

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3596868号
(P3596868)

(45) 発行日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(24) 登録日 平成16年9月17日(2004.9.17)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/68
G O 1 N 31/22
G O 1 N 33/53
G O 1 N 33/566C 1 2 N 15/00 Z N A F
C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 31/22 1 2 1 P
G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/566

請求項の数 13 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-357446 (P2000-357446)
(22) 出願日 平成12年11月24日(2000.11.24)
(65) 公開番号 特開2002-153284 (P2002-153284A)
(43) 公開日 平成14年5月28日(2002.5.28)
審査請求日 平成13年12月14日(2001.12.14)(73) 特許権者 000001007
キヤノン株式会社
東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(74) 代理人 100123788
弁理士 宮崎 昭夫
(74) 代理人 100088328
弁理士 金田 暢之
(74) 代理人 100106297
弁理士 伊藤 克博
(74) 代理人 100106138
弁理士 石橋 政幸
(72) 発明者 岡本 尚志
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ
ヤノン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 末端標識プローブアレイのプローブの量の評価方法、及び、該標識プローブアレイを用いた標的物質量の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するためのプローブをその一部を固定して、該プローブを構成するためのユニットを逐次的に結合していく、逐次合成の際に、該逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物を結合する末端標識プローブアレイの、それぞれのマトリクスの標識物質量を測定する、最終段階まで逐次合成された各マトリクスのプローブの量の評価方法。

【請求項2】

前記プローブが核酸である請求項1に記載のプローブの量の評価方法。

10

【請求項3】

前記核酸がDNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸である請求項2に記載のプローブの量の評価方法。

【請求項4】

前記核酸がDNAであり、前記逐次合成が下記の合成ステップよりなるフォスフォロアミダイト法である請求項3に記載のプローブの量の評価方法。

(1) 固相担体表面にリンカーを介して結合されている水酸基の保護基を除去する工程。

(2) 所望の塩基を有する第一番目のヌクレオチドを形成すべきアミダイトモノマーの3'側で(1)の水酸基と結合する工程。

(3) (1)の水酸基のうち(2)の工程で未反応なものをキャッピングする工程。

20

- (4)(2)で結合したアミダイトをフォスファイトからフォスフェイトへ酸化する工程。
 (5)(2)で結合したアミダイトの5'側に結合した水酸基の保護基を除去する工程。
 (6)(2)から(4)の工程を所望の塩基長、塩基配列に対して3' 5'方向へ繰り返す工程。

【請求項5】

前記プローブが蛋白質である請求項1に記載のプローブの量の評価方法。

【請求項6】

前記プローブがオリゴペプチドである請求項1に記載のプローブの量の評価方法。

【請求項7】

前記プローブの末端に結合した標識物質が蛍光物質である請求項1から6のいずれかに記載のプローブの量の評価方法。 10

【請求項8】

前記プローブの末端に結合した標識物質が蛍光色素である請求項7に記載のプローブの量の評価方法。

【請求項9】

前記プローブの末端に結合した標識物質が、標的物質に対する標識物質と異なる請求項1から8のいずれかに記載のプローブの量の評価方法。

【請求項10】

請求項1～9のいずれかに記載のプローブの量の評価方法によって量的に評価されたプローブの量と、該プローブに捕捉された標的物質の標識物質の量を比較する標的化合物の量の評価方法。 20

【請求項11】

逐次合成の第一段階において基板表面の所定のマトリクスに結合され、その後の伸長反応を行わない標識物質の量と、最終段階において結合された標識物質の量を比較する請求項1～9のいずれかに記載のプローブの量の評価方法。

【請求項12】

プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するためのプローブをその一部を固定して、該プローブを構成するためのユニットを逐次的に結合していく、逐次合成の際に、該逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物を結合する末端標識プローブアレイの 30
 所定の部位のマトリクスのプローブに捕捉された標識標的化合物の標識化合物の量と、最終段階において結合された標識物質の量と、逐次合成の第一段階において基板表面に結合された標識物質の量とを比較する標的化合物の量の評価方法。

【請求項13】

前記末端標識プローブアレイが、請求項1～9のいずれかに記載のプローブの量の評価方法により評価されたものである請求項12に記載の標的化合物の量の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標識プローブアレイのプローブの量の評価方法、及び、該標識プローブアレイを用いた標的物質量の評価方法に関する。 40

【0002】

【従来の技術】

近年、複数のプローブを基板方面にアレイ状に配置した、いわゆるプローブアレイを用いて標的物質を精密に評価する方法が精力的に検討されている。その代表的な例としてDNAプローブアレイをあげることができる。DNAプローブアレイを用いることにより、例えば、複数の標的遺伝子の存在を塩基配列レベルで、また、塩基配列そのものとして解析することが可能となる。

【0003】

プローブアレイの作製方法は大きく分けると二つの方法がある。 50

【0004】

第一の方法は、プローブがDNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)、蛋白質、オリゴペプチドのように、ヌクレチオドやアミノ酸の配列が重要な意味を持ち、かつ、化学的に伸長合成が可能な物質である場合、これらを固相アレイ基板上に逐次的に合成していく方法である。

