(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4217476号
(P4217476)

(45)発行日　平成21年2月4日(2009.2.4)　(24)登録日　平成20年11月14日(2008.11.14)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q 1/68	(2006.01)	C12N	15/00	F
G01N 37/00	(2006.01)	C12Q	1/68	A

請求項の数 9　(全 39 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-377106(P2002-377106)
(22)出願日　平成14年12月26日(2002.12.26)
(65)公開番号　特開2003-254971(P2003-254971A)
(43)公開日　平成15年9月10日(2003.9.10)
審査請求日　平成17年6月29日(2005.6.29)
(31)優先権主張番号　特願2001-394086(P2001-394086)
(32)優先日　平成13年12月26日(2001.12.26)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000001007
キヤノン株式会社
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号
(74)代理人　100090538
弁理士　西山　恵三
(74)代理人　100096965
弁理士　内尾　裕一
(72)発明者　岡田　良克
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内
(72)発明者　岩田　研逸
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プローブ媒体および基材上へのプローブ固定方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ末端に官能基が修飾されている一本鎖核酸プローブと、該一本鎖核酸プローブの末端と結合しうる官能基及びシラノール基とを有するシランカップリング剤と、を水溶液中に溶解してなるプローブ媒体。

【請求項２】

標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ末端に官能基が修飾されている一本鎖核酸プローブと、該一本鎖核酸プローブの末端と結合しうる官能基及び基材と結合しうる部位とを有するシランカップリング剤と、を水の存在下で含んでなり、前記一本鎖核酸プローブと、前記シランカップリング剤とを結合するための二価性試薬をさらに含有するプローブ媒体。

【請求項３】

上記記載の結合方法が共有結合によるものである請求項１または２に記載のプローブ媒体。

【請求項４】

前記二価性試薬が、Ｎ－（４－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ、Ｎ－（６－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍｓａｌｔ、Ｎ－（８－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ、Ｎ－（１１－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌ

ｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ、の中から選択される少なくとも１種である請求項２に記載のプローブ媒体。

【請求項５】

請求項１～４のいずれかに記載のプローブ媒体をスポッティング方法により基材上に付与することにより固定するプローブ固定方法。

【請求項６】

請求項５に記載のプローブ固定方法により作製されたプローブ固定基材のプローブがＤＮＡプローブであるＤＮＡアレイ。

【請求項７】

請求項１～４のいずれかに記載のプローブ媒体をスポッティング方法により基材上に付与することにより固定し、得られたプローブ固定基材を用いて標的物質を検出する検出方法。

【請求項８】

標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ末端に官能基が修飾されている一本鎖核酸プローブと、該一本鎖核酸プローブの末端と結合しうる官能基及びシラノール基とを有するシランカップリング剤、を水溶液中に含んでなる物質を各々もしくは一部を混合して容器中に収納し、基材上に固定する際に混合されてなるプローブ媒体。

【請求項９】

標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ末端に官能基が修飾されている一本鎖核酸プローブと、該一本鎖核酸プローブの末端と結合しうる官能基及びシラノール基とを有するシランカップリング剤、を水溶液中に含んでなるプローブ媒体が前記基材上で離間的にスポット状に配置されていることを特徴とするＤＮＡアレイ。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プローブを基材上に固定するプローブ媒体および、その固定方法に関する。本発明は、またプローブ媒体を基材上に固定することにより得られたプローブ固定基材を用いて標的物質を検出する検出方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

プローブを基材上に固定する方法としてはさまざまな方法が知られている。詳細としては、基材上においてプローブの合成を行なうことにより基材上に固定する方法、予め用意されたプローブをピンもしくは、スタンプなどにより基材上に付与することにより固定する方法である。具体的には、基体の選択された領域からアクチベーターによって保護基を除去し，除去可能な保護基を有するモノマーを前記領域に結合させることを繰返すことにより，基体上で種々の配列を有するポリマーを合成する方法が知られている(例えば、特許文献１参照)。また、基材及び該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる固定用の材料と、カルボジイミド基との反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることにより固定する方法が知られている（例えば、特許文献２参照）。同様に、生物学的に活性な物質の検出において、カルボジイミドを有する化合物上にカルボジイミド基を介して固定化することを用いて検出する方法が知られている（例えば、特許文献３参照）。さらには、末端部にチオール基を有するＤＮＡ断片と、該チオール基と反応して共有結合を形成し得る反応性置換基を有する鎖状分子が一方の末端で表面に固定された固相担体とを液相にて接触させることにより、該ＤＮＡ断片と鎖状分子との間で共有結合を形成させることによるＤＮＡ断片の固相担体表面への固定方法が知られている（例えば、特許文献４参照）。

【０００３】

また、生体成分の検出方法としても多くの方法が知られている。ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、オリゴヌクレオチド等の生体成分等の物質の検査をバックグラウンドノイズからの影響を排除しつつ、高感度、高精度で簡便に測定する方法が記載されている（例えば、特許文献５参

照）。さらには、反応する基板上の所望の位置に反応性物質を含む溶液をノズルから吐出させることによって反応性物質を基板に固定する方法が知られている（例えば、特許文献６参照）。基板がガラスもしくはシリコン製であり、その表面は親和性付与のために表面処理されているものであり、反応性物質はＤＮＡ断片、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、酵素、抗原、抗体、エピトープ、タンパク質、ポリヌクレオチド、ペプチドからなる群から選ばれた少なくとも１種である。

【０００４】

【特許文献１】

米国特許第５１４３８５４５号公報

【特許文献２】

特開平８－２３９７５

【特許文献３】

特開平８－３３４５０９

【特許文献４】

特開２００１－１７８４４２

【特許文献５】

特開２００１－１１６６９９

【特許文献６】

特開２００１－１１６７５０

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来用いられていた標的物質に対して特異的に結合可能なプローブを含むプローブ媒体としては、プローブおよびプローブと結合しうる部位、および基材上に結合しうる部位とを１つの媒体に含むものはなかった。また、従来用いられていた標的物質に対して特異的に結合可能なプローブの基材上への固定方法としては、プローブと結合しうる部位を含む材料を基材上にコーティングするもしくは、基材上を処理することによりプローブと結合しうる部位を形成させるなどの方法により基材上へ結合層などを形成した後、少なくともプローブを含む媒体を付与することによりプローブ固定を行なっていた。このため、プローブ媒体を基材上に付与する前に、あらかじめ基材上にプローブと結合しうる部位を形成するための処理する必要があった。さらには、プローブと結合しうる部位を有する化合物と基材を用いてプローブ固定材料とし、プローブ固定材料で予め基材上を処理することによりプローブを固定していた。この方法ではプローブの固定化を行なう前に、プローブ固定材料での基材処理が必要であった。

【０００６】

【課題を解決するための手段】

上記の課題は下記の本発明によって解決された。

（１）標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ末端に官能基が修飾されている一本鎖核酸プローブと、該一本鎖核酸プローブの末端と結合しうる官能基及びシラノール基とを有するシランカップリング剤と、を水溶液中に溶解してなるプローブ媒体。または、標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ末端に官能基が修飾されている一本鎖核酸プローブと、該一本鎖核酸プローブの末端と結合しうる官能基及び基材と結合しうる部位とを有するシランカップリング剤と、を水の存在下で含んでなり、前記一本鎖核酸プローブと、前記シランカップリング剤とを結合するための二価性試薬をさらに含有するプローブ媒体。プローブ及び基材と結合しうる部位が官能基であっても良い。この結合方法が共有結合、イオン結合、静電吸着を含む物理吸着のいずれかによるものであっても良い。このプローブが、ＤＮＡプローブであっても良い。

（２）上記プローブ媒体をスポッティング方法により基材上に付与することにより固定するプローブ固定方法。このプローブ固定方法により作製されたプローブ固定基材のプローブが、ＤＮＡプローブであるＤＮＡアレイ。プローブ媒体をスポッティング方法により基材上に付与することにより固定し、得られたプローブ固定基材を用いて標的物質を検出す

る検出方法。
（３）上記プローブとプローブを基材上に固定する物質を各々容器中に収納し、基材上に固定する際に混合されてなるプローブ媒体。
　また、本発明に係るＤＮＡアレイは、標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ末端に官能基が修飾されている一本鎖核酸プローブと、該一本鎖核酸プローブの末端と結合しうる官能基及びシラノール基とを有するシランカップリング剤、を水溶液中に含んでなるプローブ媒体が前記基材上で離間的にスポット状に配置されていることを特徴とするＤＮＡアレイ。
【０００７】
【発明の実施の形態】
本発明のプローブ媒体および基材上へのプローブ固定方法では、プローブとプローブと結合しうる部位、および基材上に結合しうる部位とを含む媒体からなる。
【０００８】
プローブとしては、一本鎖核酸プローブ，一本鎖ＤＮＡプローブ，一本鎖ＲＮＡプローブ，一本鎖ＰＮＡプローブなどが含まれる。媒体中に含まれるプローブの量としては、プローブ媒体としての核酸プローブ安定性を考慮すると、媒体中には例えば２ｍｅｒ～５００ｍｅｒ、特には２ｍｅｒ～８０ｍｅｒの核酸プローブを、０．０５～５００μｍｏｌ／ｌ、特には０．５～５０μｍｏｌ／ｌの濃度となるように調整することが好ましい。これらのプローブは、プローブ単体であっても構わないが、プローブ末端にリンカー修飾を行なったものが好ましい。リンカー修飾としては、ビオチン化、官能基修飾などを挙げることができる。官能基としては、アミノ（ＮＨ２）基，カルボニル（ＣＯＯＨ）基，メルカプト（ＳＨ）基，水酸（ＯＨ）基などの官能基が挙げられる。特にはプローブ官能基としては、プローブ官能基合成の容易性を考慮するとアミノ基が好ましく、プローブ官能基の反応性を考慮するとメルカプト基が好ましい。
【０００９】
プローブと結合しうる部位としては、特に制約されるものではないが、プローブ末端のリンカーと結合するものであることが好ましい。プローブ末端のリンカーと結合する形態としてはさまざまなものが挙げられるが、化学結合によるものが好ましい。プローブリンカーと結合しうる部位としては、アビジン、官能基などを挙げることができる。官能基としては、エポキシ（ＣＨＯＣＨ２）基，アミノ（ＮＨ２）基，メルカプト（ＳＨ）基，マレイミド基，スクシイミドエステル基、クロロプロピル（Ｃ３Ｈ６Ｃｌ）基，イソシアネート（ＮＣＯ）基などが挙げられる。特にはプローブと結合しうる官能基としては、プローブ官能基との結合を考慮するとエポキシ基，マレイミド基，スクシイミドエステル基、クロロプロピル基，イソシアネート基が好ましい。媒体中に含まれるプローブと結合しうる部位の量としてはプローブと結合しうる部位により異なるため特に制約されるものではないが、プローブとの結合性を考慮するとプローブ量に対して、１００～１０００００当量となるように調整することが好ましい。
【００１０】
基材上に結合しうる部位としては、特に制約されるものではないが、基材上に強固に結合するものが好ましい。結合しうる部位としては官能基であってもよく、基材との化学結合を形成するものが好ましい。基材上に結合するための官能基としてはアルコキシシリル（ＳｉＯＲ）基、シラノール（ＳｉＯＨ）基、アルコキシ（ＯＲ）基などが含まれる。特には基材上への固定容易性からアルコキシシリル基、シラノール基が好ましいが、基材上にアミノ基、カルボニル基が形成されてなる場合は、それぞれに対して反応性を有するものが好ましい。シラノール基はアルコキシシリル基の加水分解により形成されるものであっても良い。プローブとプローブを基材上に固定する物質は媒体中において反応することにより結合するものであっても良く、反応は官能基間での化学反応による共有結合であることが好ましい。
【００１１】
これらプローブ、プローブと結合しうる部位そして、基材上に結合しうる部位の各々の組

