

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4477774号  
(P4477774)

(45) 発行日 平成22年6月9日 (2010.6.9)

(24) 登録日 平成22年3月19日 (2010.3.19)

|                                |               |   |
|--------------------------------|---------------|---|
| (51) Int. Cl.                  | F I           |   |
| <b>C O 7 H 23/00 (2006.01)</b> | C O 7 H 23/00 |   |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/00 | F |
| <b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b> | G O 1 N 33/53 | M |
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>  | C 1 2 Q 1/68  | A |
| <b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>  | C 1 2 M 1/00  | A |
| 請求項の数 38 (全 19 頁) 最終頁に続く       |               |   |

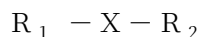
|               |                               |           |                      |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2000-547274 (P2000-547274)  | (73) 特許権者 | 391058060            |
| (86) (22) 出願日 | 平成11年5月4日 (1999.5.4)          |           | ベイラー カレッジ オブ メディシン   |
| (65) 公表番号     | 特表2002-513814 (P2002-513814A) |           | BAYLOR COLLEGE OF M  |
| (43) 公表日      | 平成14年5月14日 (2002.5.14)        |           | EDICINE              |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US1999/009810             |           | アメリカ合衆国, テキサス 77030, |
| (87) 国際公開番号   | W01999/057323                 |           | ヒューストン, ワン ベイラー プラザ  |
| (87) 国際公開日    | 平成11年11月11日 (1999.11.11)      |           | (番地なし)               |
| 審査請求日         | 平成16年4月28日 (2004.4.28)        | (74) 代理人  | 110000729            |
| (31) 優先権主張番号  | 09/071, 876                   |           | 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所   |
| (32) 優先日      | 平成10年5月4日 (1998.5.4)          | (72) 発明者  | ブラッドレイ アラン           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | アメリカ合衆国 テキサス 77096   |
| 前置審査          |                               |           | ヒューストン、クイーンズロッシュ、51  |
|               |                               |           | 27                   |
|               |                               |           | 最終頁に続く               |

(54) 【発明の名称】 化学修飾された核酸および核酸の固体支持体への結合方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の式：



(式中、 $R_1$  はエポキシ基、 $R_2$  はアルコキシシリル基を表し、 $X$  は前記  $R_1$  と  $R_2$  とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレン) で表される化合物と核酸を反応させることで該化合物に共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸。

【請求項 2】

前記エポキシ基が、オキシラニル基である請求項 1 記載の修飾された核酸。

10

【請求項 3】

前記アルコキシシリル基が、 $Si(OCH_3)_3$ 、 $Si(OC_2H_5)_3$ 、 $Si(OCH_3)_2H$ 、 $Si(OCH_3)(CH_3)_2$  および  $Si(OCH_3)_2CH_3$  からなる群より選択される請求項 1 または 2 に記載の修飾された核酸。

【請求項 4】

前記化合物が 3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランである請求項 1 に記載の修飾された核酸。

【請求項 5】

前記核酸が DNA である請求項 1 から 4 までのいずれかに記載の修飾された核酸。

【請求項 6】

20

前記核酸がRNAである請求項1から4までのいずれかに記載の修飾された核酸。

【請求項7】

核酸を固体支持体に固定化する方法であって、

式： $R_1 - X - R_2$ （式中、 $R_1$ はエポキシ基、 $R_2$ はアルコキシシリル基、Xは前記エポキシ基と前記アルコキシシリル基とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレンである）で表される化合物を核酸と反応させて、誘導体化された核酸を得る工程；および前記誘導体化された核酸を前記固体支持体と反応させる工程を含む方法。

【請求項8】

前記エポキシ基がオキシラニル基である請求項7記載の方法。

10

【請求項9】

前記アルコキシシリル基が、 $Si(OCH_3)_3$ 、 $Si(OC_2H_5)_3$ 、 $Si(OCH_3)_2H_2$ 、 $Si(OCH_3)(CH_3)_2$  および  $Si(OCH_3)_2CH_3$  からなる群より選択される請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

前記化合物が3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランである、請求項7記載の方法。

【請求項11】

前記核酸がDNAである請求項7から10までのいずれかに記載の方法。

【請求項12】

20

前記核酸がRNAである請求項7から10までのいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記誘導体化された核酸を得る工程が塩基性pHで行われる請求項7から10までのいずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記誘導体化された核酸を得る工程が、6～12のpHで行われる請求項11の方法。

【請求項15】

前記誘導体化された核酸を得る工程が、6～8.5のpHで行われる請求項12の方法。

【請求項16】

前記pHが9.5よりも大きい請求項13の方法。

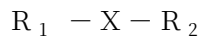
30

【請求項17】

前記固体支持体がガラスである請求項7から16までのいずれかに記載の方法。

【請求項18】

下記の式：



（式中、 $R_1$ はアミノ基、

$R_2$ はアルコキシシリル基、および

Xは前記アミノ基と前記アルコキシシリル基とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレン）で表される化合物と核酸を反応させることで該化合物に共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸。

40

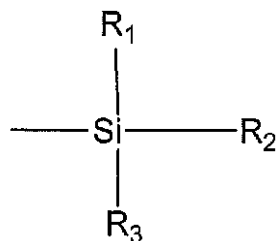
【請求項19】

前記アミノ基が一級アミンである請求項18記載の修飾された核酸。

【請求項20】

前記アルコキシシリル基が、

## 【化 1】



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  は、 $H$ 、 $CH_3$ 、 $OCH_3$  および  $OC_2H_5$  からなる群より選択されるが、 $R_1$ 、 $R_2$  または  $R_3$  の少なくとも1つは  $OCH_3$  または  $OC_2H_5$  のいずれかである) からなる群より選択される請求項 18 または 19 に記載の修飾された核酸。 10

## 【請求項 2 1】

前記化合物が 3-アミノプロピルトリエトキシシランである請求項 18 の修飾された核酸。

## 【請求項 2 2】

前記核酸が DNA である請求項 18 から 21 のいずれかに記載の修飾された核酸。

## 【請求項 2 3】

前記核酸が RNA である請求項 18 から 21 のいずれかに記載の修飾された核酸。 20

## 【請求項 2 4】

前記核酸がシトシン残基を含有する請求項 18 の修飾された核酸。

## 【請求項 2 5】

核酸を固体支持体に固定化する方法であって、

式： $R_1-X-R_2$  (式中、 $R_1$  はアミノ基、 $R_2$  はアルコキシシリル基、 $X$  は前記アミノ基と前記アルコキシシリル基とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレンである) で表される化合物を核酸と反応させて、誘導体化された核酸を得る工程；および前記誘導体化された核酸を前記固体支持体と反応させる工程を含む方法。

