

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4845307号
(P4845307)

(45) 発行日 平成23年12月28日(2011.12.28)

(24) 登録日 平成23年10月21日(2011.10.21)

| | | | |
|----------------|--------------|------------------|----------------|
| (51) Int. Cl. | | F I | |
| GO 1 N | 33/53 | (2006.01) | GO 1 N 33/53 M |
| C 1 2 M | 1/00 | (2006.01) | GO 1 N 33/53 D |
| GO 1 N | 1/28 | (2006.01) | C 1 2 M 1/00 A |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2006.01) | GO 1 N 1/28 J |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A |

請求項の数 5 (全 11 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|-------------------------------|-----------|-----------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2001-292362 (P2001-292362) | (73) 特許権者 | 000000376 |
| (22) 出願日 | 平成13年9月25日 (2001. 9. 25) | | オリンパス株式会社 |
| (65) 公開番号 | 特開2002-181819 (P2002-181819A) | | 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4 3番2号 |
| (43) 公開日 | 平成14年6月26日 (2002. 6. 26) | (74) 代理人 | 100084618 |
| 審査請求日 | 平成20年9月25日 (2008. 9. 25) | | 弁理士 村松 貞男 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2000-291306 (P2000-291306) | (74) 代理人 | 100091351 |
| (32) 優先日 | 平成12年9月25日 (2000. 9. 25) | | 弁理士 河野 哲 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | (74) 代理人 | |
| | | | 風間 鉄也 |
| | | (72) 発明者 | 大橋 陽子 |
| | | | 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4 3番2号 オリンパス光学工業株式会社内 |
| | | 審査官 | 白形 由美子 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 立体基体を用いた検出用アレイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1個のその一部分に曲面を有する粒状基体と、複数種類の被検物質に対して夫々特異的に結合する複数種類の特異親和性物質を該粒状基体の3次元的領域に亘る表面である前記曲面の少なくとも一部分に固相化された特異親和性プローブと、前記特異親和性プローブの前記基体表面での配置を判別するための少なくとも3点の位置検出用マーカートを具備する検出用アレイ。

【請求項 2】

前記位置検出用マーカータが、突起部または凹部である請求項1に記載の検出用アレイ。

【請求項 3】

前記位置検出用マーカータが、前記プローブの種類毎に異なる信号量または信号パターンを発生し得る信号発生手段である請求項1または2に記載の検出用アレイ。

【請求項 4】

請求項1から3の何れか1項に記載の検出用アレイであって、前記基体の特定部位に対し偏在的に磁性を設けたことを特徴とする検出用アレイ。

【請求項 5】

請求項1から4の何れか1項に記載の検出用アレイであって、前記特異親和性物質は、遺伝子等の核酸を含む物質、抗原、抗体、アレルゲン、ホルモンおよび酵素の群から選ばれる検出用アレイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生物学的試料中の被検物質を特異親和性物質を用いて検出するための検出用アレイであって、詳しくは、特異親和性物質としてのプローブを立体状基体の表面に固相化したプローブアレイに関する。

【0002】

【従来の技術】

生物学的な特異結合反応を利用する検出方法、例えば、ハイブリダイゼーションを利用する核酸の検出方法等は一般的に広く使用されている。また、そのような方法においてハイブリダイゼーションを行うための装置も数多く開発されている。

10

【0003】

例えば、コーニング社はDNAマイクロアレイ専用のスライドガラスとして、アミノシランコートしたCMT-GAPSを提供している。このスライドガラスは、一定規格、即ち、約7.5cm×約2.5cmの平面状のスライドガラスであり、プローブアレイの基板として使用されている。使用者は、その表面に検出されるべき核酸に特異的な核酸プローブを、多種類、別々に固相化して使用する。このようなスライドガラスを用いる手段は、他の手段に比較して安価であることや、プローブの固相化が容易であること等の利点を有する反面、ハイブリダイゼーション反応での反応むらが問題となっている。