合せとしてはさまざまなものが挙げられるが、官能基としての具体的な組合せをあげるのであれば、例えばプローブ官能基がアミノ基であり、プローブと結合しうる部位の官能基がエポキシ基、スクシイミドエステル基、基材上に結合しうる部位の官能基がシラノール基の組合せがあげられる。他に、プローブ官能基がメルカプト基であり、プローブと結合しうる部位の官能基がマレイミド基の組合せ、プローブ官能基がカルボニル基であり、プローブと結合しうる官能基がアミノ基、基材上に結合しうる部位の官能基がシラノール基の組合せ、プローブ官能基がアミノ基であり、プローブと結合しうる部位の官能基がイソシアネート基、基材上に結合しうる部位の官能基がシラノール基の組合せがあげられる。これらの中で、特にはプローブ官能基合成の容易性、プローブと結合しうる部位の官能基の反応性を考慮するのであれば、プローブ官能基がアミノ基でありプローブと結合しうる部位の官能基がイソシアネート基であるものが好ましい。これらの組合せは媒体中での混合により反応することが好ましく、反応させるために所定の条件下において処理をするものであっても良い。

【００１２】

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを単一物質中に有し、基材上に結合しうる部位の官能基がアルコキシシリル基、シラノール基である場合、単一物質として具体的なものをあげるのであれば、シランカップリング剤があげられる。シランカップリング剤において、アルコキシシリル基の加水分解によりシラノール基を形成される。シランカップリング剤におけるアルコキシシリル基とは異なるもう１種の官能基としては、上記にあげたエポキシ基、イソシアネート基、メルカプト基、クロロプロピル基、マレイミド基、スクシイミドエステル基、である場合、シランカップリング剤はそれぞれエポキシシラン、イソシアネートシラン、メルカプトシラン、クロロプロピルシラン、マレイミドシラン、スクシイミドエステルシランである。これらのシランカップリング剤は必要に応じて加水分解を行ない、プローブと混合させる。

【００１３】

なお、マレイミドシラン、および、スクシイミドシランに関しては、日本国特許公開公報２００１－７２６９０、米国特許公報５２７７８１３に一部関連記載がみられるが、本発明に関わる部分の詳細な記載はみられない。

【００１４】

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とをそれぞれ異なる物質中に有し、プローブと結合しうる部位の官能基がマレイミド基であり、基材上に結合しうる部位の官能基がアルコキシシリル基、シラノール基である場合、それぞれの物質の組合せとして具体的なものをあげるのであれば、二価性試薬とシランカップリング剤があげられる。二価性試薬として具体的な物質名をあげるのであれば、Ｎ－（４－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，Ｎ－（６－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，Ｎ－（８－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，Ｎ－（１１－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅなどがある。特にこれらの物質をプローブ媒体として取り扱う際に水溶性であることが好適であるならば、これらを水溶性としたＮ－（４－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ，Ｎ－（６－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ，Ｎ－（８－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ，Ｎ－（１１－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔであっても構わない。また、シランカップリング剤については、シラノール基はアルコキシシリル基の加水分解により形成されるものであっても構わない。シランカップリング剤として二価性試薬と反応しうるものとしてはさまざまなものがあげられるが、アミノ基を有するアミノシランが好適である。これらのシランカップリング剤は必要に応じて加水分解を行ない、プローブと混合させる。

【００１５】

プローブおよびプローブを基材上に固定する物質を含んでなるプローブ媒体の媒体としては、水を含むものが好ましい。水の他にさらに媒体中に含まれるものとしては、エチレングリコール，チオジグリコール，グリセリン，イソプロピルアルコール，エタノールなどの有機溶媒が挙げられる。具体的な媒体としては、水を７０～９５ｗｔ％、チオジグリコール０．１～３％、イソプロピルアルコール５～３０ｗｔ％を含むものが挙げられる。より好適な媒体としては、水を８０～９０ｗｔ％、チオジグリコール１～２．５ｗｔ％、イソプロピルアルコール１０～２０ｗｔ％である。また、プローブ媒体には必要に応じて水溶性高分子材料が混合されていても構わない。水溶性高分子材料としては、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、パオゲン、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、ヒドロキシエチルセルロース（ＨＥＣ）、デキストラン、プルランなどがあげられる。具体的には、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）などの汎用的な高分子水溶性材料であることが好ましい。水溶性高分子材料の媒体への混合方法としては、予め水溶性高分子材料を完全に溶解させた所定の濃度の溶液を作製する。作製された水溶性高分子溶液を所定濃度となるように秤量し、混合する方法が好適である。水溶性高分子材料溶液としては、具体的には、ポリビニルアルコール粉末を秤量し、純水中に０．５～５ｗｔ％の濃度となるように加温しながら溶解調整し、水溶性高分子水溶液を作製する。この水溶性高分子水溶液を、プローブ媒体における濃度が０．０１～１ｗｔ％となるようにプローブ媒体中に混合することが好ましい。

【００１６】

プローブ媒体を混合する手順としては、いくつかの手順が挙げられる。１つ目の方法としては、プローブおよびプローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質を予め混合させた後、媒体である水、有機溶媒などの溶液を一定量添加、混合させる。必要に応じて、温度などを調整し所定時間放置、媒体の添加混合を繰返し行なっても良い。最後に未添加もしくは添加量の少ない溶液を所定比率となるまで加えることによりプローブ媒体を調整する方法である。プローブおよび物質の混合においては、混合により反応が進行なすることも考えられ、必要に応じて、混合状態の温度、混合時間、ｐＨ等を調整することが好ましい。プローブおよび物質の混合により反応が進行なする場合にあっては、予め混合することによりプローブ、物質間の反応を十分に進めることが容易となる。さらには、混合の調整によりプローブおよび物質を十分に結合させることが容易となり、好適である。また、プローブおよび物質の混合媒体への溶液の添加、混合においては、プローブおよび物質の混合後に溶液の一部もしくは全部の構成媒体である水、有機溶媒などを順次、滴下，混合，調整する方法であっても良く、水、有機溶媒などの構成媒体の一部もしくは全部を予め混合させた混合媒体を順次、滴下，混合，調整する方法であっても良い。混合媒体においてプローブおよび物質が反応する場合において、さらには溶液の添加により反応が促進されるのであれば、添加する構成媒体の順序、間隔、添加時の状態を調整することが好ましい。２つ目の方法としては、プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とをそれぞれ異なる物質に有する場合にのみ適用できるものであるが、プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質および、プローブもしくは基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質のどちらか一方を媒体の一部もしくは全部であるである水、有機溶媒などの溶液とを混合させた後に、残る一方を混合する方法である。この方法はプローブもしくは物質を溶液中に混合、溶解させることが困難である場合、混合，溶解させるための条件を調整することが可能であるため、また、同時に混合することにより所定の反応以外の作用が生じる場合において好適である。特に物質がシランカップリング剤でありプローブと結合し得る官能基が混合もしくは／および溶解させた際に安定である場合においては、物質を予め溶液中に混合、溶解させることにより十分なシラノール基を形成することが可能となるため好ましい。３つ目の方法としては、プローブおよびプローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質および溶液の一部もしくは全部の構成媒体をそれぞれ秤量し、一つの容器中に入れ、一度に混合する方法である。この方法は、プローブ、物質および溶液の混合順序によりプローブ媒体の特性が変化することが無い場合に適用でき、混合工程が簡略化

できることから好ましい方法である。
【００１７】
このようにして得られたプローブ媒体は、標的物質を検出するためのプローブ媒体として好適である。
【００１８】
得られたプローブ媒体を基材上にスポッティングすることによりプローブ固定基材を作製することができる。プローブを固定するための基材としては特に制約されるものではないが、標的物質の検出や材料としての汎用性を考慮するとガラスもしくは石英基板材料が好ましい。具体的な材料としては、１ｉｎｃｈ×３ｉｎｃｈサイズのスライドガラス基板が好適であり、プローブ固定の固定特性などを考慮するのであれば、ガラス材質中にアルカリ成分などが含まれない無アルカリ材料スライドガラス基板もしくは石英ガラス材料であることが好ましい。また、標的物質の検出方法によっては基板状などの形状を制約されるものではないが、検出方法および装置などの汎用性から基板状態であることが好適である。さらには、表面の平滑性が高い基板材料であることが望まれる。
【００１９】
また、プローブを固定するための基材としては、基材上に均一に尚且つ確実にプローブを固定するために、清浄面であることが好ましい。プローブを固定する前に予め基材上を洗浄することにより十分な清浄面を確保しておくことが望まれる。基材上を清浄する方法としては、水による洗浄，薬液による洗浄，プラズマによる洗浄，ＵＶオゾンによる洗浄など多くの方法が知られているが、簡易的に尚且つ均一に洗浄する方法としては、薬液による洗浄方法が適当である。例えば、所定濃度の水酸化ナトリウム水溶液を用いて基材表面を十分に洗浄し、基材上に付着した汚れを除去する方法が挙げられる。具体的に述べるのであれば、５０℃程度に加温した１ｍｏｌ／ｌ水酸化ナトリウム水溶液を用意し、水溶液中で基材表面をワイピングするもしくは水溶液をシャワーリングしながらブラッシングすることにより基材上に付着した汚れを確実に除去する。汚れを除去した後、余分な水酸化ナトリウム分を十分に水で洗い流す。最後にＮ２ブローなどにより水分除去を行なえば良い。このようにして、プローブ媒体を均一に尚且つ確実に固定しうる基材を得ることができる。
【００２０】
プローブ媒体を基材上にスポッティングする方法としては、いくつかの方法が知られている。具体的な方法としては、ピン法，インクジェット法，ピン＆リング法が知られている。これらの中でもインクジェット法は高密度で尚且つ正確なスポッティングができることから好適なスポッティング方法である。
【００２１】
インクジェット法によるスポッティング方法において、プローブ媒体に含まれる成分は上記に示したようにプローブ媒体としてインクジェットヘッドから吐出させた時にプローブおよびプローブを基材上に固定する物質に対して実質的に影響を与えないものであって、且つインクジェットヘッドを用いて基材上に正常に吐出可能である媒体組成を満たすものであれば、特に限定されるものではない。例えば、インクジェットヘッドが媒体に熱エネルギーを付与して吐出させる機構を備えるバブルジェット（登録商標）ヘッドである場合、グリセリン、チオジグリコール、イソプロピルアルコールを含む液体はプローブ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的に述べるのであれば、グリセリン５～１０ｗｔ％、チオジグリコール５～１０ｗｔ％を含む液体がプローブ媒体として好適に用いられる。また、インクジェットヘッドが圧電素子を用いて媒体を吐出させるピエゾジェットヘッドである場合、エチレングリコール、イソプロピルアルコールを含む液体はプローブ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的には、エチレングリコール５～１０ｗｔ％、イソプロピルアルコール０．５～２ｗｔ％を含む液体がプローブ媒体として好適に用いられる。
【００２２】
このようにして得られたプローブ媒体をインクジェットヘッドより吐出させ基材上に付着

