

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-292007

(P2005-292007A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int.CI.⁷

F 1

テーマコード(参考)

GO1N 33/547

GO1N 33/547

GO1N 33/53

GO1N 33/53

M

GO1N 33/543

GO1N 33/543 595

GO1N 37/00

GO1N 37/00 102

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願2004-109363 (P2004-109363)

(22) 出願日

平成16年4月1日(2004.4.1)

(71) 出願人 000002369

セイコーエプソン株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目4番1号

(74) 代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74) 代理人 100080953

弁理士 田中 克郎

(74) 代理人 100093861

弁理士 大賀 真司

(72) 発明者 瀧口 宏志

長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

(72) 発明者 福島 均

長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

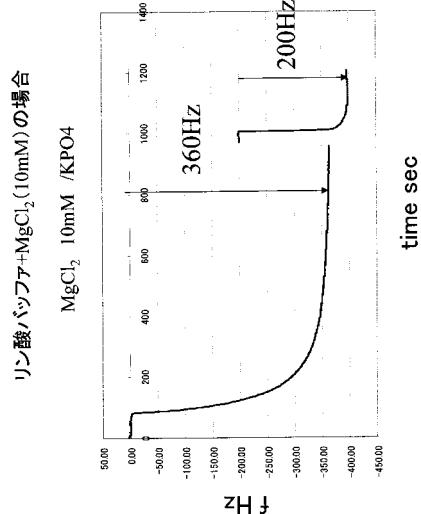
(54) 【発明の名称】核酸固定化方法およびそれを用いるバイオセンサの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 核酸プローブを固相担体表面に固定化する場合に、核酸同士が静電的に反発することを抑制して、高密度に吸着できる方法を提供すること。

【解決手段】 核酸を固相担体上に固定化するための核酸固定化方法であって、核酸を含むプローブ分子と、スペーサ分子と、少なくとも1種類の2価の陽イオンまたはその塩と、を含む溶液を調整する工程と、溶液と固相担体とを接触させてインキュベートする工程と、を含む方法。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

核酸を固相担体上に固定化するための核酸固定化方法であって、核酸を含むプローブ分子と、スペーサ分子と、少なくとも 1 種類の 2 倍の陽イオンと、を含む溶液を調製する工程と、

前記溶液と前記固相担体とを接触させてインキュベートする工程と、を含む方法。

【請求項 2】

前記 2 倍の陽イオンが、マグネシウムイオンまたはカルシウムイオンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記溶液が、2 倍の陽イオンを合計濃度で 0 . 1 mM ~ 1 0 0 mM 含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記溶液が、さらに、1 倍の陽イオンを合計濃度で 1 0 mM ~ 2 M 含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 1 倍の陽イオンが、ナトリウムイオンである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸分子が、それぞれ修飾されていてもよく、かつ一本鎖である、DNA、RNA または PNA からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記プローブ分子がチオール基を有する、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記スペーサ分子が、水酸基を有するチオール化合物、または一端にチオール基が導入されたポリエチレンギリコールである、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記固相担体表面のプローブ分子またはスペーサ分子が吸着する領域に、金薄膜が形成されている、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の核酸固定化方法を用いることを含む、センシング部位として核酸プローブを有するバイオセンサの製造方法。

【請求項 11】

被検試料中の標的核酸分子を検出する方法であって、請求項 10 に記載の方法により製造されたバイオセンサと前記被検試料とを接触させてインキュベートする工程と、

前記バイオセンサの核酸プローブにハイブリダイズした核酸の有無を検出する工程と、を含む方法。

【請求項 12】

DNA、RNA またはそれらの一塩基多型検出のための、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、核酸固定化方法、およびそれを用いるバイオセンサの製造方法と、核酸検出方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

酵素基質反応、抗原抗体反応、核酸のハイブリダイゼーション等、生体関連分子の特異

10

20

30

40

50

的な相互作用を利用して、被検試料中の標的分子を検出するバイオセンサが、基礎研究や医療の分野における血液検査や遺伝子解析、食品産業における工程管理、環境測定などに使用され始めている。

【0003】

バイオセンサは、標的物質と特異的に反応するセンシング部位としての生体関連物質と、標的物質とセンシング部位との相互作用による変化を電流や電圧などの物理的信号に変える変換器とを含む。従って、高感度のバイオセンサを作成するためには、センシング部位の構造の最適化と、信号の最適な読み取り手段とが必要とされる。

