べる。第1の実施例に示した、上下貫通する小穴を持つポリヌクレオチドプローブでは、ポリヌクレオチドプローブを保持するゲルを各小穴に形成するのは簡単であるが、試料ポリヌクレオチドを添加し、各区画のゲル中を電気泳動により移動させるための電極を、別途用意する必要がある。第2の実施例では、電極を基板上に形成する。

10

【0048】

図8は第2の実施例のポリヌクレオチドプローブチップ79の平面図(図8(a))、及びA-A'断面図(図8(b))である。ポリヌクレオチドプローブチップ79は、表面が疎水性の部材(疎水性部分86)により形成される凹部をガラス基板80の上に有し、凹部内の一方向で表面が疎水性の疎水性部分86'で仕切られたポリヌクレオチドプローブ保持ゲル83、凹部内の一方向でポリヌクレオチドプローブ保持ゲル83を挟み、線状の電極81、82、及び親水性部分84、85を有している。電極81、82、親水性部分84、85、ゲルが形成される部分(区画)87、及び疎水性部分86'はほぼ同一面にある。ゲルが形成される部分(区画)87は、疎水性部分86、86'により隔離される。区画87は、例えば、16区画設けられる。

20

【0049】

上記一方向にある、表面が疎水性された部材(疎水性部分86)には、ポリヌクレオチドプローブ保持ゲル83に照射するレーザーを導入するレーザー導入用の光学研磨したレーザー導入部6(図8には図示せず)が、第1の実施例と同様に形成される。平坦な底面を持つ凹部が直接ガラス基板80に形成される場合には、ガラス基板の側面を光学研磨してレーザー導入部を形成する。

【0050】

各区画87の大きさは0.5mm×0.5mm、疎水性部分86'のA-A'方向に直交する方向の寸法は0.25mm、親水性部分84、85のA-A'方向での寸法は0.25mm、電極81、82のA-A'方向での寸法は0.15mmである。即ち、16区画の中心が、0.75mmの間隔をおいて1次元に配置されている。

30

【0051】

ガラス基板80のゲルが形成される部分87の部分にメタクリロキシプロピルトリメトキシシランを塗付して、120°Cで30分間ベークすることにより表面に2重結合をもった残基を導入してある。金の蒸着により電極81、82をガラス基板80の面を形成する。疎水性部分86はテフロンの蒸着により形成される。親水性部分84、85は最初はテフロンを蒸着してある。

【0052】

第1の実施例と同様に2重結合をもった残基を導入した基板87の部分に、ポリヌクレオチドプローブ保持ゲルを形成する。即ち、ゲル前駆体としてアクリルアミドモノマーとN、N'-メチレンビスアクリルアミドの29:1の混合液を用意する。0.015%過硫酸アンモニウムを含む1.5Mトリス塩酸緩衝液(pH8.5)2.5μL、アクリル基を導入したポリヌクレオチドプローブ(0.2nM)0.5μL、15%のアクリルアミド1.5μLの混合液に40nMのN、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン0.5μLを加える。N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン以外の溶液を全てのプローブについて調製しておき、N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミンを加えてすぐに直ちにチップ表面に滴下する。重合反応はヘリウム雰囲気中で行なう。勿論、第1の実施例と同様に、N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン以外の試薬、即ち、アクリルアミド、N、N'-メチレンビスアクリルアミド、及び過硫酸アンモニウムを含むトリス緩衝液と、アクリル基を導入したポリヌクレオチドプローブと

40

50

を混合した溶液を調製しておき、この溶液をポリヌクレオチドプローブチップ表面の区画 87 に滴下する。

【0053】

次いで、ガス化又は霧化（ミスト化）した N、N、N'、N' - テトラメチルエチレンジアミンで、ポリヌクレオチドプローブチップを暴露して、重合反応を開始させても良い。反応液が区画 87 からはみ出しても、テフロンを蒸着してある部分はゲル化しない。これは、通常テフロンは酸素を吸蔵しており、ラジカル重合を阻害するためである。吸蔵している酸素は容易には置換されない。電極 81、82、2重結合を導入した部分 87 はゲル化する。テフロンを蒸着していた親水性部分 84、85 は、ゲル 83 を形成した後に 0.05% Tween 20 水溶液で処理して親水性に変える。

10

【0054】

図 9 は、アクリル基を導入したポリヌクレオチドプローブが保持されたポリアルリルアミドゲルを得る方法を説明する図である。5'末端にアミノ酸基 101 を導入したポリヌクレオチドプローブ 100 と、N - アクリロキシスクシンイミド 112 とを pH 9 で反応させて、ゲル濾過法でアクリロキシポリヌクレオチドプローブ 113 を得る。第 1 の実施例と同様にして、115 に示すように、ポリヌクレオチドプローブ 100 が固定されたポリアルリルアミドゲル 114 を得ることができる。このポリヌクレオチドプローブ 100 が固定されたポリアルリルアミドゲル 114 が、図 8 に示すポリヌクレオチドプローブチップ 79 のポリヌクレオチドプローブ保持ゲル 83 である。

【0055】

20

この様にして調製したポリヌクレオチドプローブチップ 79 を用いて実際に DNA 断片を検出する例について説明する。試料は第 1 の実施例と同様のものを用いる。即ち、8.7 kb のヒト DNA クローンを制限酵素 Hsp 92 I I で切断し蛍光標識した断片群を試料（調製は第 1 の実施例に従った）として、配列番号 1、及び配列番号 2 のプローブを用いて、これに相補な DNA 断片を検出した例について説明する。

【0056】

試料溶液 100 μ L をチップに滴下すると、疎水性部分 86、86'、ゲルで表面が覆われ親水性の電極 81、82、及び親水性部分 84、85 により、図 8 に示すように、試料溶液は 88 のような液だまりとなる。試料溶液とポリヌクレオチド保持ゲル 83 は接触していれば良く、ゲル 83 が試料溶液に完全に浸漬してしまうほど液量が多くてもよい。図 8 に示す電極 82 を正極、電極 81 を負極として、0.5 V の電界を印加し試料液中の DNA 断片を電気泳動によりゲル中に移動させハイブリダイゼーションを行なう。第 1 の実施例と同様に、5 秒おきに電極の極性を複数回切換えて何度も試料液 88 中の蛍光標識された DNA 断片をゲル 83 中で移動させる。電極の極性の切換えは、図 8 に図示しない極性を切換える手段（スイッチ）により行なう。今回は 5 秒おきに 10 回繰り返す。

30

【0057】

その後、セル全体を洗浄し、更に、電極 82 を正極、81 を負極として、0.5 V の電界を印加してゲル中の未反応 DNA 断片を電気泳動によりゲルから溶出させ、更に、洗浄してバックグラウンドの原因となるハイブリダイズしなかった DNA 断片を除去する。反応の終了したポリヌクレオチドプローブチップに 594 nm の He - Ne レーザーを照射し