【0004】

また一方で、半導体基板上にプローブDNAを高密度で配置するジーンチップTMがアフィメトリックス社(Affymetrix)から提供されている(米国特許第5,143,854号等を参照されたい)。ジーンチップTMは、2cm×2cmの平面状の半導体基板の片面にフォトリソグラフィ技術によって高密度に多種類のプローブDNAを別々に固相した一種の核酸プローブアレイである。また、米国特許第5,843,767号には、厚さが約10μmから約500μmの半導体基板において、口径が約5μmから約2mmの貫通孔を多数形成して、プローブDNAを各貫通孔の内壁に固相することによって、表面積を増加させた核酸プローブアレイが開示されている。

20

【0005】

このように、従来、使用される核酸プローブアレイは、何れも平面板状の基板を使用している。しかしながら、このような従来の平板状基板では、核酸プローブアレイ作製過程およびハイブリダイゼーション反応過程において、少なくとも所要の反応時間の間は蒸発しない程度の液量となるように、多量の反応用溶液、例えば、検体、洗浄用溶液および標識ターゲットDNA等の試薬を必要とするので、多量の基板を処理するのは不向きである。

30

【0006】

また、平板状の基体は、基体の表面の利用部分が少なく、少なくとも片方の基板面を固相のために使用していない。また、平板状の基体は、必要な反応部分全体を検体と接触させるために余分量を要求するとともに、各反応部分における分注精度が変動し易いので、再現性が低い反応結果が得られる可能性がある。

【0007】

他方、表面積を増加する例として、特定種類の特異親和性結合試薬を含む溶液中に直径が数μmのビーズを混合して試薬を固相化し、反応容器中で検体と反応させた後に、自由な向きで浮遊または容器底面に沈降しているビーズに対して蛍光等の光出力の合計を測定するようなビーズ状の基体も公知であるが、基体表面における位置情報を得ることができないので、検査項目の結果の取り違いを生じ得る。

40

【0008】

更に、複数の異なる検体のそれぞれに対応して反応および/または測定すべき複数の基体を互いに区別する適切な方法が提供されていないので、検体の取り違いを生じ得る。また、同時にまたは連続的に複数の異なる検査を実行する場合に、各々の検査状況を区別して把握することが困難である。

【0009】

50

【発明が解決しようとする課題】

このような状況に鑑み、本発明は、各作業工程で必要とされる試薬を少量化し、且つ検出用アレイの何れの位置においても反応むらを生じることなく処理を実施でき、また、多くの数量を一度に簡便に且つ反応むらなく安定して処理できる検出用アレイを提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

発明者等は、鋭意研究の結果、従来は平板上に特異親和性物質を固相化していた平板状のチップ状アレイを、3次元的な立体状基体である球状に変更するという大胆な発想に基づいて、上記の課題を解決し目的を達成する手段を開発した。即ち、本発明は、少なくとも1個の立体状基体と、複数種類の被検物質に対して夫々特異的に結合する複数種類の特異親和性物質を該立体状基体の特定位置の表面に部分的に固相化された特異親和性プローブと、前記特異親和性プローブの前記基体表面での配置を判別するための位置検出用マーカーとを具備する検出用アレイである。

10

【0011】

【発明の実施の形態】

〔特異親和性物質〕

本発明の特異親和性物質は、例えば、遺伝子等の核酸を含む物質、抗原、抗体、アレルギー、ホルモンおよび酵素等を含む。

【0012】

〔核酸プローブアレイ〕

本発明の核酸プローブアレイは、立体状基体と、該立体状基体の表面に固相化された核酸プローブとを具備する。好ましくは前記立体状基体は、粒状であり、更に好ましくは、少なくとも1部分に曲面を有し、特に、曲面体が好ましく、最も好ましくは真球である。

20

【0013】

〔立体状基体〕

本発明のプローブアレイを構成する立体状基体は、1個または複数個で、3次元的表面を構成する基体を意味する。3次元的表面は、公知の検出技術により検出可能なレベルの領域を3次元的に備えており、好ましくは、少なくとも一部が曲面体を有している。