【0004】

バイオセンサのセンシング部位として核酸を固定化する方法の一つに、基板などの固相担体の表面に、核酸を含む薄膜を形成する方法が挙げられる。薄膜を形成するために、核酸分子には予めその末端にリンカーを挟んで特定の基を結合させておき、固相担体表面に吸着させる。特定の基として、例えばチオール基が挙げられ、固相担体表面に金薄膜を形成しておくことによって、金 - 硫黄結合を介して核酸プローブの自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer; SAM) が形成される。こうして、既知の塩基配列を有するDNAプローブを固定化し、該プローブと、被検試料中に含まれる核酸とのハイブリダイゼーションを、物理化学的なシグナル（例えば蛍光量）として検出するセンサが実用化されている。

【0005】

被検試料に含まれる標的核酸とバイオセンサに固定化されたDNAプローブとのハイブリダイゼーションの効率は、DNAプローブの密度に大きく依存することが知られている（例えば、非特許文献1を参照）。DNAセンサの感度を向上させるためには、ハイブリダイゼーションに必要なプローブ同士の間隔は保ちつつ、均等に分散したDNAプローブの密度を最大にすることが必要である。固定化するDNAプローブの密度を最適な状態に制御するためには、例えば、スペーサ分子と呼ばれる比較的低分子量の分子を核酸プローブ間に適度に挿入する方法が用いられる。末端をチオール化した一本鎖DNAをプローブとし、スペーサ分子として6-メルカプト-1-ヘキサンノールを用いた例について報告がある（例えば、非特許文献2を参照）。

【0006】

スペーサ分子を用いる場合、先にDNAプローブを基板上に吸着させて、後からスペーサ分子を埋め込む方法と、DNAプローブとスペーサ分子を混合した溶液を使用して両者を一度に固定化する共吸着法などが一般的に用いられている。現在主流として用いられているのは前者の手法であるが、段階を経て膜を形成するためプロセスに比較的時間がかかり、DNAプローブの密度の微調整が難しい。

【0007】

一方、共吸着法は、膜の形成が一段階で進むため短時間で処理ができ、DNAプローブを含む複数種類の分子が混合している溶液に固相担体を浸漬させ、前記分子の混合比率を変えることによって固相基板に対する分子の吸着量を調整する方法で、最初に混合溶液の組成比率の調整を行うだけで、理論的にはバイオセンサにおける核酸プローブの密度を調節することができる。

【非特許文献1】 Peterson, A. W. et al., Nucleic Acids Research, vol. 29, No. 24, 5163-5168 (2001)

【非特許文献2】 Tonya M. Herne et al., Journal of American Chemical Society, 119, pp. 8916-8920 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、DNAはその骨格にリン酸を含むため、負の電荷を帯びており、DNA同士が、お互いの電荷による反発力のために一定の距離以上近付くことができない。従って、上述の共吸着法を用いる場合、DNAプローブとスペーサ分子の組成比率の調整が、

10

20

30

40

50

必ずしも DNA プローブの密度に反映されず、間隔を最適化することが困難な場合がある。

【 0 0 0 9 】

DNA プローブの吸着密度を向上させるために、溶液中にナトリウムイオンなどの陽イオンを塩の形で添加することが有効であることが知られている。溶液中に陽イオンが存在することで、骨格基同士の静電的な反発が抑えられ、DNA プローブの高密度化が可能となり、例えば、20 mM の NaCl 濃度では DNA プローブ間の電荷が及ぼす距離を 2 nm まで近付けることができる (Debye screening length) と計算できる。しかしながら、実際には DNA は高分子の柔軟な分子構造をとるために、回転運動により数十 nm より近づくことができない。

10

【 0 0 1 0 】

それでも DNA プローブ間の距離を近づけようすると、ナトリウムイオンの濃度をかなり高くして DNA の反発力を抑えなければならず、例えば、0.3 nm 程度まで電荷の及ぼす距離を近づける場合には、ナトリウムイオン濃度を 1 M まで上げる必要があり、実現するのは困難である。

【 0 0 1 1 】

そこで、本発明は、核酸プローブを固相担体表面に固定化する場合に、核酸同士が静電的に反発することを抑制して、高密度に吸着できる方法を提供することを目的とする。核酸同士の反発力を抑制することによって、スペーサ分子と核酸プローブ分子とを含む溶液を用いた共吸着法を行なう際、濃度比の調整による吸着密度の制御が容易となり、最適な吸着密度を達成しやすくなる。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

本発明者らは、上記課題に鑑みて鋭意研究を行った結果、核酸プローブ分子とスペーサ分子を含む溶液に 2 倍の金属陽イオンを加えて共吸着を行うことにより、核酸プローブ分子が非常に高密度に吸着されること；および 2 倍の陽イオンを用いれば、1 倍の陽イオンであるナトリウムイオンを添加する場合に比較して、非常に低い濃度で上記効果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 3 】