させた時、スポットの形状が円形で、また吐出された範囲が広がることがない。高密度にプローブ媒体をスポッティングした場合にも、隣接するスポットとの連結を有効に抑えることができる。なお、本発明のプローブ媒体の特性は上記のものに限定されるものではない。

【００２３】

基材上に付与されたプローブ媒体中に含まれるプローブを所定の位置に固定し、隣接するスポットに含まれるプローブとのコンタミネーションをより確実に防ぐために有効であり、かつプローブを基材上に強固に固定するための有効な手段として、基材上に結合しうる部位と基材上との双方に互いに化学的作用により結合するもおのを用いる方法がある。化学的作用による結合としてはさまざまなものがあげられるが、例えば、共有結合、イオン結合などがあげられる。プローブを基材上に強固に固定する為にも共有結合であることが好ましい。

【００２４】

官能基としての好ましい例としては、物質側にシラノール（ＳｉＯＨ）基、基材上にも水酸（ＯＨ）基を有する組合せが挙げられる。この組合せによりスポッティングにより基材上に付与されたプローブ媒体中に含まれる物質のシラノール基と基材上のシラノール基とが反応して基材上に物質が固定化される。具体的な基材をあげるのであれば、先に述べたガラス材料、石英基板材料が基材上に水酸基を有するものであり好適である。

【００２５】

さらに、プローブとプローブと結合しうる部位との間についても、化学的作用により結合していることが好ましい。化学的作用としての結合としては、例えば、共有結合、イオン結合があげられる。プローブを基材上に強固に固定する為にも共有結合であることが好ましい。この結果、プローブは基材上に固定化され、プローブのスポットを所定の位置に形成することができる。特に官能基としてアミノ基を有するプローブおよび、プローブと結合しうる部位の官能基としてエポキシ基、基材上に結合しうる部位の官能基としてシラノール基を有する物質を含んでなるプローブ媒体を調整し、所定の比率となるようグリセリン、チオジグリコール、イソプロピルアルコールなどを混合したプローブ溶液を調整した。このプローブ溶液を官能基として水酸基を有する基材上にインクジェットヘッドを用いてスポッティングを行なった場合、プローブ溶液は基材上に安定した大きさのスポットを形成する。このようにして、プローブを基材上の所定の位置に固定することができる。また、官能基としてアミノ基を有するプローブおよび、プローブと反応しうる官能基にイソシアネート基、基材上官能基と反応しうる官能基にシラノール基を有する物質を含んでなるプローブ媒体を調整し、所定の比率となるようグリセリン、チオジグリコール、イソプロピルアルコールなどを混合したプローブ溶液を調整した。このプローブ溶液を官能基として水酸基を有する基材上にインクジェットヘッドを用いてスポッティングを行なった場合、プローブ溶液は基材上に安定した大きさのスポットを形成する。このようにして、プローブを基材上の所定の位置に固定することができる。

【００２６】

なお、プローブ媒体中には水溶性高分子材料であるポリビニルアルコール（ＰＶＡ）を混合させておくことが好ましい。より好ましくは、完全に溶解させておくことが望まれる。プローブ媒体中への水溶性高分子材料の混合は、基材上におけるスポッティング状態の観察を容易にする、スポッティング後のスポットにおけるプローブ媒体を乾燥しにくくすることにより、より確実にプローブ媒体と基材上を反応させ固定できるようになる。さらには、スポッティングにより作製されたプローブ固定基材の保管状態を考慮した場合、スポッティングにより形成されたプローブ媒体スポットが乾燥した場合においても標的物質を効率よく、尚且つ安定に検出するのに有効であるためである。

【００２７】

例えば、塩基長２０ｍｅｒのプローブを含むプローブ媒体をプローブ濃度が８μｍｏｌ／ｌとなるように調整した。プローブ媒体はバブルジェット（登録商標）プリンタ（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製、但し平板に印字可能に改造したもの）を用いて、

固相とバブルジェット（登録商標）ヘッドのノズルの間隔を１．２～１．５ｍｍ程度に設定し、該ノズルから吐出させた場合（吐出量は約４ピコリットル）、固相上には直径約５０～８０μｍ程度のスポットを形成することができ、また液体が固相表面に着弾したときの飛沫に由来するスポット（以降「サテライトスポット」と称する）はルーペを用いての目視観察では全く認められなかった。

【００２８】

また、上記プローブ固定基材（水溶性高分子材料を含まないプローブ媒体を固定したもの）を顕微測定用フーリエ変換赤外分光光度計（顕微ＦＴ－ＩＲ）により分析を行なった。スポット以外の部位においては、基材に起因するＳｉ－Ｏ結合ピークを検出することができたが、他の結合ピークは殆ど認められなかった。これに対して、スポット形成部位においては基材のブロードピークを検出することができたのに加えて、プローブ媒体に含まれるプローブを基材上に固定する物質の－ＣＨ２－結合のピークが、極僅かではあるが検出することができた。

【００２９】

また、上記プローブ固定基材を昇温脱理法（ＴＤＳ：ＴｈｅｒｍａｌＤｅｓｏｐｔｉｏｎＳｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ）により分析を行なった。分析を行なうにあたり、スポットが形成されている部位を含む７ｍｍ□の基板片とスポットが形成されていないスポット外周部位の７ｍｍ□の基板片を切断抽出し、比較した。温度は２５～５００℃とし、昇温速度は毎分５℃とした。この結果、両基板片の脱離成分質量を比較したところ、スポット形成部位においてはＣＨ４，ＣＨ３ＯＨなどのプローブおよびプローブを基材上に固定する物質による質量が１５０℃以上において多く検出された。これらのことから、スポット部位にのみプローブ媒体がスポッティングされ、スポット部位以外にはプローブ媒体および媒体中に含まれる物質が付与されていないことが確認できた。

【００３０】

また、上記プローブ固定基材を飛行時間型二次イオン質量分析装置（ＴＯＦ－ＳＩＭＳ：ＴｉｍｅＯｆＦｌｉｇｈｔ－ＳｅｃｏｎｄａｒｙＩｏｎＭａｓｓＳｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒ）により分析を行なった。分析を行なうにあたり、スポット形成部位近傍について面スキャンを行ない、比較した。その結果、スポット形成部位においてはＤＮＡに起因するPO^{2-}，PO^{3-}イオンが検出された。これに対して、スポットが形成されていない箇所、スポット間隙部においては、PO^{2-}，PO^{3-}イオンが検出されないばかりでなく、プローブと結合しうる部位の官能基に起因する二次イオンは検出されなかった。

【００３１】

ここで、このプローブ固定基材を用いて、例えば標的物質の検出等を行なう場合の検出精度（Ｓ／Ｎ比）の向上を図ることを目的として、該プローブを固相表面に固定した後、該基材上のプローブ非結合部分がサンプル中に含まれる標的物質等と結合しないようにブロッキングを行なっても良い。ブロッキングは例えば、該基材を２％ウシ血清アルブミン水溶液中に、例えば２時間程度浸すことにより行なわれる。しかし、基材上のプローブ固定部位以外への標識物質の吸着を防ぐ効果からすると、ウシ血清アルブミン水溶液が好適である。なお、このブロッキングの工程は必要に応じて行なえば良く、例えばサンプルの該プローブ固定基材への供給を各々のスポットに対して限定的に行ない、スポット以外の部位へのサンプルの付着が実質的にない場合には行なわなくても良い。スポット以外の部位へのサンプルの付着は基材となる材料にもよって異なる。特に基材がガラス，石英である場合においては、ブロッキング処理は行なわなくても良い。

【００３２】

この様にして作製するプローブ固定基材はその用途に応じて、例えば同じプローブを含む複数のスポットを有するように構成しても良く、また異種のプローブを各々含む複数のスポットを有する様に構成してもよい。プローブの種類，数量，配置は必要に応じて適宜変更することが可能である。そしてこの様な方法によってプローブが高密度に配置されたプローブ固定基材は、その後標的物質の検出や、標的物質塩基配列の特定等に用いられる。例えばサンプル中に含まれている可能性のある、塩基配列が既知の標的物質である一本鎖

核酸の検出に用いる場合には、該標的物質の一本鎖核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして用い、該プローブを含む複数のスポットが固相上に配置されているプローブ固定基材を用意し、該プローブ固定基材の各々のスポットに、サンプルを供給して該標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。それによって、サンプル中における標的物質の有無の検出を行なうことができる。

【００３３】

また、サンプル中に含まれている標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の特定に用いる場合には、該標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の複数の候補を設定し、該塩基配列群に対して各々相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして該基材上にスポッティングする。次いで、各々のスポットにサンプルを供給して該標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。これにより、標的物質の一本鎖核酸の塩基配列の特定を行なうことができる。また本発明に係わるプローブ固定基材の他の用途としては、例えばＤＮＡ結合蛋白質が認識する特異的な塩基配列のスクリーニングやＤＮＡに結合する性質を有する化学物質のスクリーニングへの適用が考えられる。

【００３４】

プローブ媒体としては、上記に述べたようなプローブおよびプローブを基材上に固定する物質を含んでなるもののみならず、プローブとプローブを基材上に固定する物質を各々容器中に収納し、基材上に固定する際に混合されてなるものであっても良い。