【0014】

〔粒状基体〕

本核酸プローブアレイを構成する粒状基体は、約 $4.2 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ から約 $6.5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ の体積を有する粒状基体である。本発明で使用される粒状基体の形態は粒状であればよく、具体的には、立方体、長方体および多面体等、並びにその一部に曲面を有する形体、例えば、球体、回転楕円体およびその他の回転体を含む。また、それらの形態は中空であってもよく、更に、それらの曲面体の2分割、3分割または4分割して得られる少なくとも一部に曲面も含む形体であってもよい。好ましい形体は真球である。しかしながら、これらに限られるものではない。ここで、上記の立方体基体、ひいては粒状基体において使用される「曲面体」の語は、真球(図1)、楕円回転体(図2)、半球(図3)、楕形(図4)、卵形、俵形、葉巻形、米形、ロケット形、円錐、円柱(細長の線維体を含む)、および流線形等の曲面で囲まれた何れの形体、並びにそれらの曲面に由来する一部曲面を有する形体を含むが、これに限られるものではない。しかし、製造工程の容易さから、真球または楕円回転体等の回転体が好ましい。

30

40

【0015】

ここで使用される「粒状」の語は、比較的小さな基体の大凡の形態を示す語であり、具体的な形状および大きさは本明細書に示す通りであり、板状である従来の基板に対比して使用され、部分的に核酸プローブが固相化され得るような曲面を少なくとも1部分に有しているものを意味する語である。

【0016】

該基体の体積は、約 $4.2 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ から約 $6.5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ でよく、好まし

50

くは約 0.065 mm^3 から約 4.19 cm^3 であり、より好ましくは約 0.52 mm^3 から約 0.52 cm^3 である。例えば、真球である場合、その直径は、固相化する特異親和性物質の種類の数によっては最大 50 cm であり得るが、実用上は、 $200 \mu\text{m}$ から 5 cm でもよく、 $500 \mu\text{m}$ から 2 cm が好ましく、 1 mm から 1 cm が最も好ましい。また、大きさの異なる担体を同時に同一の反応系において使用することも可能である。また、円錐や円柱等のように曲面部分と非曲面部分とを有する基体においては、例えば、断面の直径が 2 mm 以下、特に 1 mm 未満のような微小部分であるような基体である場合には、その長手部分を充分長く（例えば、 1 cm から 50 cm ）するような組合せの細長い繊維体または棒状体を、適宜不定形もしくは螺旋状に曲げることによって、球状、円錐状、円筒状等に縮小化した3次元構造の立方体（例えば、 $200 \mu\text{m}$ から 1 cm の平均直径および/または 1 mm から 5 cm の長手部分）であってもよい。

10

【0017】

本発明で使用される粒状基体は、ガラス、プラスチック素材、磁性体、ゼラチン、ゴム、タンパク、シリコン等を単独で、または適宜、混合、封入、積層化することによって種々の所要特性（剛性、気密性、表面粗さ、比重、光透過性、溶解度、電荷、吸水性、色相、明度）を付与して製造することが可能であるが、これに限定されるものではない。

【0018】

該粒状基体は、その材質に応じたそれ自身公知の手段により形成することが可能である。例えば、ガラスを材料とする場合には、型取りまたは研磨を行うことにより所望する形体が得られる。プラスチック素材においては、射出成形または型取りを行うことで球状に加工するが、これらの方法に限定されるものではない。また、コアセルベーションのように液相から固相を形成する方法や毛玉状若しくは円筒状に繊維性素材を巻いて固化する方法等によって造粒された球体、多角粒体、異形粒体も使用できる。基体の立方性を維持するために、骨格となる種々の硬性部材に対して、核酸を固相するのに適した素材を被覆、巻き付け、植え付け等することによって製造コストを低減するようにしてもよい。

20

【0019】

また、該粒状基体の表面は、核酸プローブを固相化するために適切な程度に滑らかであることが好ましい。また、該基体の表面は、核酸プローブを固相化するために適切な表面処理、例えば、ポリLリジン処理、アミノシラン処理および酸化膜処理等の表面処理を行うことが可能である。

