

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4635532号  
(P4635532)

(45) 発行日 平成23年2月23日(2011.2.23)

(24) 登録日 平成22年12月3日(2010.12.3)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>GO 1 N</b>	<b>33/53</b> (2006.01)	GO 1 N	33/53 M
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00</b> (2006.01)	GO 1 N	33/53 D
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b> (2006.01)	C 1 2 M	1/00 A
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b> (2006.01)	C 1 2 N	15/00 F
<b>GO 1 N</b>	<b>33/543</b> (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A

請求項の数 9 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-266926 (P2004-266926)	(73) 特許権者	000004112 株式会社ニコン 東京都千代田区有楽町1丁目12番1号
(22) 出願日	平成16年9月14日(2004.9.14)	(72) 発明者	塩野 博文 東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株 式会社ニコン内
(65) 公開番号	特開2006-84216 (P2006-84216A)	審査官	山村 祥子
(43) 公開日	平成18年3月30日(2006.3.30)	(56) 参考文献	国際公開第03/092581 (WO, A1) 国際公開第02/093131 (WO, A1) 特開平04-273065 (JP, A)
審査請求日	平成19年7月31日(2007.7.31)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子の分析および回収方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

特定の条件で開裂する開裂部位を有し担体表面に結合されるリンカー分子に対して、分析対象となる有機分子である標的分子が結合されるプローブ分子を結合するステップと、前記プローブ分子に前記標的分子が結合された状態で前記開裂部位を開裂させるステップと、

前記開裂により前記プローブ分子に結合された標的分子を回収するステップと、を有することを特徴とする分析方法。

【請求項2】

前記開裂は、光の照射により開裂させることを特徴とする請求項1に記載の分析方法。

【請求項3】

前記照射される光は紫外線であることを特徴とする請求項2に記載の分析方法。

【請求項4】

前記標的分子に対し蛍光色素による標識をすることを特徴とする請求項1から3の何れか1項に記載の分析方法。

【請求項5】

前記標的分子が結合されるプローブ分子は、前記標的分子を標識した蛍光色素とは異なる蛍光色素により標識がなされ、

前記プローブ分子が結合された前記標的分子を回収した後、前記標的分子の蛍光色素と前記プローブ分子の蛍光色素を検出することを特徴とする請求項4に記載の分析方法。

10

20

## 【請求項 6】

前記蛍光色素の蛍光強度を測定することを特徴とする請求項 4 または 5 に記載の分析方法。

## 【請求項 7】

前記担体に結合されたリンカー分子は、前記開裂する条件が異なる複数の種類のリンカー分子であり、開裂条件を変えることで、選択的に前記リンカー分子を開裂させ、所望の標的分子を回収することを特徴とする請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の分析方法。

## 【請求項 8】

前記リンカー分子は前記担体表面に結合された後に前記プローブ分子を結合させ、次に前記プローブ分子に対して前記標的分子結合させ、その後、前記担体表面に結合された前記リンカー分子を開裂させることで、前記標的分子を回収することを特徴とする請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の分析方法。

10

## 【請求項 9】

前記標的分子が結合可能なプローブ分子は、前記プローブ分子を含む溶液の状態を用意され、この溶液と前記プローブ分子とを結びつけるリンカー分子を含む溶液とが混合された混合溶液を調整し、前記混合溶液を前記担体表面に滴下し、前記プローブ分子が結合されたリンカー分子を前記担体表面に結合させ、前記担体表面に固定化されたリンカー分子に結合された前記プローブ分子に前記標的分子を結合させ、前記担体表面に結合された前記リンカー分子を開裂させることで、前記標的分子を回収することを特徴とする請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の分析方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、核酸、タンパク質等の生体分子の分析および回収方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

DNAチップ(DNAマイクロアレイ)やプロテインチップ等のアレイチップをツールとして、生体分子を網羅的、包括的に分析する方法が多用されている。これらは、生体分子の本来有する選択的な結合特異性を利用するバインディングアッセイであり、位置情報を信号の種類情報とする多項目同時分析の手法である(特許文献1等参照)。

30

## 【0003】

【特許文献1】特表平3-505157号

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

しかし、このような方法では、一旦アレイチップにバインディングされた試料を回収することはできない。例えば、試料を、アレイチップにより定性分析した後、他の分析(例えば定量分析)に用いたい場合や、他のアプリケーションに用いたい場合がある。従来のように、試料を回収できないのでは、これらの要求に答えられない。重要なタンパク質は、量が少ないものが多く、特に不都合となる。

40

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、アレイチップ等によるバインディングアッセイ後、試料を回収できるようにすることにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

上記課題を解決すべく請求項1に係る発明によれば、特定の条件で開裂する開裂部位を有し、担体表面に結合されるリンカー分子に対して、分析対象となる有機分子である標的分子が結合されるプローブ分子を結合するステップと、前記プローブ分子に前記標的分子が結合された状態で前記開裂部位を開裂させるステップと、前記開裂により前記プローブ分子に結合された標的分子を回収するステップと、を有することを特徴とする分析方法が提供される。

50

## 【0006】

また、請求項2に係る発明によれば、前記開裂は、光の照射により開裂させることを特徴とする請求項1に記載の分析方法が提供される。

## 【0007】

また、請求項3に係る発明によれば、前記照射される光は紫外線であることを特徴とする請求項2に記載の分析方法が提供される。

## 【0008】

また、請求項4に係る発明によれば、前記標的分子に対し蛍光色素による標識をすることを特徴とする請求項1から3の何れか1項に記載の分析方法が提供される。

## 【0009】

また、請求項5に係る発明によれば、前記標的分子が結合されるプローブ分子は、前記標的分子を標識した蛍光色素とは異なる蛍光色素により標識がなされ、前記プローブ分子が結合された前記標的分子を回収した後、前記標的分子の蛍光色素と前記プローブ分子の蛍光色素を検出することを特徴とする請求項4に記載の分析方法が提供される。