【００３５】

プローブとしては、一本鎖核酸プローブ，一本鎖ＤＮＡプローブ，一本鎖ＲＮＡプローブ，一本鎖ＰＮＡプローブなどが含まれる。これらのプローブは官能基を有するものであっても良く、例えば官能基としては、アミノ（ＮＨ２）基，イソシアネート（ＮＣＯ）基，メルカプト（ＳＨ）基，水酸（ＯＨ）基などの官能基が挙げられる。特にはプローブ官能基としては、プローブ官能基合成の容易性を考慮するとアミノ基が好ましく、プローブ官能基の反応性を考慮するとメルカプト基が好ましい。

【００３６】

プローブを容器中に収納するにあたり、容器は他の不純物などが混入することの無いように密閉することが可能である容器であることが好ましく、また、固定する際に混合することが容易であるように開封できるものである必要がある。容器としての開封については特に限定されるものではない。容器中に収納するプローブの状態としては特に限定されるものではないが、溶液状であっても粉末状であっても構わない。官能基がメルカプト基などである場合、プローブの安定性を考慮した上でフリーズドライ法などにより粉末化したものとして保管することが好ましい。保管状態としては、プローブの安定性を確保するために冷凍保存することが好ましいが、保管期間，プローブ種類，プローブ官能基などに応じて保管状態を変更することは可能である。このように、プローブを容器中に収納し、保管した状態で基材上に固定する際に混合するものであっても構わない。

【００３７】

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質としては、プライマー，カップリング剤，シーラント，表面処理剤，表面改質剤などが含まれる。これらのプローブと結合しうる部位の官能基としてはエポキシ（ＣＯＯ）基，アミノ（ＮＨ２）基，メルカプト（ＳＨ）基，マレイミド基，スクシイミドエステル基、イソシアネート（ＮＣＯ）基，クロロプロピル（Ｃ３Ｈ６Ｃｌ）基などが含まれる。特にはプローブと結合しうる部位の官能基としては、プローブ官能基との結合を考慮するとエポキシ基，マレイミド基，スクシイミドエステル基、イソシアネート基，クロロプロピル基が好ましい。また、これらの基材上に結合しうる部位の官としてはアルコキシシリル（ＳｉＯＲ）基、シラノール（ＳｉＯＨ）基、アルコキシ（ＯＲ）基などが含まれる。特には基材上への固定容易性、反応性からアルコキシシリル基、シラノール基が好ましい。シラノ

ール基はアルコキシシリル基の加水分解により形成されるものであっても良い。プローブとプローブと結合しうる部位の官能基は媒体中において反応することにより結合するものであっても良く、反応は官能基間での化学反応による共有結合であることが好ましい。

【００３８】

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質を容器中に収納するにあたり、容器は他の不純物などが混入することが無いようにさらには物質が揮発することにより減量することが無いように密閉することが可能であるもしくは、密閉された容器であることが好ましく、また、固定する際に混合が簡易的であるように容易に開封できるものであることが好ましい。しかしながら、容器としての開封については特に限定されるものではない。プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とをそれぞれ異なる物質中に有する場合には、それぞれの物質を同一容器中に収納するか、別々の容器中に収納するか、特に制約されるものではないが、プローブ媒体を形成するにあたり適当であるように収納することが好ましい。容器中に収納する物質の状態としては特に限定されるものではないが、溶液状であっても粉末状であっても構わない。さらには基材上へ固定するための官能基例であるシラノール基を形成するために加水分解した溶液であっても構わない。保管状態としては、物質の安定性を確保するために室温保存することが好ましいが、保管期間などに応じて保管状態を変更することは可能である。特に、加水分解した溶液である場合は保管中における温度が上昇しない方が好ましい。また、プローブを基材上に固定する物質の官能基に応じて、加水分解時，加水分解後のｐＨを調整することにより安定性を得ることが好ましい。

【００３９】

プローブを基材上に固定する際に、これら容器に収納されたプローブおよびプローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質を混合するにあたり、必要に応じて水などの溶液を添加しても構わない。また、プローブ媒体とするために十分混合するための物質、例えば水などの溶媒を別容器に収納しておき、プローブ媒体調整時に混合するものであっても構わない。

【００４０】

以下実施例をもって本発明を更に詳細に説明する。

【００４１】

（実施例１）

（１）プローブの合成

標的物質に対して特異的に結合可能なプローブとして一本鎖ＤＮＡプローブを用いた。ＤＮＡ自動合成機を用いて配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブを合成した。なお配列番号１の一本鎖ＤＮＡ末端には５’末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してアミノ基を結合した１８量体のオリゴマーを用意し、以下の実験に用いた。

配列番号：１

5'H2N-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGTCGTTTTACA3’

【００４２】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてエポキシ基を有するシラン化合物（γ－グリシドキシプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－４０３；信越化学工業（株）社製）の５００μｍｏｌ／ｌ水溶液を室温下で３０分間攪拌し、プローブ結合物質溶液を調整した。調整したプローブ結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【００４３】

（３）プローブ媒体の調整

上記配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブを最終濃度が約４０μｍｏｌ／ｌとなるようにＴＥ溶液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）／１ｍＭ　エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）水溶液）に溶解し、一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調製した（正確な濃度は吸収強

度から算出）。
【００４４】
ついで、水溶性高分子材料であるポリビニルアルコール（ＰＶＡ）を濃度０．５ｗｔ％となるように純水中に溶解させた。完全に溶解させるためにホットバス中で８０℃に加温しながら６０分間攪拌した。不溶解物が無いことを確認した後、スポッティングにおいてノズルつまりが発生しないように濾過を行ない、ＰＶＡ水溶液を調整した。
【００４５】
上記のとおり調整したプローブ溶液を１００μｌ用意し、これに上記のとおり調整したプローブ結合物質溶液１００μｌ滴下した後、５分間混合した。混合した溶液を１０分間放置した後、純水を７００μｌ、上記のとおり調整したＰＶＡ水溶液を１００μｌ滴下し、５分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。
【００４６】
（４）基板洗浄
１ｉｎｃｈ×３ｉｎｃｈのガラス基板（厚み：１．１ｍｍ）をカセットに入れ、予め６０℃に加温した１ｍｏｌ／ｌ水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を１０分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にカセットごとガラス基板を浸し、超音波洗浄を１０分間行なった。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着したパーティクルを水洗、除去した。水洗後のガラス基板を１枚ずつ、窒素ガスブローにより乾燥させた。基板の洗浄を確認するために、基板上における純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。
【００４７】
（５）プローブ媒体のスポッティング
上記（３）で調整したプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用インクタンクに充填しバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（４）で用意したガラス基板を装着し、プローブ媒体をガラス基板上にスポッティングした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。また、スポット形成部位の外周において純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。この結果から、スポット部位以外にはプローブ媒体等による汚染などは発生していないことが確認できた。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。
【００４８】
（６）ブロッキング処理
上記（５）で作製したプローブ固定基材を１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で十分に洗浄し、プローブ固定基材上を濡らし、均一なブロッキング処理ができるようにした。次いでガラス基板を２％ウシ血清アルブミン水溶液中に浸して２時間放置し、ブロッキング処理を行なった。
【００４９】
（７）ハイブリダイゼーション処理
上記（１）に記載の配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（６）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（２５℃）で３時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５

０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【００５０】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１４８３０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６１４であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【００５１】

（実施例２）

（１）プローブの合成

上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【００５２】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてエポキシ基を有するシラン化合物（γ－グリシドキシプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－４０３；信越化学工業（株）社製）を用意した。このシランカップリング剤を以下の実験に用いた。

【００５３】

（３）プローブ媒体の調整

上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブ溶液および、ＰＶＡ溶液を調整した。

【００５４】

上記のとおり調整したプローブ溶液を１０ｍｌ用意し、これに上記のシランカップリング剤１１μｌ滴下した後、２０分間混合した。混合した溶液を３０分間放置した後、純水を５ｍｌずつ滴下、混合を繰返しながら合計８０ｍｌの純水を滴下した。ついで、上記のとおり調整したＰＶＡ水溶液を１０ｍｌ滴下し、１０分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した（正確な濃度は吸収強度から算出）。

【００５５】

（４）基板洗浄

上記実施例１と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。

【００５６】

（５）プローブ媒体のスポッティング

上記（３）で調整したプローブ媒体を上記実施例１と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【００５７】

（６）ブロッキング処理

上記実施例１と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。

【００５８】
（７）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例１と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。
【００５９】
（８）結果
上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２３４００であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６７２であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。
【００６０】
（実施例３）
（１）プローブの合成
標的物質に対して特異的に結合可能なプローブとして一本鎖ＤＮＡプローブを用いた。ＤＮＡ自動合成機を用いて配列番号１～４の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号２～４の一本鎖ＤＮＡプローブは、実施例１で用いた配列番号１を基本とし、１塩基変化させたものを配列番号２、３塩基変化させたものを配列番号３、そして６塩基変化させたものを配列番号４とした。また配列番号１～４の一本鎖ＤＮＡ末端には５’末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してアミノ基を結合した１８量体のオリゴマーを用意し、以下の実験に用いた。配列番号２～４の配列を以下に示す。
配列番号：２
5’H2N-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGTTGTTTTACA3’
配列番号：３
5’ H2N -(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGCTTTTTTACA3’
配列番号：４
5’ H2N -(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCATCTTGTTTACA3’
【００６１】
（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）
プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてエポキシ基を有するシラン化合物（γ－グリシドキシプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－４０３；信越化学工業（株）社製）を用意した。このシランカップリング剤を以下の実験に用いた。
【００６２】
（３）プローブ媒体の調整
上記配列番号１～４の一本鎖ＤＮＡを用いて、上記実施例２の（３）に記載した方法と同様の方法で４種類のプローブ媒体を調製した（正確な濃度は吸収強度から算出）。
【００６３】
（４）基板洗浄
上記実施例１と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【００６４】
（５）プローブ媒体のスポッティング

上記（３）で調整した４種類のプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用の４つのインクタンクに各々のプローブ媒体を充填し、各々のインクタンクをバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（４）で用意したガラス基板を装着し、４種のプローブ媒体の各々を該ガラス基板の３×３ｍｍからなる４つのエリアの各々にスポッティングした。なお各エリア内でのスポッティングのパターンは実施例１と同様とした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【００６５】

（６）ブロッキング処理

上記実施例１と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。

【００６６】

（７）ハイブリダイゼーション処理

上記実施例１と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【００６７】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１４３８０であった。これに対して、１塩基のミスマッチ配列を有する配列番号２のＤＮＡプローブのスポットでは、８９６０の蛍光量が得られた。また、３塩基ミスマッチを有する配列番号３のＤＮＡプローブのスポットでは、２０３２と完全マッチの半分以下の蛍光量しか得られず、６塩基ミスマッチの配列番号４のＤＮＡでは蛍光スポット殆ど認識できず、スポット該当部位における蛍光強度は８７６であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６３７であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。以上の事から、ＤＮＡアレイ基板上で完全相補性の一本鎖ＤＮＡを特異的に検出することができた。