30

【0020】

本発明の核酸プローブアレイの大きな特徴は、核酸プローブを固相するための基体として、少なくとも1部分に曲面を有する粒状基体を使用することである。曲面は、従来から使用される同体積の平板状の基体と比較して、その表面積が顕著に大きい。即ち、本発明において用いる粒状基体は、直径を同じとする板状基体の面積が $4r^2$ であるのと比較して、球の表面積は $4r^2$ であるので、約3倍の表面積が得られる。従って、小さな基体上でより多数のプローブDNAを配することが可能となり、これによって実装密度の向上が図れるので省資源化が達成できる。また、後述する通り、ハイブリダイゼーション反応を行う際にも必要な試料量も低減でき、同時に、使用した全ての核酸プローブアレイにおいて等しく安定した反応を行うことが可能である。

40

【0021】

また、該基体に核酸プローブを固相化する際に、核酸プローブの基体表面での配置を判別するために、何らかの位置決め用のマーカーを設けるのが好ましい。このようなマーカーを施す方法は、複数の突起部や凹部または溝を設けること、核酸プローブそのものに標識すること、および基体表面への凹凸部を伴わず、且つ光学的検出が可能な標識を行うこと等の手段を用いることが可能である。また、1つの基体に複数のマーカーを付することも可能である。特に、3点のマーカーを付すことは、任意の同一または異なる複数個の核酸プローブに関する各固相化位置を容易に認識できることから好ましい。

【0022】

[核酸プローブ]

50

本発明の核酸プローブアレイにおいて固相される核酸プローブは、検出すべき核酸に対して相補的な配列を有する核酸であり、これにはDNAおよびRNA等が含まれる。また、プローブDNAとして、オリゴヌクレオチド、PCR産物等が用いられるが、これに限定されるものではない。塩基鎖の長さは、検出すべき核酸に応じて適宜決定してよい。また、核酸プローブを合成する場合、基体への固相に先駆けて予め合成しておくことも、また、基体上で合成することも可能である。

【0023】

[固相化方法]

該基体に所望する核酸プローブを固相するためのプローブ供給手段は、基体の材料によりそれ自身公知の何れかの手段を立体状基体若しくは粒状基体の曲面、特に球面に適用し得る10ように改良することにより行うことが可能である。例えば、曲面体に加工を施した基体上に核酸プローブを配するためには、光固相方式および点着方式の2つの手法を適宜組み合わせることによって曲面の部分領域に対して定量的に核酸プローブを固相することが可能となる。更に、本発明では、プローブ供給手段と各種基体（好ましくは粒状基体、特に球状基体）とを立体面（好ましくは曲面、特に球面）に沿って相対的に移動させる手段を組み合わせることが重要である。

【0024】

光固相方式とは、フォトリソグラフィ技術を応用したもので、基体を予めマスクしておき、反応部位のみを光照射して脱保護を行い、脱保護部分にのみ特異的に核酸プローブを固相20する方法である。実際の固相において、複数種類の核酸プローブを固定する場合には、前記操作を繰り返す。光固相に適した粒状基体は、特に、シリコン類を用いたものが好ましく、例えば、球状シリコン基体を使用する場合、多結晶シリコンを加熱処理した後、ガラスチューブ等の内部で自然落下して冷却し、単結晶化することによって得られる（米国特許第5,955,776号を参照されたい）。

【0025】

また、光照射は、粒状基体用の連続露光装置等を用いることが可能である（特開平11-121368号を参照されたい）。この連続露光装置は、連続的に搬送される複数個の粒状基体を、基体の移動を停止することなく露光するものである。ここで、基体の曲面に沿った露光を実現するためには、基体を回転制御し得る構成で位置固定するのが好ましい。そこで、例えば、基体の粒状基体ホルダへの固定は、減圧により、または装置の環状部材の回転30によって生じる遠心力によって行われる。少なくとも3つの超音波アクチュエーターを個別に動作させ、保持した球形基体を回転させることによって、粒状基体の位置調整を行うことが可能である。この装置に、更に、露光後の基体に核酸プローブを反応して結合する工程を行う部位、その後、粒状基体の洗浄および乾燥を行う部位を更に組み込むことによって、核酸プローブの光固相化装置として使用することが可能である。なお、球形基体のみならず、光源または光照射部位を回転あるいは変移させることも可能である。