## 【請求項 2 6】

前記誘導体化された核酸を得る工程が、アミノ基転移反応を含む、請求項 25 に記載の方法。 30

## 【請求項 2 7】

前記化合物が 3-アミノプロピルトリエトキシシランである請求項 25 の方法。

## 【請求項 2 8】

前記核酸が DNA である請求項 25 から 27 までのいずれかに記載の方法。

## 【請求項 2 9】

前記核酸が RNA である請求項 25 から 27 までのいずれかに記載の方法。

## 【請求項 3 0】

前記核酸がシトシン残基を含有する請求項 25 に記載の方法。 40

## 【請求項 3 1】

前記固体支持体がガラスである請求項 25 から 30 までのいずれかに記載の方法。

## 【請求項 3 2】

核酸に 3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランおよび 3-アミノプロピルトリエトキシシランからなる群より選択されるアルコキシシランを反応させることによって修飾核酸を調製する工程、該修飾核酸を規則正しく離れたスポットで固体支持体に固定化する工程、を含む方法で得られる高密度マイクロアレイ。

## 【請求項 3 3】

前記固体支持体がガラスである請求項 32 の高密度マイクロアレイ。

## 【請求項 3 4】

50

前記離れたスポットが直径50ミクロンである請求項32または33記載の高密度マイクロアレイ。

【請求項35】

核酸のグアニン塩基またはシトシン塩基をN-ブロモスクシンイミドと8.0のpHで反応させて、臭素化された核酸を得る工程；および前記臭素化された核酸を、式 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ （ただし、 $n=3、4、5、6、7、8$ または9）を有するシランと反応させる工程によって調製される修飾された核酸。

【請求項36】

式：

【化2】

10



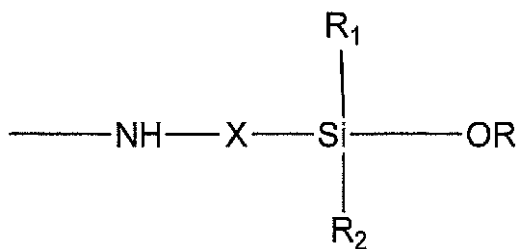
（ただし、Rが、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$  および  $\text{C}_3\text{H}_7$  からなる群より選択され、 $n=3、4、5、6、7、8$ または9）で表される置換基が共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸。

【請求項37】

下記の式：

【化3】

20



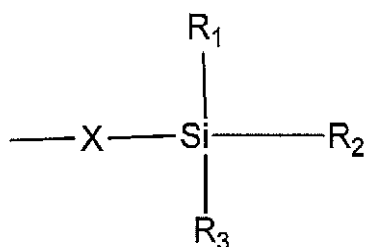
30

（式中、Rは、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$  および  $\text{C}_3\text{H}_7$  からなる群より選択され； $\text{R}_1$  および  $\text{R}_2$  は同一または異なって、 $\text{H}$ 、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ 、 $\text{C}_3\text{H}_7$  および  $\text{OC}_3\text{H}_7$  からなる群より選択され；ならびにXは、メチルオキシプロピレンまたはプロピレンである）で表される置換基が共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸。

【請求項38】

下記の式：

【化4】



40

（式中、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$  および  $\text{R}_3$  は同一または異なって、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ 、 $\text{OC}_3\text{H}_7$  および  $\text{Cl}$  からなる群より選択され；Xは、プロピレンである）で表される置換基が共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸。

【発明の詳細な説明】

50

## 【0001】

(発明の背景)

## 1. 発明の技術分野

本発明は、ゲノムの広範囲にわたる遺伝子マッピングおよび遺伝子の発現研究などの領域において結合させた核酸試料に対する科学研究または日常的な試験を行うために核酸を固体支持体に固定するための非常に関連した一連の化合物、装置、および固定化技術に関する方法の特許請求する。

## 【0002】

## 2. 先行技術

生化学分野における研究の大部分は、核酸（特に、デオキシリボ核酸、すなわち、DNA）が関与する研究に向いている。DNAは、溶液（すなわち、水系溶液）状態に置かれた場合に加水分解などで分解しやすい水溶性化合物である。明らかなことではあるが、このために、DNAが関与する研究はいずれも期待通りにならず、従って、DNAが関与する正確で信頼性の高い研究には、DNAの一体性が保証される方法または装置が必要である。DNAの研究を容易にするために、多くの場合、DNAを、ガラスの平滑なシートなどの固体表面に固定または固定化することは望ましい。このような方法で所定の位置に固定されると、DNAは容易に操作することができる（すなわち、他の物質と反応させることができる）。DNAが長鎖であると考えられる場合、DNAの固定化は、鎖の一方の端が固体支持体に固定され、その結果、鎖の残り部分が修飾されず、特定の研究に依存するさらなる反応を自由に受けることを意味する。実際、これは、DNAが関与する実験研究を行うために広く使用されている方法である。

## 【0003】

DNAを固体支持体に固定化することに伴う大きな問題は、おそらくは、（実際に固体支持体に結合している比較的小さな部分を除いて）DNAを変化させることなく、いかにしてDNAを固定化するかということそのものである。使用される固体支持体はどれも本質的に不活性でなければならないから、これは非常に難しい問題である。すなわち、固体支持体は、DNAを固体支持体に単に固定化すること以外にDNAと反応してはならない。ガラスは、安価で非常に不活性であるので特に好適な固体支持体である。現在、現行の正統な慣行は、固体支持体（例えば、ガラスの表面）を、DNAの一方の端がその表面に結合できるように、最初に処理または誘導体化しなければならないことである。これを行うための技術が多数存在する。

## 【0004】

残念なことに、ガラスのそれ以外の点で不活性な表面を誘導体化することによって、DNAが関与する実験研究の結果を混乱させ得る様々な問題が生じている。1つの問題は、ガラス表面を誘導体化することによって、正味の正の静電気電荷がガラス表面に生じることである。DNAは（正味の）負の電荷を帯びているので、他のDNA（または研究の後期で使用されるが、ガラス表面に意図的に固定されないDNA）が（非特異的な静電氣的引力によって）ガラス表面に付着しやすい。すなわち、（二本鎖よりもむしろ）一本鎖のDNAであるDNA「プローブ」が、多くの場合、固体支持体に固定されたDNA一本鎖のアレイと接触させられる。プローブは既知のヌクレオチド配列を有し、かつ特定の一本鎖DNAは相補鎖に優先的に結合するので、プローブが反応する特定の固定化された鎖によって、以前には知られていない固定化された鎖のヌクレオチド配列が明らかにされる。しかし、このタイプの簡便な実験（プローブ研究）は、誘導体化された（従って、静電氣的に帯電した）ガラス表面にプローブが静電氣的に付着することによってひどく混乱させられる。例えば、プローブは、多くの場合、その存在が通常の放射線検出器で検出できるように放射性標識されている。従って、検出器により示されるガラス表面におけるプローブの位置によって、（事前に知られ、指定されている）ガラス表面におけるその特定の位置に固定化されているDNA鎖の化学的同一性または配列が明らかにされる。しかし、放射線検出器は、固体支持体に固定されたDNAの相補鎖に化学的に結合したプローブと、（DNA鎖に対してではなく）ガラス表面に単に静電氣的に付着したプローブとを識別する