10

## 【0010】

また、請求項6に係る発明によれば、前記蛍光色素の蛍光強度を測定することを特徴とする請求項4または5に記載の分析方法が提供される。

## 【0011】

また、請求項7に係る発明によれば、前記担体に結合されたリンカー分子は、前記開裂する条件が異なる複数の種類のリンカー分子であり、開裂条件を変えることで、選択的に前記リンカー分子を開裂させ、所望の標的分子を回収することを特徴とする請求項1から6の何れか1項に記載の分析方法が提供される。

20

## 【0012】

また、請求項8に係る発明によれば、前記リンカー分子は前記担体表面に結合された後に前記プローブ分子を結合させ、次に前記プローブ分子に対して前記標的分子結合させ、その後、前記担体表面に結合された前記リンカー分子を開裂させることで、前記標的分子を回収することを特徴とする請求項1から7の何れか1項に記載の分析方法が提供される。

また、請求項9に係る発明によれば、前記標的分子が結合可能なプローブ分子は、前記プローブ分子を含む溶液の状態を用意され、この溶液と前記プローブ分子とを結びつけるリンカー分子を含む溶液とが混合された混合溶液を調整し、前記混合溶液を前記担体表面に滴下し、前記プローブ分子が結合されたリンカー分子を前記担体表面に結合させ、前記担体表面に固定化されたリンカー分子に結合された前記プローブ分子に前記標的分子を結合させ、前記担体表面に結合された前記リンカー分子を開裂させることで、前記標的分子を回収することを特徴とする請求項1から7の何れか1項に記載の分析方法が提供される。

30

## 【発明の効果】

## 【0013】

本発明によれば、アレイチップ等によりバインディングされた試料を回収する技術が提供される。

40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0014】

以下に、本発明の分析方法の一実施形態について説明する。

## 【0015】

<第一の実施形態> 図1は、第一の実施形態にかかる分析方法について説明するための図であり、アレイチップの基板表面の拡大模式図である。図示するように、本実施形態の分析方法は、下記のステップからなる。

## 【0016】

(1) 基板100の表面に、基板100とプローブ分子300とを結びつけるリンカー分子200を固定化するステップ

50

(2) リンカー分子200に、プローブ核酸や抗体等のプローブ分子300を固定化するステップ

(3) プローブ分子300に、標識化DNAやタンパク質等の標的分子(評価対象分子)400の結合を試みるステップ

(4) リンカー分子200を開裂させることにより、標的分子400を回収するステップ  
以下、それぞれのステップについて詳細に説明する。

【0017】

<ステップ(1)> まず、基板100の表面に、基板100とプローブ分子300とを結びつけるリンカー分子200を固定化するステップについて説明する。

【0018】

担体となる基板100としては、ガラス、シリカ( $\text{SiO}_2$ )、シリコンウエハ、アルミナ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )、タルク、クレー、アルミニウム、鉄、マイカ、アスベスト、酸化チタン、酸化鉄、石英等が挙げられる。これらの中でも、ガラス、シリコンウエハ等の表面にシラノール基を有するものが好ましい。なお、シリコンウエハは、自然酸化膜が形成されていればシラノール基を表面に有するが、熱酸化処理することにより、表面にシラノール基を形成させることもできる。また、窒化珪素膜を表面に有するシリコンウエハを用いることもできる。

【0019】

また、担体の形状は、板状に限られず、用途に応じて適宜選択できる。例えば、シート状、ハニカム状、ファイバー状、ビーズ状、粉状等であってもよい。

【0020】

リンカー分子200は、基板100とプローブ分子300とに結合可能であり、かつ、光照射や特定の化合物を作用させることにより、開裂するものであればよい。すなわち、リンカー分子200は、その分子構造として、基板100との結合部210と、開裂可能な架橋部220と、有機分子であるプローブ分子300との結合部230とを有するものであればよい。

【0021】

このようなリンカー分子200において、基板100との結合部210となりうる官能基としては、シラノール基と反応するトリメトキシシリル基、トリクロロシリル基等が挙げられる。

【0022】

プローブ分子300との結合部230となりうる官能基としては、アミノ基と反応性が高いスクシンイミジル基等の活性エステル基等、チオール基と反応性が高いマレイミド基等が挙げられる。

【0023】

リンカー分子200の開裂可能な部位220の官能基としては、光照射で開裂する官能基として、ニトロベンジルエステル基、ニトロベンジルエーテル基、ニトロベンジルチオエーテル基、ニトロベンジルカルバモイル基等が挙げられる。

【0024】

また、他の開裂可能な官能基としては、ジスルフィド基(  $\text{S}-\text{S}$  : 例えば、2-メルカプトエタノール、ジチオレイトール等の還元剤(10~100mM)の存在下、pH7~9、25~37、5~30分で開裂。 )、

グリコール基(  $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$  : 例えば、15mM  $\text{NaIO}_4$  とともに、pH7.5で25、4~5時間保持することで開裂。 )、

アゾ基(  $-\text{N}=\text{N}-$  : 例えば、0.1M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  とともに、0.1M  $\text{NaHCO}_3$  (pH8.0) - 0.15M  $\text{NaCl}$  中、室温で25分保持することで開裂。 )、

スルホン基(  $-\text{SO}_2-$  : 例えば、0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - トリス緩衝液(pH11.6) - 6M尿素 0.1% SDS - 2mM ジチオレイトール中、37 で2時間保持することで開裂。 )、

10

20

30

40

50

エステル ( - C O <sub>2</sub> - : 1 M ヒドロキシルアミンを用い、50 mM、トリス緩衝液 ( p H 7 . 5 ~ 8 . 5 ) - 25 mM C a C l <sub>2</sub> - 1 mM ベンズアミン中、25 ~ 37 で 3 ~ 5 時間保持することで開裂。 )、

オルトエステル ( p H 6 . 4 で 1 ~ 3 時間保持することで開裂。 ) 等が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

リンカー分子 200 の固定化方法は、基板 100 の種類や固定化するリンカー分子 200 の種類により異なる。なお、一段階でリンカー分子 200 を固定化してもよいし、複数段階で固定化してもよい。