【0026】

一方、点着方式は、プローブDNAを噴射するインクジェット方式または、ピンで接触することによりプローブDNAを付けるピン方式にて、該基体にプローブを固相する方法をいう。本発明のアレイを製造するために使用する点着装置は、球面を有する基体に対して40、プローブDNA排出側であるインクジェットヘッドおよびピンを回転若しくは変移させること、または球状基体側を回転させまたは変移させること、およびこれらの組み合わせを行うことが可能であるものが望ましい。また、そのような装置は、1つの基体のみならず、複数個の基体の処理も連続的に行うことも可能であろう。

【0027】

また、該基体に核酸プローブを固相化する際に、基体表面における核酸プローブの配置を正確に行うため、また、検出を有利に行うために、何らかの位置決めマーカを粒状基体に施すことが望ましい。このようなマーカは、複数の突起部や凹部または溝を設けること、核酸プローブそのものに標識すること、および基体表面への凹凸部を伴わず、且つ50光学的検出が可能な標識を行うこと等の手段を用いることにより可能である。図5および

6に突起部1を非対称または両極点に施した例を、図7に凹部2を対称および両極点に施した例を、また、図8に溝3を非対称に施した例を示すが、これに限定されるものではない。当該突起部の個数は、図に示すような1または2個に限らず、例えば、基体表面と容器内壁との接触が防止されるように十分な個数の突起部を設けてもよい。この場合、特定の突起部のみの寸法または形状を他の突起部と異ならせるようにして各核酸プローブの配置を把握し易くしてもよい。また、基体上の核酸プローブの配置の把握方法としては、突起または溝を設ける以外にも、検出用の標識とは異なる信号を発生し得る信号発生手段であれば、蛍光、色素、磁気等、任意のものを使用してよく、更に、同一基体の異なる位置または異なる基体の各表面部分に対して複数種類の核酸プローブを固相化する場合には、信号発生手段を核酸プローブの種類毎に異なる信号量または信号パターンとなるように、色相、色素量、磁気量等を多様に設定するのが好ましい。かかる信号発生手段を用いれば、上記の位置検出用のマーカーを基体に設ける必要がなく、基体への固相位置を制御する必要もなくなるので、本発明の検出用アレイの製造を簡単且つ低コストにするという利点もある。

10

【0028】

また、核酸プローブの固相を行う際には、1つ1つの基体を固定して保持すると共に、装置との相対位置を精密に調製することが望ましい。従って、基体を回転させ、または変移させて精密な位置決めを行うと共に、調整後の位置に粒状基体を確実に保持することが必要である。このため、本発明の粒状基体は、図5から8に示すような1つまたは複数の突起部や凹部を設けることも可能である。これらを配置することにより、位置決めが容易になり、また、その部分を起点とした該基体の回転若しくは水平移動を容易に行うことが可能になる。また、ここに述べた複数個の突起部および凹部は、大きさや形状を変えることが可能である。

20

【0029】

本発明によれば、複数種類の特異親和性結合反応を実行するに当たり、固相工程および/または測定工程において基体と特異親和性結合試薬との位置関係を把握可能になっているので、同時にまたは連続的に複数の異なる検査を実行する場合に、各々の検査状況を区別して把握することが容易である。更に、複数の異なる検体を区別するために、複数の異なる検査用の基体(各1個以上)を別々の色、濃度、明暗の所望の組合せによって透光度、反射度、屈折度、偏光度等の光学的物性が異なるような複数種類の基体を検体毎に提供することができるので、個別の検体と基体の光学的物性とを対応付けて反応、測定、結果出力等を実行することによって、複数の異なる検体を同時または連続的に処理しても取り違いを生じ難いというスループット、使い勝手、信頼性等の高さという画期的な利点も有する。

30

【0030】**[使用方法]**

以下に、本発明の核酸プローブアレイの使用の例を示す。即ち、本発明の核酸プローブアレイを用いたDNAの検出方法の例を示す。

【0031】

まず、上記の通りの方法に従って、所望するDNAプローブを該粒状基体に固相化して核酸プローブアレイを得る。この核酸プローブアレイに具備されるDNAプローブとターゲットDNAとの間でハイブリダイゼーション反応を行う。

