

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年8月2日(02.08.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/102329 A1

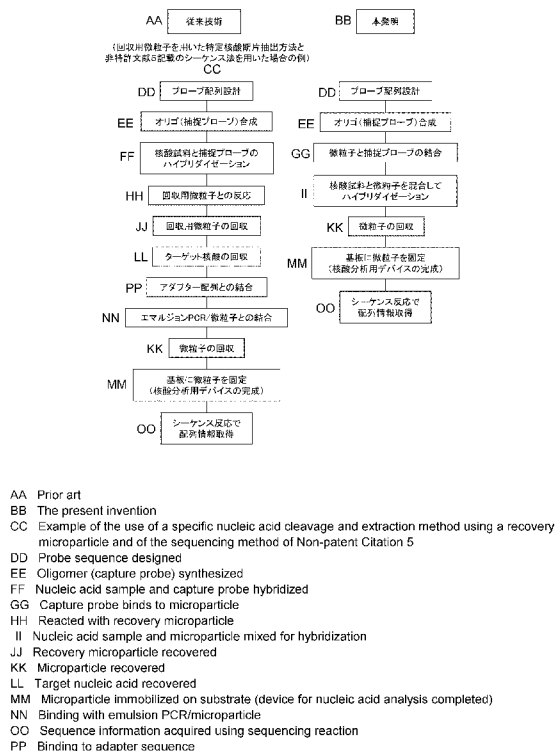
- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/051636
- (22) 国際出願日: 2012年1月26日(26.01.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-013554 2011年1月26日(26.01.2011) JP
特願 2011-074849 2011年3月30日(30.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立ハイテクノロジーズ(HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 齋藤 俊郎 (SAITO Toshiro) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 今井 一成(IMAI Kazumichi) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 小原 隆之(OBARA Takayuki) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 多羅沢 依莉(TARASAWA Eri) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: ポレール特許業務法人(POLAIRE I.P.C.); 〒1040032 東京都中央区八丁堀二丁目7番1号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,

[続葉有]

(54) Title: MICROPARTICLE HAVING SINGLE-MOLECULE NUCLEIC ACID PROBE, METHOD FOR PRODUCING SAME, METHOD FOR ANALYZING NUCLEIC ACID USING SAME, DEVICE FOR NUCLEIC ACID ANALYSIS, AND APPARATUS FOR ANALYZING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 単分子プローブ核酸付微粒子、その製造方法、それを用いた核酸分析方法、核酸分析用デバイス及び核酸分析装置

[図2]



(57) Abstract: A microparticle having a probe molecule able to capture a specific nucleic acid group to be analyzed is used to extract only the specific nucleic acid group to be analyzed from a nucleic acid sample and the microparticle is thereafter directly immobilized on a smooth plate, whereby a device for nucleic acid analysis is rapidly prepared. Immobilizing a single capture probe molecule onto an individual microparticle in advance and forming, at regular positions on the smooth substrate, an adhesion pad on which a functional group that binds to the microparticle has been introduced makes it possible to readily and rapidly prepare the device for nucleic acid analysis, where the nucleic acid sample to be analyzed is arranged molecule by molecule in a lattice shape on the smooth substrate. Combination with a sequencing method for measuring a nucleic acid elongation reaction in real-time makes it possible to readily and rapidly analyze the sequence of a targeted nucleic acid molecule. Further, in the present invention, a hybridization nucleic acid for hybridizing with a complementary strand of nucleic acid on a recovery microparticle and a probe nucleic acid molecule adapted for hybridization with the sample nucleic acid for analysis are provided on the same microparticle, and a microparticle having a single-molecule nucleic acid probe is thereby efficiently produced.

(57) 要約:

[続葉有]



CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ

シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

解析対象となる特定の核酸群を捕捉できるプローブ分子を有する微粒子を用いて、核酸試料中から、解析対象の特定核酸群のみを抽出した後、直接、この微粒子を平滑基板上に固定することで核酸分析用デバイスを迅速に作製する。微粒子には予め、捕捉プローブ分子を微粒子 1 個に一分子固定しておくこと、平滑基板上には、微粒子と結合する官能基を導入した接着パッドを規則的な位置に形成しておくことで、平滑基板上に解析対象の核酸試料を一分子ずつ格子状に配置した核酸分析用デバイスを簡便・迅速に作製できる。核酸の伸長反応をリアルタイムで計測するシーケンス方法と組み合わせることで、標的核酸分子の配列解析が簡便・迅速に実施できる。さらに、本発明は、回収微粒子上の相補鎖核酸とハイブリダイゼーションするハイブリ核酸と、分析用の試料核酸とハイブリダイゼーションするためのプローブ核酸分子を同一の微粒子上に設けることで、単分子プローブ核酸付き微粒子を効率よく製造する。

明 細 書

発明の名称：

単分子プローブ核酸付微粒子、その製造方法、それを用いた核酸分析方法、核酸分析用デバイス及び核酸分析装置

技術分野

[0001] 本発明は、単分子プローブ核酸付微粒子、その製造方法、それを用いた核酸分析方法、核酸分析用デバイスや核酸分析装置に関する。

背景技術

[0002] 近年、平滑基板上に、核酸断片試料を数多く固定することにより、パラレルに数多くの断片の配列情報を決定する方法が開発され、実用化されつつある。

[0003] 解析対象の核酸試料として、全ゲノムDNAや全RNA、メッセンジャーRNAの逆転写物であるcDNAライブラリーを用いた解析が広くおこなわれているが、一方、ゲノムDNAやRNAの特定部位のみを解析対象として解析する方法も、解析費用と解析時間を節約する観点から、広がりつつある。また、疾患関連の遺伝子群やゲノム上の領域を絞り、その代わり配列解析の冗長度を上げることで、一塩基の精度で配列解析する優位性も認められつつある。例えば、がんやクローン病、統合失調症などの疾患と関連性の高いゲノム上の特定領域が報告されてきている。がんはゲノムの異常が引き金になって起こる疾患であり、発症する組織、病態のステージ、個々人が本来持っている多型などによって配列解析すべき領域が異なるが、数十から数十kbに渡る領域で欠損・挿入・コピー数異常などの構造異常が報告されている（非特許文献1）。また、全消化管全域で炎症・潰瘍を起こす原因不明の非特異性炎症性疾患であるクローン病においても、例えば、免疫関連GTPaseファミリーM（immunity-related GTPase family, M）遺伝子上流側約20kにわたる塩基領域の欠損が発症と高い関連性を示すことが最近報告されている（非特許文献2）。統合失調症においても発症と関連性のある複数の遺伝子座が報

告されている（非特許文献3）。

[0004] 上記のように、特定の遺伝子群、関連パスウェイに関わる遺伝子群、関連遺伝子の上流、下流を含めたゲノム上の領域やホットスポットと呼ばれる塩基変異速度の速い塩基領域などを対象とする、解析する塩基領域を限定した配列解析は、臨床応用の観点からも非常に有用であることが認識されつつある。

[0005] この解析する塩基領域を限定した配列解析に対して、従来の方法では、まず、特定の配列断片を捕獲するためのプローブを有する微粒子担体あるいは前記プローブを平滑基板上に固定したマイクロアレイを用いて所望の配列断片群を抽出・分離溶出して解析用の核酸試料溶液を調整し、次に、既存のシーケンサで配列解析を行うことが常套手段である。すなわち、特定の核酸試料溶液を調整しPCRで増幅した後、各シーケンサに用いられる測定用基板上に固定することで核酸分析用デバイスを作製し、各シーケンサで配列解析をおこなうというものである。これら従来の方法では、特定配列断片の抽出・分離工程と、試料断片末端にアダプター配列をライゲーションで導入した後エマルジョン（油滴）中あるいは平滑基板上でPCR増幅反応を行うなどの一連のシーケンサで分析するためのサンプル試料の前処理工程が完全に分離しており、煩雑なウェット処理が必要であった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第3897086号

特許文献2：US2003-0064400

特許文献3：US2005-0250117

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nature 2009, Vol. 458, pp. 719-724.

非特許文献2：Nature 2008, Vol. 447, pp. 661-678.

非特許文献3：Nature 2008, Vol. 455, pp. 919-923.

非特許文献4：Nanotechnology, 2007, Vol. 18, pp. 044017-044021.

非特許文献5 : Genome Research 2008, Vol. 18, pp. 1051-1063.

非特許文献6 : P.N.A.S. 2006, Vol. 103, pp. 19635-19640.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本願発明者が解析対象の特定核酸断片の抽出と並列シーケンス方法を連続的で簡便な処理で行う方法について鋭意検討した結果、次のような知見を得るに至った。
- [0009] 抽出のための支持担体には100nm以下の微小な微粒子を用い、捕捉プローブは微粒子担体1個に一分子とすること、及び、標的核酸断片を捕獲後、支持担体の微粒子を平滑基板上に形成しておいたパッド上に選択的に固定することで、単分子シーケンスに必要な分析デバイスが簡便・迅速に作製できることを見出した。
- [0010] 微粒子担体1個に複数種の捕捉プローブをつけたのでは、捕捉後捕捉した特定核酸断片を切断・分離しなければならない。また、微粒子担体1個に単一種の捕捉プローブを複数分子固定するためには、微粒子担体と膨大な数の捕捉プローブとの反応をプローブごと個別に行わなければならない、現実的ではない。一方、捕捉プローブ分子数を微粒子担体1個に一分子とすることで、捕捉プローブの混合液と微粒子との固定反応を1回行えば十分であることを見出した。さらに、パッド径を微粒子径と同等あるいは同等以下に作製することで、パッド1個に微粒子1個を固定することが可能であり、最終的に、平滑基板上に、特定核酸断片を一分子ずつ格子状に固定した核酸分析用デバイスを簡便・迅速に作製することができることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0011] 単分子核酸付き微粒子の製造方法に関しては、特許文献2及び3に、その方法が開示されている。特許文献2では、二本鎖核酸の両末端にビオチンとDigoxigeninを修飾し、ビオチン付き磁性微粒子とDigoxigenin抗体付き回収微粒子を用いて単分子核酸付き磁性微粒子を捕獲した後、最後に、高pHの変性条件下で回収微粒子と単分子核酸付き磁性微粒子を分離し、磁石を用いて単

分子核酸付き磁性微粒子を収集する方法が開示されている。

特許文献3では、単分子核酸付き微粒子の製造方法として、3通りの方法が開示されている。方法(a)：二本鎖核酸の末端にoligo-dAと反応基（ビオチンなど）付きCapping oligonucleotideを修飾し、基板上一定の間隔を設けているBinding Agentの頂点に単分子レベルで固定されているoligo-dTとハイブリダイゼーションさせ、二本鎖核酸を固定する。次に、結合サイト（アビジンなど）を有する微粒子と反応基を結合させる。最後に、加熱或は高pHの条件下でoligo-dAとoligo-dTを分離し、単分子核酸付き微粒子を回収する。方法(b)：末端ビオチン修飾の一本鎖核酸を作製し、アビジン付き微粒子と反応させ、多分子一本鎖核酸付き微粒子を得る。相補鎖核酸をばら撒いた基板上に、多分子核酸付き微粒子をハイブリダイゼーションさせる。更に、一本鎖核酸だけ消化するexonucleaseを用いてハイブリダイゼーションできなかった多くの一本鎖核酸を消化する。最後に、加熱或は高pHの条件下で二本鎖核酸を解離させ、単分子核酸付き微粒子を回収する。方法(c)：二本鎖核酸と微粒子を結合反応させてから電場をかけ、帯電荷量の違いにより多分子核酸付き微粒子と単分子核酸付き微粒子を分離する。

[0012] 特許文献2に記載されている方法は、高pHのディネイチャー条件下で二本鎖核酸を分離する方法である。但し、再ハイブリダイゼーションが起きるため、単分子核酸付き微粒子の回収は困難であった。

[0013] 特許文献3に記載されている方法(a)は、oligo-dTが単分子レベルで基板上一定の間隔を設けているBinding Agentの頂点に固定されることが困難であった。方法(b)では、相補鎖核酸をばら撒いた基板上に、多分子一本鎖核酸付き微粒子をハイブリダイゼーションさせる時、二組以上の一本鎖核酸と相補鎖核酸が反応すると、回収した微粒子上に二本以上の一本鎖核酸が存在してしまうという問題があった。方法(c)も、電気泳動により帯電荷量の違いに基づいて単分子核酸付き微粒子だけを分離させようとしても分布がスメア状となり分離が明確でなく回収が困難であった。