【0005】

このような方法の一例として米国特許公報5,445,966には、光分解性の保護基とフォトリソグラフィ法を用いた基板上でのDNAプローブアレイの合成方法が示されている。また、他の例として米国特許公報5,474,796にはヌクレオチドモノマーをインクジェット法により供給する方法も示されている。

10

【0006】

第二の方法は上述の物質の他に、化学的に合成できない物質にも適用できるもので、予め合成、または、調製された物質をプローブアレイ基板の各マトリクス部位に、マイクロディスプレイペンサー法、ピントランスファー法、インクジェット法等により供給する方法である。

【0007】

第二の方法によれば予め精製し、量的にコントロール可能なプローブを用いるので、プローブの純度は十分確保でき、また、基板表面と反応させる濃度も自由に決めることができる。結果として基板表面に存在することになる各プローブ量のある程度正確に見積もることができ、プローブアレイを用いる標的物質の検出の信頼性が向上する。一方で第二の方法によればプローブアレイに必要な種類のプローブを全て、予め合成する必要と、それをプローブアレイ基板へ供給、反応させる必要がある。プローブアレイに必要なプローブの種類は、場合により数十万種になることもあり、これらを全て、予め合成し、基板へ供給、反応させるにはかなりの困難をとまなう。

20

【0008】

他方、第一の方法によれば、必要な種類のプローブを基板上で合成し、それを標的物質との反応に用いることができ、予め合成または調製したプローブを基板上に固定する操作を省略できる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

ところが、上述した第一の方法における検出感度や信頼性を更に向上させようとするには、以下のような問題がある。

30

【0010】

(1) 逐次合成の各段階での合成収率は100%ではないので、最終的な合成収率は場合によっては5%程度になる場合がある。これは標的物質を検出する際の感度の低下に直結する。

【0011】

(2) 同様の理由で、プローブアレイの各マトリクスには最終的に望まれる長さのプローブの他に、短い長さの物質が含まれることになり、これは、標的物質の検出時の信頼性の低下の原因となる。

40

【0012】

(3) 基板上で合成した結果、各マトリクスのプローブの量を測定することができない。これも標的物質の検出時の信頼性の低下の原因となる。

【0013】

(4) 上述のように、逐次合成の各段階での合成収率は100%ではなく、また、各段階で、また、各マトリクス部位でばらつくので、最終的に得られる各プローブの量は広い範囲でばらつくことになる。これも標的物質の検出時の信頼性の低下の原因となる。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記従来技術の課題を解決するためになされたものである。

50

【0015】

すなわち、プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するためのプローブをその一部を固定して、該プローブを構成するためのユニットを逐次的に結合していく、逐次合成の際に、該逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物を結合する末端標識プローブアレイの製造と；該プローブアレイの、それぞれのマトリクスの標識物質の量を測定する、最終段階まで逐次合成された各マトリクスのプローブの量の評価方法に関する。

【0016】

また、前記記載のプローブの量の評価方法によって量的に評価されたプローブの量と、該プローブに捕捉された標的物質の標識物質の量を比較する標的化合物の量の評価方法に関する。

10

【0017】

さらに、プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するためのプローブをその一部を固定して、該プローブを構成するためのユニットを逐次的に結合していく、逐次合成の際に、該逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物を結合する末端標識プローブアレイの所定の部位のマトリクスのプローブに捕捉された標識標的化合物の標識化合物の量と、最終段階において結合された標識物質の量と、逐次合成の第一段階において基板表面に結合された標識物質の量とを比較する標的化合物の量の評価方法に関し、

好ましくは前記末端標識プローブアレイが、前記記載のプローブの量の評価方法により

20

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明では逐次合成の最終工程において、量的に測定可能な標識物質を導入することを特徴とする。

【0019】

本発明の逐次合成方法とは、数個から百個程度のユニット（例えばDNAであればヌクレオチド、タンパク質であればアミノ酸残基）からなる鎖状のオリゴマーを、所望のユニットを逐次的に結合合成していく方法であって、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチド、PNAそれぞれに関してすでに一般的に用いられている手法をそのまま用いることができる。

30

(1) 固相担体（ガラス基板等）表面にリンカーを介して結合されている水酸基の保護基を除去する工程。

(2) 所望の塩基を有する第一番目のヌクレオチドを形成すべきアミダイトモノマーの3'側で(1)の水酸基と結合する工程。

(3) (1)の水酸基のうち(2)の工程で未反応なものをキャッピングする工程。

(4) (2)で結合したアミダイトをフォスファイトからフォスフェイトへ酸化する工程。

40

(5) (2)で結合したアミダイトの5'側に結合した水酸基の保護基を除去する工程。

(6) (2)から(4)の工程を所望の塩基長、塩基配列に対して3' 5'方向へ繰り返す工程。

(7) 核酸塩基の保護基を除去する工程。

【0020】

プローブに関しては特に限定されることはないが、核酸、DNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)、蛋白質、オリゴペプチドなどを例にあげることができる。