【００６８】

（実施例４）

（１）プローブの合成

上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【００６９】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてエポキシ基を有するシラン化合物（γ－グリシドキシプロピルトリメトキシシ

ラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－４０３；信越化学工業（株）社製）を用意した。このシランカップリング剤を以下の実験に用いた。

【００７０】

（３）プローブ媒体の調整

上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調整した。

【００７１】

上記のとおり調整したプローブ溶液を１０ｍｌ用意し、これに上記のシランカップリング剤１１μｌ滴下した後、２０分間混合した。混合した溶液を３０分間放置した後、グリセリン７．５ｗｔ％、尿素７．５ｗｔ％、及びチオジグリコール７．５ｗｔ％を含む水溶液を５ｍｌずつ滴下、混合を繰返しながら合計９０ｍｌの純水を滴下した。ついで、１０分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。

【００７２】

（４）基板洗浄

上記実施例１と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。

【００７３】

（５）プローブ媒体のスポッティング

上記（３）で調整したプローブ媒体を上記実施例１と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板は１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液を満たした容器中に浸漬し、容器ごと冷蔵庫に入れ冷蔵保管（４℃）した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【００７４】

（６）ブロッキング処理

上記（５）で作製したプローブ固定基材を１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液中より取り出した。次いでガラス基板を２％ウシ血清アルブミン水溶液を満たした容器中に浸漬して２時間放置し、ブロッキング処理を行なった。

【００７５】

（７）ハイブリダイゼーション処理

上記実施例１と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【００７６】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２３４００であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６２８であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【００７７】

（実施例５）

（１）プローブの合成

上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【００７８】
（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）
プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてクロロプロピル基を有するシラン化合物（γ－クロロプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－７０３；信越化学工業（株）社製）の５００μｍｏｌ／ｌ水溶液をｐＨ４．０となるようにｐＨを調整した後、室温下で３０分間攪拌し、プローブ固定物質溶液を調整した。調整したプローブ固定物質溶液を以下の実験に用いた。
【００７９】
（３）プローブ媒体の調整
上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調整した。
【００８０】
上記のとおり調整したプローブ溶液を１００μｌ用意し、これに上記のとおり調整したプローブ固定物質溶液１００μｌ滴下した後、５分間混合した。混合した溶液を１０分間放置した後、純水を８００μｌ滴下し、５分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。
【００８１】
（４）基板洗浄
上記実施例１と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【００８２】
（５）プローブ媒体のスポッティング
上記（３）で調整したプローブ媒体を上記実施例１と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板は１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液を満たした容器中に浸漬し、容器ごと冷蔵庫に入れ冷蔵保管（４℃）した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。
【００８３】
（６）ブロッキング処理
上記実施例４と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。
【００８４】
（７）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例１と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。
【００８５】
（８）結果
上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１１３２０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６４１であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。
【００８６】

（実施例６）
（１）プローブの合成
上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。
【００８７】
（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）
プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてクロロプロピル基を有するシラン化合物（γ－クロロプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－７０３；信越化学工業（株）社製）を用意した。このシランカップリング剤を以下の実験に用いた。
【００８８】
（３）プローブ媒体の調整
上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブ溶液および、ＰＶＡ溶液を調整した。
【００８９】
上記のとおり調整したプローブ溶液を１０ｍｌ用意し、これに上記のシランカップリング剤１０μｌ滴下した後、２０分間混合した。混合した溶液を３０分間放置した後、純水を５ｍｌずつ滴下、混合を繰返しながら合計８０ｍｌの純水を滴下した。ついで、上記のとおり調整したＰＶＡ水溶液を１０ｍｌ滴下し、１０分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。
【００９０】
（４）基板洗浄
上記実施例１と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【００９１】
（５）プローブ媒体のスポッティング
上記（３）で調整したプローブ媒体を上記実施例１と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。
【００９２】
（６）ブロッキング処理
上記実施例１と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。
【００９３】
（７）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例１と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。
【００９４】
（８）結果
上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１５７９０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６０８であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間におい

ては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【００９５】

（実施例７）

（１）プローブの合成

上記実施例１と全く同様にして配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【００９６】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）

上記実施例１と全く同様にしてプローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質を用意した後、以下の実験に用いた。

【００９７】

（３）プローブ媒体の調整

上記実施例１と全く同様にしてプローブ媒体を調整した。

【００９８】

（４）基板洗浄

上記実施例１と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。

【００９９】

（５）プローブ媒体のスポッティング

上記実施例１と全く同様にしてプローブ固定基材を作製した。

【０１００】

（６）ブロッキング処理

上記実施例１において実施したブロッキング処理を全く行なうことなく、１ＭＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄し、プローブ固定基材上を濡らし、均一なハイブリダイゼーション処理ができるようにした。

【０１０１】

（７）ハイブリダイゼーション処理

上記実施例１と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０１０２】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２３４００であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６５８であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。ブロッキング処理を行なわないことによるスポット部以外での蛍光強度の増加は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０１０３】

（実施例８）

（１）プローブの合成

標的物質に対して特異的に結合可能なプローブとして一本鎖ＤＮＡプローブを用いた。Ｄ

ＮＡ自動合成機を用いて配列番号５の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号５の一本鎖ＤＮＡ末端にはＤＮＡ自動合成機での合成時にチオールモディファイア（Ｔｈｉｏｌ－Ｍｏｄｉｆｉｅｒ）（グレンリサーチ（ＧｌｅｎＲｅｓｅａｒｃｈ）社製）を用いる事によってメルカプト（ＳＨ）基を導入した。続いて通常の脱保護を行ない、ＤＮＡを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。

配列番号：５

5’HS-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGTCGTTTTACA3'

【０１０４】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質（プローブ結合物質）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質の調整としてマレイミド基，ヒドロキシスクシンイミドエステル基を有する二価性試薬Ｎ－（６－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ（商品名：ｓｕｌｆｏ－ＥＭＣＳ；（株）同仁化学研究所社製）の５００μｍｏｌ／ｌ水溶液を室温下で５分間攪拌し、プローブ結合物質溶液を調整した。調整したプローブ結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１０５】

（３）基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質（基材結合物質）

基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質の調整としてアミノ基を有するシラン化合物（Ｎ－β（アミノエチル）γ－アミノプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－６０３；信越化学工業（株）社製）の２０ｍｍｏｌ／ｌ水溶液を室温下で３０分間攪拌し、基材結合物質溶液を調整した。調整した基材結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１０６】

（４）プローブ媒体の調整

上記配列番号５の一本鎖ＤＮＡプローブを最終濃度が約４０μｍｏｌ／ｌとなるようにＴＥ溶液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）／１ｍＭ　エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）水溶液）に溶解し、一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調製した（正確な濃度は吸収強度から算出）。

【０１０７】

上記のとおり調整したプローブ溶液を１００μｌ用意し、これに上記（２）で調整したプローブ結合物質溶液を１００μｌ滴下した後、５分間混合した。ついで上記（３）で調整した基材結合物質溶液を１００μｌ滴下した後、５分間混合した。混合した溶液を１０分間放置した後、グリセリン７．５ｗｔ％、尿素７．５ｗｔ％、及びチオジグリコール７．５ｗｔ％を含む水溶液を７００μｌ滴下し、５分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。

【０１０８】

（５）基板洗浄

１ｉｎｃｈ×３ｉｎｃｈのガラス基板（厚み：１．１ｍｍ）をカセットに入れ、予め６０℃に加温した１ｍｏｌ／ｌ水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を１０分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にカセットごとガラス基板を浸し、超音波洗浄を１０分間行なった。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着したパーティクルを水洗、除去した。水洗後のガラス基板を１枚ずつ、窒素ガスブローにより乾燥させた。基板の洗浄を確認するために、基板上における純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。

【０１０９】

（６）プローブ媒体のスポッティング

上記（４）で調整したプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用インクタンクに充填しバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名

：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（５）で用意したガラス基板を装着し、プローブ媒体をガラス基板上にスポッティングした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。また、スポット形成部位の外周において純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。この結果から、スポット部位以外にはプローブ媒体等による汚染などは発生していないことが確認できた。スポッティング終了後のガラス基板は１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液を満たした容器中に浸漬し、容器ごと冷蔵庫に入れ冷蔵保管（４℃）した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【０１１０】

（７）ブロッキング処理

上記（６）で作製したプローブ固定基材を１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液中より取り出した。次いでガラス基板を２％ウシ血清アルブミン水溶液を満たした容器中に浸漬して２時間放置し、ブロッキング処理を行なった。

【０１１１】

（８）ハイブリダイゼーション処理

上記（１）に記載の配列番号５の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（７）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（５５℃）で２時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０１１２】

（９）結果

上記（８）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号５のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２５７３０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６３９であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０１１３】

（実施例９）

（１）プローブの合成

上記実施例８と全く同様にして配列番号５の一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【０１１４】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質（プローブ結合物質）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質の調整としてマレイミド基を有する二価性試薬Ｎ－（６－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，　ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ（商品名：ｓｕｌｆｏ－ＥＭＣＳ；（株）同仁化学研究所社製）を用意した。このプローブ結合物質を以下の実験に用いた。

【０１１５】
（３）基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質（基材結合物質）
上記実施例８と全く同様にして基材結合物質溶液を調整した。調整した基材結合物質溶液を以下の実験に用いた。
【０１１６】
（４）プローブ媒体の調整
上記実施例８と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調整した。
【０１１７】
上記のとおり調整したプローブ溶液を１０ｍｌ用意し、これに上記のプローブ結合物質を約２．１ｍｇ秤量したものを添加した後、５分間混合した。混合した溶液を３０分間放置した後、純水を１０ｍｌずつプローブ，プローブ結合物質混合媒体中に滴下、混合を繰返しながら合計８０ｍｌの純水を滴下した。ついで、上記（３）で調整した基材結合物質溶液を１０ｍｌ滴下、５分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。
【０１１８】
（５）基板洗浄
上記実施例８と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【０１１９】
（６）プローブ媒体のスポッティング
上記（４）で調整したプローブ媒体を上記実施例８と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板は１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液を満たした容器中に浸漬し、容器ごと冷蔵庫に入れ冷蔵保管（４℃）した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。
【０１２０】
（７）ブロッキング処理
上記実施例８と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。
【０１２１】
（８）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例８と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。
【０１２２】
（９）結果
上記（８）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号５のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２５１００であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ７６９であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。
【０１２３】
（実施例１０）
（１）プローブの合成
標的物質に対して特異的に結合可能なプローブとして一本鎖ＤＮＡプローブを用いた。Ｄ