即ち、本発明は、〔1〕核酸を固相担体上に固定化するための核酸固定化方法であって、核酸を含むプローブ分子と、スペーサ分子と、少なくとも 1 種類の 2 倍の陽イオンと、を含む溶液を調整する工程と、前記溶液と前記固相担体とを接触させてインキュベートする工程と、を含む方法；〔2〕前記 2 倍の陽イオンが、マグネシウムイオンまたはカルシウムイオンである、上記〔1〕に記載の方法；〔3〕前記溶液が、2 倍の陽イオンを合計濃度で 0.1 mM ~ 100 mM 含む、上記〔1〕または〔2〕に記載の方法；〔4〕前記溶液が、さらに、1 倍の陽イオンまたはその塩を合計濃度で 10 mM ~ 2 M 含む、上記〔1〕から〔3〕のいずれか 1 項に記載の方法；〔5〕前記 1 倍の陽イオンが、ナトリウムイオンである、上記〔4〕に記載の方法；〔6〕前記核酸分子が、それぞれ修飾されていてもよく、かつ一本鎖である、DNA、RNA または PNA からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、上記〔1〕から〔5〕のいずれか 1 項に記載の方法；〔7〕前記プローブ分子がチオール基を備える、上記〔1〕から〔6〕のいずれか 1 項に記載の方法；〔8〕前記スペーサ分子が、6-メルカプト-1-ヘキサノール、または一端にチオール基が導入されたポリエチレンギリコールである、上記〔1〕から〔7〕のいずれか 1 項に記載の方法；〔9〕前記固相担体表面のプローブ分子またはスペーサ分子が吸着する領域に、金薄膜が形成されている、上記〔7〕または〔8〕に記載の方法；〔10〕上記〔1〕から〔9〕のいずれか 1 項に記載の核酸固定化方法を用いることを含む、センシング部位として核酸プローブを有するバイオセンサの製造方法；〔11〕被検試料中の標的核酸分子を検出する方法であって、上記〔10〕に記載の方法により製造されたバイオセンサと前記被検試料とを接触させてインキュベートする工程と、前記バイオセンサの核酸プローブにハイブリダイズした核酸の有無を検出する工程と、を含む方法；〔12〕

30

40

50

] D N A 、 R N A またはそれらの一塩基多型検出のための、上記〔11〕に記載の方法、に関する。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、D N A 等の核酸分子を吸着法によって固相担体に固定化する際、核酸同士が自己の有する電荷によって反発するのを抑制し、高密度に固定化することが可能となる。

【0015】

本発明によれば、核酸プローブとスペーサ分子とを共吸着させる場合に、スペーサ分子と核酸分子との溶液中における濃度比率を調整することによって、両者の吸着密度を制御しやすくなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、本願明細書において用いる語句の意義を説明し、実施形態に基づいて詳細に説明する。

【0017】

本発明に係る核酸固定化方法では、プローブ分子とスペーサ分子を含む溶液に、少なくとも1種類の2価の陽イオンまたはその塩を添加することを特徴とする。2価の陽イオンとしては、金属イオンを用いることができ、例えば、マグネシウムイオン(Mg^{2+})、カルシウムイオン(Ca^{2+})、ストロンチウムイオン(Sr^{2+})、バリウムイオン(Ba^{2+})などが挙げられる。中でも、マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンが扱いやすく好ましい。上記溶液には、これらの2価の陽イオンのうち1種類のみを添加してもよいし、2種類以上添加してもよい。2価の陽イオンを添加することにより、負に帯電した核酸間に静電的な反発力が作用するのを抑制し、プローブ分子を高密度に固定化することができる。

【0018】

2価の金属陽イオンは、その塩を用いてまず高濃度の水溶液を作製し、これを希釈して、プローブ分子とスペーサ分子とを含む溶液に添加することができる。塩としては、水に溶けやすい塩化物が好ましく、例えば $MgCl_2$ や $CaCl_2$ が挙げられるがこれらに限定されない。

【0019】

本発明に係る核酸固定化方法では、これらの2価の陽イオンが $0.1\text{mM} \sim 100\text{mM}$ 、好ましくは $0.1\text{mM} \sim 20\text{mM}$ 、より好ましくは $0.1\text{mM} \sim 10\text{mM}$ となるように、プローブ分子およびスペーサ分子を含む溶液に添加すればよい。1価の陽イオンであるナトリウムイオンの場合、数 $10\text{mM} \sim 1\text{M}$ 程度添加しないと効果が得られなかつたのに対し、2価の陽イオンでは、より低濃度で十分な効果を得ることができる。