40

【0058】

（第 3 の実施例）

図 10 は、第 3 の実施例のポリヌクレオチドプローブチップの構成を示す断面図（図 8 (a) の A - A' 断面に対応する）である。図 10 に示す構成では、第 2 の実施例で説明した図 8 に示すポリヌクレオチドプローブチップの構成に於いて、ゲルが形成される部分（区画）87 の各区画には、フォトダイオード 126 が形成され、更に、絶縁層（図示せず）を介してフォトダイオード 126 の上部に特定の波長範囲の光（蛍光標識から発する螢

50

光)を通過する金属蒸着膜128が形成されており、金属蒸着膜128の面にポリヌクレオチドプローブ(DNAプローブ)が固定される。金属蒸着膜128は使用される蛍光体の発光波長を通過させるバンドパスフィルターとして作用する。

【0059】

第2の実施例と同様にして、図10に示す電極82を正極、電極81を負極として、0.5Vの電界を印加し試料液88中のDNA断片を電気泳動によりゲル83中に移動させハイブリダイゼーションを行ない、蛍光標識した断片群を各区画に捕捉した後、セル全体を洗浄し、次いで、電極82を正極、81を負極として、0.5Vの電界を印加してゲル83中の未反応DNA断片を電気泳動によりゲル83から溶出させ、次いで、洗浄してハイブリダイズしなかったDNA断片を除去する。なお、電極の極性の切換えは、図10に図示しない極性を切換える手段(スイッチ)により行なう。反応の終了したポリヌクレオチドプローブチップに、図6に示す構成と同様にして、594nmのHe-Neレーザーを照射する。

10

【0060】

発する蛍光を各区画の各フォトダイオード126により検出し、各フォトダイオードに流れる電流は、ポリヌクレオチドプローブチップの面に形成される配線により、各区画毎に外部に取り出される。スルホローダミン101から発する蛍光は、605nm~660nmの光を透過する金属蒸着膜128を通して、各フォトダイオード126により検出される。以上の構成により、第1の実施例、第2の実施例と同様に目的DNA断片を検出できる。

20

【0061】

(第4の実施例)

図11は、第4の実施例のポリヌクレオチドプローブチップの構成を示す断面図(図8(a)のA-A'断面に対応する)である。図11に示す構成では、第3の実施例で説明したポリヌクレオチドプローブチップの構成に於いて、金属蒸着膜128の上部に、更に、絶縁層(図示せず)を介して透明電極130を形成する。透明電極130は、蛍光体から発する蛍光を通過させる構成とする。透明電極130の面にポリヌクレオチドプローブ(DNAプローブ)が固定される。

【0062】

透明電極130を負極とし、図11に示す電極82、81を正極として、0.5Vの電界を印加し試料液88中のDNA断片を電気泳動によりゲル83中に移動させハイブリダイゼーションを行ない、蛍光標識した断片群を各区画に捕捉した後、セル全体を洗浄し、次いで、透明電極130を正極とし、図11に示す電極82、81を負極として、0.5Vの電界を印加してゲル83中の未反応DNA断片を電気泳動によりゲル83から溶出させ、次いで、洗浄してハイブリダイズしなかったDNA断片を除去する。透明電極130、電極(81、82)の極性の切換えは、図11に図示しない極性を切換える手段(スイッチ)により行なう。

30

【0063】

反応の終了したポリヌクレオチドプローブチップに、図6に示す構成と同様にして、594nmのHe-Neレーザーを照射し、発する蛍光を各区画毎に検出することは、第3の実施例と同様である。但し、蛍光は、金属蒸着膜128及び透明電極130を介して各フォトダイオード126により検出される。以上の構成により、第1、第2、第3の実施例と同様に目的DNA断片を検出できる。

40

【0064】

(第5の実施例)

図12は第5の実施例のポリヌクレオチドプローブチップ79の平面図(図12(a))、及びA-A'断面図(図12(b))である。図12に示す構成では、第2の実施例で説明した図8に示すポリヌクレオチドプローブチップの構成に於いて、更に、ポリアクリルアミドゲル83が形成される各区画87の中心部に形成される点電極150(面積は0.15mm×0.15mm)と、各区画87の外部に形成される点電極150を挟む点電極

50

152、162（寸法はA-A'方向で0.1mm、A-A'方向に直交する方向で0.15mm）とが配置される。点電極150の中心と、点電極152、162の各中心とは、A-A'方向で、0.13mm離れている。点電極150の面積より広い範囲の区画87にポリアクリルアミドゲル83が形成されている。

【0065】

図12に示す構成では、直流電界を印加する代わりに、高周波電界を印加することにより、試料DNAをポリアクリルアミド内に導入し、試料DNAとポリアクリルアミドマトリクスに固定されているポリヌクレオチドプローブとを効率良くハイブリダイズさせる。高周波電界を用いる利点は、電気分解によるガスの発生が無く、長時間の泳動が可能な点にある。第4の実施例に於ける直流電界の印加では、ガスが発生するため、一定方向に電界を印加できず、数秒単位で印加する電界の方向を切り替えるか、又は電気分解が起きないような低電界の印加をしなければならないという問題がある。この問題は高周波電界を用いることにより解決できるが、DNA分子を高周波電界の印加により目的の方向に移動させるには、電極配置に工夫が必要である。

10

【0066】

試料DNA混合溶液をポリヌクレオチドプローブチップ表面に適下して、電極81、82、152、162、及びポリアクリルアミドゲルが、試料DNA混合溶液で浸された状態とする。先ず、点電極150と線状の電極81との間、及び点電極150と線状の電極82との間に、2MHz、50Vの高周波を印加すると、混合溶液中のDNA分子は電気力線の勾配方向に電界密度の高い向きに移動する。即ち、DNA分子は、電極81及び電極82から点電極150に向かって移動し、ポリアクリルアミドゲル中を通過することになる。この結果、標的DNAがゲルマトリクスに固定されているポリヌクレオチドプローブにハイブリダイズする。DNA分子の移動速度は、電気力線の勾配とDNAサイズに依存し、大きなDNA分子程移動しやすい。次に、ポリヌクレオチドプローブとハイブリダイズしないDNA分子を除去するため、点電極152と電極82との間、又は点電極162と電極81との間に高周波電界を印加する。

20

【0067】

電極82、81の長さは、それぞれ電極152、162の長さより長い為、電極82、81の近傍よりも電極152、162の近傍の方で電界密度が高くなり、ゲルマトリクスの中にハイブリダイズしないで保持されているDNA分子は、電極152、162の方向に移動して、ポリアクリルアミドゲルから溶出する。

30

【0068】

第5の実施例では、M13ファージ由来のDNAに相補的な50塩基長のポリヌクレオチドプローブを固定した各区画87を用意する。試料としてM13ファージ、及びラムダDNAを使用して、(1)M13ファージをPstIで切断した後に、3'末端に蛍光色素Cy-5を標識したdUTPをターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いた伸長反応により取り込み、蛍光標識されたM13ファージと、(2)(1)と同様に、ラムダDNAをPstIで切断した後に、3'末端に蛍光色素Cy-5を標識したdUTPをターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いた伸長反応により取り込み、蛍光標識されたラムダDNAとを調製して、(1)と(2)とによる調製物の混合物を試料混合溶液とする。