ＮＡ自動合成機を用いて配列番号５～８の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号６～８の一本鎖ＤＮＡプローブは、実施例８で用いた配列番号５を基本とし、１塩基変化させたものを配列番号６、３塩基変化させたものを配列番号７、そして６塩基変化させたものを配列番号８とした。また配列番号５～８の一本鎖ＤＮＡ末端にはＤＮＡ自動合成機での合成時にＴｈｉｏｌ－Ｍｏｄｉｆｉｅｒ（ＧｌｅｎＲｅｓｅａｒｃｈ社製）を用いる事によってチオール（ＳＨ）基を導入した。続いて通常の脱保護を行ないＤＮＡを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。配列番号６～８の配列を以下に示す。

配列番号：６

5’HS-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGTTGTTTTACA3’

配列番号：７

5’HS-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGCTTTTTTACA3’

配列番号：８

5’HS-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCATCTTGTTTACA3’

【０１２４】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質（プローブ結合物質）上記実施例８と全く同様にしてプローブ結合物質溶液を調整した。調整したプローブ結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１２５】

（３）基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質（基材結合物質）

上記実施例８と全く同様にして基材結合物質溶液を調整した。調整した基材結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１２６】

（４）プローブ媒体の調整

上記実施例８と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調整した。

【０１２７】

上記配列番号５～８の一本鎖ＤＮＡを用いて、上記実施例８の（４）に記載した方法と同様の方法で４種類のプローブ媒体を調製した（正確な濃度は吸収強度から算出）。

【０１２８】

（５）基板洗浄

上記実施例８と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。

【０１２９】

（６）プローブ媒体のスポッティング

上記（４）で調整した４種類のプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用の４つのインクタンクに各々のプローブ媒体を充填し、各々のインクタンクをバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（５）で用意したガラス基板を装着し、４種のプローブ媒体の各々を該ガラス基板の３×３ｍｍからなる４つのエリアの各々にスポッティングした。なお各エリア内でのスポッティングのパターンは実施例８と同様とした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板は１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液を満たした容器中に浸漬し、容器ごと冷蔵庫に入れ冷蔵保管（４℃）した。このようにして４種類のプローブを固定したプローブ固定基材を作製した。

【０１３０】

（７）ブロッキング処理

上記実施例８と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。

【０１３１】
（８）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例８に記載の配列番号５の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（７）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（５５℃）で２時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。
【０１３２】
（９）結果
上記（８）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号５のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２６１２０であった。これに対して、１塩基のミスマッチ配列を有する配列番号６のＤＮＡプローブのスポットでは、１２８７０の蛍光量が得られた。また、３塩基ミスマッチを有する配列番号７のＤＮＡプローブのスポットでは、４２２０と完全マッチの半分以下の蛍光量しか得られず、６塩基ミスマッチの配列番号８のＤＮＡでは蛍光スポット殆ど認識できず、スポット該当部位における蛍光強度は７９１であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６７５であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。以上の事から、ＤＮＡアレイ基板上で完全相補性の一本鎖ＤＮＡを特異的に検出することができた。
【０１３３】
（実施例１１）
（１）プローブの合成
上記実施例８と全く同様にして配列番号５の一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。
【０１３４】
（２）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質（プローブ結合物質）上記実施例８と全く同様にしてプローブ結合物質溶液を調整した。調整したプローブ結合物質溶液を以下の実験に用いた。
【０１３５】
（３）基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質（基材結合物質）
上記実施例８と全く同様にして基材結合物質溶液を調整した。調整した基材結合物質溶液を以下の実験に用いた。
【０１３６】
（４）プローブ媒体の調整
上記実施例８と全く同様にしてプローブ媒体を調整した。
【０１３７】
（５）基板洗浄
上記実施例８と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【０１３８】
（６）プローブ媒体のスポッティング

上記実施例８と全く同様にしてプローブ固定基材を作製した。
【０１３９】
（７）ブロッキング処理
上記実施例８において実施したブロッキング処理を全く行なうことなく、１ＭＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で基材上を洗浄し、均一なハイブリダイゼーション処理ができるようにした。
【０１４０】
（８）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例８と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。
【０１４１】
（９）結果
上記（８）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号５のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２４３８０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ７８３であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。ブロッキング処理を行なわないことによるスポット部以外での蛍光強度の増加は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。
【０１４２】
（実施例１２）
（１）プローブの合成
標的物質に対して特異的に結合可能なプローブとして一本鎖ＤＮＡプローブを用いた。ＤＮＡ自動合成機を用いて配列番号５の一本鎖ＤＮＡプローブを合成した。なお配列番号９の一本鎖ＤＮＡ末端には５’末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してアミノ基を結合した１８量体のオリゴマーを用意し、以下の実験に用いた。
配列番号：９
5’H2N-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGTCGTTTTACA3’
【０１４３】
（２）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質（プローブ結合物質）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質の調整としてマレイミド基を有する二価性試薬Ｎ－（８－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ（商品名：ｓｕｌｆｏ－ＨＭＣＳ；（株）同仁化学研究所社製）の５００μｍｏｌ／ｌ水溶液を室温下で５分間攪拌し、プローブ結合物質溶液を調整した。調整したプローブ結合物質溶液を以下の実験に用いた。
【０１４４】
（３）基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質（基材結合物質）
基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質の調整としてメルカプト基を有するシラン化合物（γ－メルカプトプロピルメチルジメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－８０２；信越化学工業（株）社製）の２０ｍｍｏｌ／ｌ水溶液を室温下で３０分間攪拌し、基材結合物質溶液を調整した。調整した基材結合物質溶液を以下の実験に用いた。
【０１４５】

（４）プローブ媒体の調整
上記配列番号９の一本鎖ＤＮＡプローブを最終濃度が約４０μｍｏｌ／ｌとなるようにＴＥ溶液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）／１ｍＭ　エチレンジアミン４酢酸（ＥＤＴＡ）水溶液）に溶解し、一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調製した（正確な濃度は吸収強度から算出）。
【０１４６】
ついで、水溶性高分子材料であるポリビニルアルコール（ＰＶＡ）を濃度０．５ｗｔ％となるように純水中に溶解させた。完全に溶解させるためにホットバス中で８０℃に加温しながら６０分間攪拌した。不溶解物が無いことを確認した後、スポッティングにおいてノズルつまりが発生しないように濾過を行ない、ＰＶＡ水溶液を調整した。
【０１４７】
上記のとおり調整したプローブ溶液を１００μｌ用意し、これに上記（２）で調整したプローブ結合物質溶液を１００μｌ滴下した後、５分間混合した。ついで上記（３）で調整した基材結合物質溶液を１００μｌ滴下した後、５分間混合した。混合した溶液を１０分間放置した後、純水を６００μｌ、上記のとおり調整したＰＶＡ水溶液を１００μｌ滴下し、５分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。
【０１４８】
（５）基板洗浄
上記実施例８と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【０１４９】
（６）プローブ媒体のスポッティング
上記（３）で調整したプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用インクタンクに充填しバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（４）で用意したガラス基板を装着し、プローブ媒体をガラス基板上にスポッティングした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。また、スポット形成部位の外周において純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。この結果から、スポット部位以外にはプローブ媒体等による汚染などは発生していないことが確認できた。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。
【０１５０】
（７）ブロッキング処理
上記（５）で作製したプローブ固定基材を１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で十分に洗浄し、プローブ固定基材上を濡らし、均一なブロッキング処理ができるようにした。次いでガラス基板を２％ウシ血清アルブミン水溶液中に浸して２時間放置し、ブロッキング処理を行なった。
【０１５１】
（８）ハイブリダイゼーション処理
上記に記載の配列番号９の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（７）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（５５℃）で２時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブロー

によりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０１５２】

（９）結果

上記（８）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号５のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１８７１０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６６４であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０１５３】

（実施例１３）

（１）プローブの合成

上記実施例１２と全く同様にして配列番号５の一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【０１５４】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質（プローブ結合物質）上記実施例１２と全く同様にしてプローブ結合物質溶液を調整した。調整したプローブ結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１５５】

（３）基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質（基材結合物質）

上記実施例１２と全く同様にして基材結合物質溶液を調整した。調整した基材結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１５６】

（４）プローブ媒体の調整

上記実施例１２と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブ溶液および、ＰＶＡ溶液を調整した。

【０１５７】

上記のとおり調整したプローブ溶液を１０ｍｌ用意し、これに上記のプローブ結合物質を約２．１ｍｇ秤量したものを添加した後、５分間混合した。混合した溶液を３０分間放置した後、純水を１０ｍｌずつプローブ，プローブ結合物質混合媒体中に滴下、混合を繰返しながら合計７０ｍｌの純水を滴下した。ついで、上記（３）で調整した基材結合物質溶液を１０ｍｌ滴下、５分間混合した。混合した後、３０分間放置した後、上記のとおり調整したＰＶＡ水溶液を１０ｍｌ滴下し、５分間混合した。混合を完了した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。

【０１５８】

（５）基板洗浄

上記実施例８と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。

【０１５９】

（６）プローブ媒体のスポッティング

上記（４）で調整したプローブ媒体を上記実施例８と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【０１６０】

（７）ブロッキング処理

上記実施例１２と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。

【０１６１】

（８）ハイブリダイゼーション処理

上記実施例１２と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０１６２】

（９）結果

上記（８）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号５のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１７９７０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ７２３であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０１６３】

（実施例１４）

（１）プローブの合成

上記実施例１２と全く同様にして配列番号９の一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【０１６４】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質（プローブ結合物質）プローブと結合しうる部位の官能基を有する物質の調整としてマレイミド基，ヒドロキシスクシンイミドエステル基を有する二価性試薬Ｎ－（６－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ（商品名：ｓｕｌｆｏ－ＥＭＣＳ；（株）同仁化学研究所社製）の５００μｍｏｌ／ｌ水溶液を室温下で５分間攪拌し、プローブ結合物質溶液を調整した。調整したプローブ結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１６５】

（３）基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質（基材結合物質）

基材上に結合しうる部位の官能基を有する物質の調整としてアミノ基を有するシラン化合物（Ｎ－β（アミノエチル）γ－アミノプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－６０３；信越化学工業（株）社製）の２０ｍｍｏｌ／ｌ水溶液を室温下で３０分間攪拌し、基材結合物質溶液を調整した。調整した基材結合物質溶液を以下の実験に用いた。

【０１６６】

（４）プローブ媒体の調整

上記配列番号９の一本鎖ＤＮＡプローブを最終濃度が約４０μｍｏｌ／ｌとなるようにＴＥ溶液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）／１ｍＭ　エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）水溶液）に溶解し、一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調製した（正確な濃度は吸収強度から算出）。