[0014] 本発明の目的は、核酸断片試料の中から、配列解析の対象とする特定の核

酸断片のみの配列情報を簡便・迅速に解析する方法を提供することである。特に、mutationが入る危険性やポピュレーションにバイアスが掛かる危険性があり、かつ、試料の調整に時間の掛かるPCR等の増幅反応を用いないで解析する方法を提供することである。また、これを実現する為に必要な、単分子プローブ核酸付微粒子及びその製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明は、PCR等の増幅反応を用いずに、核酸断片試料の中から、配列解析の対象とする特定の標的核酸断片のみを抽出するとともに、前記標的核酸断片を担体ごと平滑基板上に固定した上で、シーケンス反応、例えば相補鎖合成反応時に取り込ませる蛍光色素付き塩基を分析することで、所望の核酸断片群の塩基配列情報を得ることができる。配列解析の対象とする特定の標的核酸断片のみを抽出するために、単分子プローブ核酸付微粒子を用いる。単分子プローブ核酸付微粒子の製造方法では、回収微粒子と単分子プローブ核酸付微粒子を分離する方法がキイとなるが、本発明では、固定微粒子上に、回収微粒子上の相補鎖核酸とハイブリダイゼーション用のハイブリ核酸と、分析用の試料核酸とハイブリダイゼーションするためのプローブ核酸を有することで、効率よくかつ確実に、固定微粒子を回収することを実現した。図1に、固定微粒子と回収微粒子の構成を示した。ここで、プローブ核酸は、試料核酸を捕捉するための固定微粒子上に固定される核酸である。ハイブリ核酸は、回収微粒子に捕捉されるための固定微粒子上に固定される核酸である。相補鎖核酸は、ハイブリ核酸とハイブリダイゼーションするための核酸である。固定微粒子上に試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸と回収微粒子に捕捉されるためのハイブリ核酸が繋がっており、プローブ核酸とハイブリ核酸の間の繋がる部分に固定微粒子と結合するための結合サイトが独立に存在することで、多種類のプローブ核酸が固定された固定微粒子を同一の回収微粒子で簡便に回収できることを実現した。固定微粒子と回収微粒子の結合を制限酵素消化法を用いて切断する場合、ハイブリ核酸と相補鎖核酸にXho I配列のような制限酵素消化サイトを持たせる。制限酵素消化法以外の切断

方法にはハイブリ核酸と固定微粒子への結合サイトの間に光反応や薬液による化学反応などにより容易に切断可能なリンカーを設けることができる。

発明の効果

[0016] 本発明により、標的核酸断片の抽出工程と核酸分析用デバイスへの固定工程を連続的で簡便な処理で行うことを実現することで、PCR等の増幅反応を用いることなく、解析対象の核酸断片のみの配列解析を、簡便・迅速に行うことができる。特に、増幅反応に伴う、一塩基置換やポピュレーションへのバイアスの危険性なく、迅速に配列解析を行うことができる。さらに、本発明により、単分子プローブ核酸付き微粒子が効率よく作製され、高密度に且つ規則正しく整列させて基板に固定でき、高スループットに核酸試料を分析することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1] (a) は、本発明の一実施例に係る単分子プローブ核酸付き微粒子の間生成物であるプローブ核酸付き微粒子を示す模式図、(b) は、前記プローブ核酸付き微粒子を回収するための回収微粒子を示す模式図。

[図2] 本発明と従来技術のワークフローを説明するための図。

[図3] 標的核酸の捕捉工程と核酸分析用デバイスの作製工程の一例を説明するための図。

[図4] 核酸分析用デバイスを用いた核酸分析方法の一例を説明するための図。

[図5] 核酸分析用デバイスの構成の一例を説明するための図。

[図6] 核酸分析用デバイスの製造方法の一例を説明するための図。

[図7] 本実施例に係る単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法における工程の一例を説明するための概略図。

[図8] 上記単分子核酸付き微粒子の製造方法において、単分子核酸付き微粒子を回収微粒子により回収した後に、これらの微粒子を分離する工程（切断方法）の具体例 (a) , (b) を示す模式図。

[図9] 前記核酸分析デバイスを用いた核酸分析装置の一例を説明するための概略図。

[図10]単分子核酸付き微粒子を基板上固定後の蛍光画像及び単分子輝点の波形図。

発明を実施するための形態

[0018] 実施例では、解析対象となる特定の核酸群を捕捉できるプローブ分子を有する微粒子を用いて、核酸試料中から、前記解析対象の特定の核酸群を抽出する工程と、前記微粒子を基板上に固定する工程と、前記基板上に固定された微粒子上の核酸群に対して配列解析を行う工程を含むことを特徴とする、核酸分析方法を開示する。

[0019] また、実施例では、前記核酸群を抽出する工程で用いる微粒子は、一微粒子当り一分子のプローブ分子を有することを特徴とする、核酸分析方法を開示する。

[0020] また、実施例では、前記微粒子を前記基板上に固定する工程が、前記基板上に備えられた接着用パッド上に前記微粒子を固定する工程であることを特徴とする、核酸分析方法を開示する。

[0021] また、実施例では、前記基板上に固定された微粒子上の特定の核酸群に対して配列解析を行う工程として、蛍光標識を有する複数種のヌクレオチドを前記基板上に供給し、前記基板上で核酸試料一分子に対する相補鎖一分子合成反応を起こし、取り込まれるヌクレオチドに付随する蛍光色素の蛍光強度を計測することで、前記核酸群の配列情報を得ることを特徴とする、核酸分析方法を開示する。

[0022] また、実施例では、解析対象となる特定の核酸群を捕捉できるプローブ分子を有する微粒子を用いて、核酸試料中から、前記解析対象の特定の核酸群を抽出した後、前記微粒子を前記基板上に固定することを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法を開示する。

[0023] また、実施例では、前記微粒子が一個当たり前記プローブ分子を一分子有することを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法を開示する。

[0024] また、実施例では、前記基板上の前記微粒子の固定位置に接着用パッドを設け、前記微粒子を前記接着用パッド上に固定することを特徴とする、核酸

分析用デバイスの製造方法を開示する。

[0025] また、実施例では、前記微粒子を前記基板上の規則的に固定することを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法を開示する。

[0026] また、実施例では、前記核酸分析用デバイスの製造方法において、前記微粒子が、高分子材料、半導体、又は金属から選ばれる材料からなることを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法を開示する。

[0027] また、実施例では、基板と、解析対象の特定核酸群を抽出した、プローブ分子を有する微粒子と、を有する、核酸分析用デバイスと、前記核酸分析用デバイスに対して、蛍光色素を有するヌクレオチド、及び核酸合成酵素を供給する手段と、前記核酸分析用デバイスに光を照射する手段と、前記核酸分析用デバイス上において前記ヌクレオチド、前記核酸合成酵素が共存することにより起きる核酸伸長反応により核酸鎖中に取り込まれた蛍光色素の蛍光を測定する発光検出手段と、を備え、前記解析対象となる特定の核酸群の塩基配列情報を取得する核酸分析装置を開示する。

[0028] また、実施例では、基板と、解析対象の特定核酸群を抽出した、プローブ分子を有する微粒子と、を有し、前記微粒子が前記基板上に固定されていることを特徴とする、核酸分析用デバイスを開示する。

[0029] また、実施例では、前記微粒子が一個当たり前記プローブ分子を一分子有することを特徴とする、核酸分析用デバイスを開示する。

[0030] また、実施例では、前記基板上には接着用パッドが設けられており、前記微粒子は、前記接着用パッド上に固定されていることを特徴とする、核酸分析用デバイスを開示する。

[0031] また、実施例では、前記微粒子は、前記基板上に規則的に固定されていることを特徴とする、核酸分析用デバイスを開示する。

[0032] また、実施例では、前記核酸分析用デバイスにおいて、前記微粒子が、高分子材料、半導体、又は金属から選ばれる材料からなることを特徴とする、核酸分析用デバイスを開示する。

[0033] また、実施例では、試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸を固定した固

定微粒子を有する単分子プローブ核酸付き微粒子の中間生成物であるプローブ核酸付き微粒子であって、前記プローブ核酸と、前記プローブ核酸付き微粒子を回収するための回収微粒子に捕捉されるハイブリ核酸とが、各々、前記固定微粒子上に一分子で存在することを特徴とするプローブ核酸付き微粒子を開示する。

[0034] また、実施例では、試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸を固定した固定微粒子を有する単分子プローブ核酸付き微粒子の中間生成物であるプローブ核酸付き微粒子であって、前記プローブ核酸と、前記プローブ核酸付き微粒子を回収するための回収微粒子に捕捉されるハイブリ核酸とが繋がっており、前記プローブ核酸と前記ハイブリ核酸の間の繋がる部分には、この繋がる部分が前記固定微粒子に結合するための結合サイトが存在していることを特徴とするプローブ核酸付き微粒子を開示する。

[0035] また、実施例では、前記プローブ核酸付き微粒子における前記プローブ核酸に、試料核酸をハイブリダイゼーションさせることで、前記固定微粒子の存在を調べる工程を含むことを特徴とする核酸分析方法を開示する。

[0036] また、実施例では、前記プローブ核酸と前記ハイブリ核酸を有する前記プローブ核酸付き微粒子を得る工程と、前記ハイブリ核酸の相補鎖の配列を有する相補鎖核酸分子が結合されている前記回収微粒子を用いて、前記相補鎖核酸分子を前記ハイブリ核酸とハイブリダイゼーションさせることにより、前記プローブ核酸付き微粒子を回収する工程と、を含むことを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法を開示する。

[0037] また、実施例では、前記単分子プローブ核酸付き微粒子を製造する過程で、請求項2に記載の前記プローブ核酸付き微粒子を得る工程において、前記プローブ核酸と前記ハイブリ核酸の間に存在する前記結合サイトを前記固定微粒子と結合するために、ビオチン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェノール、グルタチオン、レクチンからなる群から選ばれた1種が修飾されていることを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法を開示する。

[0038] また、実施例では、前記プローブ核酸付き微粒子を、前記ハイブリ核酸の相補鎖の配列を有する相補鎖核酸分子が結合されている前記回収微粒子を用いて、前記プローブ核酸付き微粒子を回収した後に、制限酵素で消化、紫外線照射、プロテアーゼで消化、エステラーゼで消化、D T T、及び β -メルカプトエタノールを用いてジスルフィド結合の切断を行い、糖分解酵素で消化からなる群から選ばれる方法で前記ハイブリ核酸を前記プローブ核酸から切断することにより、単分子プローブ核酸付き微粒子を得ることを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法を開示する。

[0039] また、実施例では、前記切断方法は制限酵素を用いて消化する方法である場合、前記ハイブリ核酸と相補鎖核酸にXho I配列のような制限酵素消化サイトを有することを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法を開示する。

[0040] また、実施例では、前記切断方法は制限酵素消化法以外の方法を用いる場合、ハイブリ核酸とビオチン修飾の間には、光開裂リンカー、ペプチド型リンカー、エステル結合型リンカー、ジスルフィド結合型リンカー、糖鎖型リンカーからなる群から選ばれる1種のリンカーを有することを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法を開示する。

[0041] また、実施例では、前記プローブ核酸とハイブリ核酸の鎖長は20mer以上であることを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法を開示する。

[0042] 以下、上記及びその他の本発明の新規な特徴と効果について、図を参照して説明する。ここでは、本発明を完全に理解してもらうため、特定の実施形態について詳細な説明を行うが、本発明はここに記した内容に限定されるものではない。

実施例 1

[0043] 本発明と従来技術でのワークフローを比較したものを図2に示す。まず、従来技術でのワークフローについて説明する。

[0044] 初めに、解析対象の核酸断片群を捕捉するため、その相補配列を対象に、

特異性と T_m （二本鎖の安定性）を考慮して配列を決定する。回収用微粒子との結合を行うことを考慮し、ビオチンを修飾しておくのが一般的である。核酸試料とのハイブリダイゼーション後に、表面にアビジンを修飾した回収用磁気微粒子を核酸溶液中に入れ、磁石によって回収する。その後、90℃程度の高温加熱処理により二本鎖を分離させて一本鎖とすることで標的の核酸断片を得る。ここまでの特定配列核酸断片の抽出工程である。

[0045] 次に、シーケンサ用試料の前処理工程に入る。ここでは、現在、広く用いられている、非特許文献5に記載のシーケンス法（逐次反応方式）を用いた場合の手順操作について説明する。まず、全DNA試料断片共通のPCR増幅反応用のプライマー配列を持たせるために、10から20塩基程度のアダプター塩基配列をライゲーション反応で全DNA試料断片末端に付加する。次に、DNA試料断片、担体微粒子、DNA合成酵素、プライマーをエマルジョン（油滴）中に分散させてPCR増幅反応を行い、微粒子を回収することで、PCR産物が表面の固定された微粒子を得る。次に、この微粒子をスライドガラス表面にランダムに固定することで、核酸分析用デバイスを得る。シーケンス法は、一塩基伸長・観察・洗浄を4塩基分だけ繰り返し行う逐次反応方式により、標的核酸断片の配列情報を得る。PCR増幅反応によって、同一の配列を有する1000分子程度が固定された微粒子単位でシーケンス反応を行うため、微粒子を用いて抽出した核酸断片を一度分離し、一分子ずつ再度微粒子担体に固定せねばならないため、抽出からシーケンス反応まで連続的に簡便な操作では配列情報を得ることはできなかった。