40

【0032】

ここで、ターゲットDNAとして、追跡可能な標識分子、例えば、蛍光色素、発光色素等で標識されたもの、或いは該標識分子で標識されたプライマーで増幅し得るものを検体として使用することが考えられる。使用可能な標識は、Cy3、FITCおよびビオチン等であるが、これに限定されるものではない。また、非標識のターゲットDNAを用いて、ハイブリダイゼーション後の偏光性の変化を検出する方法なども使用可能である。

【0033】

好ましい使用例の1つを図9を用いて説明する。96ウェルのマイクロタイタープレート

50

の1ウェルに本発明の核酸プローブアレイと、試薬を添加しハイブリダイゼーション反応を行う(図9)。このとき、該核酸プローブアレイは、直径6mmの真球基体と、核酸プローブとしてのDNAプローブを具備する。また、添加する試薬は約160 μ Lである。適切な条件下でハイブリダイゼーションを行った後、プレートウォッシャーを用いて洗浄操作を行う。

【0034】

次に、もう1つの使用例を図10を用いて説明する。96ウェルのマイクロタイタープレートの1ウェルに本発明の核酸プローブアレイと試薬を添加しハイブリダイゼーション反応を行う(図10)。このとき、該核酸プローブアレイは、直径2mmの真球基体と、核酸プローブとしてのDNAプローブを具備し、1ウェル当たり、約8個の核酸プローブアレイを添加する。ここで、8個の核酸プローブアレイの夫々には、互いに異なる1種または2種類以上の核酸プローブが固相化されているものとする。このように、複数個の基体に対して検出すべきターゲットDNAに対応する複数種類のDNAプローブを個別に、或いは、組み合わせで別々に固相化するようにすれば、基体1個当たりの製造コストを低減できるという利点もある。また、添加する試薬は約100 μ Lである。適切な条件下でハイブリダイゼーションを行った後、プレートウォッシャー洗浄ノズルを用いて洗浄操作を行う。この場合、複数の基体には、標識可能な光学的または物理的標識が行われていることが望ましい。ターゲットDNAとしては1種類の標識ではなく2種類の標識以上のターゲットDNAを混合させて行うことも可能である。また、基体に磁性を持たせることにより、洗浄操作において、ウェルのある一部に多数基体を集積させることができ、それにより粒状基体が吸引されることを防止できる。このような洗浄操作後にアレイ上に残った標識物質の有無または量を、標識物質の基体上での位置または標識物質の種類毎に分類しながら適宜の計測手段およびデータ処理手段によって決定することができる。

【0035】

ハイブリダイゼーション反応および反応後の洗浄操作に適切な反応容器は、96ウェルマイクロタイタープレート等の所望の数の多穴を有するマイクロプレート、または0.2 μ Lから1.5 μ Lまでのマイクロチューブ等の汎用性のある容器が含まれるが、これに限られるものではない。また、反応容器として、フローセルや分注用ノズルのように管状のものでもよく、また、容器内がシリンジ等からの適当な圧力で凌駕され得る程度の毛管力を有する開口部を1箇所または複数箇所有するものであってもよい。

【0036】

また、ハイブリダイゼーション反応は、一般的に、45 から65 前後の恒温状態で、1時間から一晩の間、ターゲットDNAとの反応が行われるが、検出すべき核酸等の条件に応じて反応条件を変更することが可能である。

【0037】

従来は、ハイブリダイゼーション反応を試みる際、乾燥防止のためのカバーガラスを用いて静置状態で行っている。しかしながら、本発明の核酸プローブアレイを用いれば、チューブまたはウェル内にて、本アレイと試料を共存させ、振盪下または攪拌下で反応を実施できる。すなわち、容器中で、攪拌しながら該基体と検体とのハイブリダイゼーション反応を行うことが可能であるため、従来技術で問題となっている反応むらを回避することが可能であるとともに安定した反応を実施することができる。また、プローブDNAと標的DNAとの接触頻度が増加するので、ハイブリダイゼーション反応効率も上昇するという優れた効果が得られる。