【０１６７】

上記のとおり調整したプローブ溶液を１００μｌ用意し、これに上記（２）で調整したプローブ結合物質溶液を１００μｌ滴下した後、５分間混合した。ついで上記（３）で調整した基材結合物質溶液を１００μｌ滴下した後、５分間混合した。混合した溶液を１０分間放置した後、グリセリン７．５ｗｔ％、尿素７．５ｗｔ％、及びチオジグリコール７．

５ｗｔ％を含む水溶液を７００μｌ滴下し、５分間混合した。混合した後、３０分間放置し、プローブ媒体を調整した。

【０１６８】

（５）基板洗浄

１ｉｎｃｈ×３ｉｎｃｈのガラス基板（厚み：１．１ｍｍ）をカセットに入れ、予め６０℃に加温した１ｍｏｌ／ｌ水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を１０分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にカセットごとガラス基板を浸し、超音波洗浄を１０分間行なった。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着したパーティクルを水洗、除去した。水洗後のガラス基板を１枚ずつ、窒素ガスブローにより乾燥させた。基板の洗浄を確認するために、基板上における純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。

【０１６９】

（６）プローブ媒体のスポッティング

上記（４）で調整したプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用インクタンクに充填しバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（５）で用意したガラス基板を装着し、プローブ媒体をガラス基板上にスポッティングした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。また、スポット形成部位の外周において純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。この結果から、スポット部位以外にはプローブ媒体等による汚染などは発生していないことが確認できた。スポッティング終了後のガラス基板は１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液を満たした容器中に浸漬し、容器ごと冷蔵庫に入れ冷蔵保管（４℃）した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【０１７０】

（７）ブロッキング処理

上記（６）で作製したプローブ固定基材を１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液中より取り出した。次いでガラス基板を２％ウシ血清アルブミン水溶液を満たした容器中に浸漬して２時間放置し、ブロッキング処理を行なった。

【０１７１】

（８）ハイブリダイゼーション処理

上記（１）に記載の配列番号９の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（７）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（５５℃）で２時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０１７２】

（９）結果

上記（８）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと

完全マッチである配列番号９のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２５７３０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６３９であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０１７３】

（実施例１５）

（１）プローブの合成

上記実施例１と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブを用意した後、以下の実験に用いた。一本鎖ＤＮＡプローブを使用するにあたりマイクロチューブに分注した。マイクロチューブ１本あたりの一本鎖ＤＮＡプローブ量が１７．５３ｎｍｏｌとなるように分注した後、ドライアップ乾燥させ一本鎖ＤＮＡプローブを得た。

【０１７４】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてエポキシ基を有するシラン化合物（γ－グリシドキシプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－４０３；信越化学工業（株）社製）を用いることとした。上記エポキシシランカップリング剤をプローブ結合物質溶液として以下の実験に用いた。

【０１７５】

（３）プローブ媒体の調整

上記配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブを分注、ドライアップ乾燥させたマイクロチューブ中に、プローブ結合物質であるエポキシシランカップリング剤を１０μｌ滴下混合した。次いで、純水を５０μｌ滴下混合した。５分間十分に混合した後に、３０分間静置した。

【０１７６】

次に、高沸点溶媒であるエチレングリコール５００μｌ、エチルアルコール５００μｌを上記マイクロチューブ中に滴下した後、１分間混合した。

【０１７７】

ついで、水溶性高分子材料であるポリビニルアルコール（ＰＶＡ）の濃度０．５ｗｔ％水溶液を１００μｌ滴下した後、１分間混合した。最後にプローブ媒体全量が２０００μｌとなるように純水を滴下し、５分間混合した。混合した後、６０分間放置し、プローブ媒体を調整した。

【０１７８】

（４）基板洗浄

１ｉｎｃｈ×３ｉｎｃｈのガラス基板（厚み：１．１ｍｍ）をカセットに入れ、予め６０℃に加温した１ｍｏｌ／ｌ水酸化ナトリウム水溶液にガラス基板を１０分間浸した。引き続き純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着した水酸化ナトリウムを水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にカセットごとガラス基板を浸し、超音波洗浄を１０分間行なった。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着したパーティクルを水洗、除去した。水洗後のガラス基板を１枚ずつ、窒素ガスブローにより乾燥させた。基板の洗浄を確認するために、基板上における純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。

【０１７９】

（５）プローブ媒体のスポッティング

上記（３）で調整したプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用インクタンクに充填しバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名

：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（４）で用意したガラス基板を装着し、プローブ媒体をガラス基板上にスポッティングした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。また、スポット形成部位の外周において純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。この結果から、スポット部位以外にはプローブ媒体等による汚染などは発生していないことが確認できた。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【０１８０】

（６）ブロッキング処理

上記（５）で作製したプローブ固定基材を１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で十分に洗浄し、プローブ固定基材上を濡らし、均一なブロッキング処理ができるようにした。次いでガラス基板を２％ウシ血清アルブミン水溶液中に浸して２時間放置し、ブロッキング処理を行なった。

【０１８１】

（７）ハイブリダイゼーション処理

上記（１）に記載の配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（６）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（２５℃）で３時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０１８２】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１５７５０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ１０８であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０１８３】

（実施例１６）

（１）プローブの合成

上記実施例１５と全く同様にして一本鎖ＤＮＡプローブの分注、ドライアップ乾燥させた。

【０１８４】

（２）プローブと結合しうる部位の官能基と機材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質（プローブ結合物質）

プローブと結合しうる部位の官能基と基材上に結合しうる部位の官能基とを有する物質の調整としてイソシアネート基を有するシラン化合物（３－イソシアネートプロピルトリエトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＥ－９００７；信越化学工業

（株）社製）を用いることとした。上記イソシアネートシランカップリング剤をプローブ結合物質溶液として以下の実験に用いた。

【０１８５】

（３）プローブ媒体の調整

上記配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブを分注、ドライアップ乾燥させたマイクロチューブ中に、プローブ結合物質であるイソシアネートシランカップリング剤を２０μｌ滴下混合した。次いで、純水を５０μｌ滴下混合した。５分間十分に混合した後に、３０分間静置した。

【０１８６】

次に、高沸点溶媒であるエチレングリコール５００μｌ、エチルアルコール５００μｌを上記マイクロチューブ中に滴下した後、１分間混合した。

【０１８７】

ついで、水溶性高分子材料であるポリビニルアルコール（ＰＶＡ）の濃度０．５ｗｔ％水溶液を１００μｌ滴下した後、１分間混合した。最後にプローブ媒体全量が２０００μｌとなるように純水を滴下し、５分間混合した。混合した後、６０分間放置し、プローブ媒体を調整した。

【０１８８】

（４）基板洗浄

上記実施例１５と全く同様にして基板洗浄を行ない、基板を得た。

【０１８９】

（５）プローブ媒体のスポッティング

上記（３）で調整したプローブ媒体をバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）用インクタンクに充填しバブルジェット（登録商標）ヘッドに装着した。なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンター（商品名：ＢＪＦ８５０；キヤノン（株）社製）は平板への印刷が可能な様に改造を施したものである。次いでこのプリンターに上記（４）で用意したガラス基板を装着し、プローブ媒体をガラス基板上にスポッティングした。ここでバブルジェット（登録商標）ヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は１．２～１．５ｍｍであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。また、スポット形成部位の外周において純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位において約５°であった。この結果から、スポット部位以外にはプローブ媒体等による汚染などは発生していないことが確認できた。スポッティング終了後のガラス基板はデシケーター内に静置した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【０１９０】

（６）ブロッキング処理

上記（５）で作製したプローブ固定基材を１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で十分に洗浄し、プローブ固定基材上を濡らし、均一なブロッキング処理ができるようにした。次いでガラス基板を２％ウシ血清アルブミン水溶液中に浸して２時間放置し、ブロッキング処理を行なった。

【０１９１】

（７）ハイブリダイゼーション処理

上記（１）に記載の配列番号１の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（６）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（２５℃）で３時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素

ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０１９２】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１５７５０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ１０８であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０１９３】

（実施例１７）

（１）プローブの合成

ＤＮＡ自動合成機を用いて配列番号５の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号１の一本鎖ＤＮＡ末端にはＤＮＡ自動合成機での合成時にチオールモディファイア（Ｔｈｉｏｌ－Ｍｏｄｉｆｉｅｒ）（グレンリサーチ（ＧｌｅｎＲｅｓｅａｒｃｈ）社製）を用いる事によってメルカプト（ＳＨ）基を導入した。続いて通常の脱保護を行ない、ＤＮＡを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。

配列番号：５

5'HS-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGTCGTTTTACA3'

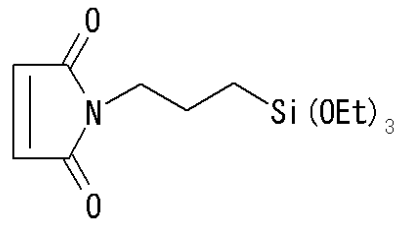
【０１９４】

（２）プローブ固定物質

プローブを基材上に固定する物質の調整としてマレイミド基を有するシランカップリング剤（マレイミドプロピルトリエトキシシラン：化合物Ｉ）を含むシランカップリング剤を日本国公開特許公報２００１－７２６９０に記載の方法により合成した。合成の確認は^{1}ＨＮＭＲ、^{13}ＣＮＭＲによって行った。このシランカップリング剤を以下の実験に用いた。