【 0 0 2 6 】

例えば、表面にシラノール基を有する基板に、アミノ基と反応性が高いスクシンイミジル基を有しかつ照射により開裂するニトロベンジルチオエーテル基を有するリンカー分子を固定化する場合、以下のようにして行う。

【 0 0 2 7 】

まず、シラノール基を表面に有する基板 (例えば、ガラス基板) に、メルカプトメチルジメチルエトキシラン、3 -メルカプトプロピルトリメトキシシラン等のチオール基を有するシランカップリング剤にて、基板表面にチオール基を形成させる。

【 0 0 2 8 】

次に、チオール基と反応性の高い 2 - ニトロベンジルブロマイド基を有するスクシンイミジル - 4 - プロモメチル - 3 - ニトロベンゾエート ( B N B A - O s u ) を作用させて、表面にスクシンイミジル基を形成させる。または、シランカップリング剤と B N B A - O s u を反応させた後、生成物を基板表面に作用させる。

【 0 0 2 9 】

なお、B N B A - O s u のほかに、スクシンイミジル - 4 - ( 4 - プロモメチル - 3 - ニトロベンジル ) アミノブチレート ( B N B A C 3 - O s u )、スルホスクシンイミジル - 4 - ( 4 - プロモメチル - 3 - ニトロベンジル ) アミノブチレートのナトリウム塩 ( B N B A C 3 sulfo - O s u )、スクシンイミジル - 6 - ( 4 - プロモメチル - 3 - ニトロベンジル ) アミノヘキサノエート ( B N B A C 5 - O s u )、スルホスクシンイミジル - 6 - ( 4 - プロモメチル - 3 - ニトロベンジル ) アミノヘキサノエートのナトリウム塩 ( B N B A C 5 sulfo - O s u ) 等を用いることもできる。

【 0 0 3 0 】

なお、開裂条件が異なる複数種類のリンカー分子を固定化するようにしてもよい。こうすれば、回収時、リンカー分子の開裂条件を変えることで、選択的にリンカー分子を開裂させて、選択的に標的分子を回収することができるようになる。

【 0 0 3 1 】

<ステップ ( 2 ) > 次に、リンカー分子 200 にプローブ核酸やタンパク質等のプローブ分子 300 を固定化するステップについて説明する。

用いられるプローブ分子 (リガンド) は、標的分子 (評価したい分子) により異なる。

【 0 0 3 2 】

すなわち、DNA アレイの場合は、プローブ分子として、配列の分かっているオリゴヌクレオチドや cDNA ( mRNA と相補的な塩基配列を持つ DNA ) を用いることができる。

【 0 0 3 3 】

タンパク検出用プロテインアレイ ( Protein-detection array ) の場合であれば、プローブ分子として抗体を用いることができる。また、抗体以外のプローブ分子としては、核酸やタンパク質の一部の配列をランダムに変化させて、特定の分子に結合するようにセレクションしたアプタマーを用いることができる。アプタマーは、抗体よりもセレクションが容易で効率がよい。

【 0 0 3 4 】

また、タンパク質の機能解析用のプロテインアレイ ( Protein-function array ) の場合であって、タンパク質間、タンパク質 - 小分子、タンパク質 - 薬物、タンパク質 - 核酸などの相互作用や酵素活性を評価したい場合は、その組み合わせの片方の物質をプローブ分

10

20

30

40

50

子とし、他方を標的分子とすればよい。

【0035】

また、酵素の基質探しや阻害剤の探索のためペプチドアレイであれば、プローブ分子として、基質や阻害剤を用いることができる。

【0036】

プローブ分子の固定化は、プローブ分子を溶解させた溶液を、リンカー分子を固定化させた基板表面に、塗布、点着等することにより行う。基板に溶液を点着したら、そのまま1時間～1日間保持する。そして、その後、乾燥させることにより、プローブ分子を固定化した基板を得ることができる。

【0037】

なお、点着後に水溶液や有機溶媒等で洗浄することにより、固定化に寄与していない余分なプローブ分子を除去し、固定化量を均一にすることができる。

【0038】

また、異なる種類のプローブ分子を、パターンング等により、基板の特定の位置に固定化するようにしてもよい。こうすれば、同時に他項目にわたる網羅的解析、コンビナトリアル解析が可能になる。

【0039】

また、上記では、基板に、リンカー分子を固定化してからプローブ分子を固定化している。これに限らず、リンカー分子の固定化とプローブ分子の固定化を同時に行ってもよい。

【0040】

<ステップ(3)> 次に、プローブ分子300に標的分子400の結合を試みるステップについて説明する。上記の通り、解析の目的によってプローブ分子300と標的分子400の組み合わせは異なる。

【0041】

例えば、DNAアレイの場合は、標的分子は、DNAやRNAである。タンパク質検出プロテインアレイの場合は、標的分子はタンパク質である。タンパク質の機能解析用のプロテインアレイの場合は、相互作用や酵素活性を評価したい、タンパク質間、タンパク質-小分子、タンパク質-薬物、タンパク質-核酸などの組み合わせの片方の物質が標的分子となる。ペプチドアレイの場合は、プローブ分子が基質や阻害剤であれば、標的分子は、酵素となる。

【0042】

標的分子は、溶媒とともに基板表面にスポットされることにより、プローブ分子との結合が試みられる。スポット後、所定時間放置した後、溶媒で洗浄される。標的分子がプローブ分子に結合したかどうかで、DNAの配列情報、タンパクの検出、抗体との相互作用、酵素活性等を知ることができる。

【0043】

なお、標的分子を蛍光標識等しておけば、アレイ上のどのプローブ分子と結合したかを容易に判断することができる。また、蛍光強度により、その量を測ることができる。

【0044】

<ステップ(4)> 次に、固定化した標的分子400を回収するステップについて説明する。上記のとおり、リンカー分子200は、何らかの作用で開裂する部位220を有している。そこで、開裂条件を与えることにより、リンカー分子200の開裂部220を開裂させて、標的分子400をプローブ分子300とともに基板100から脱離させ回収する。