【0021】

また、プローブアレイを用いる標的物質の検出においては、標的物質を蛍光色素で標識するのが一般的な手段として用いられているので、そのような場合にはプローブの標識物質

50

にも蛍光色素を用いれば、同じ測定器を用いて検出することができ都合がよい。

【0022】

その他の標識物質も用いることができるが、標的物質の検出の際の妨げにならないようにその種類を適宜選択する必要がある、そういう意味からも標的物質に結合させた標識物質とプローブに結合させた標識物質は異なるものであることが望ましい。

【0023】

標識物質が共に蛍光色素である場合には、それぞれの励起波長と、蛍光波長が異なることが望ましく、例えば、片方がFITCで他方がローダミン、片方がCY3（アマシャムファルマシアバイオテク（株））で他方がCY5（アマシャムファルマシアバイオテク（株））などの例をあげることができる。

10

【0024】

プローブの固相での逐次合成の際には、一段伸長反応を行った後に、伸長せずに未反応のまま残った反応サイト（官能基）を反応性のないものに替える処理（キャッピング）をする。例えばDNAの固相合成では反応サイトの水酸基がアセチル化されることにより反応性を失う。

【0025】

従って本発明において標識物質が導入されるのは最終段階（所望の鎖長）まで伸長されたプローブのみということになり、結果として、それぞれのマトリクスのプローブの標識物質の量を測定することにより、各マトリクスのプローブの量を評価することが可能となる。

20

【0026】

この量的に評価されたプローブの量と、これらプローブに捕捉された標的物質の標識物質の量を比較することにより標的物質の量の測定における各プローブ間の相対的補正を行うことができる。

【0027】

また、絶対的な標的物質の量の評価方法として、本発明では、逐次合成の第一段階において基板表面の所定の位置に結合され、その後の伸長反応を行わないマトリクス部位の標識物質の量と、伸長反応を行なう各マトリクス部位での最終段階において伸長合成されたプローブに結合された標識物質の量を比較し、第一段階の反応前に形成した基板表面の官能基の量に対する各マトリクスのプローブ量を評価し、この量的に評価されたプローブ量と、これらプローブに捕捉された標的物質の標識物質の量を比較することにより標的物質の量の測定における絶対量の把握と、各プローブ間の相対的補正を同時に行うことができる。

30

【0028】

本発明における末端標識プローブアレイを作製する際の各操作には前記の米国特許公報のいずれに記載の方法でもよく、他にも従来技術を用いることが可能である。

【0029】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明する。

【0030】

（実施例1） 末端標識DNAプローブアレイの作製

（1）合成石英基板（25.4mm×25.5mm 厚さ0.5mm）を、超音波洗浄専用洗剤GP-II（プランソン社製）の10%水溶液で20分間超音波洗浄した。超純水で適宜洗浄した後、1N水酸化ナトリウム水溶液（80）に浸漬し、同様に超純水で洗浄、乾燥し、ついで、UVオゾン処理を行い、表面を清浄化した。

【0031】

（2）次に、カーボンブラックを含有したDEEP-UVレジスト（新日鉄化学株式会社ブラックマトリクス用ネガ型レジスト BK-739P）を、スピコートで膜厚5μmになるように塗布した。この基板をホットプレートで80で5分間加熱し硬化させた。このレジスト膜にDEEP-UV露光装置を使用し、1cm×1cmの領域に、10

40

50

0 μm 間隔で、100 μm × 100 μm の正方形のマトリクス部位が図 1 のように等間隔で配置されるパターンに対応する所定のパターンマスクを用いてプロキシミティー露光し、ついで、無機アルカリ水溶液の現像液で、スピン現像機を用いて現像し、さらに、超純水でリンス処理し、現像液を完全に除去し、その後、スピン乾燥機を用いて簡単に乾燥した後、クリーンオープン中で、180℃、30分加熱し、レジストを本硬化させ、所定のレジスト膜で囲まれた基板表面からなるマトリクス部位を 2500 個形成した。なお、本実施例で形成した各マトリクス部位の容積は 50 pL と計算される。

【0032】

(3) エポキシ基を有するシランカップリング剤 (KBM403: グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、信越化学工業株式会社)

の 1% 水溶液を予め室温で 1 時間攪拌し加水分解した。この溶液に前記マトリクス部位を形成した基板を 1 時間浸漬し、ついで、超純水で適宜洗浄後、120℃ で 1 時間加熱した。この処理により前記マトリクス部位にエポキシ基が結合した。この基板をさらにヘキサエチレングリコールで処理することにより、前記マトリクス部位にオリゴヌクレオチドを結合するための水酸基を導入した基板を得た。

【0033】

(4) 基板上でのオリゴヌクレオチドの合成は通常のアミダイト法によって行った。上記基板を収納可能なポリプロピレン製のチャンバーを製作し、DNA 合成機 (ABI 社製 381A) のカラム部分に装着した。アミダイトモノマーとアクティベーター以外の供給と、その後の洗浄、乾燥以外の合成工程は、この自動合成機によって行った。アミダイトモノマーとアクティベーターの供給にはインクジェットに用いられるピエゾ素子を改造して用いた。インクの代わりにアミダイトモノマー 4 種とアクティベーターのアセトニトリル溶液を用いて、装置をドライボックス (アルゴン) 中で操作して各溶液を上記基板のマトリクス部位に位置を制御して供給した。なお、ピエゾ素子から一度に供給される液の量は平均的に 24 pL である。