40

【0069】

試料混合溶液をポリヌクレオチドプローブチップの表面に滴化し、点電極150と線状の電極81との間、及び点電極150と線状の電極82との間に、2MHzの電界を2分間印加して、試料DNAをポリアクリルアミドゲル中に導いた後、電極162と電極81との間に同様に2MHzの電界を2分間印加する。ポリヌクレオチドプローブチップ表面を洗浄した後、更に、電極82と電極152との間に同様に2MHzの電界を2分間印加した後に、ポリヌクレオチドプローブチップ表面を洗浄する。

【0070】

ポリヌクレオチドプローブチップの凹部に洗浄液を満たしたまま、洗浄液の面にカバーガ

50

ラスを乗せ、図6に示すように、ポリヌクレオチドプローブチップの側面からレーザーを照射し、各区画87に於けるポリアクリルアミドゲル83から発生する蛍光を検出する。その結果、M13ファージ由来のDNAに相補的な50塩基長のポリヌクレオチドプローブが固定された区画から検出された蛍光強度は、他の塩基配列を持つポリヌクレオチドプローブが固定された区画から検出された蛍光強度よりも、100~300倍強い蛍光強度で観測される。

【0071】

図12に示す電極が配置されたポリヌクレオチドプローブチップを用いれば、高周波電界の印加により、DNA分子をポリアクリルアミドゲル中にトラップしたり、ポリヌクレオチドプローブとハイブリダイズしなかったDNA分子をポリアクリルアミドゲルから溶出させたりする等の、DNA分子のハンドリングを容易に行なうことができる。また、電気分解によるガスの発生が無いので、電極表面に直接ポリアクリルアミドゲルを形成する場合も、長時間の電界の印加が可能である。このため、希薄な溶液からポリアクリルアミドゲル中にハイブリダイゼーションにより特定のDNA分子を濃縮するのにも有効である。

【0072】

なお、第5の実施例の構成において、第3の実施例と同様にして、各区画87に、各区画の面積とほぼ同面積を持つフォトダイオードと、絶縁層を介してフォトダイオードの上部に特定の波長範囲の光（蛍光標識から発する蛍光）を通過する金属蒸着膜128とを形成して、第4の実施例と同様にして、更に、金属蒸着膜128の上部に、絶縁層を介して透明電極130を形成して、透明電極130を図12に示す電極150として用いることも可能である。

【0073】

（第6の実施例）

本発明のポリヌクレオチドプローブチップでは、多量のポリヌクレオチドプローブをゲルマトリックスに固定できるため、ハイブリダイゼーションにより捕捉できるDNA量が各区画当たりサブpmolに達する。このため、各区画に捕捉されたDNAを回収して、更に詳しい分析を行なうことが可能である。第6の実施例では、捕捉されたDNAを複数本のキャピラリーから構成されるキャピラリーアレー電気泳動装置を用いて直接分析する方法について、以下説明する。

【0074】

図13は、キャピラリーアレー電気泳動装置と第1の実施例のポリヌクレオチドプローブチップとを組合わせた第6の実施例の装置の構成及び動作を説明する断面図である。第6の実施例では、第1の実施例と同様に、ヒト8.7kbのヒトDNAクローンを制限酵素HSP92IIで切断して得た断片群を試料とする。配列番号1、2のポリヌクレオチドプローブを固定したポリヌクレオチドプローブチップ1（図5）を用いて、配列番号1、2のポリヌクレオチドプローブに相補的な断片を各区画に捕捉する。図13の上部に示す60は、各区画に断片が捕捉された状態を示す（図5の下部に示す60と同じである）。

【0075】

図13に示すように、第6の実施例の装置の構成では、ポリヌクレオチドプローブチップ1の各区画54、55に、キャピラリー200の末端を密着させる。複数本のキャピラリー200は、ポリヌクレオチドプローブチップ1の各区画の配置の形状に合わせて、キャピラリー200の先端は、16×16のマトリックス状に束ねてあり、各区画に1本のキャピラリー200が対応して接触できるようになっている。即ち、各キャピラリー200の先端の中心は、1mmの間隔をおいて2次元に配置されている。各キャピラリーの内部には、電気泳動分離担体として、T=4.5%、C=2.5%の架橋ポリアクリルアミドゲル201が形成されている。

【0076】

各キャピラリーの一端でキャピラリー内部のポリアクリルアミドゲルと、ポリヌクレオチドプローブチップの各区画に形成されたゲルとは、電氣的に接触しており、各キャピラリーの他端でキャピラリー内部のポリアクリルアミドゲルと接触する電極204と、電極4

10

20

30

40

50

3との間で電界を印加できる。

【0077】

ポリヌクレオチドプローブチップに赤外線ランプを用いて赤外線を照射すると、ポリヌクレオチドプローブチップの温度が上昇し、ゲルマトリックス35に固定されているポリヌクレオチドプローブ56、57にハイブリダイズしている配列58又は59を持つDNA断片が遊離する。

【0078】

電極204を正極とし、電極43を負極として、各キャピラリー内部のゲルとポリヌクレオチドプローブチップの各区画には、100V/cmの電界が印加されており、遊離したDNA断片は各区画毎に別々のキャピラリーに電気泳動的に移動する。連続的に30分間電界を印加すると、各断片はサイズにより泳動速度が異なるので、電極204に近い側で、各キャピラリーにレーザーを照射するか、又は、各キャピラリーの外部の緩衝液中でレーザーを照射して、各断片の蛍光標識を励起して発する蛍光を検出する、レーザー照射系及び蛍光検出系(図13に図示せず)を用いて、各区画に捕捉されていたDNA断片のサイズを知ることができる。更に、上記の蛍光の検出と同期させて、各区画に捕捉されていたDNA断片をサイズ毎に、分取して回収できることは言うまでもない。

【0079】

(第7の実施例)

次に、キャピラリーアレー電気泳動装置と、第2の実施例(図8)、第3の実施例(図10)、第4の実施例(図11)、第5の実施例(図12)の各実施例に示すポリヌクレオチドプローブチップ79とを組合わせた第7の実施例のDNA断片を回収する装置の構成及び動作を説明する。

【0080】

図14は、キャピラリーアレー電気泳動装置と第5の実施例(図12)とを組合わせた第7の実施例のDNA断片を回収する装置の構成及び動作を説明する断面図である。各区画87のポリヌクレオチドプローブを固定したゲルマトリックス83には、ポリヌクレオチドプローブに相補的なDNA断片が捕捉されている。各区画87の中心と、16本の各キャピラリーの一方の先端の中心とが、ほぼ一致するように、各キャピラリー200の先端の中心が0.75mmの間隔をおいて、溶液88、及びゲルマトリックス83に接触して、1次元方向に配置されている。

【0081】

第6の実施例と同様にして、赤外線ランプを用いてポリヌクレオチドプローブチップ97の表面を赤外線照射して加熱して、ハイブリダイズしているDNA断片をポリヌクレオチドプローブから遊離させる。次に、電極152、162、150を負極とし、他端で各キャピラリー内部のポリアクリルアミドゲルと接触する電極204'を正極として、50V/cmの電界強度を30秒印加し、ゲルマトリックス83から遊離したDNA断片をキャピラリー200に導入する。試料溶液88の容量は少なく、このまま電界を印加し続けると溶液のpHが変化し、電気泳動に影響が出るので、キャピラリー200の先端をポリヌクレオチドプローブチップから離し、十分な電解液を含む電極槽に移し、更に、200V/cmで泳動を続ける。第6の実施例と同様に、キャピラリーの他の末端側には、レーザー照射系、蛍光検出系が配置してあり、泳動時間からポリヌクレオチドプローブチップに捕捉されたDNA断片のサイズを測定できる。