【0020】

一方、本発明に係る核酸固定化方法では、プローブ分子とスペーサ分子とを含む溶液に、2価の陽イオンに加えて、1価の陽イオンまたはその塩を加えることによって、核酸同士の静電的な反発力を抑制することができる。1価の陽イオンとしては、ナトリウムイオン(Na^+)、カリウムイオン(K^+)等が挙げられ、これらの塩としては、それぞれの塩化物である塩化ナトリウムや塩化カリウムを用いることが好ましい。上述のように、1価の陽イオンは比較的高濃度にしないと効果が表れないため、 $10\text{mM} \sim 2\text{M}$ 、好ましくは $20\text{mM} \sim 1.5\text{M}$ 、さらに好ましくは $100\text{mM} \sim$ 約 1M 程度加えることによって微調整が可能である。

【0021】

本発明で用いられるプローブ分子は、核酸を含み、固相担体上に固定化することが可能な分子である。核酸は、全部または一部が修飾(置換を含む。)されていてもよく、かつ、さらにそれぞれ一本鎖または二本鎖であるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを意味し、中でも全部または一部が修飾(置換を含む)されていてもよい、一本鎖のオリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドまたはポリクローナル抗体ヌクレオチドが好ましい。具体的には、例えば、D N A、R N A、P N A(ペプチド核酸)、C N A(アミノシクロヘキシリエタン酸核酸)、H N A(ヘキシトール核酸)、p-R N A(ピラノシリルR N A)、前記核酸分子からなるオリゴヌクレオチド、前記核酸分子からなるポリヌクレオチド、等から選ばれる核酸などが挙げられ、好ましくは、D N A、R N AおよびP N Aが用いられる。

【0022】

本発明で用いられるスペーサ分子は、核酸分子と混合して溶液とすることが可能であり、固相担体表面に固定化されたプローブ分子の機能を阻害せず、また、バイオセンサとしての動作に影響を与えない低分子物質である限りにおいて特に限定されず、目的とするバイオセンサ上の核酸の密度、プローブ分子の構造、使用する固相担体に応じて当業者が適宜選択することができる。10

【0023】

上記「スペーサ分子」としては、例えば、X-A-B〔ここで、Xは固相担体に固定化することが可能な官能基を示し；AはC₁₋₁₅の置換基を有してもよいアルキレン基、ポリエチレングリコール基(P E G)を示し；Bは水酸基、アミノ基、フェロセニル基またはカルボキシリ基を示す。〕で表される化合物またはその塩が挙げられる。中でも、Bが水酸基であり、AがC₆のアルキレン基またはポリエチレングリコール基であるものが好ましい。

【0024】

本発明で用いられるプローブ分子およびスペーサ分子は、その一端に固相担体に固定化可能な官能基を有することが好ましい。このような官能基としては、例えば、チオール基、ジスルフィド基、スルフィド基、カルボキシリ基、アミノ基、イソシアネート基、クロライド基、エポキシ基、カルボジイミド基、マレイミド基などが挙げられ、中でもチオール基が好ましい。「プローブ分子」および「スペーサ分子」の末端にチオール基を導入しておくことにより、表面に金薄膜等が形成された固相担体を用いれば、プローブ分子およびスペーサ分子は固相担体上にS A Mを形成し、容易に固定化される。20

【0025】

したがって、本発明で用いられるスペーサ分子としては、水酸基を有するチオール化合物、または一端にチオール基が導入されたポリエチレングリコールなどが好ましく、より具体的には、Aがアルキレン基であるアルカンチオールや、Xがチオール基でAがP E GであるP E Gチオールなどが特に好ましく、中でもH S - (C H₂)₆ - O Hで表される6-メルカプト-1-ヘキサノール(M C H)が好ましい。30

【0026】

本発明で用いられる「固相担体」は、プローブ分子およびスペーサ分子の核酸の固定化を妨げない限り、形状や材料を特に限定されない。形状としては、基板上、粒子状、糸状、テープ状、フィルム状等が挙げられ、中でも検出や取扱の点から基板が好適である。基板の場合、材料や厚さは、固定化されるプローブ分子の吸着に寄与する官能基の種類、標的核酸分子の検出のために採用するシグナル検出手段等に依存して、当業者が最適な条件を選択することが可能である。基板材料としては、ガラス基板、金属基板(例えば、金、銀、銅、アルミニウム、白金、酸化アルミニウム、S r T i O₃、L a O₃、N d G a O₃、Z r O₂等)、シリコン基板(例えば酸化シリコン)、ポリマー樹脂基板(例えばポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート)等から選択される材料が好適である。40