【0034】

(5) 基本的には 2500 すべてのマトリクス部位に異なる配列オリゴヌクレオチドを合成することが可能であるが、本実施例では発癌関連遺伝子 p53 の二つのアミノ酸残基のうちの計 3 個所の塩基の全ての組み合わせを含む以下の 64 種のオリゴヌクレオチド、すなわち DNA プローブ合成した。得られた DNA プローブアレイ基板を 30% アンモニア水に室温で 12 時間浸漬し、核酸塩基の脱保護を行った。

合成した DNA プローブ (No. 1 ~ No. 64) の塩基配列

合成した DNA プローブ (No. 1 ~ No. 64) の塩基配列

No. 1. 5' - G A T G G G A C T C A A G T T C A T - 3'
 No. 2. 5' - G A T G G G A C T C A G G T T C A T - 3'
 No. 3. 5' - G A T G G G A C T C A C G T T C A T - 3'
 No. 4. 5' - G A T G G G A C T C A T G T T C A T - 3'
 No. 5. 5' - G A T G G G A C T C G A G T T C A T - 3'
 No. 6. 5' - G A T G G G A C T C G G G T T C A T - 3'
 No. 7. 5' - G A T G G G A C T C G C G T T C A T - 3'
 No. 8. 5' - G A T G G G A C T C G T G T T C A T - 3'
 No. 9. 5' - G A T G G G A C T C C A G T T C A T - 3'
 No. 10. 5' - G A T G G G A C T C C G G T T C A T - 3'
 No. 11. 5' - G A T G G G A C T C C C G T T C A T - 3'
 No. 12. 5' - G A T G G G A C T C C T G T T C A T - 3'
 No. 13. 5' - G A T G G G A C T C T A G T T C A T - 3'
 No. 14. 5' - G A T G G G A C T C T G G T T C A T - 3'
 No. 15. 5' - G A T G G G A C T C T C G T T C A T - 3'
 No. 16. 5' - G A T G G G A C T C T T G T T C A T - 3'
 No. 17. 5' - G A T G G G G C T C A A G T T C A T - 3'

10

20

30

40

50

No. 18.5' - G A T G G G G C T C A G G T T C A T - 3 '
 No. 19.5' - G A T G G G G C T C A C G T T C A T - 3 '
 No. 20.5' - G A T G G G G C T C A T G T T C A T - 3 '
 No. 21.5' - G A T G G G G C T C G A G T T C A T - 3 '
 No. 22.5' - G A T G G G G C T C G G G T T C A T - 3 '
 No. 23.5' - G A T G G G G C T C G C G T T C A T - 3 '
 No. 24.5' - G A T G G G G C T C G T G T T C A T - 3 '
 No. 25.5' - G A T G G G G C T C C A G T T C A T - 3 '
 No. 26.5' - G A T G G G G C T C C G G T T C A T - 3 '
 No. 27.5' - G A T G G G G C T C C C G T T C A T - 3 '
 No. 28.5' - G A T G G G G C T C C T G T T C A T - 3 '
 No. 29.5' - G A T G G G G C T C T A G T T C A T - 3 '
 No. 30.5' - G A T G G G G C T C T G G T T C A T - 3 '
 No. 31.5' - G A T G G G G C T C T C G T T C A T - 3 '
 No. 32.5' - G A T G G G G C T C T T G T T C A T - 3 '
 No. 33.5' - G A T G G G C C T C A A G T T C A T - 3 '
 No. 34.5' - G A T G G G C C T C A G G T T C A T - 3 '
 No. 35.5' - G A T G G G C C T C A C G T T C A T - 3 '
 No. 36.5' - G A T G G G C C T C A T G T T C A T - 3 '
 No. 37.5' - G A T G G G C C T C G A G T T C A T - 3 '
 No. 38.5' - G A T G G G C C T C G G G T T C A T - 3 '
 No. 39.5' - G A T G G G C C T C G C G T T C A T - 3 '
 No. 40.5' - G A T G G G C C T C G T G T T C A T - 3 '
 No. 41.5' - G A T G G G C C T C C A G T T C A T - 3 '
 No. 42.5' - G A T G G G C C T C C G G T T C A T - 3 '
 No. 43.5' - G A T G G G C C T C C C G T T C A T - 3 '
 No. 44.5' - G A T G G G C C T C C T G T T C A T - 3 '
 No. 45.5' - G A T G G G C C T C T A G T T C A T - 3 '
 No. 46.5' - G A T G G G C C T C T G G T T C A T - 3 '
 No. 47.5' - G A T G G G C C T C T C G T T C A T - 3 '
 No. 48.5' - G A T G G G C C T C T T G T T C A T - 3 '
 No. 49.5' - G A T G G G T C T C A A G T T C A T - 3 '
 No. 50.5' - G A T G G G T C T C A G G T T C A T - 3 '
 No. 51.5' - G A T G G G T C T C A C G T T C A T - 3 '
 No. 52.5' - G A T G G G T C T C A T G T T C A T - 3 '
 No. 53.5' - G A T G G G T C T C G A G T T C A T - 3 '
 No. 54.5' - G A T G G G T C T C G G G T T C A T - 3 '
 No. 55.5' - G A T G G G T C T C G C G T T C A T - 3 '
 No. 56.5' - G A T G G G T C T C G T G T T C A T - 3 '
 No. 57.5' - G A T G G G T C T C C A G T T C A T - 3 '
 No. 58.5' - G A T G G G T C T C C G G T T C A T - 3 '
 No. 59.5' - G A T G G G T C T C C C G T T C A T - 3 '
 No. 60.5' - G A T G G G T C T C C T G T T C A T - 3 '
 No. 61.5' - G A T G G G T C T C T A G T T C A T - 3 '
 No. 62.5' - G A T G G G T C T C T G G T T C A T - 3 '
 No. 63.5' - G A T G G G T C T C T C G T T C A T - 3 '
 No. 64.5' - G A T G G G T C T C T T G T T C A T - 3 '