【0045】

例えば、光照射により開裂するリンカー分子が固定化されている基板である場合、光照射を行う。このとき、開裂に適した波長の光を照射するとよい。

【0046】

なお、架橋の切断の条件を与える際、標的分子やプローブ分子の構造が壊れない条件で

10

20

30

40

50

行うのが好ましい。

【0047】

脱離した標的分子は、基板を適当な溶媒で洗浄することにより、回収することができる。

【0048】

なお、開裂条件が異なる複数種類のリンカー分子が固定化された基板の場合、開裂条件を変えることで、選択的にリンカー分子を開裂させて、標的分子を回収することができる。

【0049】

例えば、光照射で開裂するリンカー分子と、2-メルカプトエタノール等の還元剤により開裂するリンカー分子とが固定化された基板の場合、まず、光照射により、一部の特定の標的分子をプローブ分子とともに回収できる。そして、還元剤により、その他の標的分子をプローブ分子とともに回収することができる。

10

【0050】

以上、標的分子を回収するまでのステップを説明した。

【0051】

回収された標的分子は、他の分析やアプリケーションに用いることができる。例えば、電気泳動分析や質量分析(TOF-MS等)の試料とすることができる。また、特定遺伝子を細胞へ導入し発現させる等のアプリケーションに用いることができる。

【0052】

20

なお、回収した標的分子は、リンカー分子の破片やプローブ分子などが付加されているが、付加されたものが分かっているので、その分を差し引いて分析等の評価をすればよい。

【0053】

<第二の実施形態> 次に第二の実施形態について説明する。第二の実施形態は、上記第一の実施形態の分析方法を実行する分析システムに関する。

【0054】

図2は、第二実施形態にかかる分析システムの概略を示す構成図である。図示するように、本実施形態の分析システム1は、基板受入部11と、リンカー分子固定化装置12と、プローブ分子固定化装置13と、標的分子結合試験装置14と、回収装置15とからなる。

30

【0055】

基板受入部11は、リンカー分子200が固定化される前の基板100を受け入れる部分で、基板100を支持する治具を備える。なお、基板100に限らず、アレイの担体となるものでその形状に制限はない。

【0056】

リンカー分子固定化装置12は、リンカー分子200となる物質を、基板100表面に塗布、点着等して、固定化させる装置である。第一実施形態で説明した、基板100へのリンカー分子200の固定化ステップの一連のステップを行う機能を有する。

【0057】

40

プローブ分子固定化装置13は、プローブ分子300をリンカー分子200に固定化させる装置である。第一実施形態で説明した、プローブ分子300の固定化ステップの一連のステップを行う機能を有する。

【0058】

標的分子結合試験装置14は、標的分子(評価対象物質)400とプローブ分子300との結合を試みる装置である。第一実施形態で説明した、標的分子400の結合を試みるステップの一連のステップを行う機能を有する。

【0059】

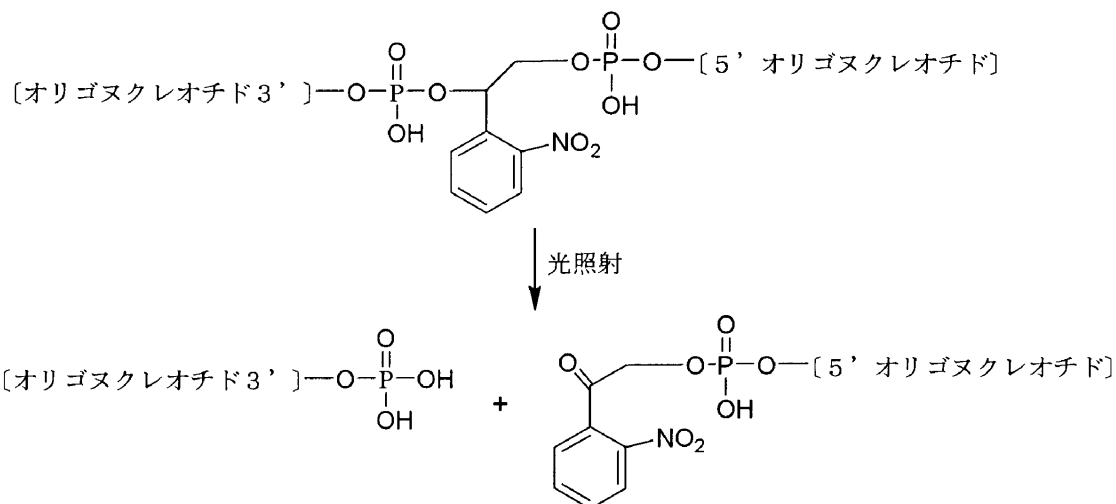
回収装置15は、リンカー分子200を開裂させる条件を与え、標的分子400を回収する装置である。第一実施形態で説明した、標的分子400の回収ステップの一連のステ

50



## 【化2】

## 化2



10

## 【実施例1】

## 【0069】

次に、本発明について、実施例からより詳しく説明するが、本発明は下記の実施例のみに限定されるものではない。

20

## 【0070】

<実施例1>

1. リンカー分子の固定化

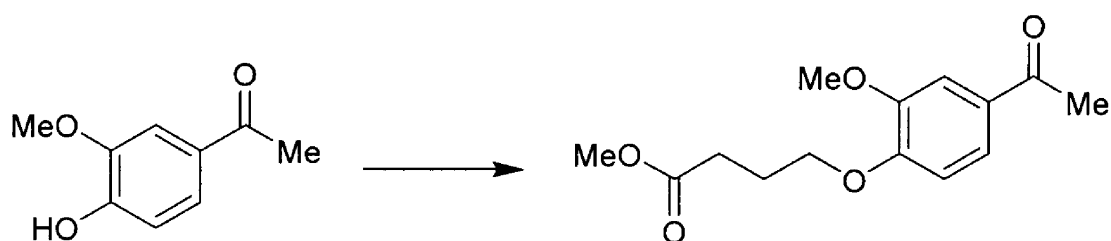
1-1. 4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタン酸の合成