【0082】

図15は、ポリヌクレオチドチップ79の16の各区画にハイブリダイズしたDNA断片を、各区画から回収して測定したDNA断片の電気泳動パターンの例を示す。第6の実施例と同様にして、各区画の異なるポリヌクレオチドにハイブリダイズしたDNA断片をサイズ毎に、分取して回収可能なことがわかる。

【0083】

以上の説明では、キャピラリーアレー電気泳動装置と第5の実施例(図12)に示すポリヌクレオチドプローブチップ79とを組合わせたDNA断片を回収する装置の構成及び動

10

20

30

40

50

作を説明したが、第5の実施例(図12)の代わりに、第2の実施例(図8)、第3の実施例(図10)、第4の実施例(図11)の各実施例に示すポリヌクレオチドプローブチップ79と、キャピラリーアレー電気泳動装置とを組合わせても良いことはいうまでもない。第2の実施例(図8)、第3の実施例(図10)の各ポリヌクレオチドプローブチップを用いる場合には、電極81、82を負極とし、第4の実施例(図11)の各ポリヌクレオチドプローブチップを用いる場合には、透明電極130、電極81、82を負極とする。

【0084】

以上説明した各実施例では、十分な量のDNA断片をポリヌクレオチドプローブチップに捕捉できるので、捕捉したDNA断片を更に詳しく解析することが可能である。通常、固相に捕捉したDNAを利用する場合には、十分な量のDNAを得るために磁気ビーズや多孔質ビーズ等の非常に広い表面積を持つ担体を利用するのが一般的であり、各実施例で説明した実質平面からなるポリヌクレオチドプローブチップを用いて、分離分取を行なうことは、従来困難であった。

10

【0085】

また、従来のビーズを用いる分離では、何らかの形で固相に捕捉したDNAは、一旦溶液中に溶出させて利用するのが一般的であるが、多くの場合、溶出時に希釈され、濃縮が必要である場合が殆どである。本発明の各実施例では、種々の異なるプローブが異なる区画にアレー状に固定されているため、種々のDNAを同時に分取できる多成分同時分取デバイスを実現できる。

20

【0086】

更に、本発明の各実施例によれば、各区画から分取したDNA断片は、溶液に再溶出することなく、直接キャピラリー電気泳動を用いた分離計測したり、分離後に微量体積のまま回収することができる利点がある。

【0087】

以上説明した各実施例に基づき、本発明の概要を以下に説明する。本発明では、特定のポリヌクレオチドにハイブリダイズしたポリヌクレオチドプローブの存在を、蛍光標識をレーザーで励起して放射される蛍光を光検出器で検出するが、蛍光標識は、予め試料ポリヌクレオチドに結合されるか、あるいは、特定のポリヌクレオチドにハイブリダイズしたポリヌクレオチドプローブに付加(結合)される。

30

【0088】

(1)本発明のポリヌクレオチドプローブチップは、各々異なるポリヌクレオチドプローブが保持された複数区画と、各区画に保持されポリヌクレオチドプローブを保持するゲルを有し、試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中を電気泳動により移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの中の特定のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる。各ポリヌクレオチドプローブは、10塩基乃至60塩基からなる実質的に共通な配列からなる共通部分と、共通部分の3'末端に任意の2塩基乃至3塩基の組み合わせからなる認識部分を有し、認識部分の種類毎に各々異なる区画に保持される。

【0089】

(2)本発明のポリヌクレオチドプローブチップの作成法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブが保持された複数区画を有するポリヌクレオチドプローブチップの作成法に於いて、反応残基を有するゲル前駆体と反応残基と結合する残基を有する複数種のポリヌクレオチドプローブからなるポリヌクレオチドプローブセットを予め準備する工程と、ポリヌクレオチドプローブセットから選んだ任意のポリヌクレオチドプローブの種類毎にゲル前駆体とそれぞれ混合し、異なる区画に添加してゲル化させる工程とを有する。

40

【0090】

(3)本発明のポリヌクレオチドプローブチップの他の作成法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブが保持された複数区画を有するポリヌクレオチドプローブチップの作成法に於いて、反応残基を有するゲル前駆体と反応残基と結合する残基を有する複数種のポリ

50

ヌクレオチドプローブからなるポリヌクレオチドプローブセットを予め準備する工程と、ポリヌクレオチドプローブセットから選んだ複数の任意のプローブからなる複数のポリヌクレオチドプローブグループを、ポリヌクレオチドプローブグループ毎にゲル前駆体と混合し、異なる区画に添加してゲル化させる工程とを有する。

【0091】

(4) 本発明のポリヌクレオチド検出法は、ポリヌクレオチド混合物を蛍光標識する工程と、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を有するポリヌクレオチドプローブチップに、蛍光標識した試料ポリヌクレオチドを添加して各区画のゲルの中を電気泳動により移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブとポリヌクレオチド混合物の中の特定ポリヌクレオチドとをハイブリダイズして捕捉する工程と、各区画のゲルに捕捉された蛍光標識された特定のポリヌクレオチドを検出する工程とを有する。

10

【0092】

(5) 本発明の他のポリヌクレオチド検出法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を有するポリヌクレオチドプローブチップに試料ポリヌクレオチドを添加して、各区画のゲルの中を電気泳動により移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの中の特定ポリヌクレオチドとをハイブリダイズして捕捉する工程と、特定のポリヌクレオチドがハイブリダイズしたポリヌクレオチドプローブを蛍光標識する工程と、蛍光標識されたポリヌクレオチドプローブを検出する工程とを有する。

20

【0093】

(6) 本発明のポリヌクレオチドプローブチップは、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を有し、ゲルの中で試料ポリヌクレオチドを移動させる第1の電極、及び第2の電極が各区画を挟んで配置される。

【0094】

(7) 本発明の他のポリヌクレオチド検出法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を基板に有するポリヌクレオチドプローブチップに試料ポリヌクレオチドを添加する工程と、各区画を挟んで配置されゲルの中で試料ポリヌクレオチドを移動させる第1の電極、及び第2の電極の極性を複数回切換えて、試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中で移動させる工程とを有し、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの中の特定ポリヌクレオチドとをハイブリダイズする。

30

【0095】

(8) 本発明の他のポリヌクレオチドプローブチップは、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を基板に有するポリヌクレオチドプローブチップの各区画を挟んで配置され、ゲルの中で試料ポリヌクレオチドを移動させる第1の電極、及び第2の電極と、第1の電極、第2の電極の極性を複数回切換えて試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中で移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの中の特定ポリヌクレオチドとをハイブリダイズさせる。

【0096】

(9) 本発明のポリヌクレオチド検出装置は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を基板に有するポリヌクレオチドプローブチップと、基板の面と平行方向から複数区画のゲルにレーザー照射する手段と、放射される蛍光を基板の面と直角方向から検出する光検出器を有する。