【0038】

また、ハイブリダイゼーション反応および反応後の洗浄操作を、規格化されたマイクロタイタープレートにて行えば、洗浄等の操作をマイクロタイタープレート用ウォッシャー等を利用することが可能で、ハイブリダイゼーション反応から洗浄操作において自動化または半自動化が可能である。従って、本発明の核酸プローブアレイを汎用性のある容器と共に用いることによって、更に、洗浄操作における操作性の向上および洗浄時間短縮化も可能となる。

【0039】

また更に、本発明は、従来の核酸プローブアレイの同面積のものに比較して小型であるため、試薬および被検試料等の少量化が可能である。すなわち、粒状基体の直径を踏まえて、適切な反応容器を選択することによって、粒状基体を覆うのに十分なだけの少ない液量で反応及び洗浄を行うことが可能となり、試薬等の省資源化が図れる。また、1つの容器内において一度に多くの数量の核酸プローブアレイを反応に供することも可能である。また、反応容器に合わせて、粒状基体の直径を変えることも可能である。例えば、1ウェル当たり1つの本核酸プローブアレイを使用する場合、96ウェルには約6から7mm、384ウェルには約3mmが好ましく使用できる。また、図10では、粒状基体の直径および個数が、ウェル内で、2層以上に積層する用に設定されているが、1層となるように設定すれば、2次元状で各基体の配置を把握できるのでより好ましい。また、大きさの異なる核酸プローブアレイを組み合わせて使用することにより、容器内のスペースを効率よく使用することが可能であり、それにより省資源化および省試薬化等を実現することが可能である。

10

【0040】

上述のように同一容器内での複数の基体を用いてハイブリダイゼーション反応を実施することで、1ウェル当たり基体の表面積をより大きくでき、従ってより省資源化が図れる。また、大きさの異なる基体を組み合わせて使用することも可能である。このように使用することにより試薬の必要量を低減することが可能である。

【0041】

また、本発明の核酸プローブアレイを図11から14に示す容器と共に使用することも好ましい。図11に示すようにウェルまたは試験管の底をU字形にすることにより、反応溶液を少量化することが可能である。また、図12および13に示す通り、本発明の核酸プローブアレイに具備される基体に施された凹部または凸部（または突起部とも称する）に対応する凹部または凸部を容器に配することにより、球状の基体を容器中で安定して支持することが可能であり、これにより、球状、円筒状のように転がり易い形状を有する基体に関しても、該基体に具備される各核酸プローブの配置アドレスの把握も容易になると共に、基体上のDNAプローブが試験管底面と接触して隠れることなく十分な反応と洗浄を行える。また更に、図14に示す通り、該基体の特定部位に磁性14を設けることにより部分的ないし偏在的に部磁性を持たせ、且つ使用する容器の外部に磁石13を配置することによっても、同様に、該基体を一定の向きに安定に固定することが可能である。基体の特定部位に磁性体を配置させる方法としては、点着法、封入法等が挙げられる。尚、図12、13および14に示した基体の位置決めは、核酸プローブの固相処理や測定の際にも有効に利用できる。特に、図14に示した位置決め方法によれば、例えば、浅底の容器上で1個または複数個の基体を一定向きに固定した状態で固相処理や測定を同時または連続的に行える。更に、容器の下方で磁石を断続的に回転させるか、或いはU字状底面の側方へ磁石を移動させたり、側方で磁石を回転させることにより、あらゆる向きに基体を配向させることができるので、十分な表面積での固相化や測定が容易となる。

20

30

【0042】

【発明の効果】

基体を従来の平板状から、3次元表面を有する立体状の形状として複数種類の特異親和性物質を固相化したことにより、多量のサンプル、試薬、洗浄液等の処理液を必要とせず表面積を増加することが可能となった。それにより実装密度を向上することが可能となり、より多くのプローブを固定することが可能になった。従って、省資源化が可能である。

40

【0043】

さらに、特異親和性結合試薬との位置関係を把握可能になっているので、同時にまたは連続的に複数の異なる検査を実行する場合に、各々の検査状況を区別して把握することが容易である。