10

20

30

40

図1は作製したDNAアレイ基板上のDNAプローブの塩基配列とその配置、および、後にハイブリダイゼーションに用いるテトラメチルローダミン標識モデル標的DNAの塩基配列を示したものである。配列No. 65は標的DNAの塩基配列、他の配列は配列No

50

．65に対して相補的であるが、下線部の3塩基については、AGCTすべての組み合わせをもったもの、すなわち、 $4^3 = 64$ とおりの配列である。なお、上記プローブの3塩基は、配列No. 65の下線部に対応している。また、各配列のNの部分はいずれも四角で形どられた部分の上部に書かれた塩基に対応している。結果として、基板上的各DNAプローブは図1に示したように、標的DNA配列に対して、完全に相補的（No. 42）、あるいは、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチ、3塩基ミスマッチを有するものとなる。

【0035】

(6) 合成した全てのDNAプローブの5'末端にはフルオロセインフォスフォロアミダイト（グレンリサーチ社）をもちいて蛍光色素であるフルオロセインを結合した。また、
10
他の1個所のマトリクス部位には直接、上記アミダイトを用いてフルオロセインを結合した。すなわち第一段階の所望の塩基を有するアミダイトの代わりにフルオロセインフォスフォロアミダイトを用いてフルオロセインを結合した。なお、このものには原理的に次段階以降の伸長反応は進行しない。

【0036】

(実施例2) 実施例1で合成したDNAプローブアレイの蛍光定量。

【0037】

各マトリクス部位からのフルオロセイン由来の蛍光は蛍光顕微鏡ECLIPSE 800（株式会社ニコン、対物レンズCFI Plan Apo 20x）とイメージインテンシファイヤー付きCCDカメラC2400-87（浜松ホトニクス株式会社）で取り込み、
20
画像処理装置Argu 50（浜松ホトニクス株式会社）を用いて定量した。なお、イメージインテンシファイヤーの増幅度はHV = 2.0とし、積算回数は64回、蛍光顕微鏡のフィルターブロックはフルオロセイン測定用のB-2E/Cを使用した。また、蛍光の測定は基板をスライドガラス上に置き、50 mmol/L リン酸緩衝液（pH = 7.0、100 mmol/L NaClを含む）を適宜滴下した後、カバーガラスで覆った状態で行った。

【0038】

図2に蛍光の測定値を示した。図2の四角形の外部の蛍光値（11330）はフルオロセインを直接結合したマトリクス部位からのものである。図2から最終的に結合されたオリゴヌクレオチドからの蛍光値は2940から10350の範囲に渡ることがわか
30
る。これは各オリゴヌクレオチドプローブの量の指標に用いることができ、ハイブリダイゼーションの結果をこれらの蛍光値で補正すれば良いことになる。また、複数のDNAアレイを用いる場合には、各アレイの直接結合されフルオロセインからの蛍光値によりマトリクス部位間の補正を行うことが可能である。

【0039】

(実施例3) 実施例1で合成したDNAプローブアレイによる標的DNAの定量。

【0040】

図3にハイブリダイゼーションに用いたテトラメチルローダミン標識モデル標的DNAの構造を示す。前述のようにこの標的DNAの塩基配列は配列No. 65である。

【0041】

上記基板をBSA（牛血清アルブミン、シグマアルドリッチジャパン）を2%の濃度で含む50 mmol/Lリン酸緩衝液（pH = 7.0、100 mmol/L NaClを含む）に1時間浸漬した後、上記緩衝液で適宜洗浄した後のハイブリダイゼーションに用いた。
40

【0042】

ハイブリダイゼーションは上記の標的DNAを50 nmol/Lの濃度で含む100 mmol/L NaCl、50 mmol/Lリン酸緩衝液（pH = 7.0）2 mLとDNAプローブアレイ基板をハイブリダイゼーション用の樹脂パックに封じ、70℃に加熱した後、20℃まで冷却し、その後その状態で24時間放置することによりおこなった。