1-1-1. メチル 4-(4-アセチル-2-メトキシフェノキシ)ブタノエートの合成 (C.P. Holmes, J.O.C., 62, 2370 (1997) を参考にして合成を行った)

## 【0071】

## 【化3】

## 化3



30

## 【0072】

4'-ヒドロキシ-3'-メトキシアセトフェノン (和光純薬社製, 41.00g, 246.7 mmol) と、メチル 4-プロモブチレート (和光純薬社製, 49.63 g, 274.1 mmol) と、炭酸カリウム (和光純薬社製, 51.1g, 370mmol) とをジメチルホルムアミド200mlに入れ、室温にて一晩攪拌した。得られた反応液を、水にあげ反応を停止した後、酢酸エチル 500 ml にて抽出し、有機相を水、飽和塩化ナトリウム水溶液の順で洗浄し、無水硫酸マグネシウムにて乾燥を行った。有機相を、ろ別後、溶媒を減圧留去して、メチル 4-(4-アセチル-2-メトキシフェノキシ)ブタノエートを 95% の収率で得た。本化合物の構造は、プロトン核磁気共鳴スペクトル (1H-NMR) により確認した。

40

## 【0073】

1H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm); 2.19 (4重線, 2H), 2.56 (3重線, 2H),

50

2.60 (1重線, 3H), 3.70 (1重線, 3H), 3.91 (1重線, 3H), 4.15 (3重線, 2H), 6.89 (2重線, 1H), 7.51-7.78 (多重線, 2H)

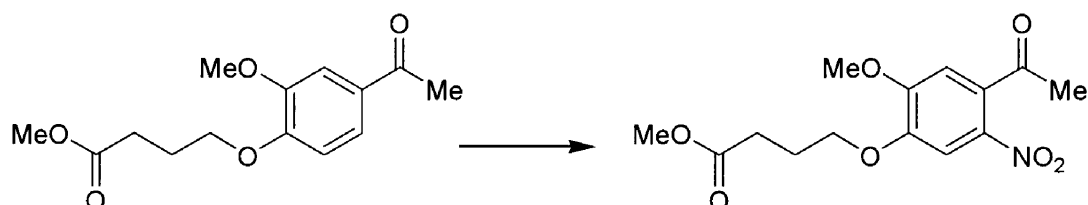
【0074】

1-1-2. メチル 4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタノエートの合成

【0075】

【化4】

#### 化4



10

【0076】

メチル 4-(4-アセチル-2-メトキシフェノキシ)ブタノエート (5.0g, 18.8 mmol) を無水酢酸 30 ml に溶解した。氷冷しながら、70%硝酸 (100ml) を徐々に加えた。3時間室温にて攪拌した後、反応物を氷水に投入した。析出物をろ過により回収し、メタノール-水から再結晶を行い、メチル 4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタノエートを収率 66% で得た。本化合物の構造は、プロトン核磁気共鳴スペクトル (1H-NMR) により確認した。

20

【0077】

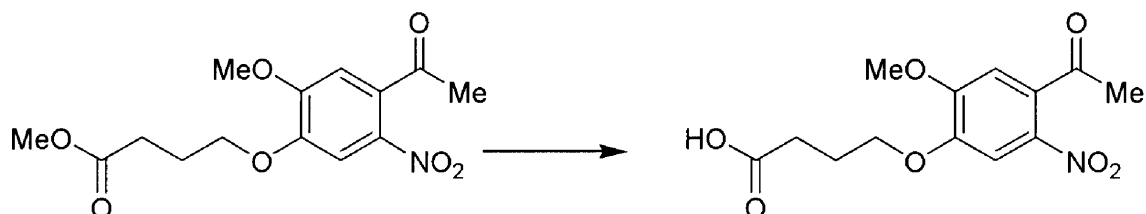
1H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm); 2.20 (4重線, 2H), 2.49 (3重線, 2H), 2.56 (1重線, 3H), 3.70 (1重線, 3H), 3.95 (1重線, 3H), 4.15 (3重線, 2H), 6.75 (2重線, 1H), 7.67 (1重線, 1H) .

1-1-3. 4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタン酸の合成

【0078】

【化5】

#### 化5



40

【0079】

メチル 4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタノエート (2.44 g, 7.84 mmol) を1規定水酸化ナトリウム水溶液-メタノール (1対1) 混合液 100 ml に溶解した。これを1昼夜、室温にて攪拌したのち、塩酸を加えて pH を 2 に調整後、酢酸エチルにて抽出した。有機相を水、飽和塩化ナトリウムの順で洗浄し、無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。その後、有機溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて単離精製して、4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタン酸を 97% の収率にて得た。本化合物の構造は、プロトン核磁気共鳴スペクトル (1H-NMR) により確認した。

【0080】

50

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm); 2.20 (4重線, 2H), 2.49 (3重線, 2H), 2.56 (1重線, 3H), 3.70 (1重線, 3H), 3.95 (1重線, 3H), 4.15 (3重線, 2H), 6.75 (2重線, 1H), 7.67 (1重線, 1H).