【0027】

本発明で用いられる「固相担体」のプローブ分子が吸着する領域には、例えば、金属薄膜(好ましくは金薄膜、銀薄膜、銅薄膜、白金薄膜)が形成されていてもよい。金属薄膜は自体公知またはそれに準じた方法により形成することが可能であり、例えば、電気めつき法、無電解めつき法、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法等を用いることができる。金属薄膜が形成された固相担体を用いることによって、末端にチオール基を有するプローブ分子やスペーサ分子は、基板表面にS A Mを形成することが可能となる。

【0028】

10

20

30

40

50

また、本発明で用いられる「固相担体」表面には、高分子化合物やシランカップリング剤などでコーティングし、反応性の高い官能基を導入してもよい。このような官能基としては、例えば、アミノ基、カルボキシリ基、ジスルフィド基、エポキシ基、カルボジイミド基、マレイミド基などが挙げられる。例えば、プローブ分子やスペーサ分子がチオール基を有する場合は、基板表面のマレイミド基と共有結合し、アミノ基を有する場合は、基板表面のエポキシ基との共有結合によりプローブ分子やスペーサ分子が固定化される。

【0029】

本発明に係る「核酸固定化方法」で用いられるプローブ分子およびスペーサ分子は、固相担体との吸着反応に供される前に、まず両者を含む混合溶液として準備される。溶液中、プローブ分子とスペーサ分子とが、合計濃度で通常0.1～5μM含まれ、かかる範囲内の濃度である限りにおいて、プローブ分子によって固相担体表面を良好に被覆することができる。中でも好適な合計濃度は、0.1～10μM、より好ましくは0.1～2μM、特に好ましくは0.5μM～約1μMである。

【0030】

前記混合溶液におけるプローブ分子とスペーサ分子またはその塩との組成比(モル%)は特に限定されず、目的とするバイオセンサ上の核酸の密度、プローブ分子の構造、使用するスペーサ分子、使用する固相単体の種類に応じて当業者が適宜選択することができる。プローブ分子/スペーサ分子=約1モル%/約99モル%～約99モル%/約1モル%の範囲に含まれる組成比を有するプローブ分子およびスペーサ分子を含む混合溶液であれば、目的に応じていかなる組成比も実施可能である。

【0031】

本発明にかかる核酸固定化方法によれば、プローブ分子同士が反発して近づけない状態を避けられるので、プローブ分子とスペーサ分子の溶液中の混合比率が、固相担体に吸着される比率に反映されやすい。核酸分子/スペーサ分子=約1/99～約10/90、約10/90～約20/80、約20/80～約30/70、約30/70～約40/60、約40/60～約50/50、約50/50～約60/40、約60/40～約70/30、約70/30～約80/20、約80/20～約90/10、約90/10～約99/1(以上、モル%濃度比)のいずれの範囲においても混合及び組成の微調整が可能であり、固相基板の被覆が達成される。

【0032】

本発明で用いられるプローブ分子とスペーサ分子と少なくとも1種類の2価の陽イオンを含む溶液の溶媒は特に限定されず、両者を溶解し、かつ固相基板表面への吸着反応を阻害しない限り、いかなる溶媒も使用することができる。好適な溶媒としては、各種リン酸緩衝液(例えばPBS(50mM K₂PO₄、5mM EDTA、1M NaCl、pH 7.0)、等)、TE緩衝液(Tris-HClとEDTAの混合緩衝液、pH 8.0)、等が挙げられる。当該緩衝液のpHも特に限定されないが、通常、pH 5.5～8.5付近であり、好適にはpH 7～8付近である。

【0033】

なお、上記プローブ分子とスペーサ分子と少なくとも1種類の2価の陽イオンを含む溶液は、自体公知またはそれに準じた方法に従って調整することができ、例えばプローブ分子、スペーサ分子、陽イオンのそれぞれの溶液を調整し、それらを適当な比率で混合することによって準備することができる。

【0034】

本発明に係る核酸固定化方法では、上述したプローブ分子、スペーサ分子、および少なくとも1種類の2価の陽イオンを含む溶液と、上述の固相担体とを接触させてインキュベートすることによって、プローブ分子とスペーサ分子を固相担体表面に固定化する。

【0035】

固定化に際し、固相担体表面が、例えば大気中の有機物等で汚染されている場合、有機溶剤による洗浄や、必要に応じて強酸での洗浄、紫外線により発生するオゾンによる洗浄を行って汚染物質を行って、汚染物質を分解除去してから用いることが好ましい。好適な

10

20

30

40

50

例としては、金属表面を有機溶剤（例えばアセトン等）で煮沸洗浄し、次いでUVオゾン洗浄機を用いて洗浄する方法、piranha溶液（過酸化水素水／濃硫酸 = 30 / 70の混合溶液）を用いる洗浄方法が挙げられる。