[0046] 次に、本発明のワークフローについて説明する。

[0047] 初めに、解析対象の核酸断片群を捕捉するための捕捉プローブの配列設計が必要である。捕捉方法としては、ハイブリダイゼーションを用いることができる。ハイブリダイゼーションを用いる場合には、捕捉プローブの塩基配列として配列解析対象の特定の核酸断片の相補配列の一部を使うことができる。その際、配列の特異性を十分確保するとともに T_m 値はすべての捕捉プローブ核酸と配列対象の核酸断片との組合せで均一にすることが好ましい。ハ

イブリダイゼーションで形成した二本鎖の安定性を揃えておくことで、平滑基板に固定した以降の反応条件ですべての配列対象核酸断片を基板に固定しておくことができる。上記のような配列設計には、例えば、特許文献1に開示されている方法を用いることができる。

[0048] 次に設計した配列に基づいてオリゴを合成する。オリゴの塩基長に特に制限はないが、実用的な T_m 値を考慮すると20から100塩基の範囲が好ましい。微粒子との結合を考慮して、オリゴの末端に官能基を修飾しておくことが好ましい。例えば、オリゴ末端にビオチン、アミノ基、スルホヒドリル基を修飾しておき、一方、微粒子表面には、それぞれ、アビジン、スクシンイミド、マレイミドを修飾しておくことで、微粒子と捕捉プローブとの結合を完成することができる。微粒子としては、高分子材料、半導体、又は金属から選ばれる材料からなるものを用いることができる。微粒子の大きさに特に制限はないが、凝集を防ぐなどのハンドリングの点、平滑基板上に固定する際に接着パッドを用いる場合には接着パッドの直径と同等以上の大きさを持ったほうがパッド当たりの固定微粒子数を1個に限定する上で有利である点、平滑基板の裏面より励起光を照射してエバネッセント光でDNA伸長反応中に取り込まれる基質のラベル蛍光色素を励起する場合には微粒子が大きすぎると平滑基板と色素との距離が遠くなりエバネッセント光の強度が落ち色素の蛍光強度が弱くなってしまう点、などを考慮して微粒子サイズを決めることが好ましい。以上の点を考慮すると、10nm～100nm程度の直径のものが好ましいと判断される。微粒子1個に捕捉プローブを一分子固定する方法については、実施例4において詳細を開示する。

核酸試料中に、捕捉プローブが固定された微粒子を投入し、ハイブリダイゼーション後、微粒子を回収する。回収は、遠心分離や、磁気ビーズを用いた場合には磁石を利用することで達成できる。

[0049] 次に、回収した微粒子を平滑基板表面に固定することで核酸分析用デバイスを完成させることができる。固定方法については実施例2において詳細を開示する。

[0050] 次に、シーケンス反応により平滑基板上に微粒子を介して固定した核酸断片の配列情報を取得する。シーケンスの方法には、平滑基板上の接着パッド1箇所に核酸断片一分子を固定した核酸分析用デバイスを用いることができるので、リアルタイムでDNA伸長反応を観察することができ、一塩基伸長・観察・洗浄を4塩基分だけ繰り返し行う逐次方式に比べて、観測時間を短くかつ読取塩基長を長くすることが出来る。

[0051] 標的の核酸断片が捕捉された回収微粒子をそのまま平滑基板上に固定できるため、従来技術を用いた場合に比べ、工程数も短く、迅速・簡便に核酸分析用デバイスを完成させることができる。捕捉する核酸断片を一分子とすることでリアルタイム方式のシーケンス方法も適用でき、より一層迅速に配列情報を取得できる。

[0052] 次に、本実施例の核酸分析方法、核酸分析用デバイス及び核酸分析装置を図3及び図4を用いて詳細に説明する。微粒子201には、配列解析対象の特定の核酸断片を捕捉するための捕捉プローブ分子202を一分子だけ結合させておく。この一分子固定方法に関しては実施例2で方法の一例を詳細に開示する。前記捕捉プローブ分子202が結合した微粒子201を核酸試料溶液203の中に入れ、所定の反応時間の後に分離することで、配列解析対象の特定の標的核酸分子204を捕捉する。捕捉方法としては、ハイブリダイゼーションを用いる方法を用いることができる。標的核酸分子204の捕捉後に微粒子201を分離・回収する方法としては、微粒子201は通さないが捕捉されなかった核酸試料は通過する程度の大きさを有するメンブレンでろ過することで容易に回収できる。または、遠心分離を用いることもできる。微粒子201には化合物半導体や金属、高分子の微粒子を用いることができる。高分子材料からなる微粒子を用いた場合には、微粒子の粒径を揃えることができ、粒径の大きさも数十nmから数 μ mまで幅広く選択することが出来る。また、高分子材料が有する官能基を足場に表面修飾を施すことで、微粒子表面に固定する捕捉プローブ分子202の固定反応のための官能基の導入量を均一にすることができるという点で好ましい。特に、捕捉プローブ

分子202を一分子だけ微粒子表面に固定する場合、固定率の再現性が非常に高く、好ましい。

[0053] 回収した微粒子を直接、接着パッド205を形成した平滑基板206上に固定することで、核酸分析用デバイス207を完成できる。接着パッド205にはあらかじめ微粒子表面の官能基と結合を形成できる官能基を導入しておく。詳細は実施例2において開示する。接着パッド205の直径を微粒子201の直径と同等あるいは同等以下とすることで、接着パッド205に微粒子201を1個だけすなわち標的核酸分子204を一分子だけ固定することができる。あらかじめ、接着パッド205を平滑基板206上に格子状に整列させて作ることにより、最終的に、解析対象の標的核酸分子204を一分子ずつ平滑基板206上に格子状の整列した形態で固定した核酸分析用デバイス207を作製できる。

[0054] 本実施例の核酸分析用デバイスから核酸試料に関する情報を検出するやり方にはいくつかの方式が考えられるが、感度や簡便性の観点から蛍光検出法を用いる方式が好ましい。分析方法を図3を用いて説明する。核酸分析用デバイス207の上に微小流路301を作製することで、外部からDNA伸長反応に必要なDNA合成酵素、蛍光色素でラベルされたヌクレオチド、バッファー液、洗浄液を供給することができる。標的核酸分子204にハイブリダイゼーションしていた捕捉プローブ分子202がプライマーとして動作することで、標的核酸分子204の相補鎖の合成反応がおこる。この合成反応で取り込まれるヌクレオチドに付随した蛍光色素の蛍光を対物レンズを含む光学系302で集光した光をイメージセンサー303で、個々の接着パッド205上での伸長反応を独立且つ並列して計測することができる。例えば、ヌクレオチドの一種類を供給、未反応ヌクレオチドの洗浄、蛍光観察、違う種類のヌクレオチドの供給、以降を繰り返し行う、いわゆる逐次伸長反応方式は容易に実現できる。蛍光観察後に蛍光色素を消光するか、蛍光色素がリン酸部位に付いたヌクレオチドを用いることにより、連続的な反応を起こし、核酸試料の塩基配列情報を得ることができる。一方、4種類のヌクレオチドが各々

異なる蛍光色素を有すものを供給し、洗浄することなく、連続的な核酸伸長反応を起こし、連続的に蛍光観察を行うことで、いわゆるリアルタイム反応方式を実現することもできる。この場合、蛍光色素がリン酸部位に付いたヌクレオチドを用いると、伸長反応後リン酸部位が切断されるため、消光することなく連続的に蛍光測定して核酸試料の塩基配列情報を得ることができる。

[0055] 以上のように、本発明により、特定の核酸断片の抽出・分離・基板への固定を連続的に実施して核酸分析用デバイスを作製することができ、それを用いることで、個々の核酸断片の配列解析を並列して実施することが可能である。

実施例 2

[0056] 核酸分析用デバイスの構成の一例を、図5を用いて説明する。平滑基板401の上に接着パッド402が規則正しく、例えば図5に示すように格子状に形成されている。接着パッド402と微粒子403は、線状分子405を介して化学結合あるいは化学的相互作用により結ばれている。線状分子405の末端の官能基406と、接着パッド402とは化学的相互作用により結合していることが好ましい。その際、官能基406は、平滑基板401との相互作用が弱く、接着パッド402との相互作用が強いことが好ましい。このような観点から、平滑基板としては、石英ガラス、サファイア、シリコン基板などを用いることができる。また、接着パッド402には、金、チタン、ニッケル、アルミから選ばれる材料で構成することができる。官能基406には、平滑基板401と接着パッド402との組合せを考えて選択せねばならないが、例えば、スルホヒドリル基、アミノ基、カルボキシル基、リン酸基、アルデヒド基等を用いることができる。線状分子405は、微粒子403と接着パッド402を結ぶ役割を果たし、長さに大きな限定はないが、低分子の場合には炭素数にして3から20程度の直鎖状分子が好ましい。線状分子405の末端の官能基407は、微粒子403との接着性をもたらす。また、線状分子405として高分子を用いる場合には、複数の側鎖を有し

、官能基406を有する側鎖と官能基407を持つ側鎖を併せ持つものを用いることができる。微粒子403としては、金属微粒子や半導体微粒子を用いることができる。例えば、金の微粒子として、直径5 nm～100 nmのものが市販されており、活用することができる。また、半導体微粒子としては、直径が10 nm～20 nm程度のCdSe等の化合物半導体が市販されており、活用することができる。官能基407として用いることができる官能基は、微粒子の種類によって異なるが、例えば金微粒子を用いた場合にはスルホヒドリル基、アミノ基等が好ましい。半導体微粒子を用いる場合には、ストレプトアビジンで表面が修飾された微粒子が市販されており、官能基407としてビオチンを用いることができる。標的核酸408を捕捉する捕捉プローブ分子404には、DNAやRNAの核酸分子の一本鎖を用いることができる。核酸分子の末端を官能基407と同様に予め修飾しておき、微粒子403と反応させておく。一つの微粒子403に固定する捕捉プローブ分子404は一分子であることが好ましく、接着パッド402の上には標的核酸408も一分子だけ固定されることになる。

[0057] 簡便な蛍光検出でプローブを識別する場合回折限界を考慮するとプローブ間が1 μ m程度離れていることが好ましい。したがって、微粒子403のサイズは1 μ m以下であることが適している。

[0058] 接着パッド402を平滑基板401上に形成する方法としては、半導体で既に実用化されている薄膜プロセスを活用することができる。例えば、マスクを通した蒸着・スパッタリング、あるいは蒸着・スパッタリングにより薄膜を形成した後、ドライあるいはウェットエッチングにより製造することができる。規則正しく配置することは、薄膜プロセスを用いることで容易に実現できる。パッド間の間隔は任意に設定できるが、検出手段として光計測を行う場合、光検出の回折限界を考えると1 μ m以上が好ましい。

[0059] 接着パッド402を平滑基板401上に形成した後、微粒子403と接着パッド402を結ぶ線状分子405を供給し、接着パッド402上に線状分子405を固定する。この際、平滑基板401上での非特異的吸着を防止す

る目的で、線状分子405を供給する前に、平滑基板401との接着力の強い材料を平滑基板401上に反応させる方法が有効である。例えば、シランカップリング剤等が利用できる。次に、標的核酸分子408を捕捉プローブ分子404で捕捉した後の微粒子を基板上に供給して、微粒子403を接着パッド402上に固定させることにより、核酸分析用デバイスを完成する。

[0060] 接着パッド402上に微粒子403を固定させる際、一つの接着パッド402に複数個の微粒子403が固定される可能性がある。複数個が固定されてしまうと、種類の違う核酸断片の情報が重なり合ってしまう、正確な核酸分析ができなくなってしまう。そのため、一つの接着パッド402には、1個の微粒子403を固定させねばならない。そこで、発明者らは、種々の条件での固定実験を繰り返し、鋭意検討した結果、接着パッド402の直径dが微粒子303の直径Dに比べて小さい、という条件が成り立てば、一つの接着パッド402に1個の微粒子403を固定できることを見出した。接着パッド402に比べて同等以上の大きさの微粒子403が固定されると、未反応の線状分子が固定された微粒子に覆い隠されてしまい、別の微粒子と反応できなくなってしまうものと説明される。さらに、鋭意検討を続けた結果、微粒子403がその表面に電荷を有する場合には、微粒子間に静電的な反発力が働くため、接着パッド402の直径dが微粒子403の直径Dに比べて大きい場合にも接着パッドあたりの固定微粒子数が1個になることが判明した。したがって、微粒子403の表面電荷が小さく静電反発力が弱い場合には、接着パッド402の直径dが微粒子403の直径Dに比べて小さいことが好ましく、微粒子403の表面電荷が大きく静電反発力が強い場合には、接着パッド402の直径dは必ずしも微粒子403の直径Dよりも小さくなくても良いことが明らかとなった。