40

【0097】

(10) 本発明の他のポリヌクレオチド検出法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を有するポリヌクレオチドプローブチップの複数区画のゲルを、基板の面と平行方向に同時にレーザー照射して、放射される蛍光を基板の面と直角方向から検出する。

【0098】

(11) 本発明の他のポリヌクレオチドプローブチップは、各々異なるポリヌクレオチド

50

プローブがゲルに保持された複数区画を基板に有し、各区画の各々に光検出素子が配置される。

【0099】

(12) 本発明の他のポリヌクレオチド検出法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を基板に有するポリヌクレオチドプローブチップの基板の面と平行方向から複数区画のゲルにレーザー照射して、各区画の各々に光検出素子が配置された光検出素子により放射される蛍光を基板の面と直角方向から検出する。

【0100】

(13) 本発明の他のポリヌクレオチド検出装置は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数区画を基板に有し、各区画の各々に光検出素子が配置される光検出素子を有するポリヌクレオチドプローブチップと、基板の面と平行方向から複数区画のゲルにレーザー照射する手段とを有する。

【0101】

(14) 本発明の他のポリヌクレオチドプローブチップは、凹部が形成された光学的に透明な基板と、凹部の平坦な底面に基板を貫通して形成されたテーパを持つ側面を有する穴に保持されるゲルと、ゲルに保持される各々異なるポリヌクレオチドプローブと、基板の側面にレーザー光を照射する部位とを有し、電気泳動により試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中を移動させることにより、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの中の特定のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる。

【0102】

(15) 本発明の他のポリヌクレオチドプローブチップは、凹部が形成された基板と、凹部の平坦な底面にゲルを保持する一方向に配列する複数の部位と、複数の部位を挟んで配置される第1の電極、及び第2の電極と、ゲルに保持される各々異なるポリヌクレオチドプローブと、基板の側面にレーザー光を照射する部位とを有し、電気泳動により試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中を移動させることにより、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの中の特定のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる。

【0103】

(16) 本発明の他のポリヌクレオチドプローブチップは、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数の区画を基板に有し、各区画の各々に光検出素子が配置される光検出素子と、光検出素子の上部に形成されたバンドパスフィルターと、バンドパスフィルターの上部に形成された第1の電極と、各区画を挟んで配置された第2の電極とを有し、第1の電極、第2の電極の極性を複数回切換えて試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中で電気泳動により移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドの中の特定ポリヌクレオチドとをハイブリダイズさせる。

【0104】

(17) 本発明の他のポリヌクレオチド検出装置は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数の区画を基板に有し、各区画の各々に光検出素子が配置される光検出素子と、光検出素子の上部に形成されたバンドパスフィルターと、バンドパスフィルターの上部に絶縁層を挟んで形成された第1の電極と、各区画を挟んで配置された第2の電極とを有するポリヌクレオチドプローブチップと、第1の電極、及び第2の電極の極性を切換える手段(スイッチ)と、基板の面と平行方向から複数の区画のゲルにレーザー照射する手段とを有する。

【0105】

(18) 本発明の他のポリヌクレオチドプローブチップは、各々異なるポリヌクレオチドプローブを保持するゲルを有し、第1の方向に配置された複数の区画と、各区画のほぼ中心部に配置される点状の第1の電極と、複数の区画を挟んで第1の方向に沿ってほぼ平行に配置される線状又は帯状の第2の電極とを具備し、第1の電極と第2の電極との間に高周波電界を印加して、試料ポリヌクレオチドを各区画のゲル中を移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる。

10

20

30

40

50

【0106】

(19) 本発明の他のポリヌクレオチドプローブチップは、各々異なるポリヌクレオチドプローブを保持するゲルを有し、第1の方向に配置された複数の区画と、各区画のほぼ中心部に配置される点状の第1の電極と、複数の区画を挟んで第1の方向に沿ってほぼ平行に配置される線状又は帯状の第2の電極と、第1の電極と第2の電極との間に配置される点状の第3の電極とを具備し、第1の電極と第2の電極との間に高周波電界を印加して、試料ポリヌクレオチドを各区画のゲル中を移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ、第2の電極と第3の電極との間に高周波電界を印加して、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブとハイブリダイズしない試料ポリヌクレオチドをゲルから移動させる。

10

【0107】

(20) 本発明の他のポリヌクレオチド検査装置は、各々異なるポリヌクレオチドプローブが保持された複数の区画と、各区画に保持されポリヌクレオチドプローブを保持するゲルとを具備するポリヌクレオチドプローブチップと、電気泳動により試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中を移動させ、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる手段と、試料ポリヌクレオチドがハイブリダイズしたポリヌクレオチドプローブから試料ポリヌクレオチドを遊離させる手段と、各区画に対応してそれぞれ配置され、遊離した試料ポリヌクレオチドを電気泳動分離するキャピラリーを有する。

【0108】

(21) 本発明の他のポリヌクレオチド検出法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持され、第1の方向に配置された複数の区画と、各区画のほぼ中心部に配置される点状の第1の電極と、複数の区画を挟んで第1の方向に沿ってほぼ平行に配置される線状又は帯び状の第2の電極とが基板に形成されたポリヌクレオチドプローブチップに、試料ポリヌクレオチドを添加する工程と、第1の電極と第2の電極との間に高周波電界を印加して、試料ポリヌクレオチドを各区画のゲル中を移動させる工程とを有し、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドとをハイブリダイズする。

20

【0109】

(22) 本発明の他のポリヌクレオチド検出法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持され、第1の方向に配置された複数の区画と、各区画のほぼ中心部に配置される点状の第1の電極と、複数の区画を挟んで第1の方向に沿ってほぼ平行に配置される線状又は帯び状の第2の電極と、第1の電極と第2の電極との間に配置される点状の第3の電極とが基板に形成されたポリヌクレオチドプローブチップに、試料ポリヌクレオチドを添加する工程と、第1の電極と第2の電極との間に高周波電界を印加して、試料ポリヌクレオチドを各区画のゲル中を移動させて、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程と、第2の電極と第3の電極との間に高周波電界を印加して、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブとハイブリダイズしない試料ポリヌクレオチドをゲルから移動させる工程とを有する。

30

【0110】

(23) 本発明の他のポリヌクレオチド検出法は、各々異なるポリヌクレオチドプローブがゲルに保持された複数の区画を具備するポリヌクレオチドプローブチップに、試料ポリヌクレオチドを添加する工程と、電気泳動により試料ポリヌクレオチドを各区画のゲルの中を移動させ、ゲルに保持されたポリヌクレオチドプローブと試料ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程と、試料ポリヌクレオチドがハイブリダイズしたポリヌクレオチドプローブから試料ポリヌクレオチドを遊離させる工程と、各区画に対応してそれぞれ配置されたキャピラリーを用いて、遊離した試料ポリヌクレオチドを電気泳動分離する工程とを有する。

40

【0111】

【発明の効果】

本発明によれば、任意の種類のプローブを保持したプローブアレーを簡単に、安価に作成

50

できる。また、ゲルに保持したDNAプローブを用い、電気泳動を用いてゲルの中を強制的に試料を移動させるため、ゲルに保持されたプローブと試料DNA断片のハイブリダイゼーションを高速、高効率で実行できる。ハイブリダイズしないDNA断片を電気泳動で除去できるので、従来のゲルを利用したチップに比べバックグラウンドの低減ができる。本発明では、チップ側面から全ての小穴（又は一列毎の小穴列）内のゲル、又は一列をなす各区画の面のゲルを同時に照射できるので、スキャンに要する時間が unnecessary になる。レーザーを、蛍光を検出する方向と直角な方向から照射するのため、散乱光が検出器に直接入らない配置であり、各小穴（又は各区画）から発する光は2次元カメラで同時計測が可能で、高速、高感度な計測が可能となる利点がある。更に、サブミリワットクラスの半導体レーザーでも効率良く、各小穴（又は各区画）を同時照射できる利点がある。

10

【0112】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> HITACH, LTD.