【0043】

次に基板を上記緩衝液中で20分間洗浄した後に標的DNAのテトラメチルローダミンからの蛍光を実施例2と同様の方法で定量した。なお、蛍光フィルターブロックにはY-2E/Cを使用した。また、イメージインテンシファイヤーの増幅度は4.0である。

【0044】

結果を図4に示す。また、図4の定量値に補正值(伸長反応を行なわないマトリクス部位に直接結合したフルオロセインからの蛍光値:11330/伸長反応を行なった各マトリクス部位のフルオロセインからの蛍光値)を掛け合わせた値を図5に示した。これらの値を比較例の値と比較する(後記)。

【0045】

(比較例1) インクジェット法による既合成DNAプローブの基板への供給と結合、及び、ハイブリダイゼーション

10

実施例1と同様にガラス基板を洗浄した後、減圧蒸留して精製したアミノシランカップリング剤(KBM-603 信越化学工業株式会社)を1%の濃度で含む水溶液を室温下、1時間攪拌し、メトキシ基部分を加水分解させた。次に上記基板を洗浄後速やかに上記シランカップリング剤水溶液に室温下、1時間浸漬し、流水(超純水)洗浄後、窒素ガスを吹きつけて乾燥させ、次いで、120のオーブン中で1時間加熱定着させた。

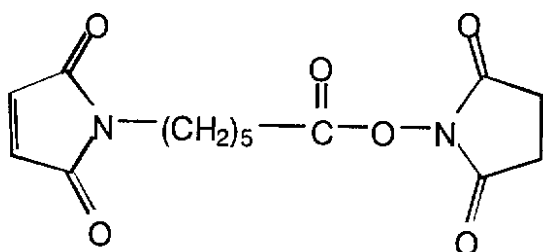
【0046】

冷却後、N-(6-マレイミドカプロキシ)スクシイミド(EMCS, 化合物I, 同仁化学研究所)

【0047】

20

【化1】



化合物 I

30

【0048】

の0.3%溶液(エタノール;ジメチルスルホキシド=1:1)に基板を室温下、2時間浸漬し、反応させたのち、エタノール:ジメチルスルホキシド=1:1で1回、エタノールで3回洗浄し、窒素ガスを吹きつけて乾燥させた。この処理によりガラス基板上のシランカップリング剤のアミノ基とEMCSのスクシイミド基が結合し、表面にマレイミド基が生成したことになる。このマレイミド基とDNAプローブのチオール基が結合する(後記)。

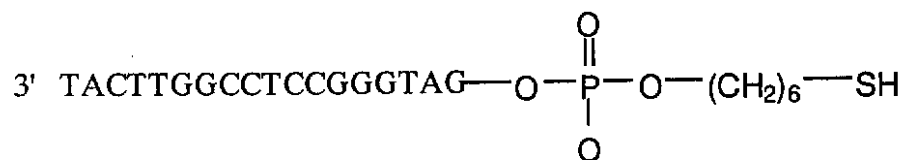
【0049】

実施例3と全く同様の塩基配列を有する64種のDNAプローブをベックス株式会社より購入した。これらのDNAには基板に結合するために5'末端にチオールリンカーを担持させてある。チオールリンカーを有するDNAの例を化合物II

40

【0050】

【化2】



化合物II

【0051】

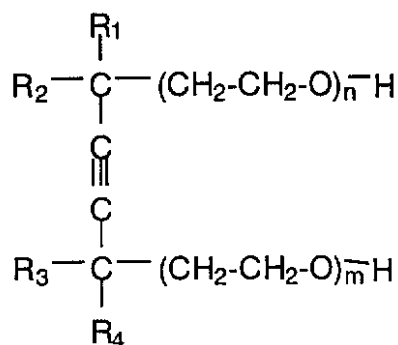
としてあげた。ちなみに化合物IIはモデル標的DNAに対して完全に相補的な塩基配列(No. 42)を有するものである。

【0052】

これらのDNAをサーマルジェットプリンターで吐出するための溶媒、すなわち、グリセリン 7.5wt%、尿素 7.5wt%、チオジグリコール 7.5wt%、一般式III

【0053】

【化3】



一般式III

【0054】

で示されるアセチレンアルコール(例えば、商品名:アセチレノールEH 川研ファインケミカル株式会社)1wt%を含む水溶液に、吸光度が1.0になるように溶解させ、0.4mLをサーマルジェットプリンター(キヤノン株式会社製のインクジェット用ヘッドを2個搭載可能)のインク供給部を改良して充填し、上記の基板上に吐出した。吐出のパターンは実施例1から3と同様である(形状は異なる)。装置の仕様上からは、吐出される液滴1滴の量は24pLで、この条件では液滴1滴のしめるドットの直径は70~100μmである。吐出密度は120dpi(ドット/インチ)である。この基板を湿度100%の保湿チャンバー内に室温下で1時間反応させた後、流水(超純水)中で約30秒洗浄した。

【0055】

BSAによる処理、ハイブリダイゼーションの条件、及び、蛍光定量の条件は実施例3と同様である。イメージインテンシファイヤーの増幅度は2.0である。蛍光定量の結果を図6に示した。