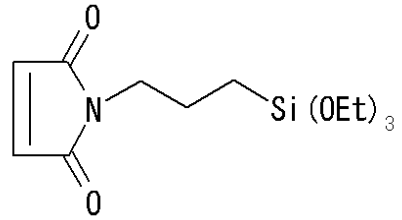
【０１９５】

【外１】



【０１９６】

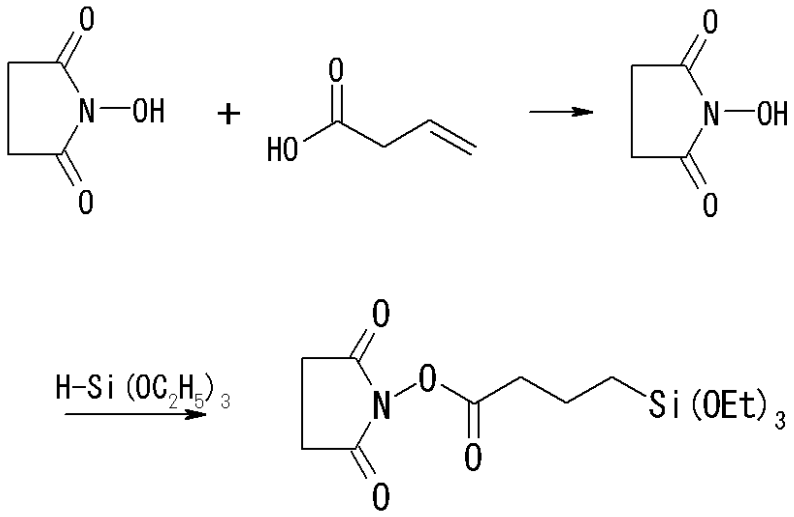
【外２】



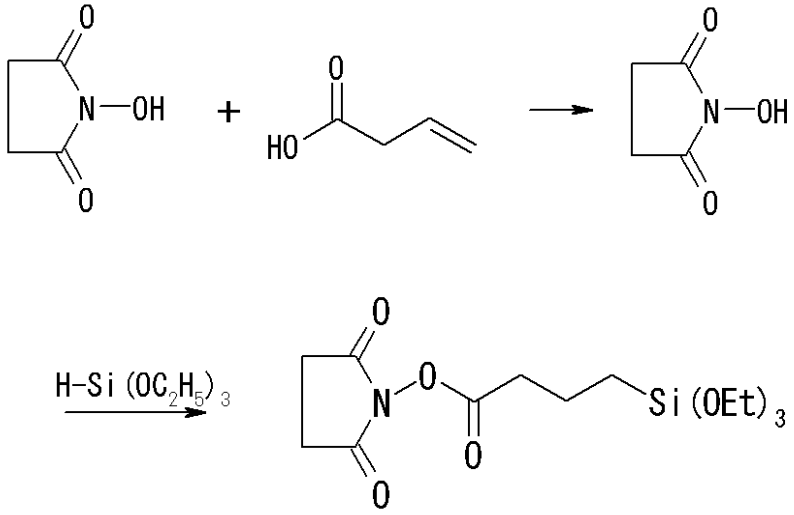
化合物Ｉ

【０１９７】

（３）プローブ媒体の調整
上記実施例１と全く同様にしてプローブ媒体を調整した。
【０１９８】
（４）基板洗浄
上記実施例１と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【０１９９】
（５）プローブ媒体のスポッティング
上記実施例１と全く同様にしてプローブ固定基材を作製した。
【０２００】
（６）ブロッキング処理
上記実施例１と全く同様にしてブロッキング処理を全く行ない、１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄し、プローブ固定基材上を濡らし、均一なハイブリダイゼーション処理ができるようにした。
【０２０１】
（７）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例１と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；ＡｘｏｎＩｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。
【０２０２】
（８）結果
上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２３４００であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６５８あった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。ブロッキング処理を行なわないことによるスポット部以外での蛍光強度の増加は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。
【０２０３】
（実施例１８）
（１）プローブの合成
実施例１７と全く同様にして配列番号５の一本鎖核酸を合成した。続いて通常の脱保護を行ない、ＤＮＡを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。
【０２０４】
（２）プローブ固定物質
プローブを基材上に固定する物質の調整としてスクシイミドエステル基を有するシランカップリング剤（スクシイミジルトリエトキシシリルプロピオネート：化合物II）を含むシランカップリング剤を以下にスキームを示した方法により合成した。合成の確認は^{1}ＨＮＭＲ、^{13}ＣＮＭＲによって行った。このシランカップリング剤を以下の実験に用いた。
【０２０５】
【外３】



【０２０６】
【外４】



化合物II
【０２０７】
（３）プローブ媒体の調整
上記実施例１７と全く同様にしてプローブ媒体を調整した。
【０２０８】
（４）基板洗浄
上記実施例１７と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。
【０２０９】
（５）プローブ媒体のスポッティング
上記実施例１７と全く同様にしてプローブ固定基材を作製した。
【０２１０】
（６）ブロッキング処理
上記実施例１７と全く同様にしてブロッキング処理を全く行ない、１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄し、プローブ固定基材上を濡らし、均一なハイブリダイゼーション処理ができるようにした。
【０２１１】
（７）ハイブリダイゼーション処理
上記実施例１７と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水

で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；ＡｘｏｎＩｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０２１２】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は２３４００であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ６５８であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。ブロッキング処理を行なわないことによるスポット部以外での蛍光強度の増加は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０２１３】

（比較例）

（１）プローブの合成

標的物質に対して特異的に結合可能なプローブとして一本鎖ＤＮＡプローブを用いた。ＤＮＡ自動合成機を用いて配列番号１０の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号１の一本鎖ＤＮＡ末端にはＤＮＡ自動合成機での合成時にチオールモディファイア（Ｔｈｉｏｌ－Ｍｏｄｉｆｉｅｒ）（グレンリサーチ（ＧｌｅｎＲｅｓｅａｒｃｈ）社製）を用いる事によってメルカプト（ＳＨ）基を導入した。続いて通常の脱保護を行ない、ＤＮＡを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。

配列番号：１０

5’HS-(CH2)6-O-PO2-O-ACTGGCCGTCGTTTTACA3’

【０２１４】

（２）プローブ媒体の調整

上記実施例１と全く同様にして、配列番号１０の一本鎖ＤＮＡプローブ溶液を調製した（正確な濃度は吸収強度から算出）。調整したプローブ溶液を以下の実験に用いた。

【０２１５】

上記のとおり調整したプローブ溶液を１００μｌ用意し、これに、グリセリン７．５ｗｔ％、尿素７．５ｗｔ％、及びチオジグリコール７．５ｗｔ％を含む水溶液を９００μｌ滴下した。５分間混合した後、３０分間放置、プローブ媒体を調整した。

【０２１６】

（３）基板洗浄

上記実施例１と同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を準備した。

【０２１７】

（４）プローブ固定化処理

アミノ基を有するシラン化合物（Ｎ－β（アミノエチル）γ－アミノプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：ＫＢＭ－６０３；信越化学工業（株）社製）の１ｗｔ％水溶液を室温下で３０分間攪拌し、シランカップリング剤水溶液を調整した。次いでこの水溶液に上記（３）で洗浄したガラス基板を室温（２５℃）で２０分間浸した後、流水で十分にすすぎ、余分なシランカップリング剤水溶液を除去した。すすいだ基板に窒素ガスを基板両面に吹き付けて乾燥させた。次に基板を１２０℃に加熱したオーブン中で１時間ベークしてシランカップリング処理を完結させた。次いでＮ－マレイミドカプロイロキシスクシンイミド　Ｎ－（６－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ）ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ　（商品名：ＥＭＣＳ；（株）同仁化学研究所社製）を２．７ｍｇ秤量し、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）／エタノールの１：１溶液に最終濃度が０．３ｍｇ／ｍｌとなる様に溶解させ、ＥＭＣＳ溶液を用意した。シランカッ

プリング処理を行った基板をこのＥＭＣＳ溶液に室温で３０分間浸漬した。ＥＭＣＳ溶液から引き上げた基板はＤＭＳＯ及びエタノールの混合溶媒及びエタノールで順次洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。このようにしてプローブ固定化処理を完了させた。プローブ固定化処理の効果を確認するために純水接触角を測定した。その結果、基板上における接触角は２５～３０°であった。この結果から、基板上へのプローブ固定化処理が適切に実施できていることが確認できた。

【０２１８】

（５）プローブ媒体のスポッティング

上記（２）で調整したプローブ媒体を上記実施例１と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。また、プローブ固定化処理の効果を確認するために純水接触角を測定した。その結果、基板上における接触角は２５～３０°であった。この結果から、スポット部位以外にはプローブ媒体等による汚染などは発生していないことが確認できた。スポッティング終了後のガラス基板は１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液を満たした容器中に浸漬し、容器ごと冷蔵庫に入れ冷蔵保管（４℃）した。このようにしてプローブ固定基材を作製した。

【０２１９】

（６）ブロッキング処理

上記実施例１と全く同様にしてブロッキング処理を行なった。

【０２２０】

（７）ハイブリダイゼーション処理

上記（１）に記載の配列番号１０の一本鎖ＤＮＡプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡプローブをＤＮＡ自動合成機で合成し、５’末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖ＤＮＡプローブを得た。この標識化一本鎖ＤＮＡを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に最終濃度１μＭとなるように溶解し、この溶液中に上記（６）で得たブロッキング処理したプローブ固定基材を浸漬し、室温（２５℃）で３時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを１Ｍ　ＮａＣｌ／５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖ＤＮＡプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブ固定基材を乾燥させた。次に該プローブ固定基材のスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：ＧｅｎｅＰｉｘ４０００Ｂ；Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを１００％に設定し、ＰＭＴを４００Ｖに設定した。

【０２２１】

（８）結果

上記（７）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖ＤＮＡプローブと完全マッチである配列番号１０のＤＮＡプローブのスポットでは、５３２ｎｍでの蛍光強度は１２７９０であった。また、ＤＮＡプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ７９２であった。各ＤＮＡプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約２００μｍの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【０２２２】

【発明の効果】

以上説明した様に、本発明によればプローブおよびプローブと結合しうる物質、基材上と結合しうる物質をプローブ媒体中に含ませることにより、プローブ媒体を基材上に付与するだけで、プローブを効率良く、安定的に基材上に固定させることができる。また、この方法を用いることによってプローブ固定基材を製造することにより、少ない工程でプロー

ブ固定基材を製造できるようになるばかりではなく、プローブ固定基材を高品質で尚且つ、簡略的に製造できる。

【０２２３】

また本発明によれば、多種のプローブを一つの基材上に固定する場合、各プローブ種に対応して結合物質種，濃度を選択することが可能となる。さらにはプローブおよびプローブと結合しうる物質、基材上と結合しうる物質間の結合反応条件の各プローブ種に応じて調整可能となる。このため、一つの基材上において多種プローブをプローブ種毎に最適な条件で結合させることができる。

【０２２４】

更に本発明によれば少量の検体からでも標的物質に関するより多くの情報を、より正確に検査可能なプローブアレイを得ることができ、またそれを用いることでサンプル中に標的物質が存在するか否かをより正確、且つ迅速に判定できる。同様にこのプローブアレイを用いることでサンプル中の標的物質の構造をより正確に、且つ迅速に特定することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
G01N 37/00 102

(72)発明者 亀山 誠
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内
(72)発明者 岡本 尚志
東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 国際公開第９９／０５７３２３（WO，Ａ１）
特開２００１－０６６３０５（ＪＰ，Ａ）
特開２００１－２３５４６９（ＪＰ，Ａ）
特開平１１－１８７９００（ＪＰ，Ａ）
特開２００１－２２８１５２（ＪＰ，Ａ）
特開２００１－０６６３０４（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５１３８１４（ＪＰ，Ａ）
B.Arkles, et al., Stable, water-borne silane coupling agents, Compos.Inst.Int.Compos.Expo.Proc., １９９１年, Vol.46th, p.2.D, 1-7

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
G01N 33/48-33/98
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 37/00
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)