実施例 3

[0061] 核酸分析用デバイスの製造方法の一例を、図6を用いて説明する平滑な支持基体501上に電子線用ポジ型レジスト502をスピンコート法により塗工する。平滑な支持基体としては、ガラス基板、サファイア基板、シリコン

ウエハ等が用いられる。デバイスとしたときに、微粒子を配列した面と反対側の裏面より励起光を照射する必要がある場合には、光透過性に優れた石英基板やサファイア基板を用いればよい。電子線用ポジ型レジストとしては、例えば、ポリメチルメタクリレートやZEP-520A（日本ゼオン社製）を挙げることができる。基板上のマーカの位置を用いて位置合わせを行ったうえ電子線直描露光を行って、レジストにスルーホールを形成する。例えば、直径15nmのスルーホールを形成する。スルーホールは並行処理で解析できる核酸の分子数に依存するが、1 μ m程度のピッチで形成することが、製造上の簡便さ、歩留まりの高さ、及び並行処理で解析できる核酸の分子数を勘案すると適している。スルーホール形成領域も、並行処理で解析できる核酸の分子数によるが、検出装置側の位置精度や位置分解能にも大きく依存する。例えば、1 μ mピッチで反応サイト（接着パッド）を構成した場合、スルーホール形成領域を1mm $\times$ 1mmとすると、100万反応サイトを形成できる。スルーホールを形成後、接着用パッド503を構成する材料、例えば、金、チタン、ニッケル、アルミ、をスパッタリングで製膜する。平滑な支持基体としてガラス基板、サファイア基板を用い、接着用パッド材料として金、アルミ、ニッケルを用いる場合には、基板材料と接着用パッド材料との間に接着を補強する意味でチタンやクロムの薄膜を入れることが好ましい。次に、接着用パッド503に線状分子504を反応させる。接着用パッド503が金、チタン、アルミ、ニッケルの場合には、線状分子末端の官能基505としては、各々、スルホヒドニル基、リン酸基、リン酸基、チアゾール基を用いることが好ましい。線状分子の反対側の官能基506には、例えばビオチンを用いることができる。線状分子を接着用パッドと反応させた後、レジストを剥離する。レジストを剥離後、接着用パッドを形成した以外の平滑基板表面に非特異吸着防止処理を施す。蛍光色素付きヌクレオチドに対する吸着防止を実現するには負の電荷を帯びた官能基を有する非特異吸着防止用分子507でコートする。例えば、エポキシシランを表面にスピンコートで塗工し、加熱処理後、弱酸性溶液（pH5～pH6程度）で処理する

ことにより、エポキシ基を開環させOH基を表面に導入することで非特異吸着防止効果をもたらすことができる。

[0062] 微粒子508表面には、予めアビジン509を修飾しておくことが好ましい。金または白金微粒子を用いる場合には、アミノチオールを反応させた後、ビオチン-スクシンイミド（Pierce社製NHS-Biotin）を反応させ、最後にストレプトアビジンを反応させることにより、アビジン修飾することが容易にできる。金または白金以外の金属微粒子を用いる場合には、酸素雰囲気中で加熱処理することにより表面を酸化処理した後、アミノシランを反応させ、次にビオチン-スクシンイミド（Pierce社製NHS-Biotin）を反応させ、最後にストレプトアビジンを反応させる。これにより、金属微粒子表面をアビジン修飾することが容易にできる。微粒子として、半導体微粒子を用いる場合には、市販の微粒子を用いることができる。例えば、直径が15～20nmである製品名「Qdot(R)ストレプトアビジン標識」（インビトロジェン社製）を利用することができる。捕捉プローブ510としてオリゴヌクレオチドを用いる場合には、末端をビオチン修飾して合成しておくことにより、容易に微粒子上に固定できる。核酸捕捉プローブ510を固定した微粒子を核酸試料溶液中に入れてハイブリダイゼーションにより標的核酸断片511を捕捉した後、微粒子を回収後、接着用パッドと反応させることにより、本実施例の核酸分析用デバイスを製造することができる。

実施例 4

[0063] 以下、本実施例に係る単分子プローブ核酸付き微粒子の具体例を、詳述する。

[0064] 図1(a)に示すように、単分子プローブ核酸を固定するための固定微粒子101上には、

試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸105と回収微粒子108（図1(b)）に捕捉されるためのハイブリ核酸103とが各々単分子で存在する。このような単分子プローブ核酸105及びハイブリ核酸103を有する固定微粒子101により、単分子プローブ核酸付き微粒子の中間物であるプローブ核酸付き微粒子が生

成される。

[0065] 好ましくは、プローブ核酸105とハイブリ核酸103とが繋がっており、プローブ核酸105とハイブリ核酸103の間の繋がる部分（繋がる部分については後述の実施例で述べる）に、これらの核酸を固定微粒子101に結合するための結合サイト104が存在する。結合サイト104は、固定微粒子101側に設けた結合サイト102と結合する（これらの結合サイトについては後に述べる）。

[0066] 一方、図1の（b）に示すように、回収微粒子108側には、固定微粒子101側のハイブリ核酸103の相補鎖核酸106が結合している。この相補鎖核酸106をハイブリ核酸103とハイブリダイゼーションさせることで単分子プローブ核酸付き微粒子101を回収微粒子108に回収する。

[0067] 単分子プローブ核酸付き微粒子を回収した後、制限酵素で消化するなどの切断方法を用いて、固定微粒子101と回収微粒子を分離することで、核酸分析装置に供される最終的な単分子プローブ核酸付き微粒子が得られる。

[0068] 図7は、単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法における工程の一例を説明するための概略図である。図7に示すように、固定微粒子101の表面にプローブ核酸分子105を捕捉するための結合サイト102を結合させておく。例えば、結合サイト102としてストレプトアビジンを用いることができる。また、市販のストレプトアビジンコート微粒子（インビトロジェン社製）を固定微粒子101として用いることができる。

[0069] 試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸分子105と回収微粒子に捕捉されるためのハイブリ核酸103とを、固定微粒子101上に固定させることで中間物たるプローブ核酸分子付きを得る（ステップS1）。プローブ核酸分子105とハイブリ核酸103がそれぞれ単分子状態（一分子）で存在するが、これらの核酸を固定微粒子上に別々に固定することが困難であるため、プローブ核酸分子105の5'側とハイブリ核酸103の3'側が繋がっており、繋がっている部分に固定微粒子101に固定するための結合サイト104を修飾しておく。

[0070] 結合サイト104には、固定微粒子101表面の結合サイト102と容易に結合するものを選択する。例えば、結合サイト102としてストレプトアビジンを用いた

場合には、結合サイト104としてビオチンを用いる。

[0071] 固定微粒子101上の結合サイト102とプローブ核酸分子105・ハイブリ核酸の結合サイト104とを反応溶液中で反応させることで、プローブ核酸分子105を固定微粒子101に固定（結合）する。固定微粒子101一個につき一分子のプローブ核酸分子105を固定するは、反応液中のプローブ核酸分子105の濃度を固定微粒子101の濃度よりも低くすることが好ましい。固定微粒子101よりもプローブ核酸分子105が過剰にあると固定微粒子101一個当たりの捕捉プローブ核酸分子数が一分子よりも多くなる可能性が高いからである。例えば、固定微粒子101の数をプローブ核酸分子105の数よりも100倍多くして反応させると、約99%の固定微粒子101にはプローブ核酸分子105が捕捉されず、約1%の固定微粒子にはプローブ核酸分子105が一分子捕捉されていた。この結果は、ポアソン分布を仮定した場合の予測結果とよく一致している（ポアソン分布を仮定した場合の予測結果を表1に示す）。

[0072] 従って、プローブ核酸分子105を捕捉した固定微粒子101のみを捕捉すれば、捕集した固定微粒子101のうち99.5%以上はプローブ核酸分子105を一分子のみ捕捉した固定微粒子101となる。

[0073] [表1]

表 1

ポアソン分布を仮定した場合の予測結果

	プローブ核酸分子の数/微粒子の数						
	0.002	0.01	0.02	0.1	0.5	1	2
捕集した固定微粒子のうち 一分子プローブ核酸が 結合した微粒子の割合	99.90%	99.50%	99.00%	94.76%	76.92%	58.73%	31.40%

[0074] 結合サイト102及び結合サイト104について、共有結合型サイトと非共有結合型サイトがある。非共有結合型サイトとはビオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェノール、グルタチオン、レクチン及び抗体等を微粒子に固定することで、それらに親和性を有する分子と特異的に結合できる。ビ

オチンの場合は、アビジンとの特異的な結合を介してビオチン化された目的核酸と、またビオチン化されたポリマーと結合することが可能である。共有結合型サイトとは、カルボキシル基 ($-COOH$)、ヒドロキシル基 ($-OH$)、アルコキシカルボニル基 ($-COOR_1$ 、この時、 R_1 は炭素数 1 乃至 10 のアルキル基、フェニル基、又はベンジル基である)、アミノ基 ($-NH_2$) 及びチオキシ基 ($-SH$) などで構成される群から 1 種を選ばれる。ここで、粒子表面のカルボキシル基は、1-(3-ジエチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) などの活性化試験薬で活性化し、核酸にあらかじめ導入したアミノアルキル基と結合させることができる。粒子表面のアミノ基は、2 価反応性の架橋試薬を用いてカルボキシル基に変換し、核酸にあらかじめ導入したアミノアルキル基と結合させるか、又は末端に付加したリン酸と結合させることができる。また、粒子表面の水酸基は、トシル基で活性化して核酸に付加したアミノアルキル基と結合させることができる。

[0075] 固定微粒子 101 及び回収微粒子 108 としては、非磁気微粒子や磁気微粒子を用いることができる。

[0076] 非磁気微粒子の材質とはポリスチレン、スチレン・ジビニルベンゼン、シリカ、ホウ珪酸ガラス、ソーダライムガラス、金属、半導体、鉱物、石英、ポリマーなどからなる群から 1 種を選ばれる。非磁気微粒子としては、Sigma-Aldrich 社の Latex beads、インビトロジェン社の FluoSpheres microspheres、microspheres-nanospheres 社の Dextran Nanospheres、Polysciences, Inc. 社の Polybead (登録商標)、Thermo Fisher Scientific Inc. 社の Polymer Microspheres などを用いることができる。磁気微粒子としては、Merck Chime, S.A.S 社の Estapor (エスタポール：登録商標)、Thermo Scientific Seradyn 社の Sera-Mag (登録商標)、Magnetic SpeedBeads (商標)、Polysciences, Inc. 社の BioMag (登録商標)、Magnetic Microspheres と ProMag (商標)、Highly Uniform Magnetic Microspheres、Merck4Biosciences (Novagen) 社の MagPrep (登録商標)、chemicell 社の fluidMAG と SiMAG、また、Invitrog

en by life technologies社のダイナビーズなどを用いることができる。

[0077] 反応液中における前記構成を有するプローブ核酸付き微粒子101は、回収微粒子108を介して捕集（回収）される（ステップS2、S3）。

[0078] 捕集方法として、例えば、磁気回収微粒子108に相補鎖核酸分子106を結合させ、この相補鎖核酸分子106をプローブ核酸付き微粒子101のハイブリ核酸103とハイブリダイゼーションさせた後に、磁石にて前記磁気回収微粒子108を捕集すれば、この回収微粒子103で捕捉された前記プローブ核酸付き微粒子101が捕集される。

[0079] すなわち、磁気回収微粒子108には、ハイブリ核酸分子103の末端配列と相補鎖配列を持ち末端に結合サイト107が修飾された相補鎖核酸106を用意し、結合サイト107と結合する結合サイト109を予め、回収微粒子108の表面にコートしておく。こうして作製した磁気回収微粒子108を用いることで単分子プローブ核酸分子105を捕捉した固定微粒子101を99%以上と高い割合で分離、収集することができる。

[0080] 磁気回収微粒子108から単分子プローブ核酸付き微粒子となるプローブ核酸付き微粒子101を単離するには、切断方法を用いることができる（ステップS4）。