【0056】

図7には図6の結果と図5の結果の比較を示した。図5の各マトリクスの値をAn、図6の各マトリクスの値をBn(n=1~64)とすると、図7の各マトリクスの値Cnは以下の(1)式で示される。

10

20

30

40

50

$$(1) \quad C_n = B_n \times (A_n / B_n) / A_n$$

(A_n は A_n の総和、 B_n は B_n の総和を示す。)

図7の結果は本発明による逐次合成のDNAプローブアレイによるハイブリダイゼーションの結果をプローブの末端標識に用いた蛍光色素の蛍光値と、伸長反応を行わないマトリクス部位の蛍光値とで補正した値と、予め合成、精製したDNAプローブを結合したDNAプローブアレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を比較したものである。図7の数値は±約20%、標準偏差は約9%の範囲であり、本発明の補正方法が有効であることを示している。また、DNAプローブアレイ基板相互の補正も伸長反応を行わないマトリクス部位において、直接基板に結合した蛍光色素(フルオロセイン)の値により可能である。

10

【0057】

【発明の効果】

本発明の逐次合成におけるプローブアレイの合成において、末端に標識を施すことにより、各マトリクス間のプローブ量を把握することが可能となり、また、各プローブ量を補正して標的物質を検出、定量することが可能となった。また、各プローブ基板に直接標識物質を結合することにより、各プローブアレイ間の補正も可能となった。

【0058】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Canon Inc.

<120> Probe array.

<130> 3906114

10

<160> 81

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 1

gatgggactc aagttcat

18

30

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

⟨400⟩ 2		
gatgggactc aggttcat	18	
⟨210⟩ 3		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		10
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		
⟨400⟩ 3		
gatgggactc acgttcat	18	
⟨210⟩ 4		20
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		30
⟨400⟩ 4		
gatgggactc atgttcat	18	
⟨210⟩ 5		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 5

gatgggactc gagttcat 18

<210> 6

10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

20

<400> 6

gatgggactc gggttcat 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 7

gatgggactc gcgttcat 18

40

<210> 8

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 8 10
gatgggactc gtgttcat 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 9
gatgggactc cagttcat 18

<210> 10 30
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 10 40
gatgggactc cggttcat 18

<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	10
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized	
<400> 11	
gatgggactc ccgttcat	18
<210> 12	
<211> 18	20
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized	
<400> 12	30
gatgggactc ctgttcat	18
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	40

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized**<400> 13****gatgggactc tagttcat** 18**<210> 14****<211> 18**

10

<212> DNA**<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized****<400> 14**

20

gatgggactc tggttcat 18**<210> 15****<211> 18****<212> DNA****<213> Artificial Sequence**

30

<220>**<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized****<400> 15****gatgggactc tcgttcat** 18**<210> 16**

40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 16

gatgggactc ttgttcat

18

10

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 17

gatggggctc aagtcat

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 18

40

gatggggctc aggttcat

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 19

gatggggctc acgttcat

18

<210> 20

20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

30

<400> 20

gatggggctc atgttcat

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 21

gatggggctc gagttcat 18

<210> 22

10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

20

<400> 22

gatggggctc gggttcat 18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 23

gatggggctc gcgttcat 18

40

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

10

<400> 24

gatggggctc gtgttcat

18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 25

gatggggctc cagttcat

18

30

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

⟨400⟩ 26		
gatggggctc cggttcat	18	
⟨210⟩ 27		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		10
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		
⟨400⟩ 27		
gatggggctc ccgttcat	18	
		20
⟨210⟩ 28		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		30
⟨400⟩ 28		
gatggggctc ctgttcat	18	
⟨210⟩ 29		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		40
⟨213⟩ Artificial Sequence		

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 29

gatggggctc tagttcat 18

10

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

20

<400> 30

gatggggctc tggttcat 18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 31

gatggggctc tcgttcat 18

40

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

10

<400> 32

gatggggctc ttgttcat

18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 33

gatgggcctc aagtcat

18

30

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

⟨400⟩ 34		
gatgggcctc aggttcat	18	
⟨210⟩ 35		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		10
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		
⟨400⟩ 35		
gatgggcctc acgttcat	18	20
⟨210⟩ 36		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		30
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		
⟨400⟩ 36		
gatgggcctc atgttcat	18	
⟨210⟩ 37		
⟨211⟩ 18		40
⟨212⟩ DNA		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 37

gatgggcctc gagttcat

18

10

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 38

gatgggcctc gggttcat

18

<210> 39

<211> 18

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 39

40

gatgggcctc gcgttcat

18

<210> 40	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	10
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized	
<400> 40	
gatgggcctc gtgttcat	18
<210> 41	
<211> 18	20
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized	
<400> 41	30
gatgggcctc cagttcat	18
<210> 42	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	40

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized**<400> 42****gatgggcctc cggttcat** 18**<210> 43****<211> 18** 10**<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized****<400> 43** 20**gatgggcctc ccgttcat** 18**<210> 44****<211> 18****<212> DNA****<213> Artificial Sequence**

30

<220>**<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized****<400> 44****gatgggcctc ctgttcat** 18**<210> 45** 40**<211> 18**