 <120> Polynucleotide Probe Chip and Polynucleotide Detection Detection
 method

 <130> H98021021A1 10

 <160> 4

 <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial Sequence 20

 <220>
 <223> DNA probe having acryloxy residue and hybridizing with DNA
 fragment originated from human DNA.

 <400> 1
 tctcacacca gctgtcccaa gaccgtttgc 30 30

 <210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220> 40
 <223> DNA probe having acryloxy residue and hybridizing with DNA

fragment originated from human DNA.

<400> 2

aatacaggca tcttcacta cattttccct 30

<210> 3

<211> 14

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA tagged with fluorophore at 3' end and tagged with phosphate at 5' end to connect to 3' end of DNA fragment originated from human DNA.

20

<400> 3

actggccgtc gttt 14

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA having phosphate at 3' end and hybridizing with DNA having SEQ ID NO: 3.

<400> 4

40

aaacgacggc cagtcatg 18

配列表フリーテキスト

(1) 配列番号1の配列に関する他の関連する情報の記載

ヒトDNAに由来するDNA断片に相補結合し、5'末端にアクリル残基をもつDNAプローブ。

【0113】

DNA probe hybridizing with DNA fragment originated from human DNA.

【0114】

50

(2) 配列番号2の配列に関する他の関連する情報の記載

ヒトDNAに由来するDNA断片に相補結合、5'末端にアクリル残基をもつDNAプローブ。

【0115】

(3) 配列番号3の配列に関する他の関連する情報の記載

ヒトDNAに由来するDNA断片の3'末端に連結される3'末端が蛍光標識され、5'末端にリン酸基を有するたDNA。

【0116】

(4) 配列番号4の配列に関する他の関連する情報の記載

3'末端がリン酸基を有し、配列番号3のDNAと相補結合可能なDNA。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1の実施例のポリヌクレオチドプローブチップの一例を示す図。

【図2】本発明の第1の実施例のポリヌクレオチドプローブチップのゲルが保持される小穴の内面の表面処理を説明する図。

【図3】本発明の第1の実施例のポリヌクレオチドプローブチップにポリヌクレオチドプローブを保持する方法を説明する図。

【図4】本発明の第1の実施例のポリヌクレオチドプローブチップと電気泳動電極の位置関係を示す平面図。

【図5】本発明の第1の実施例のオリゴヌクレオチドプローブチップの動作を説明する図

20

【図6】本発明の第1の実施例に於いて、ポリヌクレオチドプローブチップ上に検出された蛍光標識DNA断片の位置を示す図。

【図7】本発明の第1の実施例のポリヌクレオチドプローブチップによるDNA断片の検量線の例を示す図。

【図8】本発明の第2の実施例のポリヌクレオチドプローブチップの構成を示す平面図、及び断面図。

【図9】本発明の第2の実施例の、ポリヌクレオチドプローブが保持されたポリアルリルアミドゲルを得る方法を説明する図。

【図10】本発明の第3の実施例のポリヌクレオチドプローブチップの構成を示す断面図

30

【図11】本発明の第4の実施例のポリヌクレオチドプローブチップの構成を示す断面図

【図12】本発明の第5の実施例のポリヌクレオチドプローブチップの構成を示す平面図、及び断面図。

【図13】本発明の第6の実施例であり、キャピラリーアレー電気泳動装置と第1の実施例のポリヌクレオチドプローブチップとを組合わせた構成及び動作を説明する断面図。

【図14】本発明の第7の実施例であり、キャピラリーアレー電気泳動装置と第5の実施例とを組合わせたDNA断片を回収する装置の構成及び動作を説明する断面図。

【図15】本発明の第7の実施例に於いて、ポリヌクレオチドチップ7の各区画にハイブリダイズしたDNA断片を、各区画から回収して測定したDNA断片の電気泳動パターンの例を示す図。

40

【符号の説明】

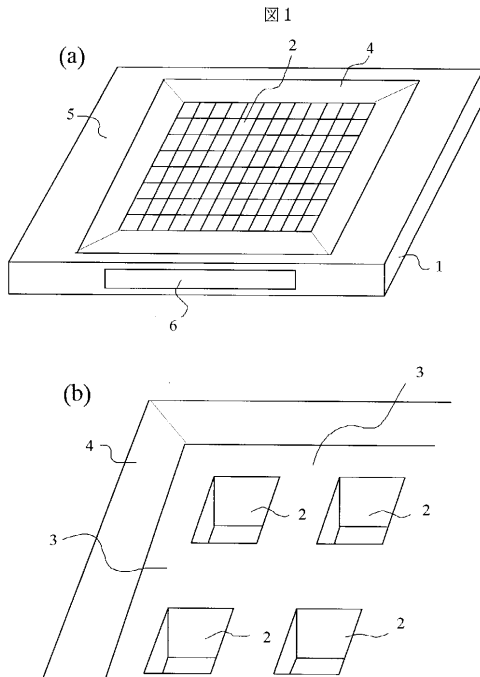
1、79...ポリヌクレオチドプローブチップ、2...テーパを持つ小穴、3...隔壁、4、84、85...親水性部分、5、86、86'...疎水性部分、6...レーザー導入部、21...小穴の内面、22...直鎖脂肪属化合物の一部にアクリル基を導入した試薬、23...小穴の内面に活性アクリル基を導入した状態、30、56、57、100...ポリヌクレオチドプローブ、32...アクロレイン、33...活性アクリル基が導入されたポリヌクレオチドプローブ、34、115...ポリヌクレオチドプローブがポリアルリルアミドゲル鎖に固定された状態、35...ゲルマトリックス、41...電極槽、42、43、81、82...電極、44...スイッチ、50...電気泳動方向、52...DNA断片混合物、53...蛍光体、54、55