ことができない。

#### 【0005】

第2に、誘導体化された表面は、「スプレッディング」として知られていることが生じる。スプレッディングは、誘導体化されたときに固体支持体表面が親水性になるために生じる。その結果、（固体支持体に固定化されることが望ましい）DNAを固体支持体の表面と接触させた場合、DNAは、離れた「スポット」で留まるのではなく広がる。理想的には、DNAを、離れた「スポット」で留まるようにしなければならない。なぜなら、放射性標識プローブが特定のスポットまたは別のスポットで検出されるかどうかによって、科学者は、プローブがあちこちの固定化されたDNAと反応したことを推定するかどうかを決定するからである。スプレッディングは、アレイ密度（すなわち、1つの固体支持体上に配列させることができる種々の核酸試料の数）に対する大きな制約である。従って、スプレッディングを縮小し、従って、アレイ密度を大きくする何らかの手段が非常に望ましい。

10

#### 【0006】

核酸試料を結合させるガラス表面を調製するために使用されている1つの非常に一般的な物質は、ポリ-L-リシンである。例えば、デリシ (DeRisi) ら、ヒトのガンにおける遺伝子の発現パターンを分析するためのcDNAマイクロアレイの使用、14、Nature Genetics、457 (1996)；シャロン (Shalon) ら、2色蛍光プローブハイブリダイゼーションを使用する複雑なDNA試料を分析するためのDNAマイクロアレイシステム、6、Genome Res. 639 (1996)；およびシェナ (Schen) ら、相補的DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現パターンの定量的モニターリング、270、Science、467 (1995)を参照のこと。事前に誘導体化されたガラス支持体の他のタイプが市販されている（例えば、シリル化された顕微鏡スライドガラス）。例えば、シェナ (Schen) ら、並行的なヒトゲノム分析：1000遺伝子のマイクロアレイ型発現モニターリング、93、P. N. A. S. 10614 (1996)を参照のこと。

20

#### 【0007】

多数の他の表面コーティングが開示されている。例えば、米国特許第5,630,932号（承継人：Molecular Imaging Corp.）は、走査トンネル顕微鏡法で使用されるプローブ（白金）チップのコーティングを開示している。多数の手段が、表面をコーティングするために開示されているが、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)\text{CH}_2\text{I}$ が注目される。米国特許第5,610,287号（承継人：Molecular Tool）は、固体表面を塩またはカチオン性界面活性剤でコーティングして、核酸をその表面に非共有結合的に結合させることを開示している。米国特許第5,024,933号（承継人：Enzo Biochem）は、天然に存在するイガいの接着性タンパク質の単離物で固体支持体をコーティングすることを開示している。米国特許第4,937,188号（承継人：Northeastern University）は、酵素の基質として作用する分子鎖を介して酵素を固体支持体に共有結合させることを開示している。米国特許第4,818,681号（承継人：Molecular Diagnostics）は、ヌクレオシドの複素環部分を介してヌクレオシドホスフェートで固体支持体をコーティングすることを開示している。この場合、核酸は、次いで、酵素的に結合させることによって固体支持体に固定化される。米国特許第4,806,631号（承継人：Miles）は、ナイロン表面のアミン基の部分的な加溶媒分解によって（例えば、アルキル化基で処理することによって）ナイロンの固体支持体を活性化することを開示している。

30

40

#### 【0008】

この問題に対する別の取り組みには、固体支持体および固定化しようとする核酸の両方を誘導体化することが含まれる。例えば、米国特許第5,641,630号（承継人：AmgenおよびAbbott）は、結合させようとする核酸が同様に結合する複合化剤に結合する別の複合化剤で固体支持体をコーティングすることを開示している。米国特許第5,554,744号（承継人：Hybridon）は、固体支持体をジイソプロピルカル

50

ボジイミドおよび酸触媒と接触させること、およびヌクレオシドを固定化するためのスクシニル化ヌクレオシドを開示している。米国特許第5, 514, 785号（承継人：Be c t o n D i c k i n s o n）は、固体支持体を、好ましくは一級アミンおよび二級アミンでコーティングし、その後、塩化シアヌルを使用して核酸を活性化することを開示している。米国特許第5, 215, 882号（承継人：O r t h o D i a g n o s t i c S y s t e m s）は、固定化しようとする核酸を一級アミンまたは等価物で修飾し、その後、修飾された核酸を還元剤の存在下で固体支持体（支持体は遊離のアルデヒド基を有しなければならない）と反応させることを開示している。

#### 【0009】

最後に、核酸を固体支持体物質に固定化するという問題に対する第3の取り組みには、新規な固体支持体を作製することが含まれる。例えば、米国特許第5, 055, 429号、同第5, 008, 220号、同第4, 963, 436号、同第4, 826, 790号および同第4, 826, 789号（承継人：E C C I n t e r n a t i o n a l）を参照のこと。これらは、アルミノケイ酸塩物質から作られる固体支持体を開示している。

#### 【0010】

核酸試料を固定する前にガラス表面（の全体）を誘導体化することの上記欠点のために、固体支持体に対して、直接、核酸試料を合成することを含むいくつかの方法が開発されている。例えば、ハシア（H a c i a）ら、高密度オリゴヌクレオチドアレイおよび2色蛍光分析を使用するBRCA1におけるヘテロ接合変異の検出、14 N a t u r e G e n e t i c s, 441（1996）；ロックハート（L o c k h a r t）ら、高密度オリゴヌクレオチドアレイに対するハイブリダイゼーションによる発現のモニターリング、14 N a t u r e B i o t e c h n o l o g y, 1675（1996）；マスコス（M a s k o s）およびサザン（S o u t h e r n）、ガラス支持体でのオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション：オリゴヌクレオチド合成用の新規なリンカーおよびインサイチュで合成されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性、20 N u c l e i c A c i d s R e s. 1679（1992）（およびその引用参考文献、特に、5～11）を参照のこと。

#### 【0011】

繰り返すが、現在、生化学分野における一般的な考えは、核酸を固体表面に効果的に固定化するために、固体支持体は、最初に誘導体化しなければならない、すなわち、化学的に不安定にしなければならない、そうすることによって、次に、核酸を固体支持体と反応させることができることである。さらに、エポキシドは発ガン性であると知られている。すなわち、エポキシドは、核酸（特に、DNA）に損傷を与えることが知られている。

#### 【0012】

従って、生化学分野における現在の知識水準とは全く逆に、今回提示された本発明は、修飾または誘導体化が行われていないガラス表面に核酸が容易に接着するように修飾されたDNA（より一般的には、核酸）を開示し、特許請求する。詳細には、本発明は、修飾されていない固体支持体に容易に固定されるエポキシド修飾された核酸（特に、DNA）を開示し、特許請求する。