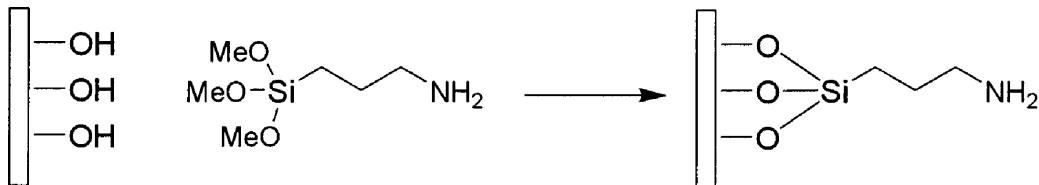
【0081】

1-2. ガラス基板表面上へのアミノ基の導入

【0082】

【化6】

## 化6



10

【0083】

ガラス平板 (松浪硝子工業社製・NEOカバーガラス 24×32) を有機溶剤 (メタノール等)、純水、酸性水溶液 (硫酸-過酸化水素混合液等) の順で十分に洗浄した後、1規定水酸化ナトリウム水溶液に1分間浸した。そして、純水、1規定塩酸、純水、メタノールの順に十分に洗浄した。ガラス平板をトリメトキシ-アミノプロピルシラン (和光純薬社製) の5%エタノール溶液に2時間、室温にて浸した。その後、水-エタノール (1対1) 混合溶液にて十分に洗浄した後、窒素雰囲気下、150℃にて2時間保持した。

20

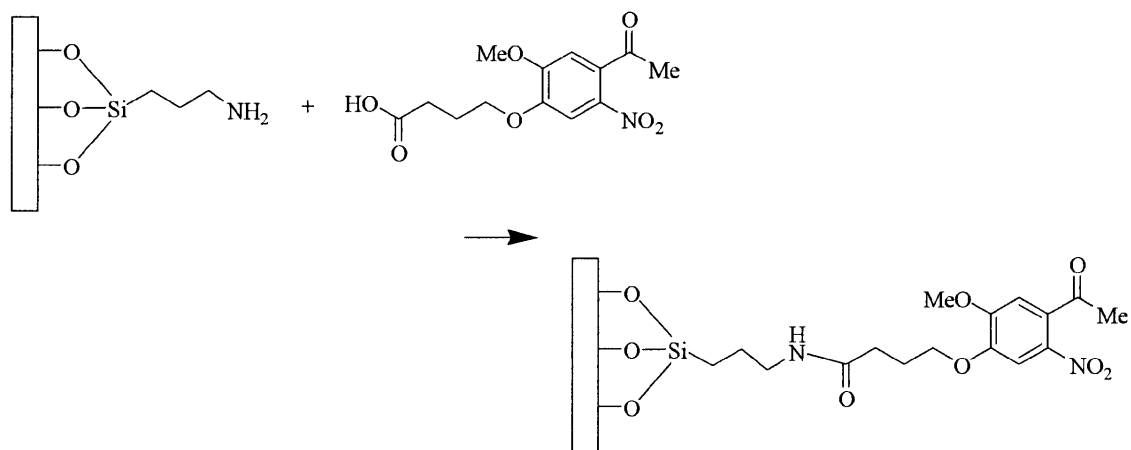
【0084】

1-3. 4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタン酸の固定化

【0085】

【化7】

## 化7



30

40

【0086】

5% 4-(4-アセチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタン酸のジメチルホルムアミド溶液を調製した。5%塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (同仁化学研究所社製) および5%トリエチルアミンジメチルホルムアミド溶液を調製し、三種溶液を等量混合し、反応液を調製し、この中に、アミノ基の形成処理を施したガラス平板を浸し、室温にて1昼夜放置した。その後、メタノール、純水、メタノールの順にて洗浄をし、乾燥をおこなった。

【0087】

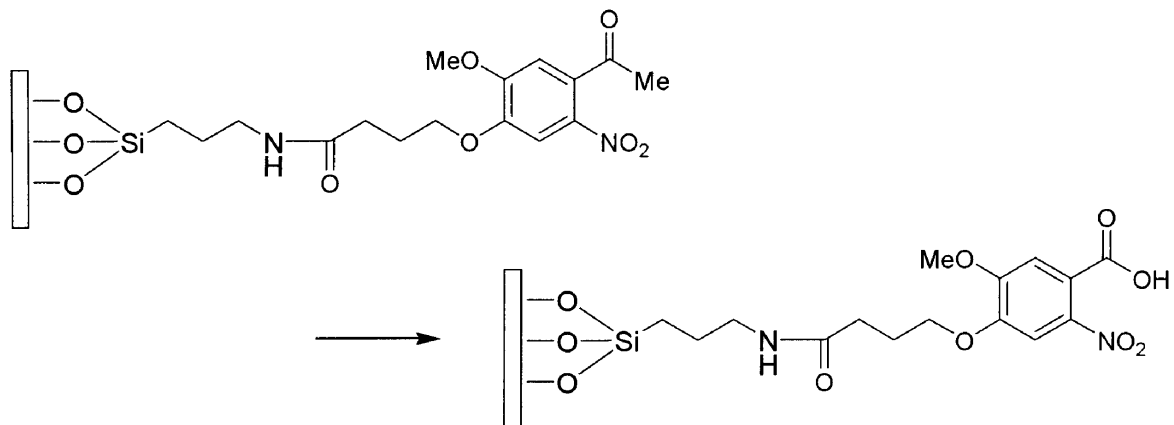
1-4. 還元反応

50

【 0 0 8 8 】

【化 8】

化 8



10

【 0 0 8 9 】

水素化ホウ素ナトリウム（和光純薬社製，166m g）をテトラヒドロフラン40m lに溶解した溶液中へ、先に処理したガラス平板を浸し、室温にて一日放置した。その後、メタノール、純水、メタノールの順にて洗浄をし、乾燥をおこなった。

