

(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2004-184312
(P2004-184312A)

(43) 公開日 平成16年7月2日(2004.7.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	M 4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	GO 1 N 33/53	D 4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
GO 1 N 33/553	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-353559 (P2002-353559)	(71) 出願人	000006507 横河電機株式会社 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号
(22) 出願日	平成14年12月5日 (2002.12.5)	(72) 発明者	嶋本 伸雄 静岡県三島市谷田(遺伝学)2138-4番地
		(72) 発明者	福島 和久 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内
		Fターム(参考)	4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA12 HA15 4B029 AA07 AA23 BB15 BB20 CC03 FA15 4B063 QA18 QA19 QA20 QQ43 QQ52 QR08 QR42 QR56 QS25 QS33 QS34 QS39 QX02

(54) 【発明の名称】 生体高分子検出方法およびバイオチップ

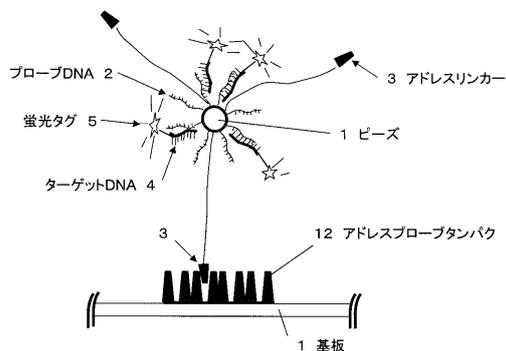
(57) 【要約】

【課題】 S/N比の向上、検出感度の向上、検出時間の短縮を図った抗原抗体反応利用の生体高分子検出方法およびバイオチップを提供する。

【解決手段】 ターゲット生体高分子を基板側に捕捉してターゲット生体高分子を検出する生体高分子検出方法であって、

蛍光標識したターゲット生体高分子と、表面にプローブ生体高分子とビーズのID認識用のアドレスリンカーを固定したビーズとを溶液中に入れて、ターゲット生体高分子とプローブ生体高分子をハイブリダイズさせた後、基板上に固定の前記アドレスリンカーとは抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質で前記アドレスリンカーを抗原・抗体反応により捕捉する。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ターゲット生体高分子を基板側に捕捉してターゲット生体高分子を検出する生体高分子検出方法であって、

蛍光標識したターゲット生体高分子と、表面にプローブ生体高分子とビーズの I D 認識用のアドレスリンカーを固定したビーズとを溶液中に入れて、ターゲット生体高分子とプローブ生体高分子をハイブリダイズさせた後、基板上に固定の前記アドレスリンカーとは抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質で前記アドレスリンカーを抗原・抗体反応により捕捉することを特徴とする生体高分子検出方法。

【請求項 2】

前記アドレスリンカーは、前記ビーズの I D を認識するためのアドレス判定用抗原または抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の生体高分子検出方法。

【請求項 3】

前記ターゲット生体高分子とビーズをバッファ溶液と共に容器中に入れ、物理的もしくは電気的もしくは化学的手段により攪拌することを特徴とする請求項 1 または 2 記載の生体高分子検出方法。

【請求項 4】

前記ビーズとして磁気ビーズもしくは金属またはプラスチックを用いたビーズを使用したことを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の生体高分子検出方法。

【請求項 5】

前記ターゲット生体高分子は、DNA からの転写産物である RNA、または cDNA、またはタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の生体高分子検出方法。

【請求項 6】

ハイブリダイゼーション法によりターゲット生体高分子と結合するプローブ生体高分子と共にビーズ表面に固定された I D 認識用のアドレスリンカーを、抗原・抗体反応により捕捉することのできるアドレスプローブタンパク質を基板上に固定しているバイオチップ。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、DNA や RNA (RNA は DNA からの転写産物、すなわち mRNA または rRNA または tRNA または低分子 RNA である)、タンパク質などの生体高分子を検出する方法およびそれに用いられるバイオチップに関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

従来より、マイクロアレイチップを用いて生体高分子(以下 DNA を例にとる)を解読する技術はよく知られている(例えば、特許文献 1 参照)。そして、この種の DNA のマイクロアレイチップは通常次のように形成され、DNA を解読することができるようになっている。

【0003】

ガラス(あるいはプラスチック)基板上に、ターゲットとなる mRNA (cDNA) と相補的配列をもつプローブ DNA をアレー状にスポットティングして固定する。その上に、ターゲットとなる mRNA (cDNA) に蛍光ラベルを付けたものを滴下する。相補的配列同士のプローブとターゲットはハイブリダイズして結合するが、そうでないものは結合しない。

【0004】

十分ハイブリダイゼーションが進行した後、基板上をウォッシングバッファ液で洗浄し、ハイブリダイズしなかったターゲットを洗い流す。次に、読取装置で光学的に蛍光ラベルの位置および光量を読み取ることにより、ターゲットとなる mRNA (cDNA) の有無およびその量を測定することができる(例えば、特許文献 2 参照)。

10

20

30

40

50

【0005】

【特許文献1】

特開2000-131237号公報(第2頁、図1-3)