【0036】

本発明に係る核酸固定化方法において、溶液と固相担体表面とを接触させてインキュベートする場合の反応温度は、特に限定されないが、通常0～40であり、好適には20～35付近である。反応時間も特に限定されないが、通常、10分～24時間のインキュベートで十分であり、好適には10分～12時間である。

【0037】

本発明は、本発明に係る核酸固定化方法を用いることを含む、バイオセンサの製造方法、およびその製造方法により製造されたバイオセンサを用いて標的核酸分子を検出する方法も提供するが、当該製造方法および核酸分子の検出方法について用いられる用語や各種の条件のうち、上述した本発明に係る核酸固定化方法について説明されたものについては、ここでは説明を省略する。

【0038】

本発明に係るバイオセンサの製造方法は、最も好適には、一端にチオール基を有し、他端に一本鎖核酸を含むプローブ分子と、スペーサ分子としての6-メルカプト-1-ヘキサノールと、マグネシウムイオン若しくはカルシウムイオンと、を含む溶液を調整する工程と、この溶液と表面に金薄膜が形成された固相単体とを接触させてインキュベートする工程とを含む。これにより、プローブ分子が互いに反発することなく、プローブ分子とスペーサ分子は溶液中の混合比率に従って、固相担体表面を被覆する。

【0039】

本発明に係るバイオセンサの製造方法により製造されるバイオセンサは、 1 cm^2 あたり少なくとも 1×10^8 個～ 1×10^{16} 個の核酸分子を有するバイオセンサであり、好ましくは、少なくとも 1×10^{11} 個～ 1×10^{14} 個の核酸分子を有するバイオセンサである。

【0040】

本発明に係る核酸分子の検出方法は、本発明に係る核酸固定化方法または製造方法により製造されたバイオセンサを用いて、被検試料中に含まれる標的核酸分子が、プローブ分子の核酸とハイブリダイズしたかどうかを検出することにより、その標的分子の有無を判別する方法を意味する。本検出法は、特に、DNA(cDNAを含む)のオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド；RNA(mRNA等)のオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド；それらの核酸の一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism, SNPs)、等の検出に有用である。

【0041】

プローブ分子として、二本鎖核酸を含む分子を固定化した場合には、標的核酸分子とハイブリダイゼーションが起こるよう、被検試料と接触させる前に、加熱処理や化学変性によって一本鎖核酸とする。

【0042】

ハイブリダイゼーションの検出は、例えば、標的核酸分子等を蛍光分子標識して発光強度の変化を検出する方法が一般的であり、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)、水晶発振子マイクロバランス(Quartz Crystal Microbalance; QCM)等の標識を用いない方法が好ましいが、これらに限定されない。当業者は、適宜最適な方法、試薬、装置等を選択してハイブリダイゼーションを検出することが可能である。

【0043】

以下に示す本発明の実施例は例示的なものであり、本発明は以下の実施例に制限されるものではない。当業者は、以下に示す実施例に様々な変更を加えて本発明を最大限に実施することができ、かかる変更は本願特許請求の範囲に含まれる。

【実施例】

【0044】

10

20

30

40

50

(1) 混合溶液の調整

プローブ分子として、式 $dA20 - (CH_2)_6 - SH$ で表される核酸プローブを購入入手した。ここで、 $dA20$ とはデオキシアデノシン 5' - リン酸を意味する。

【0045】

スペーサ分子として、式 $H O - (CH_2)_6 - SH$ で表される化合物（以下「MCH」と称する。）を購入入手した。

【0046】

2価の陽イオンを溶液に添加した実施例1～3と、添加しなかった比較例1および2を行った。それぞれについて添加したイオンを表1に示す。

【0047】

【表1】

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	比較例2
2価の陽イオン	MgCl ₂ (10 mM)	MgCl ₂ (10 mM)	CaCl ₂ (10 mM)	—	—
1価の陽イオン	—	NaCl (1 M)	NaCl (1 M)	—	NaCl (1 M)

10

20

溶媒として、リン酸緩衝液（50 mM KPO₄、pH 7.0）を用い、核酸プローブおよびMCHはそれぞれ0.5 μM、2価および1価の陽イオンは表1に示される濃度となるよう溶解させた。