20

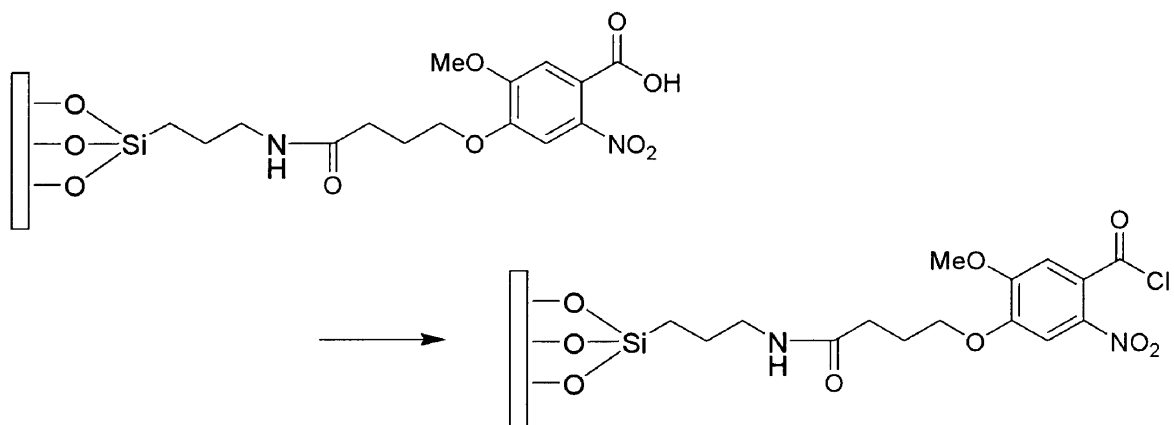
【 0 0 9 0 】

1 - 5 . クロロホルメート体の合成

【 0 0 9 1 】

【化 9】

化 9



30

【 0 0 9 2 】

窒素ガス雰囲気下、トリホスゲン（和光純薬社製，2.1g，12.56 mmol）と炭酸カリウム（和光純薬社製，1.5g 5mmol）をトルエン100m lに溶解した。この溶液中へ、先に処理したガラス平板を浸して、2日間室温にて放置した。そして、エーテルにて十分に洗浄し、乾燥をおこなった。

40

【 0 0 9 3 】

2 . プロブ分子（蛍光色素標識化アミノ基導入核酸）の固定化

蛍光色素（Cy3）を5'末端に、炭素鎖（C6）を介してアミノ基を3'末端に修飾した9塩基からなる核酸鎖（日本ジーン社製）をpH7.0の100mMリン酸緩衝液（ジメチルホルホルムアミド20%含有）に溶解して、3mMの核酸溶液を調製した。この核酸溶液を金属製針を用いて、上記で作成したガラス平板上へスポットした。このまま一晩放置した後、水で十分に洗浄した。

50

蛍光顕微鏡下で蛍光色素 (Cy3) からの蛍光を観察することにより、固定化を確認した。

【0094】

### 3. 核酸のハイブリダイゼーション反応

先に固定化した核酸鎖と相補的配列をもった、蛍光色素 (Cy5) を5'末端に修飾した9塩基からなる核酸鎖 (エスベックオリゴ社製) を、5×SSC (クエン酸ナトリウム-食塩緩衝液、同仁化学研究所社製) - 0.5% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬社製) 溶液に溶解させプローブ溶液を調製した。

【0095】

先に核酸をスポットしたガラス平板へ、プローブ溶液を載せ、65℃にて20時間インキュベーションを行い、交差反応を実施した。反応後、2×SSC-0.1% SDS溶液にて2回、0.2×SSC-0.2% SDS溶液にて4回洗浄した。蛍光顕微鏡により、Cy5からの蛍光を観察して、ハイブリダイゼーション反応が進行したこと確認した。

【0096】

### 4. 光照射による回収

ハイブリダイゼーション反応後のガラス平板上の試料が載っている部分へ、紫外線 (366ナノメートル光) 照射装置 (ウシオ電機社製, 250 kW 高圧水銀灯-オブチプレックス装置) を使用して、紫外線を20分間照射した。

リン酸緩衝液 (20% ジメチルホルムアミド含有) を用いて、光照射によるリンカー光開裂反応によって基板から脱離した核酸試料を回収した。回収した試料溶液を濃縮後、キャピラリー電気泳動装置において、2種の蛍光色素 (Cy3とCy5) の検出することにより、目的の回収が達成できていることを確認した。

【0097】

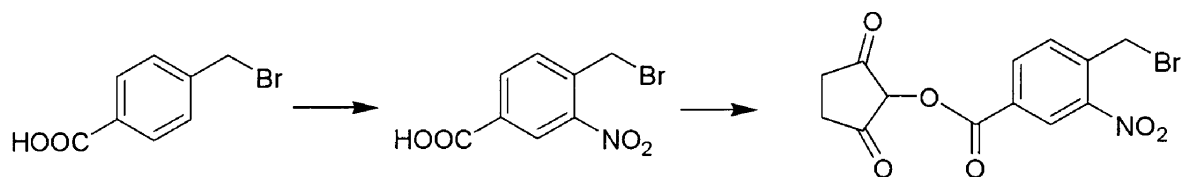
<実施例2>

### 1. 4-ブロモメチル-3-ニトロベンゾイックアシッド スクシンイミドエステルの合成

【0098】

【化10】

化10



【0099】

4-(ブロモメチル)安息香酸 (東京化成社製, 5g) を、氷冷しながら70%硝酸 (100ml) に徐々に加えた。室温にて2時間攪拌した後、反応液を氷水へ投入して得られた析出物をろ別し、これをメチレンクロリド-ヘプタンから再結晶して、4-ブロモメチル-3-ニトロベンゾイックアシッドを得た。これを乾燥後、アセトニトリル20mlに溶解し、N-ヒドロキシスクシンイジド (和光純薬社製, 1.05g) とジシクロヘキシルカルボジイミド (和光純薬社製, 2.15g) を加えて一晚室温にて攪拌した。尿素誘導体をろ過にて除いた後に、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をメチレンクロリド-ヘプタンから再結晶して4-ブロモメチル-3-ニトロベンゾイックアシッド スクシンイミドエステルを得た。本化合物の構造は、プロトン核磁気共鳴スペクトル (1H-NMR) により確認した。

【0100】

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm); 2.94 (1重線, 4H), 4.87 (1重線, 2H), 7.78 (2重線, 1H), 8.34 (2重線-2重線, 1H), 8.78 (2重線, 1H) .