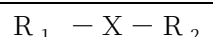
#### 【0013】

（発明の開示）

本発明の目的の1つは、その後の生化学的研究が可能であるように固体表面に接着する修飾された核酸である。

#### 【0014】

本発明は、下記の式：



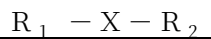
（式中、 $R_1$  はエポキシ基、 $R_2$  はアルコキシシリル基を表し、 $X$ は前記 $R_1$ と $R_2$ とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレン）で表される化合物と核酸を反応させることで該化合物に共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸、に関する。上記エポキシ基は、オキシラニル基であり得る。上記アルコキシシリル基は

、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)_2\text{H}$ 、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3)_2$  および  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_2\text{CH}_3$  からなる群より選択され得る。

上記化合物は、3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランであり得る。

上記核酸は、DNA または RNA であり得る。

本発明はまた、下記の式：

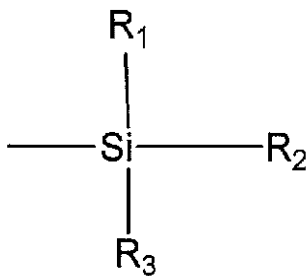


(式中、 $\text{R}_1$  はアミノ基、 $\text{R}_2$  はアルコキシシリル基、および X は前記アミノ基と前記アルコキシシリル基とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレン) で表される化合物と核酸を反応させることで該化合物に共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸、に関する。

上記アミノ基は、一級アミンであり得る。

上記アルコキシシリル基は、

【化 5】



(式中、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$  および  $\text{R}_3$  は、H、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{OCH}_3$  および  $\text{OC}_2\text{H}_5$  からなる群より選択されるが、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$  または  $\text{R}_3$  の少なくとも 1 つは  $\text{OCH}_3$  または  $\text{OC}_2\text{H}_5$  のいずれかである) からなる群より選択され得る。

上記化合物は、3-アミノプロピルトリエトキシシランであり得る。

上記核酸は DNA または RNA であり得る。

上記核酸は、シトシン残基を含有し得る。

【0015】

本発明はまた、核酸を固体支持体に固定化する方法であって、

式： $\text{R}_1 - \text{X} - \text{R}_2$  (式中、 $\text{R}_1$  はエポキシ基、 $\text{R}_2$  はアルコキシシリル基、X は前記エポキシ基と前記アルコキシシリル基とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレンである) で表される化合物を核酸と反応させて、誘導体化された核酸を得る工程；および前記誘導体化された核酸を前記固体支持体と反応させる工程

を含む方法、に関する。ここで、上記エポキシ基は、オキシラニル基であり得る。上記アルコキシシリル基は、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ 、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)_2\text{H}$ 、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3)_2$  および  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_2\text{CH}_3$  からなる群より選択され得る。上記化合物は、3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランであり得る。上記核酸は、DNA または RNA であり得る。上記誘導体化された核酸を得る工程は、塩基性 pH で行われ得る。上記誘導体化された核酸を得る工程は、6～12 の pH で行われ得る。

上記誘導体化された核酸を得る工程は、6～8.5 の pH で行われ得る。あるいは、

上記 pH は、9.5 よりも大きくてもよい。上記固体支持体は、ガラスであり得る。

【0016】

本発明はまた、核酸を固体支持体に固定化する方法であって、

式： $\text{R}_1 - \text{X} - \text{R}_2$  (式中、 $\text{R}_1$  はアミノ基、 $\text{R}_2$  はアルコキシシリル基、X は前記アミノ基と前記アルコキシシリル基とを連結する為の部分であって、メチレンオキシプロピレンまたはプロピレンである) で表される化合物を核酸と反応させて、誘導体化された核酸を得る工程；および前記誘導体化された核酸を前記固体支持体と反応させる工程を含む

方法、に関する。

上記誘導体化された核酸を得る工程が、アミノ基転移反応を含み得る。

上記化合物は、3-アミノプロピルトリエトキシシランであり得る。

上記核酸は、DNAまたはRNAであり得る。上記核酸は、シトシン残基を含有し得る。

。

上記固体支持体は、ガラスであり得る。

【0017】

本発明はまた、核酸に3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランおよび3-アミノプロピルトリエトキシシランからなる群より選択されるアルコキシシランを反応させることによって修飾核酸を調製する工程、該修飾核酸を規則正しく離れたスポットで固体支持体に固定化する工程、を含む方法で得られる高密度マイクロアレイ、に関する。

10

上記固体支持体は、ガラスであり得る。

上記離れたスポットは、直径50ミクロンであり得る。

【0018】

本発明はまた、核酸のグアニン塩基またはシトシン塩基をN-ブロモスクシンイミドと8.0のpHで反応させて、臭素化された核酸を得る工程；および前記臭素化された核酸を、式  $H_2N-(CH_2)_n-Si(OC_2H_5)_3$  (ただし、 $n=3, 4, 5, 6, 7, 8$  または  $9$ ) を有するシランと反応させる工程によって調製される修飾された核酸、に関する。

【0019】

本発明はまた、式：

【化6】

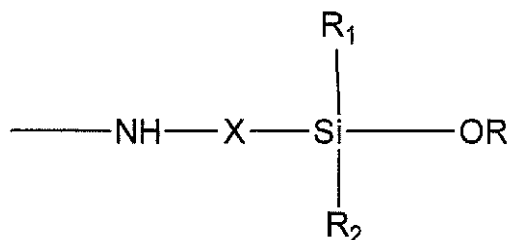


(ただし、Rが、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$  および  $C_3H_7$  からなる群より選択され、 $n=3, 4, 5, 6, 7, 8$  または  $9$ ) で表される置換基が共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸、に関する。

30

本発明はまた、下記の式：

【化7】



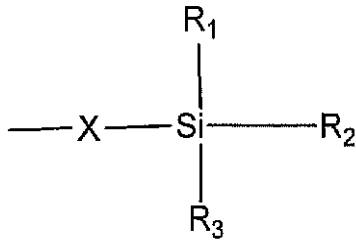
40

(式中、Rは、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$  および  $C_3H_7$  からなる群より選択され； $R_1$  および  $R_2$  は同一または異なって、 $H$ 、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ 、 $C_3H_7$  および  $OC_3H_7$  からなる群より選択され；ならびにXは、メチルオキシプロピレンまたはプロピレンである) で表される置換基が共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸、に関する。

さらに、本発明は、下記の式：

【化8】

50



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  は同一または異なって、 $OC_1H_3$ 、 $OC_2H_5$ 、 $OC_3H_7$  および  $Cl$  からなる群より選択され； $X$ は、プロピレンである) で表される置換基が共有結合した核酸を含んでなる修飾された核酸、に関する。

10

#### 【0020】

本発明は、先行技術を上回る多数の利点を有する。そのような利点の多くは、典型的には通常のガラスである固体表面が非常に化学的に不活性のままであるという事実から得られる。従って、ガラスに付着するプローブ（または他の反応物）の前記の問題は、「スプレディング」と同様に完全に除かれる。最大の結果は、特に、現在の技術水準の誘導体化された固体支持体と比較して、はるかにより大きな検出感度である。