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 45

gatgggcctc tagttcat

10

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 46

gatgggcctc tggttcat

18

<210> 47

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

<400> 47

gatgggcctc tcgttcat

18

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 48

gatgggcctc ttgttcat

18

<210> 49

20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

30

<400> 49

gatgggtctc aagttcat

18

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 50

gatgggtctc aggttcat 18

<210> 51

10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

20

<400> 51

gatgggtctc acgttcat 18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 52

gatgggtctc atgttcat 18

40

<210> 53

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

10

<400> 53

gatgggtctc gagttcat

18

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 54

gatgggtctc gggttcat

18

30

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

<400> 55

gatgggtctc gggttcat

18

<210> 56

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 56

gatgggtctc gtgttcat

18

<210> 57

20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

30

<400> 57

gatgggtctc cagttcat

18

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 58

gatgggtctc cggttcat 18

<210> 59

10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

20

<400> 59

gatgggtctc ccgttcat 18

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 60

gatgggtctc ctgttcat 18

40

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

10

<400> 61

gatgggtctc tagttcat

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 62

gatgggtctc tggttcat

18

30

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

<400> 63

gatgggtctc tcgttcat

18

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 64

gatgggtctc ttgttcat

18

20

<210> 65

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

30

<400> 65

atgaaccgga ggcccatc

18

<210> 66

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 66

gatgggactc angttcat 18

10

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

20

<400> 67

gatgggactc gngttcat 18

<210> 68

<211> 18

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 68

gatgggactc cngttcat 18

40

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

10

<400> 69

gatgggactc tngttcat

18

<210> 70

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 70

gatggggctc angttcat

18

30

<210> 71

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

⟨400⟩ 71		
gatggggctc gngttcat	18	
⟨210⟩ 72		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		10
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		
⟨400⟩ 72		
gatggggctc cngttcat	18	
		20
⟨210⟩ 73		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthesized		30
⟨400⟩ 73		
gatggggctc tngttcat	18	
⟨210⟩ 74		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		40
⟨213⟩ Artificial Sequence		

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 74

gatgggcctc angttcat 18

10

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

20

<400> 75

gatgggcctc gngttcat 18

<210> 76

<211> 18

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 76

gatgggcctc cngttcat 18

40

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

10

<400> 77

gatgggcctc tngttcat

18

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 78

gatgggtctc angttcat

18

30

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

40

〈400〉 79

gatgggtctc gngttcat

18

〈210〉 80

〈211〉 18

〈212〉 DNA

10

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Synthesized

〈400〉 80

gatgggtctc cngttcat

18

20

〈210〉 81

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

30

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Synthesized

〈400〉 81

gatgggtctc tngttcat

18

【図面の簡単な説明】

【図1】 標的DNA塩基配列とプローブ塩基配列およびアレイ基板上での配置

40

【図2】 実施例2のDNAプローブアレイのフルオロセイン由来の蛍光測定値

【図3】 標的DNAの構造

【図4】 実施例3のハイブリダイゼーションの結果

【図5】 実施例3のハイブリダイゼーションの結果の補正值

【図6】 比較例のハイブリダイゼーションの結果

【図7】 実施例3の補正值と比較例の結果の比較

【 5 】

1190	940	4650	1270	ND	ND	520	ND
1830	1970	4460	1440	ND	ND	330	ND
5270	1800	6630	5180	4190	2680	6030	2570
1390	2160	5570	1840	ND	ND	500	ND
ND	ND	1240	ND	ND	ND	640	ND
ND	ND	1150	ND	ND	ND	810	ND
2740	3290	4700	3130	2850	3230	3940	1590
ND	ND	1340	ND	ND	ND	1120	ND

【 6 】

1050	590	3780	910	ND	ND	420	ND
1310	1320	3270	1240	ND	ND	230	ND
4560	1150	4830	4010	3040	1800	4380	1810
1220	1540	4130	1240	ND	ND	400	ND
ND	ND	940	ND	ND	ND	590	ND
ND	ND	980	ND	ND	ND	560	ND
2040	2550	3840	2500	1890	2490	2890	1130
ND	ND	920	ND	ND	ND	960	ND

【 7 】

0.86	1.21	0.91	1.06	ND	ND	0.94	ND
1.06	1.13	1.03	0.88	ND	ND	1.09	ND
0.88	1.05	1.04	0.98	1.05	1.03	1.04	1.08
0.86	1.06	1.04	1.12	ND	ND	0.94	ND
ND	ND	1.00	ND	ND	ND	0.82	ND
ND	ND	0.89	ND	ND	ND	1.10	ND
1.02	0.98	0.93	0.95	1.06	0.98	1.03	1.06
ND	ND	1.11	ND	ND	ND	0.89	ND

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
G 0 1 N 37/00 G 0 1 N 37/00 1 0 2

(72)発明者 山本 伸子
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 鈴木 智博
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

審査官 田中 耕一郎

(56)参考文献 特表平09-508473(JP,A)
国際公開第99/041007(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 1/00 - C12N 15/90
C12Q 1/00 - C12Q 3/00
C07K 1/00 - C07K 19/00
CA(STN)
REGISTRY(STN)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JICSTファイル(JOIS)