【図面の簡単な説明】

50

- 【図1】 真球形の球状基体を示す側面図。
- 【図2】 回転楕円形の球状基体を示す側面図。
- 【図3】 半球形の球状基体を示す側面図。
- 【図4】 椀形の球状基体を示す断面図。
- 【図5】 突起部を具備する真球形の球状基体を示す側面図。
- 【図6】 突起部を具備する真球形の球状基体を示す側面図。
- 【図7】 凹部を具備する真球形の球状基体を示す断面図。
- 【図8】 溝を具備する真球形の球状基体を示す側面図。
- 【図9】 本核酸プローブアレイの好ましい使用例を示す図。
- 【図10】 本核酸プローブアレイの好ましい使用例を示す図。
- 【図11】 本核酸プローブアレイを使用するための好ましい容器形状の例を示す図。
- 【図12】 本核酸プローブアレイを使用するための好ましい容器形状の例を示す図。
- 【図13】 本核酸プローブアレイを使用するための好ましい容器形状の例を示す図。
- 【図14】 本核酸プローブアレイを使用するための好ましい容器形状の例を示す図。

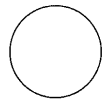
10

【符号の説明】

- 1 . 突起部 2 . 凹部 3 . 溝 4 . 反応容器 5 . 粒状基体
- 6 . DNAプローブ 7 . 反応溶液 8 . 標識化ターゲットDNA
- 9 . 洗浄ノズル 10 . 磁性粒状基体
- 11 . 第1の標識化ターゲットDNA 12 . 第2の標識化ターゲットDNA
- 13 . 磁石 14 . 磁性部

20

【図1】



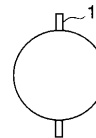
【図5】



【図2】



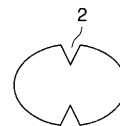
【図6】



【図3】



【図7】



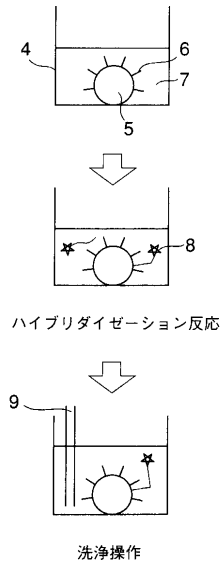
【図4】



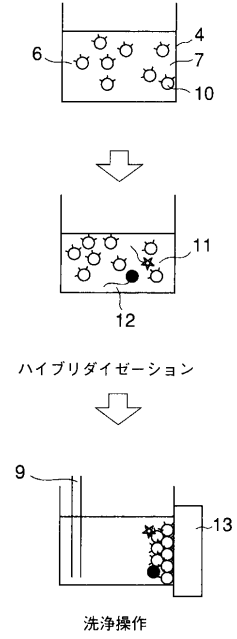
【図8】



【図 9】



【図 10】



【図 11】



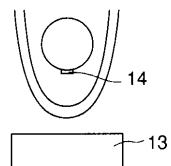
【図 12】



【図 13】



【図 14】



 フロントページの続き

| | | | |
|-----------------------|------------------|----------------|-------|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| G 0 1 N 33/566 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | F |
| G 0 1 N 37/00 | (2006.01) | G 0 1 N 33/566 | |
| | | G 0 1 N 37/00 | 1 0 2 |

(56)参考文献 特開平 1 0 - 1 8 5 9 2 3 (J P , A)
 国際公開第 0 0 / 0 2 0 8 6 1 (W O , A 1)
 国際公開第 0 1 / 0 5 1 2 0 7 (W O , A 1)
 国際公開第 0 5 / 0 6 4 3 3 4 (W O , A 1)
 特開平 1 1 - 2 4 3 9 9 7 (J P , A)
 特開 2 0 0 0 - 2 4 9 7 0 6 (J P , A)
 特開昭 6 3 - 0 2 4 1 5 7 (J P , A)
 特開平 0 3 - 2 6 4 8 6 3 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48 - G01N 33/98
 C12M 1/00
 C12N 15/09
 C12Q 1/68
 G01N 1/28
 G01N 37/00