#### 【0021】

さらに、固体支持体に固定化される核酸は容易に誘導体化される。本発明のエポキシド誘導体の反応は簡単に実施することができ、穏和な条件のもとで生じる。反応速度は速く、平衡は非常に有利である。さらに、本発明のエポキシド修飾された核酸は、本質的には永久的に安定であり、従って、後で使用するために調製して保存することができる。さらに、より具体的な利点が、本発明の特定の実施形態が議論されている下記に開示される。

20

#### 【0022】

他の目的、特徴および利点ならびにさらなる目的、特徴および利点は、開示の目的で示される本発明の現時点での好ましい実施形態の下記の説明から、添付された図面と組み合わせた場合に明らかである。

#### 【0023】

図面は必ずしも縮尺が合っていない。本発明のいくつかの特徴は一定の割合で誇張されている場合があり、あるいは明快化および簡略化のために概略的な形式で示されている場合がある。

30

#### 【0024】

(好適な態様の詳細な説明)

様々な代替および改変を、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書中に開示された本発明に対して行い得ることは、当業者には容易に理解される。

#### 【0025】

本発明の骨子は、固定化しようとする核酸の化学的修飾である。この化学的に修飾された核酸は、次いで、ガラス表面などの固体支持体に対して容易に反応する。これにより核酸は固定化される。再度ではあるが、これは、核酸自体ではなく、むしろ固体支持体の修飾を教示する先行技術に対する直接的な否定である。

40

#### 【0026】

本発明の修飾された核酸は、ヒドロキシル基を有する様々な固体表面に容易に接着する。これらには、石英ガラス、雲母、アルミナ ( $Al_2O_3$ )、チタニア ( $TiO_2$ )、 $SnO_2$ 、 $RuO_2$ 、 $PtO_2$ 、ならびに多数の他の金属酸化物の表面が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0027】

一群の実施形態において、本発明の化学的に修飾された核酸は、環状エーテル基およびアルコキシシラン基の2つの極めて重要な官能基を有する化合物でそのように修飾される。核酸を環状エーテルと反応させ、次いで、新たに修飾された核酸を、それ以外の点では不

50

活性なガラス表面と接触させると、その表面でアルコキシシラン基がガラス表面の Si-OH 基と反応する。

【0028】

別の異なる種類の実施形態において、本発明の化学的に修飾された核酸は、アミノ基およびアルコキシシラン基の2つの極めて重要な官能基を有する化合物でそのように修飾される。核酸をアミノ基と反応させ、次いで、新たに修飾された核酸を、それ以外の点では不活性なガラス表面と接触させると、その表面でアルコキシシラン基がガラス表面の Si-OH 基と反応する。

【0029】

さらに別の異なる種類の実施形態において、核酸は、ハロゲン化シラン化合物と反応させることによって修飾される。さらに別の種類の実施形態において、核酸は、アミン含有シランおよび臭素化された核酸との最終的な反応を含む2段階プロセスによって誘導体化される。

【0030】

他の実施形態は、本発明の先の実施形態の修飾された核酸を利用する高密度マイクロアレイの調製および最適化に関する。

【0031】

実施例1

3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランを使用する修飾された核酸の調製

本実施例は、本発明の修飾された核酸の一形態を記載する。化学的修飾の目的は、誘導体化されていない固体表面に核酸を容易に固定させることができることである。本実施例において、核酸（好ましくは、DNA）は、図1に従って、3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン（GPTS）との反応によって修飾される。GPTSは、実際には、（修飾されていない）DNA試料をその後で接触させて固定化するガラス表面を誘導体化するために以前から使用されている。しかし、GPTSの使用は、これとは反対の目的のためである。すなわち、誘導体化されていないガラス表面に対するその後の結合のためにDNAを修飾することは、以前には開示も示唆もされていない。さらに、エポキシド基を含有しているために、GPTSはインビボでDNAを損傷することが知られている。これらの理由のために、DNAを誘導体化するためにGPTSを使用することは、実際には先行技術によって思いとどまらされている。

【0032】

概略的に記載すると、核酸を固体支持体に固定することは、本質的には2工程からなる。最初の工程において、核酸をGPTS分子のエポキシド端と反応させ、第2の工程において、ガラス表面を反対側の端（すなわち、GPTSで修飾された核酸のシラン端）と反応させ、それによって、核酸は、誘導体化されていないガラス表面に固定される。全体の反応は迅速であり、好ましい平衡を特徴とし、最少量の安価な試薬を使用する非常に穏和な条件のもとで生じる。多数の方法が反応のどちらかの工程を行うために存在することは極めて明らかであるが、好ましい方法を本実施例および下記の実施例において示す。

【0033】

図1に示されているように、環状エーテルおよびアルコキシシランを有する化学化合物（この場合、それぞれ、エチレンオキシドおよびトリメトキシシラン）は化合物の2つの端を構成する。2つの端は、炭素が4個のエーテルリンカーで連結されている。示される化合物は、3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン（すなわち、GPTS）である。最初の工程において、DNAを、好ましくは9.5よりも高い塩基性pHでGPTSと反応させて、修飾されたDNAを得る。次いで、この修飾されたDNAを、誘導体化していないガラス（または他のシラノール含有）表面と中性pHで反応させる。このようにして、DNAがガラス表面に固定化される。最初の工程において、環状エーテル官能基がDNAと反応する。再度ではあるが、環状エーテルは、GPTSの場合のようにエチレンオキシドである必要はない。しかし、小さな環が、比較的非反応性であるエーテル官能基の反応性を大きくするために好ましい。

## 【0034】

誘導体化されたDNAに導く最初の反応は、DNAのリボース環の5位炭素が関与すると考えられる開環反応である。この誘導体化されたDNAは極めて安定であり、実際に使用されるまでの長期間にわたって保存することができる。誘導体化されたDNAをガラス表面に固定化する第2の反応は、ガラス表面においてSi-O-Si結合が生成する単純な置換反応であり、GPTS分子からのアルコキシ基の脱離反応である。

## 【0035】

## 実施例2

3-アミノプロピルトリエトキシシランを使用する修飾された核酸の調製

本実施例は、本発明の修飾された核酸の別の好ましい形態を記載する。化学的修飾の目的は、誘導体化されていない固体表面に核酸を容易に固定させることができることである。本実施例において、核酸（好ましくは、DNA）は、図2に従って、3-アミノプロピルトリメトキシシランとの反応によって修飾される。実施例1の場合のように、核酸を固体支持体に固定することは、本質的には2工程からなる。最初の工程において、核酸を3-アミノプロピルトリメトキシシラン分子のエポキシド端と反応させる。第2工程において、ガラス表面を、反対側の端（すなわち、3-アミノプロピルトリメトキシシランで修飾された核酸のシラン端）と反応させる。それによって、核酸は、誘導体化されていないガラス表面に固定化される。