[0081] 例えば、制限酵素消化法を用いて分離することができる。単離した単分子プローブ核酸付き微粒子101は図4に示す実施例2に記載した方法（後述する）を用いることで、平滑基板上の所定の固定場に固定することができ、本実施例の単分子プローブ核酸分子105を一分子だけ固定した核酸分析デバイスを製造することができる。

[0082] 本実施例で例示する固定微粒子101は、ポリスチレンなど非磁気微粒子である場合、回収微粒子108は、前述したように磁性を有する磁気微粒子であることが好ましい。

[0083] 一方、固定微粒子101が磁気微粒子である場合には、回収微粒子108はポリスチレンなど非磁気微粒子であることが好ましい。回収微粒子108の平均粒径は100～10000nmであることが好ましい。回収微粒子108は磁気微粒

子である場合、磁石で捕集することができる。回収微粒子108は非磁気微粒子である場合、比重の違いによる捕集方法を用いることができる。例えば、固定微粒子101は磁気微粒子である場合、比重が高いため、回収微粒子108は比重の低いポリスチレン微粒子を使用すれば良い。例えば、60%のグリセロールの中に回収微粒子と固定微粒子を混合させ、3分間20,000×gで遠心分離し、上層の水溶液を吸い取り、回収微粒子108と結合した磁性固定微粒子101を回収することができる。

[0084] 一方、固定微粒子101が磁気微粒子である場合には、回収微粒子108はポリスチレンなど非磁気微粒子であることが好ましい。回収微粒子108の平均粒径は100～10000nmであることが好ましい。回収微粒子108は磁気微粒子である場合、磁石で捕集することができる。回収微粒子108は非磁気微粒子である場合、比重の違いによる捕集方法を用いることができる。例えば、固定微粒子101は磁気微粒子である場合、比重が高いため、回収微粒子108は比重の低いポリスチレン微粒子を使用すれば良い。例えば、60%のグリセロールの中に回収微粒子と固定微粒子を混合させ、3分間20,000×gで遠心分離し、上層の水溶液を吸い取り、回収微粒子108と結合した磁性固定微粒子101を回収することができる。

[0085] 回収微粒子108と固定微粒子101を分離するために、切断方法を使用することができる。

切断方法は、制限酵素消化或はUV照射などの方法を用いて核酸を切断する方法である。制限酵素消化法で切断する場合、回収微粒子に捕捉されるためのハイブリ核酸103と回収微粒子上の相補鎖核酸106にXho I配列のような制限酵素消化サイトを有する必要がある。制限酵素消化法以外の切断方法を用いる場合、ハイブリ核酸103と結合サイト104の間に光反応や薬液による化学反応などにより容易に切断可能なリンカーを設ける必要がある。切断方法とリンカーの種類を図8及び表2に示す。

[0086]

[表2]

表 2

リンカーの種類と切断方法

リンカーの種類	切断方法
光開裂リンカー	長波長紫外線
ペプチド型リンカー	プロテアーゼ
エステル結合型リンカー	エステラーゼ
ジスルフィド結合型リンカー	DTT、 β -メルカプトエタノール
T- (EDTA) 型リンカー	鉄イオン、DTT
糖鎖型リンカー	糖分解酵素

[0087] 切断方法では回収微粒子に捕捉されるためのハイブリ核酸103が切断されるため、ハイブリ核酸103だけが固定微粒子101に存在する構成では、分析用の試料核酸を捕捉することができなくなる。因って、試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸105部分も固定微粒子上に存在することが好ましい。固定微粒子上に試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸と回収微粒子に捕捉されるためのハイブリ核酸とは、各々固定微粒子上に存在するが、それぞれ別々に固定することが困難であるため、プローブ核酸とハイブリ核酸が繋がっているものを用いて、固定微粒子上に一分子で固定することが好ましい。プローブ核酸105の3'末端は伸長反応などに使用するため、3'末端のデオキシリボースの3'位の水酸基はヌクレオチドのリン酸基を結合させることができるフリーの状態のものが好ましい。プローブ核酸105とハイブリ核酸103の間の繋がる部分ではなく、端っこに固定微粒子と結合するための結合サイト104が存在する場合、結合サイト104の結合場所はハイブリ核酸103側とプローブ核酸105側の2種類がある。ハイブリ核酸103側に結合サイト104が存在する場合、ハイブリ核酸103が切断されると、プローブ核酸分子105も一緒に外されるため、使用することができない。

[0088] プローブ核酸105側に結合サイト104が存在する場合、ハイブリ核酸103が切断されると、リンカーの一部或は相補鎖核酸106の一部は残されるため、伸長反応に使用することができない。プローブ核酸105とハイブリ核酸103の間の繋がる部分に固定微粒子と結合するための結合サイト104が存在する場合、プローブ核酸分子とハイブリ核酸の結合方向は2種類がある。プローブ核酸分子105の3'側とハイブリ核酸103の5'側が繋がる場合、プローブ核酸105の3'側が結合サイト104と結合しているので伸長反応に使用することができない。プローブ核酸分子105の5'側とハイブリ核酸103の3'側の間に結合サイト104を付ける場合、プローブ核酸分子105の3'側がフリーの状態なので、伸長反応に使用することができる。因って、プローブ核酸分子105の5'側とハイブリ核酸103の3'側の間に結合サイト104を付けることが好ましい。

[0089] ハイブリ核酸103の切断後の残った部分に蛍光色素を標識すれば、単分子プローブ核酸付き微粒子が回収された後、パッド基板上に固定したら固定微粒子を検出することができる。

[0090] 長波長紫外線で切断できる光開裂型リンカーとして、具体的には、例えば、 α -置換-2-ニトロベンジル基の構造を持つもの等が挙げられる。 α 置換基として、(i) 水酸基と反応するホスホアミダイト、(ii) アミノ基と反応するN-ヒドロキシスクシンイミドカルボネート、(iii) チオール基と反応するハロゲン等が挙げられる。上記(i)に記載の光開裂型リンカーとしては、PCビオチンホスホアミダイト、PCアミノ修飾ホスホアミダイト、PCスペーサーホスホアミダイト（いずれも商品名、グレンリサーチ社製）等が挙げられる。

実施例 5

[0091] 本実施例では、核酸分析用デバイスを用いた核酸分析装置の好ましい構成の一例について図9を参照しながら説明する。

[0092] 本実施例の核酸分析装置は、核酸分析用デバイスに対して、蛍光色素を有するヌクレオチド、核酸合成酵素を供給する手段と、核酸分析用デバイスに光を照射する手段と、核酸分析用デバイス上においてヌクレオチド、核酸合

成酵素が共存することにより起きる核酸伸長反応により核酸鎖中に取り込まれた蛍光色素の蛍光を測定する発光検出手段と、を備える。より具体的には、カバープレート701と検出窓702と溶液交換用口である注入口703と排出口704から構成される反応チャンバに前記のデバイス705を設置する。なお、カバープレート701と検出窓702の材質として、PDMS (Polydimethylsiloxane) を使用する。また、検出窓702の厚さは0.17 mmとする。YAGレーザ光源（波長532 nm，出力20 mW）707およびYAGレーザ光源（波長355 nm，出力20 mW）708から発振するレーザ光709および710を、レーザ光709のみをλ/4板711によって円偏光し、ダイクロイックミラー712（410 nm以下を反射）によって、前記2つのレーザ光を同軸になるよう調整した後、レンズ713によって集光し、その後、プリズム714を介してデバイス705へ臨界角以上で照射する。

[0093] 以下、微粒子として直径50 nm程度の金微粒子を用いた場合を例にとり、説明する。この場合、レーザ照射により、デバイス705表面上に存在する金微粒子において局在型表面プラズモンが発生し、金微粒子に結合したDNAプローブにより捕捉された標的物質の蛍光体は蛍光増強場内に存在することになる。蛍光体はレーザ光で励起され、その増強された蛍光の一部は検出窓702を介して出射される。また、検出窓702より出射される蛍光は、対物レンズ715（×60，NA1.35，作動距離0.15 mm）により平行光束とされ、光学フィルタ716により背景光及び励起光が遮断され、結像レンズ717により2次元CCDカメラ718上に結像される。

[0094] 逐次反応方式の場合には、蛍光色素付きヌクレオチドとして、非特許文献6に開示されているような、リボースの3' OHの位置に3'-O-アリル基を保護基として入れ、また、ピリミジンの5位の位置にあるいはプリン7位の位置にアリル基を介して蛍光色素と結びつけたものが使用できる。アリル基は光照射（例えば波長355 nm）あるいはパラジウムと接触することで切断されるため、色素の消光と伸長反応の制御を同時に達成することが

できる。逐次反応でも、未反応のヌクレオチドを洗浄で除去する必要はない。さらに、洗浄工程が必要ないことからリアルタイムで伸長反応を計測することも可能である。この場合には、前記ヌクレオチドにおいて、リボースの3' OHの位置に3' -O-アシル基を保護基として入れる必要は無く、光照射（例えば波長355 nm）で切断可能な官能基を介して色素と結びついているヌクレオチドを用いれば良い。

[0095] 微粒子として、半導体微粒子を用いた場合にも、上述の核酸分析装置の例は適用可能である。例えば、半導体微粒子としてQdot(R)565 conjugate（インビトロジェン社製）を用いると、YAGレーザ光源（波長532 nm，出力20 mW）707で十分に励起できる。この励起エネルギーは532 nmの光では励起されないアレクサ633（インビトロジェン社製）へ移動することにより蛍光を発するようになる。つまり、未反応のヌクレオチドに付随する色素は励起されることはなく、DNAプローブに捕捉され半導体微粒子に近接しエネルギー移動が起きてはじめて発光するので、捕捉されたヌクレオチドを蛍光測定で識別することが可能である。

[0096] 図10に本実施例に係る核酸分析装置を用いて、単分子核酸付き微粒子を基板上固定後に撮像した試料核酸捕捉の蛍光画像及び単分子輝点の波形図を示す。

[0097] 上記のように、本実施例の核酸分析用デバイスを用いて核酸分析装置を組上げることにより、洗浄工程を入れることなく、解析時間の短縮化、デバイス及び分析装置の簡便化が図れ、逐次反応方式のみならず、リアルタイムで塩基の伸長反応を計測することも可能となり、従来技術に対して大幅なスループットの改善が図れる。

符号の説明

[0098] 101：固定用微粒子，102，104，107，109：結合サイト，103：ハイブリ核酸，105：プローブ核酸，106：相補鎖核酸，108：回収用微粒子，201 微粒子，202 捕捉プローブ分子，203 核酸試料溶液，204 標的核酸分子，205 接着パッド，206 平滑基

板, 207 核酸分析用デバイス, 301 微小流路, 302 光学系, 303 イメージセンサー, 401 平滑基板, 402 接着パッド, 403 微粒子, 404 捕捉プローブ分子, 405 線状分子, 406, 407 線状分子末端の官能基, 408 標的核酸分子, 501 平滑な支持基体, 502 電子線用ポジ型レジスト, 503 接着用パッド, 504 線状分子, 505, 506 線状分子末端の官能基, 507 非特異吸着防止用分子, 508 微粒子, 509 アビジン, 510 捕捉プローブ分子, 511 標的核酸分子, 701 カバープレート, 702 検出窓, 703 注入口, 704 排出口, 705 デバイス, 706 流路, 707, 708 YAGレーザ光源, 709, 710 レーザ光, 711 $\lambda/4$ 板, 712 ダイクロイックミラー, 713 レンズ, 714 プリズム, 715 対物レンズ, 716 光学フィルタ, 717 結像レンズ, 718 2次元CCDカメラ

請求の範囲

- [請求項1] 解析対象となる特定の核酸群を捕捉できるプローブ分子を有する微粒子を用いて、核酸試料中から、前記解析対象の特定の核酸群を抽出する工程と、
- 前記微粒子を基板上に固定する工程と、
- 前記基板上に固定された微粒子上の核酸群に対して配列解析を行う工程を含むことを特徴とする、核酸分析方法。
- [請求項2] 請求項1において、前記核酸群を抽出する工程で用いる微粒子は、一微粒子当り一分子のプローブ分子を有することを特徴とする、核酸分析方法。
- [請求項3] 請求項1において、前記微粒子を前記基板上に固定する工程が、前記基板上に備えられた接着用パッド上に前記微粒子を固定する工程であることを特徴とする、核酸分析方法。
- [請求項4] 請求項1において、
- 前記基板上に固定された微粒子上の特定の核酸群に対して配列解析を行う工程として、
- 蛍光標識を有する複数種のヌクレオチドを前記基板上に供給し、前記基板上で核酸試料一分子に対する相補鎖一分子合成反応を起こし、取り込まれるヌクレオチドに付随する蛍光色素の蛍光強度を計測することで、前記核酸群の配列情報を得ることを特徴とする、核酸分析方法。
- [請求項5] 解析対象となる特定の核酸群を捕捉できるプローブ分子を有する微粒子を用いて、核酸試料中から、前記解析対象の特定の核酸群を抽出した後、前記微粒子を前記基板上に固定することを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法。
- [請求項6] 請求項5において、前記微粒子が一個当たり前記プローブ分子を一分子有することを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法。
- [請求項7] 請求項5において、前記基板上の前記微粒子の固定位置に接着用パ