【特許文献2】

特開2000-235035号公報(第2頁、図7-9)

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来のDNAマイクロアレイは上記のような一連のプロトコルにより目的とするデータが得られるが、実際には各段階のプロトコル上で色々な問題点を抱えている。その結果、得られたデータには確かさ、再現性、繰り返し特性、感度などの課題が多く、それゆえ実験データの標準化が進まず、更にはコンテンツ面での問題点と相俟って臨床現場でDNAマイクロアレイが普及するには至っていない。

10

色々な問題点のうち特に問題となる項目は、S/N比、検出感度、検出時間、確からしさ、再現性である。

【0007】

本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、S/N比の向上、検出感度の向上、検出時間の短縮を図った抗原抗体反応利用の生体高分子検出方法およびその方法に用いられるバイオチップを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

20

このような目的を達成するために、請求項1の発明は、

ターゲット生体高分子を基板側に捕捉してターゲット生体高分子を検出する生体高分子検出方法であって、

蛍光標識したターゲット生体高分子と、表面にプローブ生体高分子とビーズのID認識用のアドレスリンカーを固定したビーズとを溶液中に入れて、ターゲット生体高分子とプローブ生体高分子をハイブリダイズさせた後、基板上に固定の前記アドレスリンカーとは抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質で前記アドレスリンカーを抗原・抗体反応により捕捉することを特徴とする。

【0009】

本発明ではビーズを使用しているため、ビーズの表面積は従来のDNAチップの表面積に比べ格段に大きくなり、そのビーズ表面に沢山のプローブ生体高分子を固定することができ、これによりビーズ上のプローブ生体高分子と溶液中のターゲット生体高分子とが邂逅する機会が格段に高まり、ターゲット生体高分子を極めて高い感度で捕捉することができる。一般にDNAアレイの約1000倍以上の感度である。

30

ビーズには、さらにID認識用のアドレスリンカーが固定されている。

一方、基板上のサイトにはアドレスリンカーと抗原・抗体の関係にあるアドレスプローブタンパク質が固定されている。基板に前記ビーズを注ぐと、抗原・抗体反応によりアドレスリンカーはアドレスプローブタンパク質に強力な結合力で捕捉される。

このようにして、高S/N比、高検出感度でターゲット生体高分子を基板上に捕捉することができる。

40

【0010】

前記アドレスリンカーは、請求項2のように前記ビーズのIDを認識するためのアドレス判定用抗原または抗体である。

また、請求項3のように、ターゲット生体高分子とビーズをバッファ溶液と共に容器中に入れ、物理的もしくは電気的もしくは化学的手段により攪拌すると、従来方式が単にブラウン運動にて相補的プローブを探すことに比べ、本発明では他からのエネルギーを得て相補的プローブを探すことになるので、邂逅する機会が格段に高まり、その結果プローブ生体高分子とターゲット生体高分子のハイブリダイゼーションを高速化することができる。

【0011】

ビーズとしては、請求項4のように磁気ビーズ、もしくは金属またはプラスチックを用い

50

たビーズを使用する。また、ターゲット生体高分子は、請求項5のようにDNAからの転写産物であるRNA（mRNAまたはrRNAまたはtRNAまたは低分子RNA）、またはcDNA、またはタンパク質である。

【0012】

請求項6の発明は、ハイブリダイゼーション法によりターゲット生体高分子と結合するプローブ生体高分子と共にビーズ表面に固定されたID認識用のアドレスリンカーを、抗原・抗体反応により捕捉することのできるアドレスプローブタンパク質を基板上に固定していることを特徴とするバイオチップである。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明では、ビーズの良いところとDNAアレーの良いところを組合わせている。ビーズの良いところは、表面積が大きいためプローブDNAを沢山結合しておくことができ（平板状のサイトにプローブDNAを結合するのに比して格段に多い）、しかも溶液中を自由に移動することができるので、溶液中のターゲット生体高分子と邂逅する機会が飛躍的に向上し、その結果溶液中の微量のターゲットDNAを極めて高い感度で捕捉することができる（一般にDNAアレーの約1000倍以上である）点である。

【0014】

しかしながら、一方で、各ビーズのIDすなわちどのビーズにどのDNAが結合したかが分からないという欠点がある。このビーズのIDを認識するため、通常、カラービーズを使ったり、2色の光源で識別したりと色々な試みがなされているが、識別できる数が少ないという問題と、装置が複雑化、高額化、大型化し、そして取り扱いが難しくなるという問題がある。本発明ではビーズ上とアレイ上のタンパク質の抗原・抗体反応により識別できるようにして、この問題をうまく解決している。

【0015】

以下図面を用いて本発明を詳しく説明する。図1ないし図3は本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する図である。なお、ここでは、生体高分子がDNAである場合について説明する。