10

## 【0036】

実施例1の場合のように、全体の反応は迅速であり、好ましい平衡を特徴とし、最少量の安価な試薬を使用する非常に穏和な条件のもとで生じる。多数の方法が反応のどちらかの工程を行うために存在することは極めて明らかであるが、好ましい方法を本実施例および下記の実施例において示す。

20

## 【0037】

図2に示されているように、アミノ基およびアルコキシシランを有する化学化合物（この場合、それぞれ、 $-NH_2$  およびトリエトキシシラン）は化合物の2つの端を構成する。2つの端はプロピル結合によってつながっている。示される化合物は、3-アミノプロピルトリエトキシシランである。最初の工程において、DNAを、好ましくは重亜硫酸ナトリウムの存在下、中性pHで3-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させる。

## 【0038】

誘導体化されたDNAに導く最初の反応は、核酸のシトシン残基のアミノ基転移反応である。実施例1の場合のように、誘導体化されたDNAをガラス表面に固定化する第2の反応は、ガラス表面においてSi-O-Si結合が生成する単純な置換反応であり、GPTS分子からのアルコキシ基の脱離反応である。

30

## 【0039】

## 実施例3

高密度マイクロアレイの調製

実施例1および2に記載される修飾された核酸などの本発明の修飾された核酸が調製されると、その後、そのような修飾された核酸を利用することができる。再度ではあるが、このような修飾された核酸（好ましくは、DNA）は、誘導体化されていない表面に修飾されたDNAを単に接触させることによってガラス表面に固定化することができる。この重要性は、特に、スプレッディング（固定化しようとするDNAの所望する部位からの移動）および非特異的なプローブ付着（正味の負電荷のDNAが引き寄せられる表面での正味の正の静電電荷を生じさせるガラス表面の誘導体化によって生じる）が本質的になくなることである。

40

## 【0040】

これらの利点によって、非常に望ましい極端に高密度のマイクロアレイの作製が可能になる。例えば、スプレッディングがなくなり、プローブ付着が効果的になくなるために、1つの小さなガラス表面は、實際上、試験すべき数千のDNA試料を含有することができる。この場合、そのそれぞれは、顕微鏡レベルの大きさであり、すべてが1つのガラス表面

50

に固定化されている。実際、ガラス表面に置かれた50ミクロンよりも小さい多数の単一試料スポットからなるマイクロアレイを組み立てることができる。

#### 【0041】

多数のDNA試料からなるこのタイプの高密度マイクロアレイはまた、本発明に従って容易に組み立てることができる。修飾されたDNAを、実際の使用に先立って、（例えば、実施例1および2に従って）良好に調製することができる。このような化学的に修飾されたDNA試料は、その後、例えば格子様式で、誘導体化されていないガラスシートに容易に「印刷」され得る「DNAチップ」の類似体である。図3には、本発明のDNAチップを使用するそのような高密度マイクロアレイを調製するための装置の1つの実施形態が例示されている。1つの好ましい実施形態において、この装置は、多数の安価な市販の毛細管マイクロピペットから作製される。好ましくは10cmのマイクロピペットであるが、他の大きさも当然に使用される。図3に示されているように、10cmのマイクロピペットはそれぞれ、一方の端を先細り状にするために引っ張られる。マイクロピペットは六方最充填配列で配列させられ、正方形のフレームによって結束される。マイクロピペットは互いに接着され、フレーム内の安定なユニットを形成することができる。先細り端（図3B）は切断され、研磨されて光学的平坦にされる。

10

#### 【0042】

マイクロアレイを調製するために、装置のチップが、（本発明に従って化学的に修飾された）試験すべきDNA試料を含有する多ウェル容器に浸漬される。従って、そのウェルは装置のマイクロピペットとともに整列される。チップをウェルと接触させたとき、少量の各DNA試料が、単なる毛細管作用によって、特定のウェルに対応するマイクロピペット内に入る。スポットのサイズは、先細り端の大きさによって慎重に制御することができる。この装置および本発明のDNAチップを使用して、数千の試料を、同時に、そして高価なロボット工学を必要とすることなく狭い領域に配列させることができる。実際、本発明の（DNAチップおよびピペット装置を含む）方法は、高速度のスポット用ロボットを使用する方法よりもさらに効率的であることが示されている。最後に、本発明の化合物、方法および装置は、市販される充填済みキットに容易に組み入れられる。

20

#### 【0043】

本発明の高密度マイクロアレイはまた、上記の先行技術の節に開示されたマイクロアレイシステムなどの先行技術のマイクロアレイシステムに容易に組み込むこともできる。これらの方法、例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）およびシャロン（Shal on）ら（2色蛍光プローブハイブリダイゼーションを使用する複雑なDNA試料を分析するためのDNAマイクロアレイシステム、6、Genome Res. 639, 1996）によって記載される方法は、参照により本出願において取り込まれる。シャロン（Shal on）らの方法において、DNA試料のマイクロアレイをガラス基板上に作製すること、複雑な蛍光標識プローブとのハイブリダイゼーションによってそれらをプローブすること、およびレーザー走査顕微鏡を使用して、ハイブリダイゼーションを示す蛍光シグナルを検出することを含むマイクロアレイシステムが、DNA試料を分析するために提供されている。同様に、サージェント（Sargent）ら（米国特許第5,601,982号）は、走査トンネル顕微鏡法で核酸を走査することを含む、ポリヌクレオチドの配列を決定するための方法および装置を開示している。

30

40

#### 【0044】

##### 実施例4

ハロゲン化シランを使用する修飾された核酸の調製

本実施例は、本発明の修飾された核酸の別の形態を記載する。再度ではあるが、ここで開示され特許請求される化学的修飾の目的は、誘導体化されていない固体表面（例えば、通常は石英ガラス）に核酸を容易に固定させることができることである。図4に従って、本発明による修飾された核酸は、修飾されていない核酸を、ほぼ中性pHのもとで、好適なシラン化合物と反応させることによって調製される。図4の「X」は任意のハロゲン化合物を示し得るが、好ましくは、Cl、BrまたはIを示し； $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  は同一ま

50

たは異なっているとしてもよく、 $-\text{OCH}_3$  および  $-\text{OC}_2\text{H}_5$  を含む。特に、好ましい実施形態において、図4の矢印の左側に示されるハロゲン化シランは、8-ブロモオクチルトリクロロシラン、8-ブロモオクチルトリメトキシシラン、4-クロロブチルメチルジクロロシラン、および3-ヨードプロピルトリメトキシシランである。

#### 【0045】

図4に示される変換反応は、下記のように行われた。ハロゲン化シランをジメチルホルムアミド(DMF)に約30mMの濃度で溶解した。次に、3~10 $\mu\text{g}$ の核酸を100 $\mu\text{l}$ の0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。次いで、1~3 $\mu\text{g}$ の30mMハロゲン化シランを加えて、溶液を十分に混合し、約37 $^{\circ}\text{C}$ で約3時間反応させた(あるいは、周囲温度で一晩反応させることができる)。反応後、所望する生成物(すなわち、修飾された核酸)をエタノール沈澱で精製し、次いで修飾された核酸を水に溶解する。