ッドを設け、前記微粒子を前記接着用パッド上に固定することを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法。

[請求項8] 請求項5において、前記微粒子を前記基板上の規則的に固定することを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法。

[請求項9] 請求項5に記載の核酸分析用デバイスの製造方法において、前記微粒子が、高分子材料、半導体、又は金属から選ばれる材料からなることを特徴とする、核酸分析用デバイスの製造方法。

[請求項10] 基板と、解析対象の特定核酸群を抽出した、プローブ分子を有する微粒子と、を有する、核酸分析用デバイスと、
前記核酸分析用デバイスに対して、蛍光色素を有するヌクレオチド、及び核酸合成酵素を供給する手段と、
前記核酸分析用デバイスに光を照射する手段と、
前記核酸分析用デバイス上において前記ヌクレオチド、前記核酸合成酵素が共存することにより起きる核酸伸長反応により核酸鎖中に取り込まれた蛍光色素の蛍光を測定する発光検出手段と、を備え、前記解析対象となる特定の核酸群の塩基配列情報を取得する核酸分析装置。

[請求項11] 基板と、
解析対象の特定核酸群を抽出した、プローブ分子を有する微粒子と、を有し、前記微粒子が前記基板上に固定されていることを特徴とする、核酸分析用デバイス。

[請求項12] 請求項11において、前記微粒子が一個当たり前記プローブ分子を一分子有することを特徴とする、核酸分析用デバイス。

[請求項13] 請求項11において、前記基板上には接着用パッドが設けられており、
前記微粒子は、前記接着用パッド上に固定されていることを特徴とする、核酸分析用デバイス。

[請求項14] 請求項11において、前記微粒子は、前記基板上に規則的に固定さ

れていることを特徴とする、核酸分析用デバイス。

[請求項15] 請求項 1 1 に記載の核酸分析用デバイスにおいて、前記微粒子が、高分子材料、半導体、又は金属から選ばれる材料からなることを特徴とする、核酸分析用デバイス。

[請求項16] 試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸を固定した固定微粒子を有する単分子プローブ核酸付き微粒子の中間生成物であるプローブ核酸付き微粒子であって、前記プローブ核酸と、前記プローブ核酸付き微粒子を回収するための回収微粒子に捕捉されるハイブリ核酸とが、各々、前記固定微粒子上に一分子で存在することを特徴とするプローブ核酸付き微粒子。

[請求項17] 試料核酸を捕捉するためのプローブ核酸を固定した固定微粒子を有する単分子プローブ核酸付き微粒子の中間生成物であるプローブ核酸付き微粒子であって、前記プローブ核酸と、前記プローブ核酸付き微粒子を回収するための回収微粒子に捕捉されるハイブリ核酸とが繋がっており、前記プローブ核酸と前記ハイブリ核酸の間の繋がる部分には、この繋がる部分が前記固定微粒子に結合するための結合サイトが存在していることを特徴とするプローブ核酸付き微粒子。

[請求項18] 請求項 1 6 又は 1 7 記載のプローブ核酸付き微粒子における前記プローブ核酸に、試料核酸をハイブリダイゼーションさせることで、前記固定微粒子の存在を調べる工程を含むことを特徴とする核酸分析方法。

[請求項19] 請求項 1 6 又は 1 7 に記載の前記プローブ核酸と前記ハイブリ核酸を有する前記プローブ核酸付き微粒子を得る工程と、

前記ハイブリ核酸の相補鎖の配列を有する相補鎖核酸分子が結合されている前記回収微粒子を用いて、前記相補鎖核酸分子を前記ハイブリ核酸とハイブリダイゼーションさせることにより、前記プローブ核酸付き微粒子を回収する工程と、

を含むことを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法。

[請求項20] 単分子プローブ核酸付き微粒子を製造する過程で、請求項17に記載の前記プローブ核酸付き微粒子を得る工程において、前記プローブ核酸と前記ハイブリ核酸の間に存在する前記結合サイトを前記固定微粒子と結合するために、ビオチン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェノール、グルタチオン、レクチンからなる群から選ばれた1種が修飾されていることを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法。

[請求項21] 請求項16又は17に記載の前記プローブ核酸付き微粒子を、前記ハイブリ核酸の相補鎖の配列を有する相補鎖核酸分子が結合されている前記回収微粒子を用いて、前記プローブ核酸付き微粒子を回収した後に、制限酵素で消化、紫外線照射、プロテアーゼで消化、エステラーゼで消化、DTT、及びβ-メルカプトエタノールを用いてジスルフィド結合の切断を行い、糖分解酵素で消化からなる群から選ばれる方法で前記ハイブリ核酸を前記プローブ核酸から切断することにより、単分子プローブ核酸付き微粒子を得ることを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法。

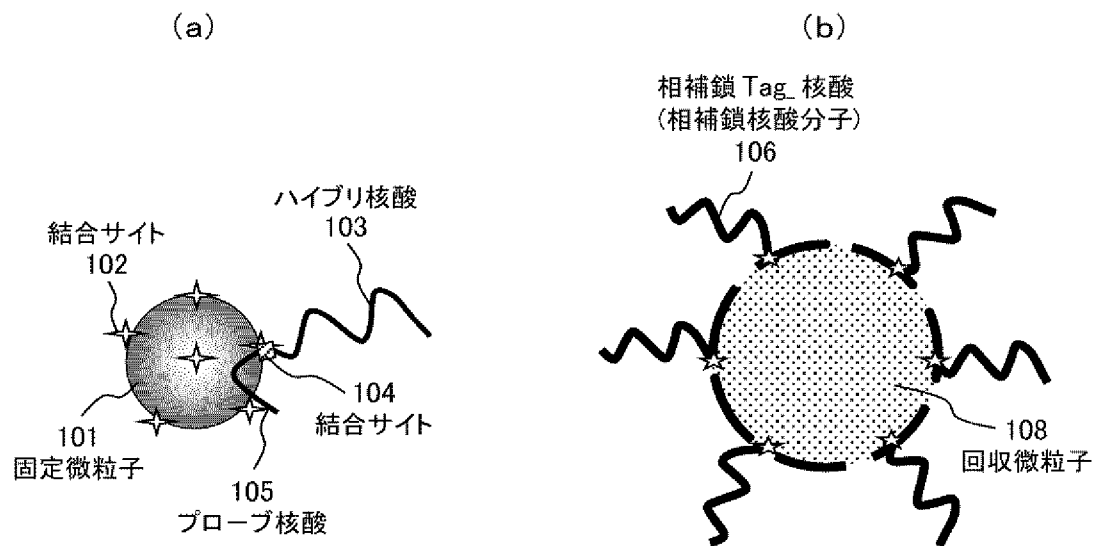
[請求項22] 請求項21において、
前記切断方法は制限酵素を用いて消化する方法である場合、前記ハイブリ核酸と相補鎖核酸にXho I配列のような制限酵素消化サイトを有することを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法。

[請求項23] 請求項21において、
前記切断方法は制限酵素消化法以外の方法を用いる場合、ハイブリ核酸とビオチン修飾の間には、光開裂リンカー、ペプチド型リンカー、エステル結合型リンカー、ジスルフィド結合型リンカー、糖鎖型リンカーからなる群から選ばれる1種のリンカーを有することを特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法。

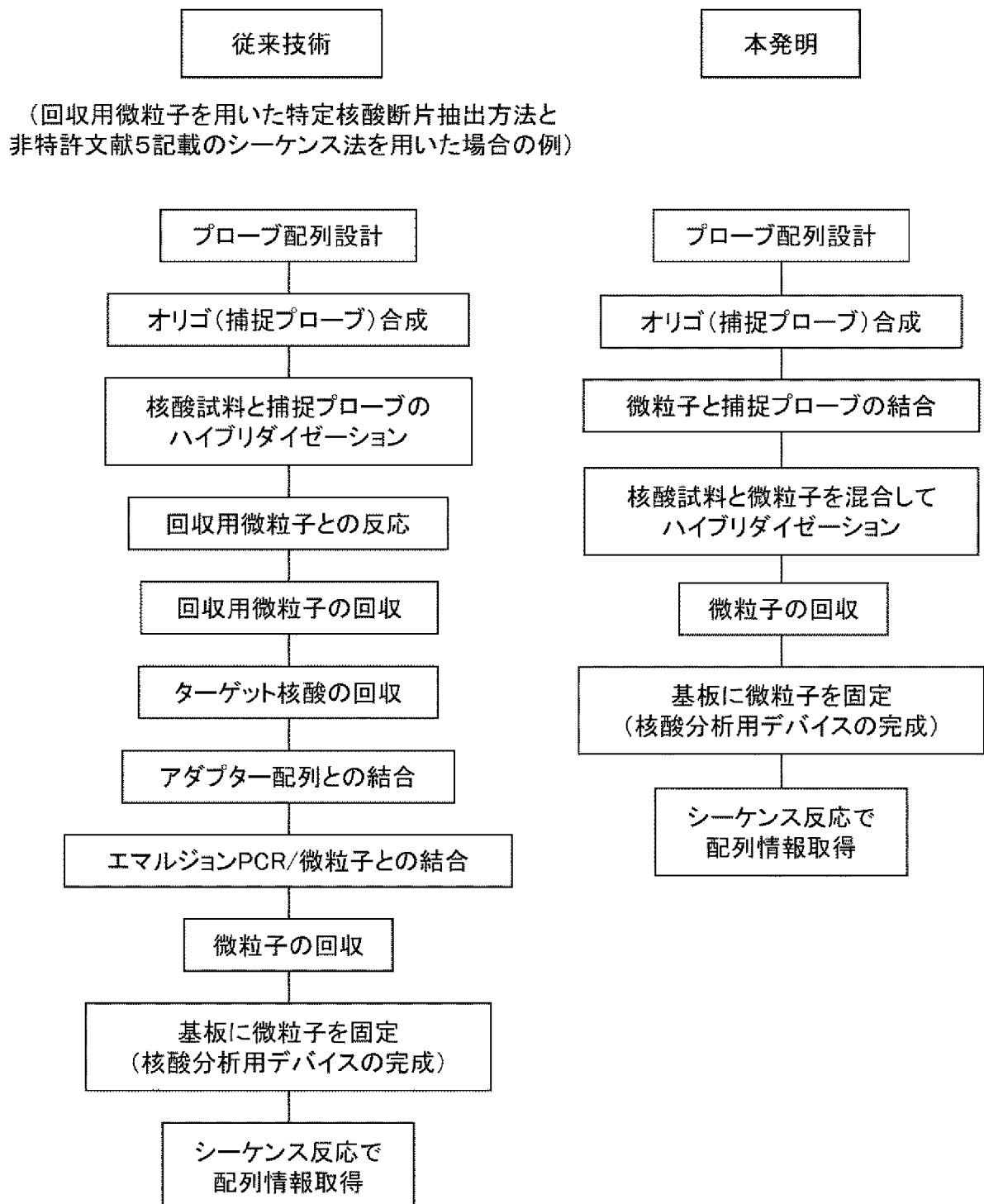
[請求項24] 請求項18から22のいずれか1項において、
前記プローブ核酸とハイブリ核酸の鎖長は20mer以上であることを