50

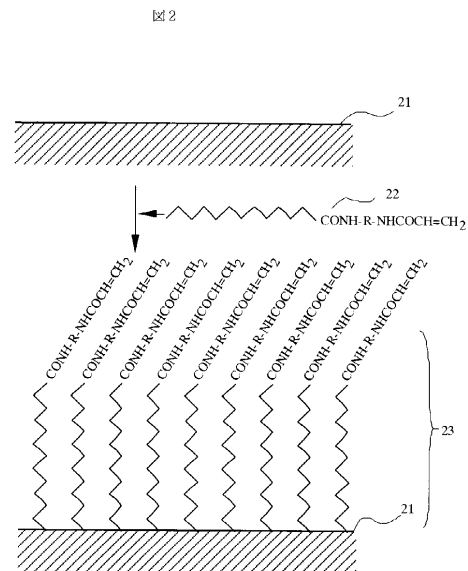
... 蛍光が検出された小穴、58、59... ポリオリゴヌクレオチドプローブに相補な塩基配列、60... 特定の蛍光標識DNA断片が小穴に捕捉された状態、61... 小穴に捕捉されなかった蛍光標識DNA断片、63... その他の小穴、71、72... 蛍光標識DNA断片から検出される蛍光強度、73... 非特異吸着由来のバックグラウンドの蛍光強度、80... ガラス基板、83... ポリヌクレオチドプローブ保持ゲル、87... ゲルが形成される部分、88... 試料DNA溶液、112... N-アクリロキシスクシニミド、113... アクリロキシポリヌクレオチドプローブ、122... レーザー、122... レーザー光源、124... 高感度冷却CCDカメラ、126... フォトダイオード、128... 金属蒸着膜、130... 透明電極、150、152、162... 点電極、200... キャピラリー、201... ポリアクリルアミド、204、204'... 電極。