10

#### 【0046】

##### 実施例5

##### スポット密度/サイズの制御

本出願を通して議論されているように、本発明の1つの特定の利点は、研究者が、核酸研究を行うための非常に高密度なマイクロアレイを調製できることである。本実施例は、本発明による高密度マイクロアレイの調製が開示された実施例3に関連して最も良く理解される。本実施例では、本発明に従って、固体支持体における個々の核酸「スポット」のサイズを制御するために強化された方法が開示される。

#### 【0047】

20

小さなスポットサイズは、高密度マイクロアレイに関連して、より高い試料密度(すなわち、単位面積あたり、より多くの試料)および優れた検出感度を可能にする(シグナルがほとんど拡散しないからである)。従来の固体支持体システムでは、当業者は極めて重大なジレンマに直面している。(本明細書に記載される実験で使用されるタイプの)通常の清浄な石英ガラス表面は、非常に親水性である。従って、核酸試料は、ガラス表面に置かれた場合には自然に広がりやすい。再度ではあるが、これは望ましくない。スプレッディングを軽減するために、当業者は、例えば、表面を疎水性薬剤で前処理するか、または表面を単に脱水することのいずれかによって表面がより疎水性になるように処理することができる。自然のことではあるが、このような選択肢はいずれも、ガラス表面のシラン修飾核酸に対する反応性を低下させる。

30

#### 【0048】

本実施例で議論される本発明の一群の実施形態において、当業者はこのジレンマから解放される。より詳細に記載すると、本発明の別のタイプのシランを使用することによって、スプレッディングをなくすことができ、その上、修飾された核酸に対する表面の反応性を維持することができる。例えば、加水分解後におけるこのようなシランの1つの極めて一般的な実施形態は、疎水性基で連結された $\text{Si}(\text{OH})_3$ をそれぞれの端に含有する。図6を参照のこと。任意の様々な疎水性リンカーを使用することができる。特に好ましい実施形態には、1,6-ビス-トリクロロシリルヘキサン、1,8-ビス-トリクロロシリルオクタン、1,6-ビス-メトキシシリルヘキサン、および1,4-ビス-トリメトキシシリルエチルベンゼンが含まれる。従って、本発明のこれらの実施形態により、シランの一方の端は表面に結合するが、もう一方の端は修飾された核酸に対する反応性を有したままである。疎水性リンカーにより、疎水性が表面に付与される。従って、当業者は、表面の静電特性(疎水性対親水性)を容易に調節させ得る方法を容易に理解することができる。例えば、リンカーの鎖長を調節して疎水性を制御することができ、表面の反応性を、表面と接触するシランの量を調節することによって制御することができる。

40

#### 【0049】

本発明のこの側面に従って固体支持体を調節するために、ガラス表面を、ドラフト内で、約2時間、3M HCl中でゆっくり煮沸することによって清浄化した。次に、表面を脱イオン水でリンスし、次いで、使用できるまで0.1M HCl中で保管した。使用できるようになった場合、表面を再蒸留脱イオン水でリンスし、存在する酸を除き、次いで無

50

水エタノールでリンスした。次に、表面を、直ちに、0.0005%~0.002%の本発明のこの側面の二官能性シランを含有するエタノール溶液に移した。次いで、表面を室温で約48時間処理した。次いで、表面をエタノールでリンスし、風乾した。最後に、使用できるまで、ガラス表面を無塵環境で保管した。

#### 【0050】

##### 実施例6

アミン含有シラン化合物を使用する修飾された核酸の調製

本実施例は、本発明の修飾された核酸の別の形態を記載する。この一群の実施形態において、修飾された核酸は、未処理の核酸をアミン含有シランと反応することによって調製される。実践的に、アミン含有シランによる核酸の誘導体化は2工程からなる：(1)核酸のハロゲン化（または、示されるように、臭素化）（図5a、5b）；および(2)ハロゲン化された核酸の誘導体化（図5c）。図5a、5bに示されているように、反応は、N-ブロモスクシンイミドの存在下、穏和なpH条件下で進行し得る。これらの反応変数のいずれかを変更することによって、当業者たる生化学者は反応速度を制御することができる。また、図5a、5bによって明らかであるように、反応は、通常、pHに依存してグアニン塩基またはシトシン塩基で生じる。すなわち、中性からわずかに塩基性のpHはグアニン残基での反応に有利であり、より塩基性のpHはシトシン残基での反応に有利である。

#### 【0051】

少し異なる反応プロトコルが、好ましくは、核酸がDNAまたはRNAであるかに依存して使用される。DNAの場合、5μgのDNAを100μlの0.1MのNaHCO<sub>3</sub>に溶解し、pHを約9.5にした。この溶液を氷上で約5分間保つ。同時に、濃度が約10mMのN-ブロモスクシンイミド溶液を新しく調製し、これも氷上で冷却した。次に、1μlのN-ブロモスクシンイミド溶液をDNA溶液に加える。次いで、溶液を（渦が巻くまで）激しく攪拌した。次いで、反応を氷上で約15分間進行させた。次に、pHが約9.5~12の0.5Mアミノシラン溶液の10μlを臭素活性化DNA溶液に加えた。この新しい混合物を65℃で約2時間反応させた。最後に、シランで修飾されたDNAを、当該技術分野でよく知られている方法で精製した。好ましくは、エタノール沈澱で精製される。

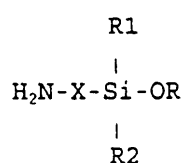
#### 【0052】

類似するが、少し異なるプロトコルを使用した。5μgのRNAを100μlの0.1Mリン酸緩衝液に溶解し、pHを約7.5にした。この溶液を氷上で約5分間保つ。同時に、濃度が約10mMのN-ブロモスクシンイミド溶液を新しく調製し、これも氷上で冷却した。次に、1μlのN-ブロモスクシンイミド溶液をDNA溶液に加える。次いで、溶液を（渦が巻くまで）激しく攪拌した。次いで、反応を氷上で約15分間進行させた。次に、pHが約8.0の1Mアミノシラン溶液の10μlを臭素活性化DNA溶液に加えた。この新しい混合物を45℃で約2時間反応させた。最後に、シランで修飾されたDNAを、当該技術分野でよく知られている方法で精製した。好ましくは、エタノール沈澱で精製される。

#### 【0053】

これらの実施形態において、下記のシランがこのような理由で利用することができる：

#### 【化4】



R: -CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; R1: H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
R2: H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
X: a linker

10

20

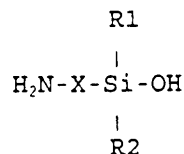
30

40

50

さらに、下記の形態を取る加水分解後の任意の他のアミノシラン化合物が有用である：

【化 5】



10

本明細書中において言及されているすべての特許、刊行物は、本発明が関係する分野の当業者の水準を示し得る。本明細書中におけるすべての特許、刊行物は、個々の刊行物のそれぞれが参照により取り込まれるように明示的かつ個々に示されている場合には同じ程度に参照により取り込まれる。