【0048】

(2) プローブ分子とスペーサ分子の共吸着

プローブ分子とスペーサ分子の固定化、および固定化されたプローブ分子への標的核酸分子のハイブリダイゼーションは、QCM測定法により測定した。

【0049】

具体的には、QCM測定用の金電極を備えた測定子を固相担体として用い、これを上記(1)で調製した溶液に浸漬させ、プローブ分子およびスペーサ分子を吸着させた。これらの分子が吸着することにより、金電極上に形成された薄膜の振動数が変化し、この変化を検出することによって、吸着した分子を定量的に検出することができる。さらに、プローブ分子に標的核酸分子がハイブリダイズした場合も、質量変化を振動数の変化として検出し、ハイブリダイゼーションを定量的に検知することができる。

【0050】

図6に、QCM測定により得られるグラフの一例を示す。縦軸は、薄膜の振動数を示し、横軸は時間の経過を示す。まず、プローブ分子とスペーサ分子の共吸着によって振動数が減少する。この減少分（ $f(c_o a)$ ）が共吸着による、プローブ分子とスペーサ分子を含む膜の形成量を示す。続いて、プローブ分子の核酸部分に標的核酸がハイブリダイズすることにより、薄膜の振動数がさらに減少する。この減少分（ $f(h_y)$ ）が、ハイブリダイゼーション量を相対的に示している。

【0051】

実施例1～3と比較例1、2について、 $f(c_o a)$ の平均を表2に示す。

【0052】

30

40

【表2】

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	比較例2
$\Delta f(\text{coa}) [\text{Hz}]$	360	430	400	75	243
比較例1に対する割合(倍)	4.80	5.73	5.33	1.00	3.24

陽イオンを添加していない比較例1に比べると、1価の陽イオン(1M Na^+)のみ添加した比較例2では $f(\text{coa})$ は3倍以上増加したが、2価の陽イオン(10mM Mg^{2+})のみ添加した実施例1では5倍近い増加が見られた。1価の陽イオンは 1M と高濃度であったのに対し、2価の陽イオンは 10mM と低濃度であったにもかかわらず、共吸着量を大きく増加させる効果を得られた。10

【0053】

また、2価の陽イオン(10mM Mg^{2+})と1価の陽イオン(1M Na^+)の両方を添加した実施例2では、2価の陽イオンのみ添加した場合(実施例1)に比較して、 $f(\text{coa})$ が 70Hz 上昇しており、2価の陽イオンに1価の陽イオンを組合せて使用することによって、吸着量を調整することが可能であることが確認された。

【0054】

さらに実施例3から、2価の陽イオンによる効果は、 Mg^{2+} のみならず、 Ca^{2+} でも同様に得られることがわかった。20

(3)ハイブリダイゼーション

$f(\text{coa})$ は、プローブ分子の吸着量による振動数変化と、スペーサ分子の吸着量による振動数数変化の合計を表すので、プローブ分子が高密度化したことの確認にはならない。そこで次に、プローブ分子と標的核酸とのハイブリダイゼーションによる振動数の減少を測定し、プローブ分子の密度変化を観測した。

【0055】

ハイブリダイゼーション用の溶液には、上述のリン酸緩衝液に $NaCl$ を 1M 添加した溶媒を用い、プローブ分子の核酸部分に相補的なDNA分子として(dT)₂₀を $1\mu\text{M}$ となるように溶解させた。この溶液に、プローブ分子とスペーサ分子とを共吸着させた測定子を浸漬させ、インキュベーションを行った。30

【0056】

実施例1～3と比較例1、2について、 $f(hy)$ の平均を表3に示す。

【0057】

【表3】

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	比較例2
$\Delta f(hy) [\text{Hz}]$	200	325	250	40	115
比較例1に対する割合(%)	5.00	8.13	6.25	1.00	2.88

40

実施例1～3は、比較例1に比較して、 $f(hy)$ が5倍から8倍増加した。 $f(hy)$ の増加率が、 $f(\text{coa})$ の増加率よりも大きいことから、実施例1～3では、スペーサ分子よりプローブ分子の吸着の高密度化が起こったことが確認された。

【0058】

一方、比較例2では、 $f(hy)$ の増加率は、 $f(\text{coa})$ の増加率よりも小さく、 1M Na^+ を添加した場合の共吸着量の増加は、添加濃度が 1M であるため、効果が得られなかった。図1～5に、実施例1～3および比較例1、2のQCM測定データを、それぞれ一例ずつ示す。2価の陽イオンを添加することによるプローブ分子吸着の高密50

度化が視覚的に確認され、2価の陽イオンは、少量の添加により核酸同士の反発を抑制することが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】10mM Mg^{2+} を添加した場合のQCM測定結果を示す。