【0101】

### 2. ガラス平板への光開裂性リンカーを介した核酸の固定化

10

20

30

40

50

蛍光色素 (Cy3) を5'末端に、炭素鎖 (C6) を介してチオール基を3'末端に修飾した9塩基からなる核酸鎖 (日本ジーン社製) を、pH7.0の100mMリン酸緩衝液 (ジメチルホルホルムアミド20%含有) に溶解させて、3 mMの核酸溶液を調製した。この溶液と、4-ブロモメチル-3-ニトロベンゾイックアシッド スクシンイミドエステルのpH8.6の100mMリン酸緩衝液溶液の10 mM溶液との同量混合液を調製した。そして、トリメトキシアミノプロピルシランを使用して表面へアミノ基を導入したガラス平板 (松浪硝子工業社製・NEOカバーガラス 24×32) 上へ、先に調製した混合溶液を、金属製針を用いてスポットした。このまま一晩放置した後、水で十分に洗浄した。

蛍光顕微鏡下で蛍光色素 (Cy3) からの蛍光を観察することにより、固定化を確認した。

10

#### 【0102】

##### 3. 核酸のハイブリダイゼーション反応

先に固定化した核酸鎖と相補的配列をもった、蛍光色素 (Cy5) を5'末端に修飾した9塩基からなる核酸鎖 (エスベックオリゴ社製) を、5×SSC (クエン酸ナトリウム-食塩緩衝液, 同仁化学研究所社製) - 0.5% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム, 和光純薬社製) 溶液に溶解させプローブ溶液を調製した。

先に核酸をスポットしたガラス平板へ、プローブ溶液を載せ、65℃にて20時間インキュベーションを行い、交差反応を実施した。反応後、2×SSC-0.1% SDS溶液にて2回、0.2×SSC-0.2% SDS溶液にて4回洗浄した後、蛍光顕微鏡により、Cy5からの蛍光を観察して、ハイブリダイゼーション反応が進行したことを確認した。

20

#### 【0103】

##### 4. 光照射による回収

ハイブリダイゼーション反応後のガラス平板上の試料が載っている部分へ、紫外線 (356ナノメートル光) 照射装置 (ウシオ電機社製, 250 kW高圧水銀灯-オブチブックス装置) を使用して、紫外線を20分間照射した。リン酸緩衝液 (20%ジメチルホルムアミド含有) を用いて、光照射によるリンカー光開裂反応によって基板から脱離した核酸試料を回収した。回収した試料溶液を濃縮後、キャピラリー電気泳動装置において、2種の蛍光色素 (Cy3とCy5) の検出することにより、目的の回収が達成できていることを確認した。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0104】

【図1】図1は基板表面の拡大模式図である。

【図2】図2は分析システムの構成図である。

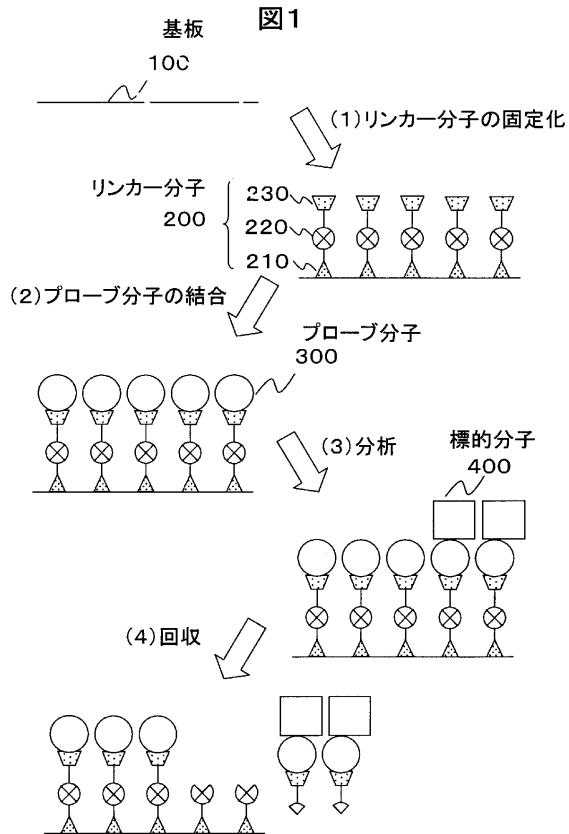
#### 【符号の説明】

#### 【0105】

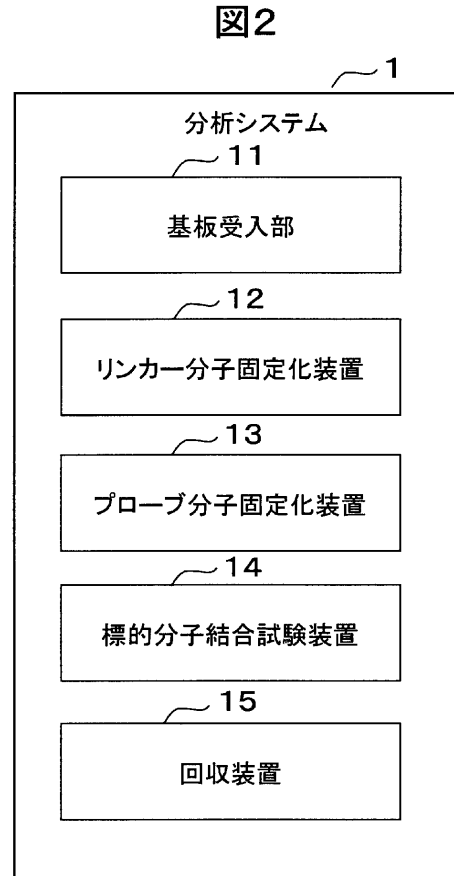
100...基板、200...リンカー分子、300...プローブ分子、400...標的分子、1...システム、11...基板受入部、12...リンカー分子固定装置、13...プローブ分子固定装置、14...標的分子結合試験装置、15...回収装置

30

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 37/00 (2006.01)** G 0 1 N 33/543 5 2 5 U  
G 0 1 N 37/00 1 0 2

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 9 8  
C 1 2 M 1 / 0 0  
C 1 2 N 1 5 / 0 9  
C 1 2 Q 1 / 6 8  
G 0 1 N 3 7 / 0 0