【0054】

当業者であれば、本発明の対象を実施し、言及されている目的および利点ならびにその固有的なそれらを得るために本発明を十分に適合させることを容易に理解するであろう。化学的に修飾された核酸、その固体支持体への結合は、本明細書中に記載されている配列、方法、手順、アッセイ、分子、装置および特定の化合物とともに、現時点での好ましい実施形態を表し、例示であり、本発明の範囲に対する限定として意図されるものではない。本発明の精神に包含され、かつ請求項の範囲によって規定される、本発明における変化および他の使用が当業者には考えられる。

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、核酸（この場合、DNA）と 3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランとのカップリング反応、その後の新しく修飾された DNA と固体支持体（この場合、ガラス表面）との反応を示す。最終反応生成物、すなわち、固定化 DNA を下段に示す。

【図 2】 図 2 は、核酸（この場合、DNA）と 3-アミノプロピルトリエトキシシランとのカップリング反応、その後の新しく修飾された DNA と固体支持体（この場合、ガラス表面）との反応を示す。最終反応生成物、すなわち、固定化 DNA を下段に示す。

30

【図 3】 図 3 は、高密度マイクロアレイを作製するための装置を示す。上面図（図 3 A）および側面図（図 3 B）をともに示す。

【図 4】 図 4 は、ハロゲン含有シラン化合物のアルキル化による核酸のシラン処理を示す。

【図 5】 図 5 a は、アミン含有シラン化合物を使用する核酸のシラン処理における最初の工程を示す。この場合、反応は、中性 pH およびわずかに塩基性 pH においてグアニン塩基で優先的に生じる。

図 5 b は、アミン含有シラン化合物を使用する核酸のシラン処理における最初の工程を示す。この場合、反応は、より塩基性 pH においてシトシン塩基で優先的に生じる。

図 5 c は、アミン含有シラン化合物を使用する核酸のシラン処理における第 2 で最終の工程を示す。

40

【図 6】 図 6 は、本発明の 1 つの実施形態の概略図であり、疎水性リンカーによるシランリンカーを示す。

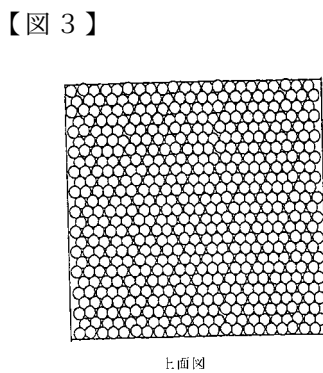
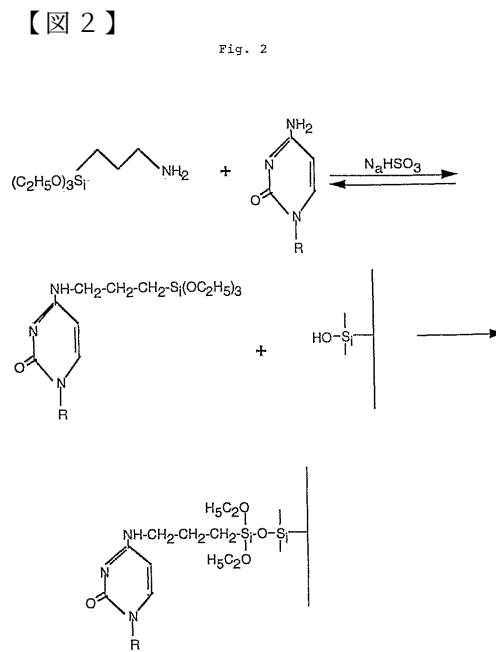
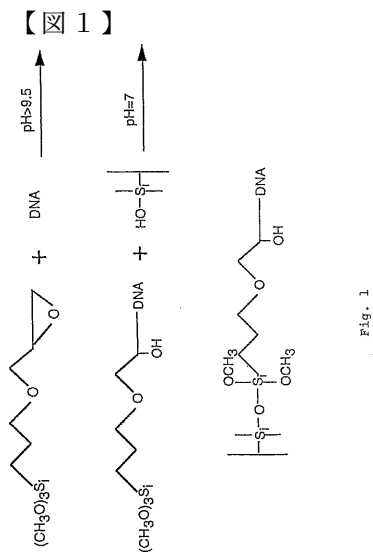


Fig. 3A

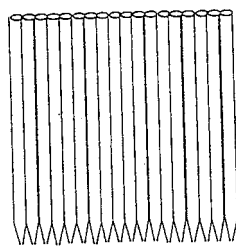
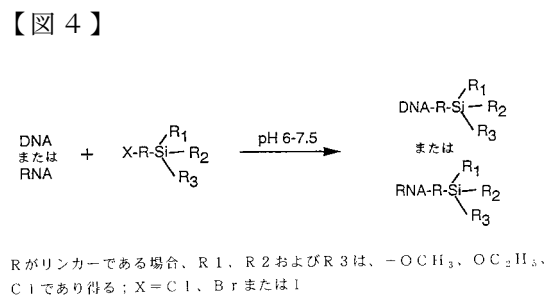


Fig. 3B



【図 5】

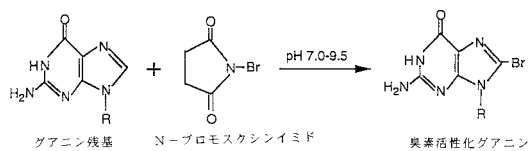


FIG. 5a

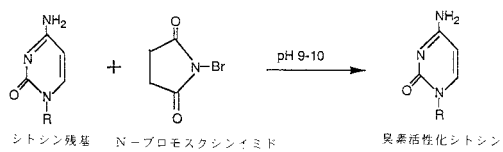


FIG. 5b

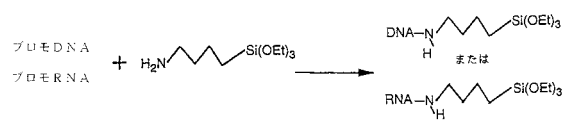
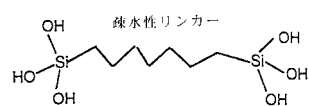


FIG. 5c

【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 H 21/00 (2006.01) C 0 7 H 21/00

(72)発明者 カイ ウェイ ウェン  
アメリカ合衆国 テキサス 77054 ヒューストン、ホーリー ホール 3103、2250

審査官 渕野 留香

(56)参考文献 国際公開第97/039151 (WO, A1)  
国際公開第96/041809 (WO, A1)  
Nucleic Acids Research, 1994, 22, 24, p.5456-5465  
Nucleic Acids Research, 1992, 20, 7, p.1679-1684  
Molecular Biotechnology, 1995, 4, p.213-225

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07H 21/00-23/00  
C12M 1/00  
C12N 15/09  
C12Q 1/68  
G01N 33/53  
G01N 33/566  
CA/REGISTRY(STN)