特徴とする単分子プローブ核酸付き微粒子の製造方法。

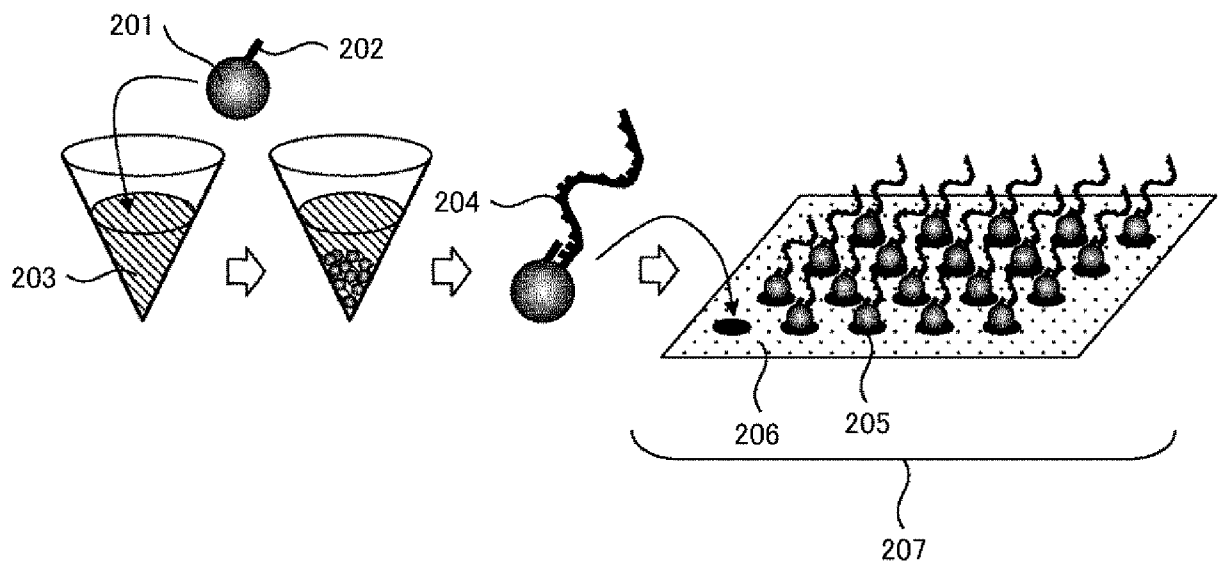
[図1]



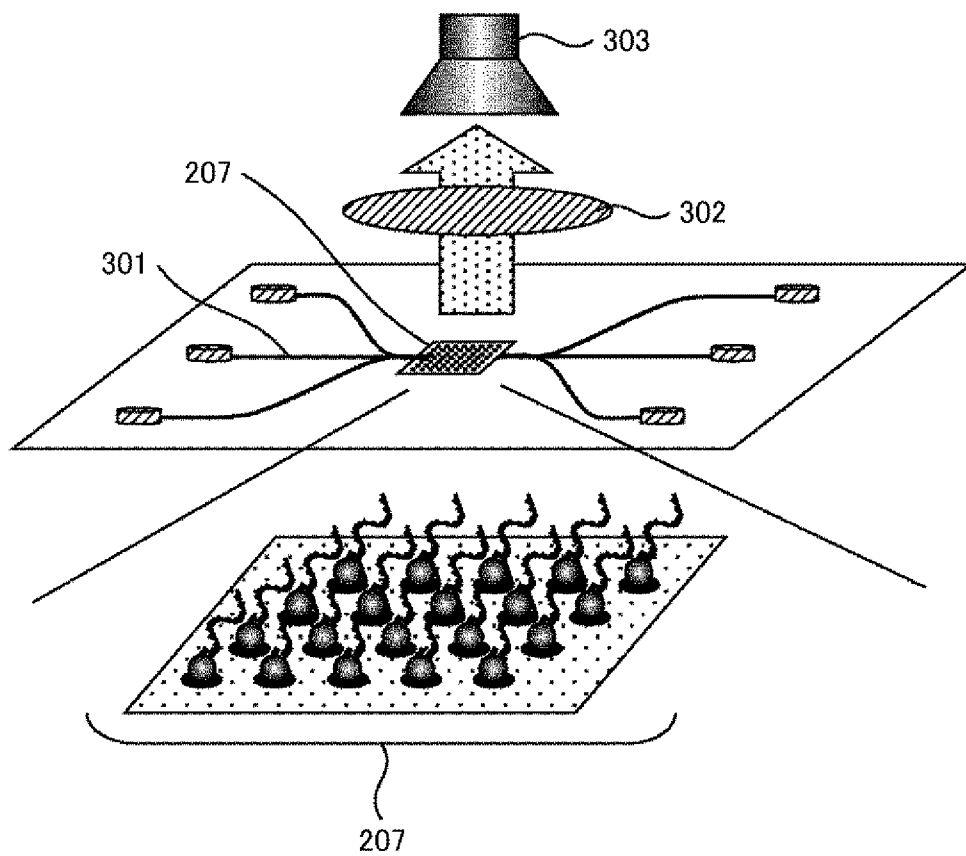
[図2]



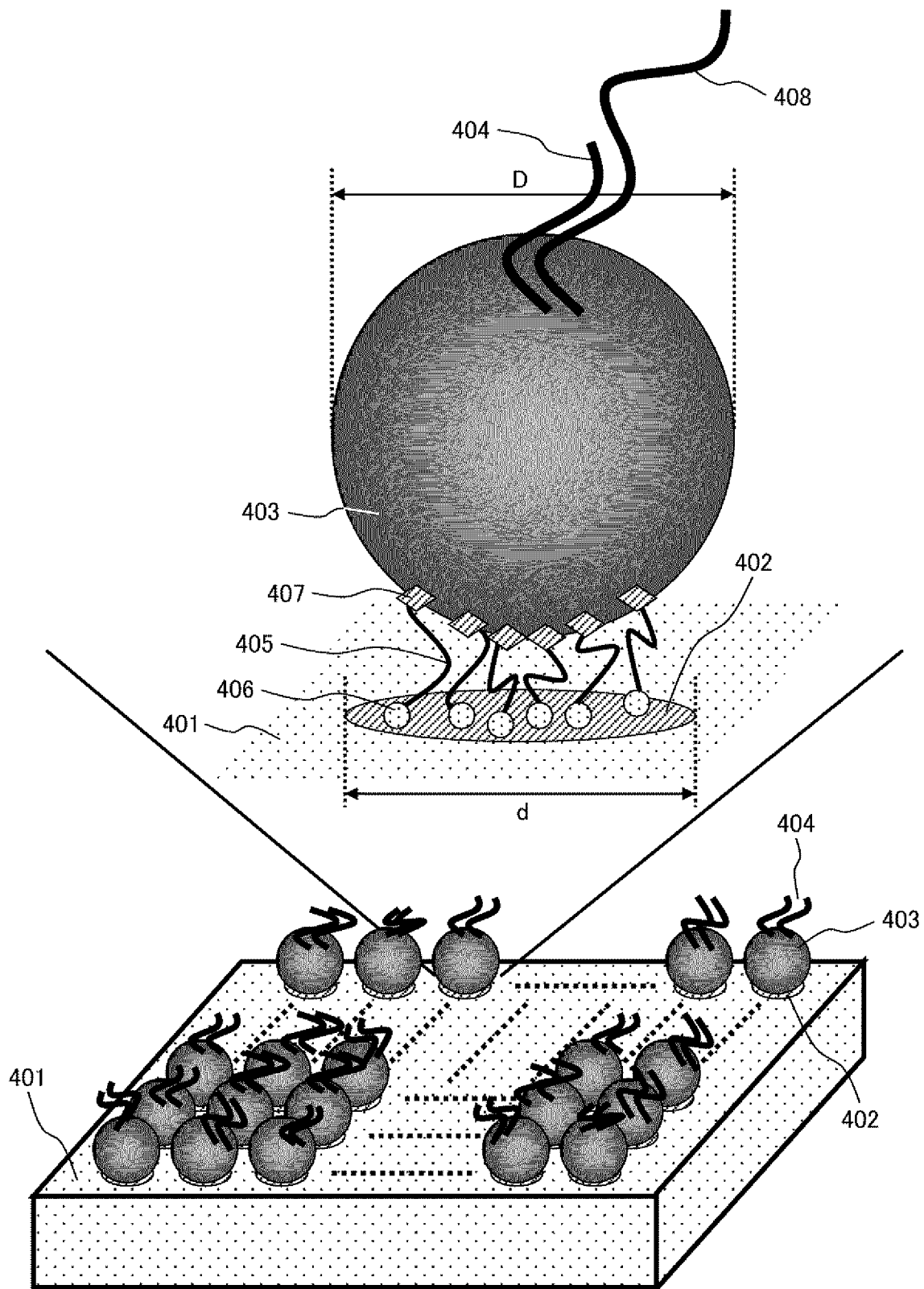
[図3]



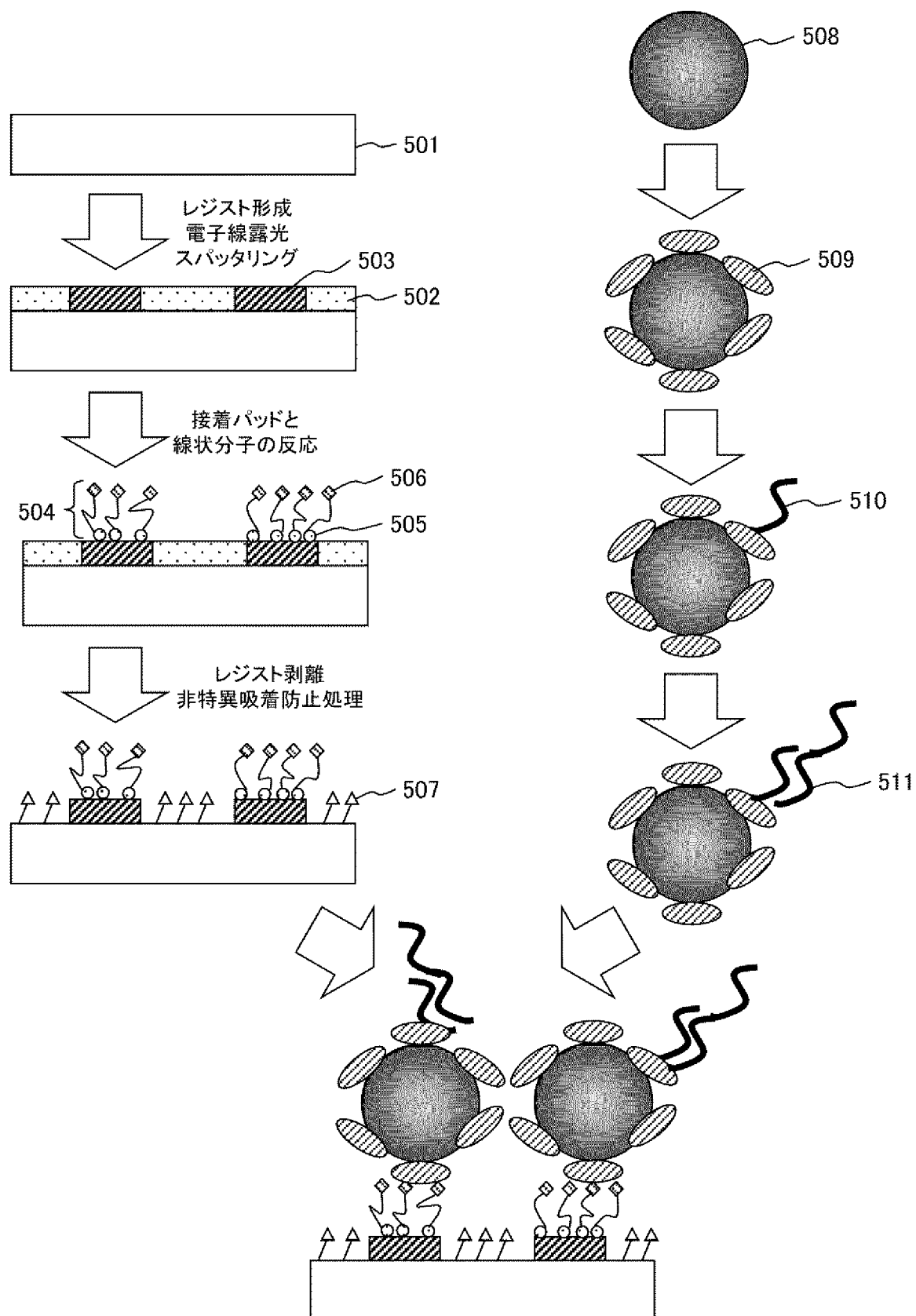
[図4]