【図2】10mM Mg^{2+} および1M Na^+ を添加した場合のQCM測定結果を示す。

【図3】10mM Ca^{2+} および1M Na^+ を添加した場合のQCM測定結果を示す。

【図4】1M Na^+ を添加した場合のQCM測定結果を示す。

【図5】陽イオンを添加しなかった場合のQCM測定結果を示す。

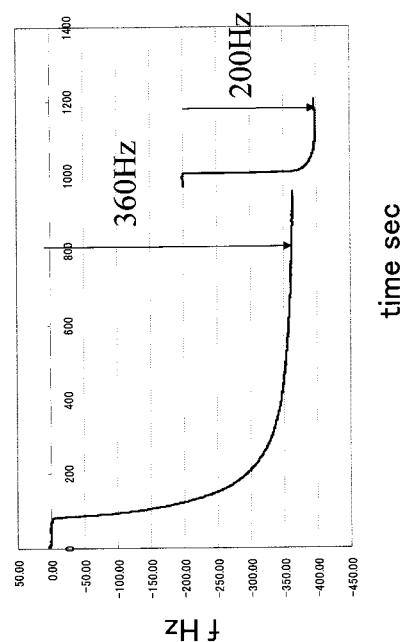
【図6】QCM測定結果の見方を示す説明図である。

10

【図1】

リソ酸バッファ+ $MgCl_2$ (10mM)の場合

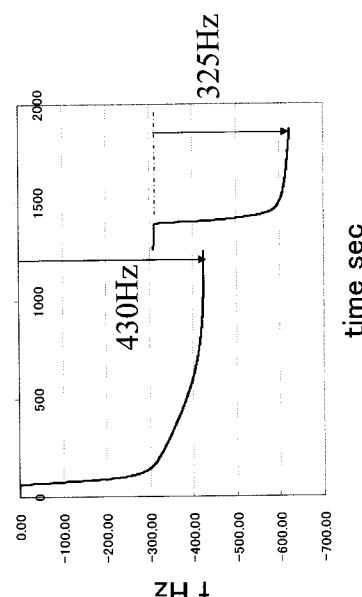
$MgCl_2$ 10mM /KPO4



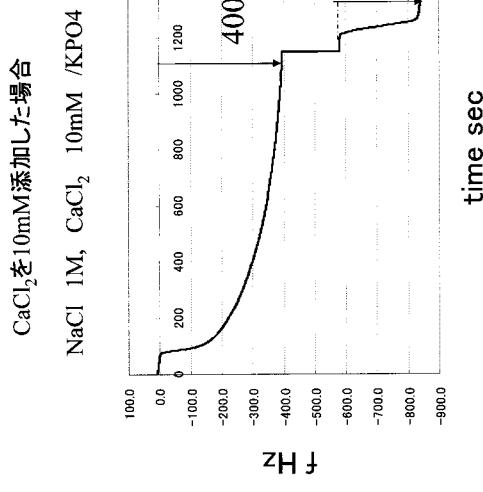
【図2】

リソ酸バッファ+ $NaCl$ (1M)+ $MgCl_2$ (10mM)の場合

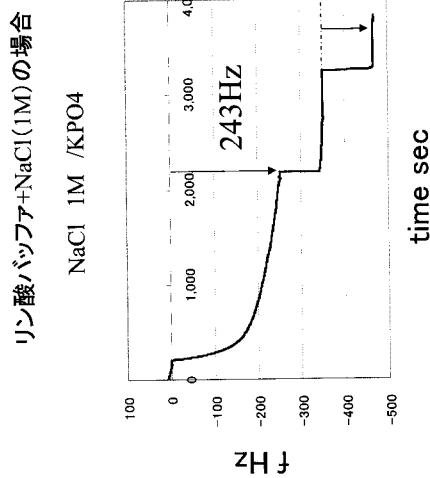
$NaCl$ 1M, $MgCl_2$ 10mM /KPO4



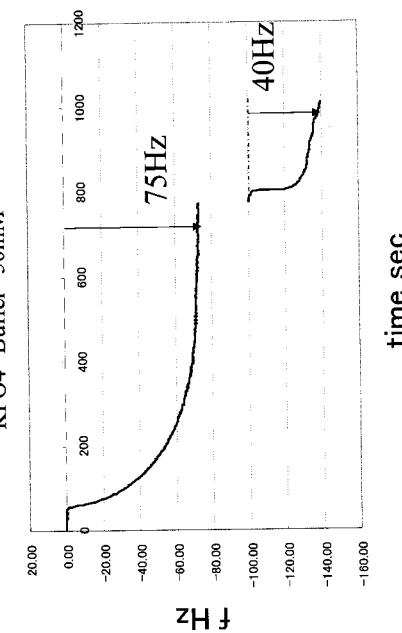
【図3】



【図5】



【図4】



【図6】