図1に示すように、ビーズ1の表面にプローブDNA2を固定する。ビーズとしては、磁気ビーズや金属もしくはプラスチックを用いたビーズなどが使用できる。

【0016】

ビーズ1の表面には、それに加えてビーズの特定番号IDを認識するためのアドレスリンカー3（アドレス判定用抗原もしくはアドレス判定用抗体）を固定する。他方、ターゲットとなるRNAあるいはcDNAあるいはタンパク質（以下これらを代表してRNAという）4には、蛍光タグ5を標識する。

【0017】

前記ビーズ1とターゲットRNA4とバッファ溶液6を共に容器7中に入れ、必要に応じて物理的もしくは電気的もしくは化学的手段によって攪拌する。この結果、ビーズ1表面のプローブDNA2には、これと相補的關係にあるターゲットRNA4が結合する。

【0018】

次に、前記結合したビーズを図2に示すバイオチップ10のアレイ状のサイト11上に注ぐ。なお、同図(a)は側面図、同図(b)は平面図である。

サイト11上には、ビーズ1表面のID認識用アドレスリンカー3を抗原・抗体反応により捕捉し、ビーズ1のIDを認識するためのアドレスプローブタンパク質12があらかじめ固定されている。なお、図3は図2の丸囲み部分Aの拡大図である。

【0019】

アドレスリンカー3とアドレスプローブタンパク質12は抗原・抗体反応により結合する。ビーズ1がどのプローブサイト11のアドレスプローブタンパク質12に結合したかは蛍光ラベル5によって認識することができる。蛍光ラベルは蛍光読取装置（図示せず）により容易に検出できる。

このようにしてターゲットRNA4の存在およびその量を効率よく測定することができる

10

20

30

40

50

。

【0020】

なお、以上の説明は、本発明の説明および例示を目的として特定の好適な実施例を示したに過ぎない。したがって本発明は、上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。

【0021】

【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば次のような効果がある。

(1) ビーズは表面積が大きいいため沢山のプローブDNAを結合でき、したがって溶液中の微量のターゲット生体高分子を極めて高い感度(一般のDNAアレーの約1000倍以上の感度)で容易に捕捉することができる。 10

(2) 1つのビーズに結合した沢山のプローブDNAにターゲットDNAをハイブリダイズさせ結合させ得るので、容易にS/N比を上げることができる。

(3) 1つのビーズに沢山のプローブDNAを結合していることと、溶液を攪拌することにより、ターゲットDNAとプローブDNAとの邂逅の機会が多くなり、検出時間(主としてハイブリダイゼーションに要する時間)を容易に短縮できると同時に、極めて高い感度でターゲットDNAとプローブDNAとをハイブリダイズさせることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する図である。 20

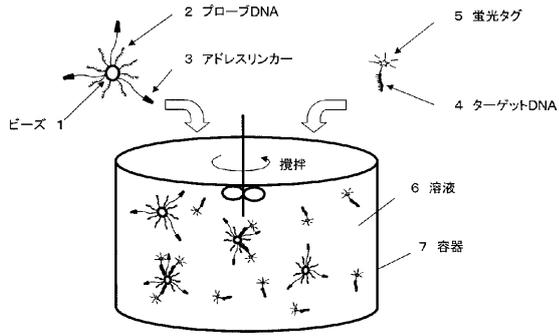
【図2】本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する他の説明図である。

【図3】本発明に係る生体高分子検出方法の一例の原理を説明する他の説明図である。

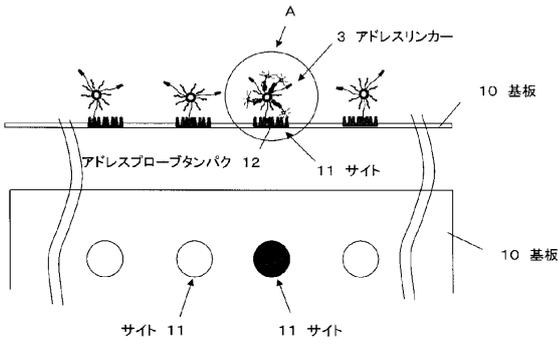
【符号の説明】

- 1 ビーズ
- 2 プローブタンパク
- 3 アドレスリンカー
- 4 ターゲットDNA
- 5 蛍光タグ
- 6 溶液
- 7 容器
- 10 基板
- 11 サイト
- 12 アドレスプローブタンパク

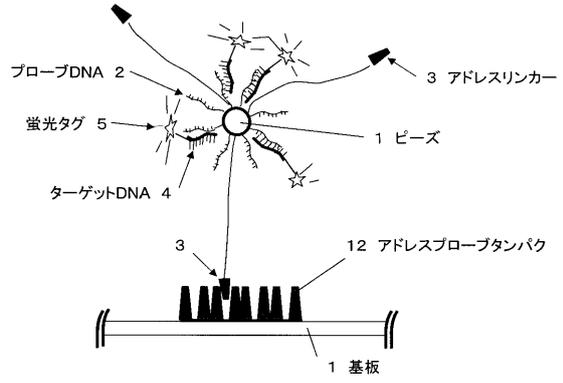
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 37/00

F I

G 0 1 N 37/00

1 0 2

C 1 2 N 15/00

F

テーマコード(参考)