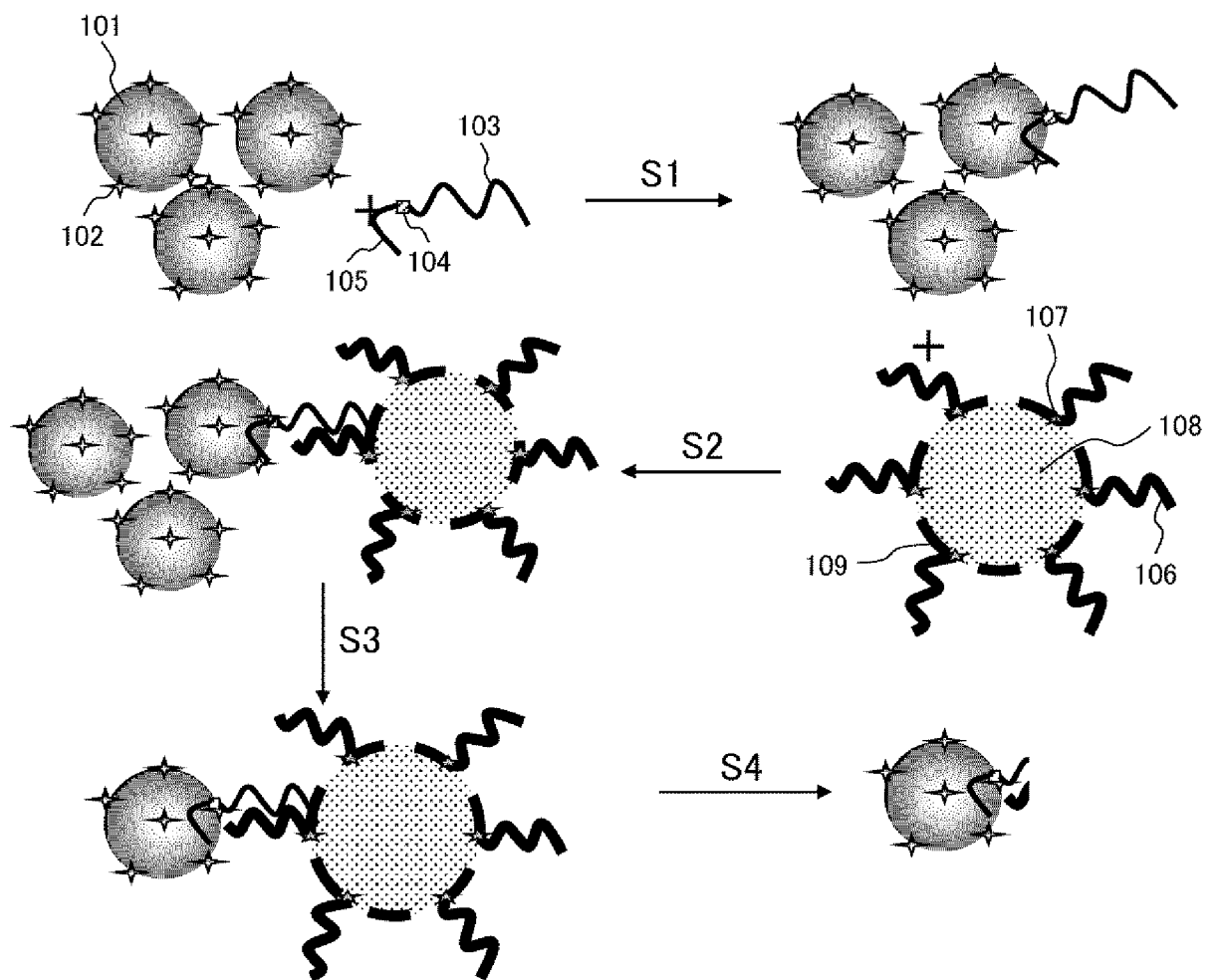
[図5]



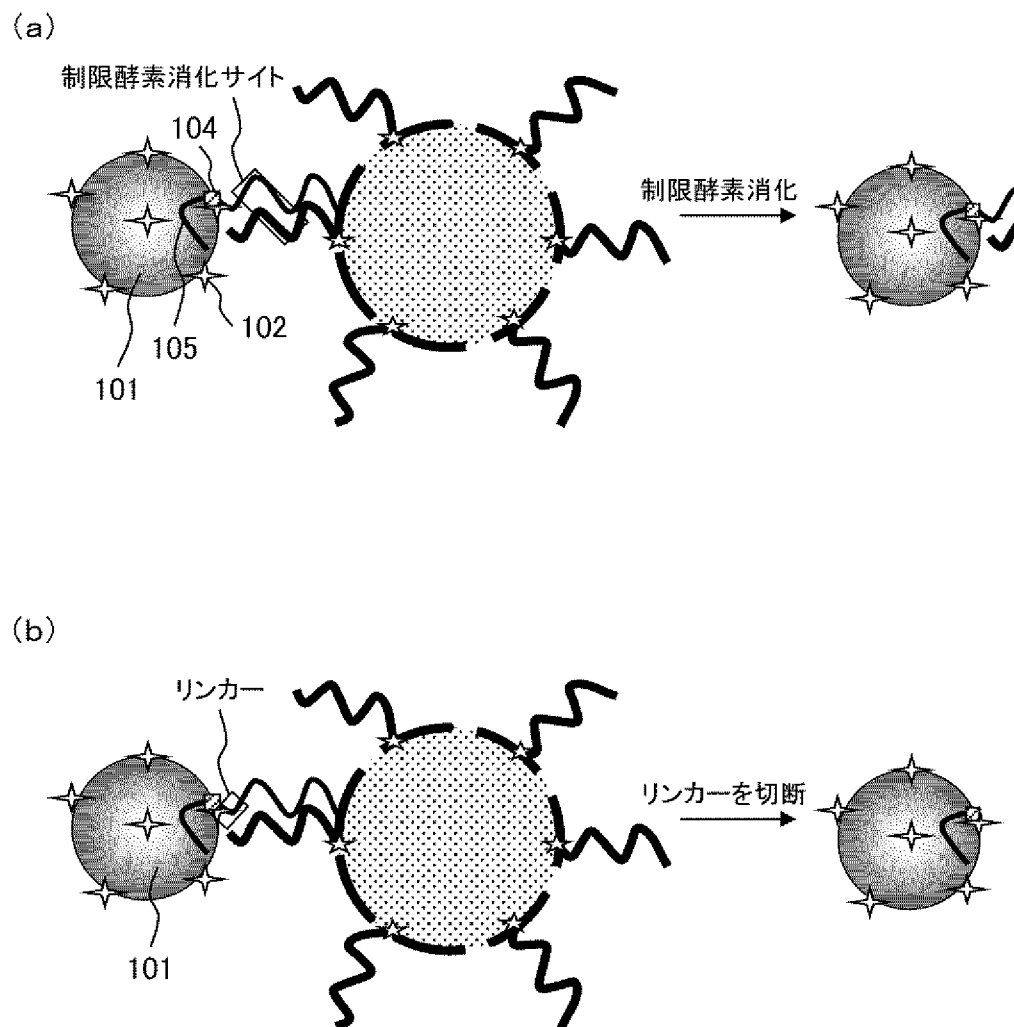
[図6]



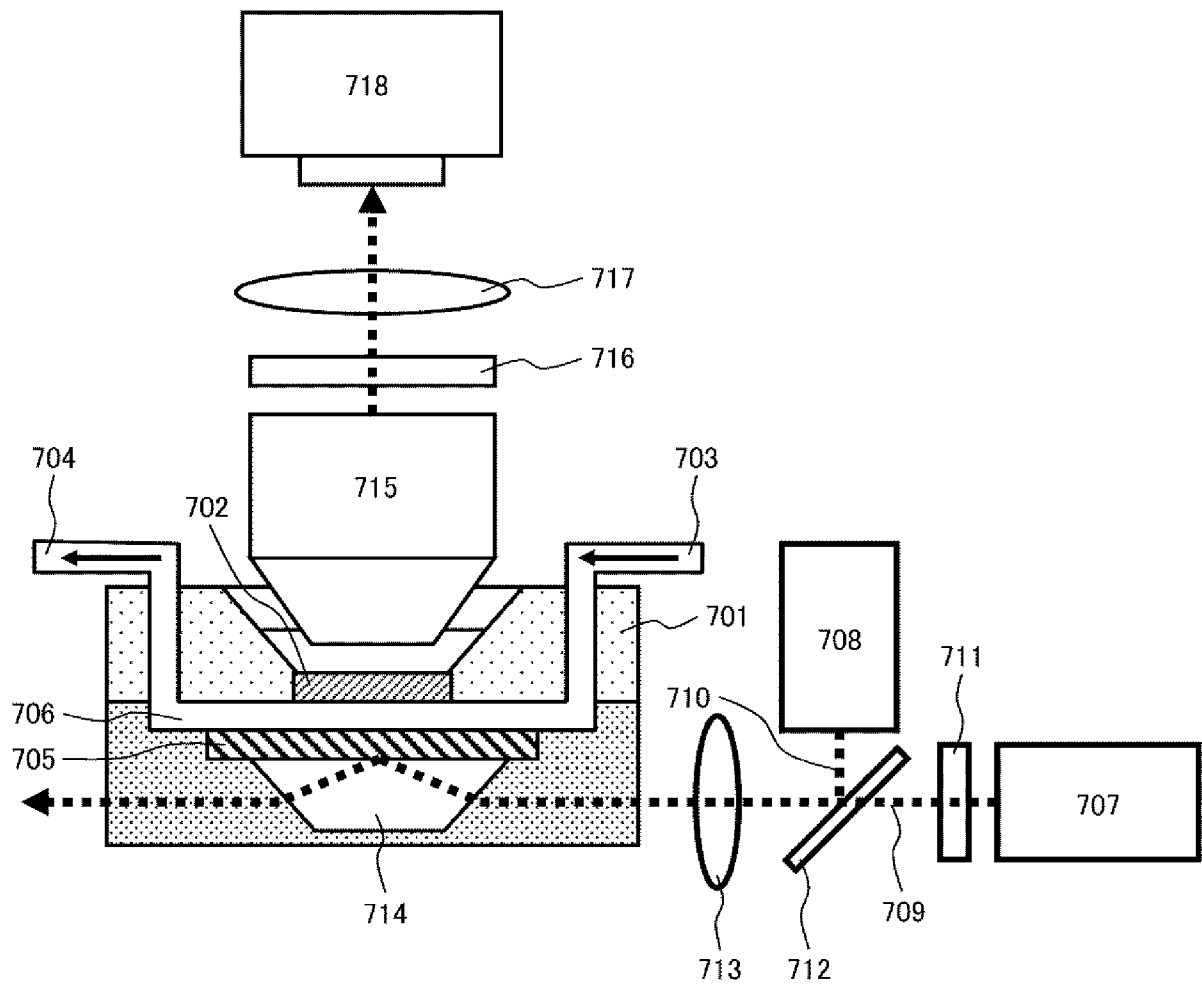
[図7]



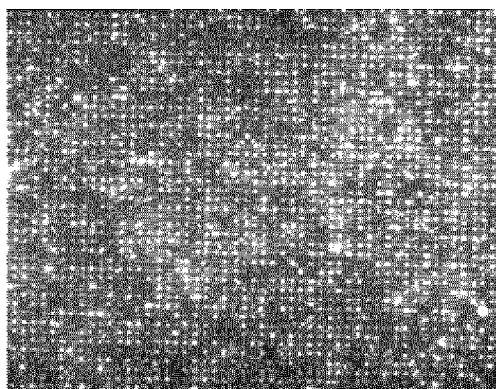
[図8]



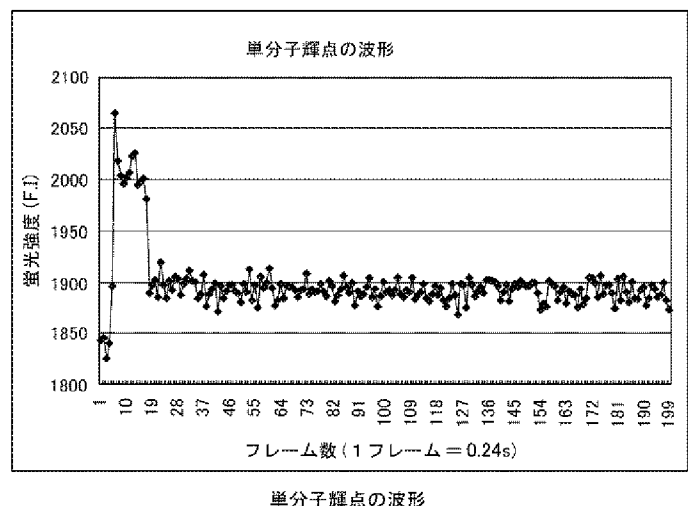
[図9]



[図10]



単分子DNA付き微粒子を
基板上固定後の蛍光画像



単分子輝点の波形

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/051636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/53, G01N33/543, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2008-190937 A (Hitachi High-Technologies Corp.), 21 August 2008 (21.08.2008), entire text & US 2010/0009862 A1	1-15/16-24
A	JP 2009-85840 A (Hitachi High-Technologies Corp.), 23 April 2009 (23.04.2009), entire text (Family: none)	16-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 April, 2012 (11.04.12)

Date of mailing of the international search report
24 April, 2012 (24.04.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12M1/00, G01N33/53, G01N33/543, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	JP 2008-190937 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2008.08.21, 全文 & US 2010/0009862 A1	1-15/16-24
A	JP 2009-85840 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2009.04.23, 全文 (ファミリーなし)	16-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

柴原 直司

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

3 5 3 4