10

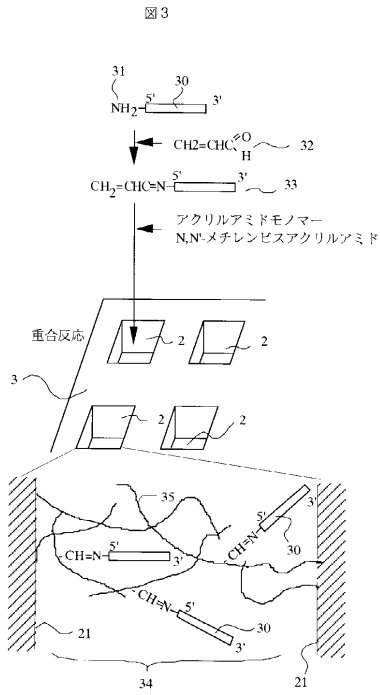
【図1】



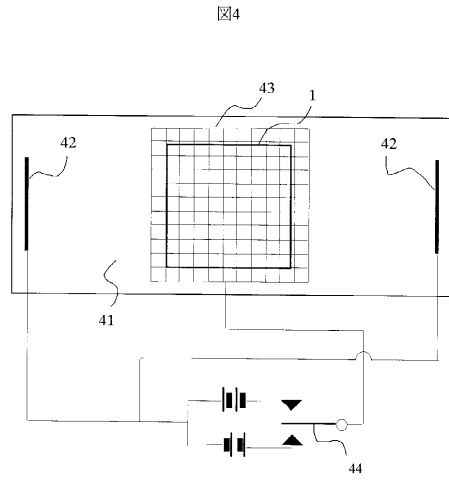
【図2】



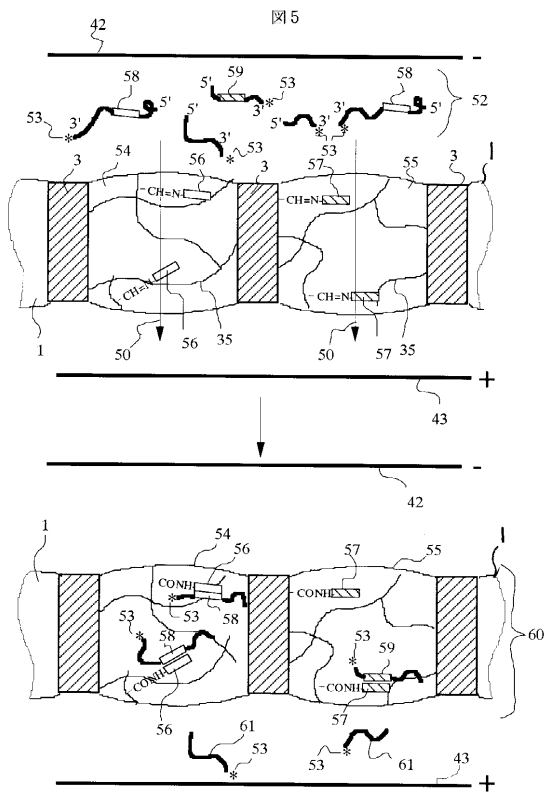
【 図 3 】



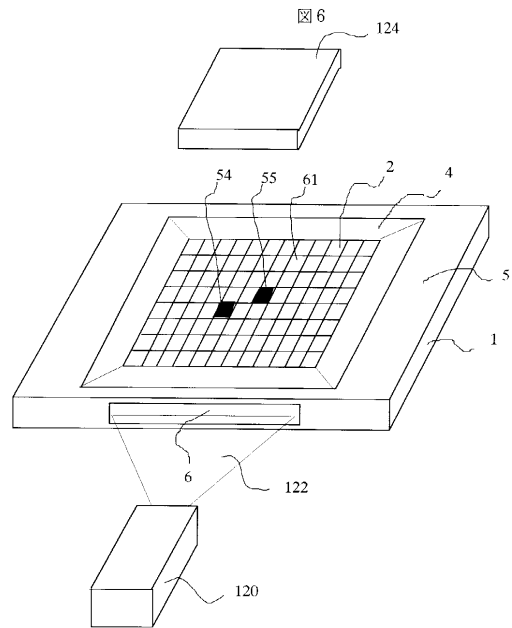
【 図 4 】



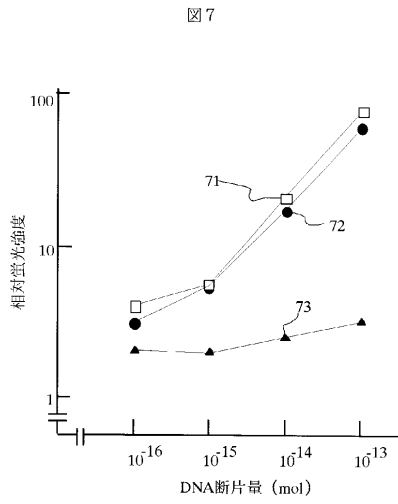
【 図 5 】



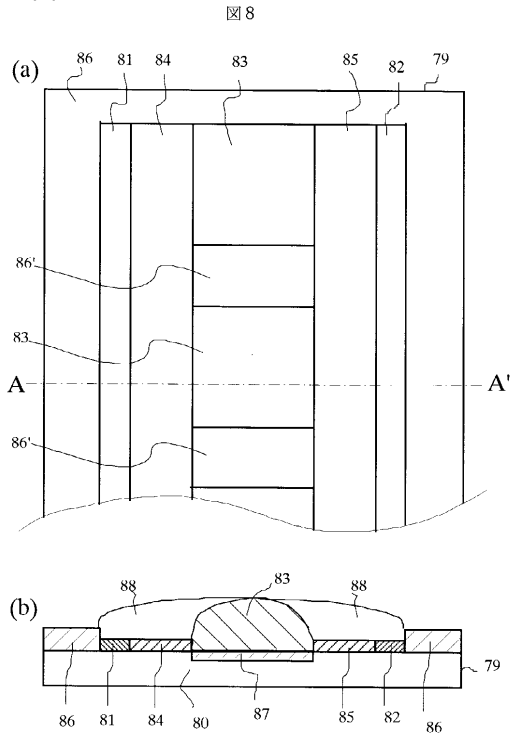
【 図 6 】



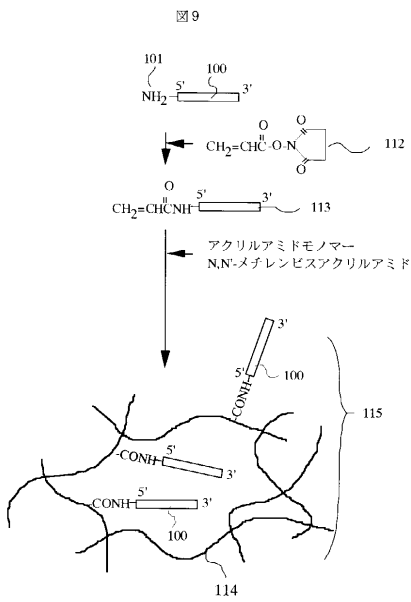
【 図 7 】



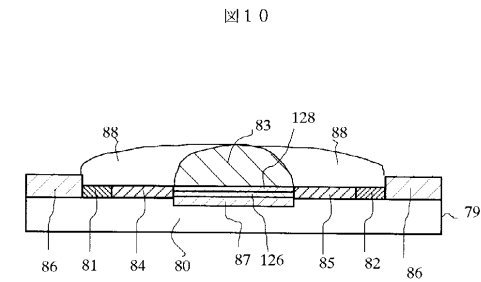
【 図 8 】



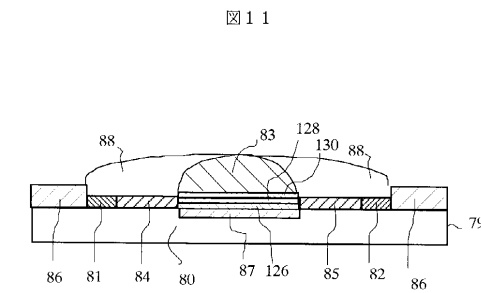
【 図 9 】



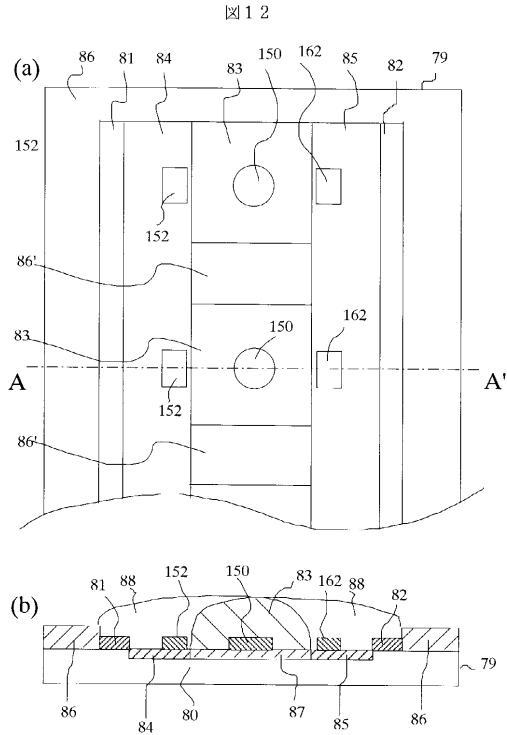
【 図 10 】



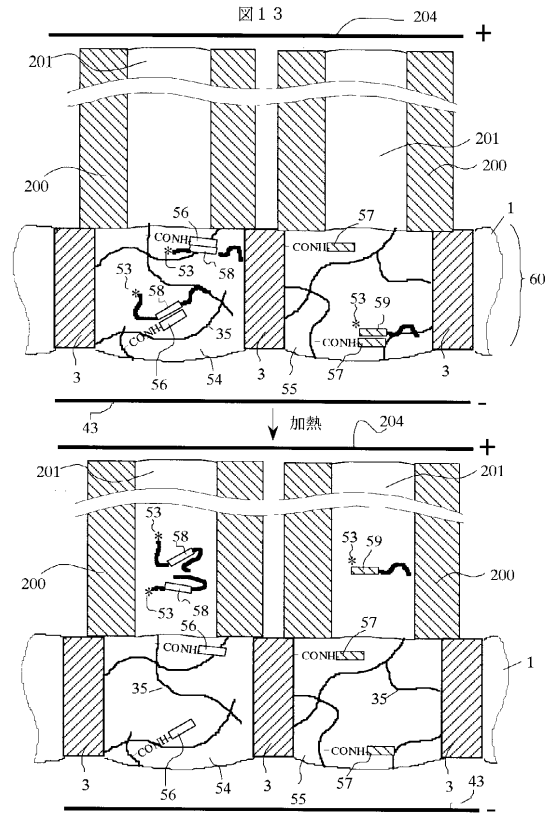
【 図 11 】



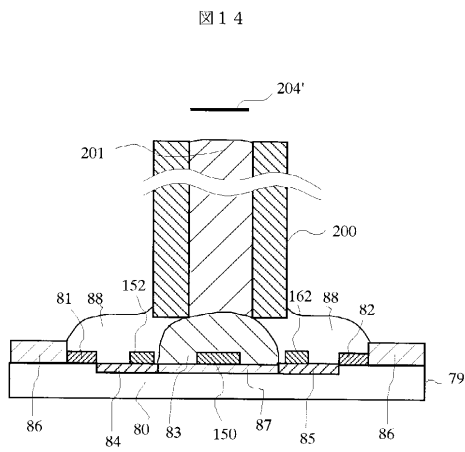
【 図 1 2 】



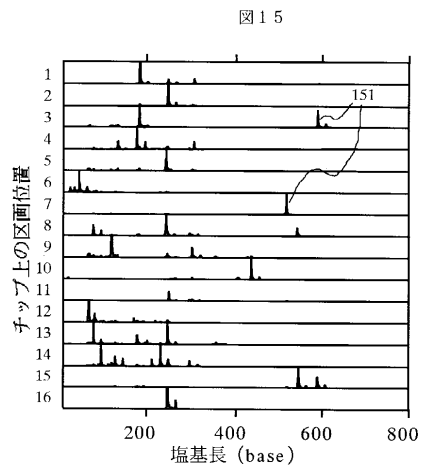
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



フロントページの続き

- (72)発明者 植松 千宗
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
- (72)発明者 松永 浩子
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
- (72)発明者 入江 隆史
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
- (72)発明者 梶山 智晴
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
- (72)発明者 安田 賢二
埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

審査官 森井 隆信

- (56)参考文献 国際公開第98/010277(WO, A1)
Proc. Acad. Natl. Sci. USA, 米国, 1996年, Vol.93, No.10, 4913-4918

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
G01N 27/00
G01N 33/50
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)