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

特許第3951309号

(P3951309)

(45)発行日　平成19年8月1日(2007.8.1)　(24)登録日　平成19年5月11日(2007.5.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAZ
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
		C12N	15/00	F

請求項の数 16　(全 10 頁)

(21)出願番号　特願平5-189624
(22)出願日　平成5年7月30日(1993.7.30)
(65)公開番号　特開平7-39399
(43)公開日　平成7年2月10日(1995.2.10)
審査請求日　平成11年9月17日(1999.9.17)

(73)特許権者　000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区丸の内一丁目６番６号
(74)代理人　100100310
弁理士　井上　学
(72)発明者　神原　秀記
東京都国分寺市東恋ケ窪１丁目２８０番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(72)発明者　岡野　和宣
東京都国分寺市東恋ケ窪１丁目２８０番地
株式会社日立製作所中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡ解析法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

（１）制限酵素でＤＮＡを切断してＤＮＡ断片を得る工程と，

（２）前記ＤＮＡ断片の３’末端に，蛍光体，エレクトロルミネッセンス試薬，放射性標識の何れかが結合された既知の塩基配列を持つオリゴマーを結合する工程と，

（３）前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し前記ＤＮＡ断片を分取する工程と，

（４）分取された前記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程とを有し、

工程（３）では，分離された各区画に異なるＤＮＡプローブが固定されたプローブアレーを用いて，前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し，前記オリゴマーの少なくとも一部及び前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍と，前記ＤＮＡプローブとの間でハイブリダイゼーションを行うことにより前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し，

前記ＤＮＡプローブの塩基配列が，前記オリゴマーの少なくとも一部の配列と，前記制限酵素による認識配列と，前記認識配列に続く少なくとも２塩基の長さの塩基配列とからなる一連の塩基配列に相補であることを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項２】

（１）制限酵素でＤＮＡを切断してＤＮＡ断片を得る工程と，

（２）前記ＤＮＡ断片の３’末端に，蛍光体，エレクトロルミネッセンス試薬，放射性標識の何れかが結合された既知の塩基配列を持つオリゴマーを結合する工程と，

（３）前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し前記ＤＮＡ断片を分取する工

程と，
（４）分取された前記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程とを有し、
工程（３）では，分離された各区画に異なるＤＮＡプローブが固定されたプローブアレーを用いて，前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し，前記オリゴマーの少なくとも一部及び前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍と，前記ＤＮＡプローブとの間でハイブリダイゼーションを行うことにより前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し，前記ＤＮＡ断片と前記ＤＮＡプローブとの間でのハイブリダイゼーションの有無により前記ＤＮＡ断片の、前記制限酵素による認識配列と、それに続く少なくとも２塩基の塩基配列を識別することを特徴とするＤＮＡ解析方法。
【請求項３】
（１）制限酵素でＤＮＡを切断してＤＮＡ断片を得る工程と，
（２）前記ＤＮＡ断片の３’末端に，蛍光体，エレクトロルミネッセンス試薬，放射性標識の何れかが結合された既知の塩基配列を持つオリゴマーを結合する工程と，
（３）前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し前記ＤＮＡ断片を分取する工程と，
（４）分取された前記ＤＮＡ３’断片の塩基配列を決定する工程とを有し、
異なるＤＮＡプローブが固定される分離された区画が線状に配列され，前記区画の配列方向で相互にずらすことができる複数のプローブアレーを組合わせて用い，工程（３）では，前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列の識別して複数の前記ＤＮＡ断片を分取し，前記オリゴマーの少なくとも一部及び前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍と，前記ＤＮＡプローブとの間でハイブリダイゼーションを行うことにより前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し、前記ＤＮＡ断片と前記ＤＮＡプローブとの間でのハイブリダイゼーションの有無により前記ＤＮＡ断片の、前記制限酵素による認識配列と、それに続く少なくとも２塩基の塩基配列を識別することを特徴とするＤＮＡ解析方法。
【請求項４】
（１）制限酵素でＤＮＡを切断してＤＮＡ断片を得る工程と，
（２）前記ＤＮＡ断片の３’末端に，蛍光体，エレクトロルミネッセンス試薬，放射性標識の何れかが結合された既知の塩基配列を持つオリゴマーを結合する工程と，
（３）前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し前記ＤＮＡ断片を分取する工程と，
（４）分取された前記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程とを有し、
工程（３）では，異なるＤＮＡプローブが固定され，前記ＤＮＡプローブの種類毎に分離して扱うことができるプローブ媒体を用いて，前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し，前記オリゴマーの少なくとも一部及び前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍と，前記ＤＮＡプローブとの間でハイブリダイゼーションを行うことにより前記ＤＮＡ断片の３’末端近傍の塩基配列を識別し、前記ＤＮＡ断片と前記ＤＮＡプローブとの間でのハイブリダイゼーションの有無により前記ＤＮＡ断片の、前記制限酵素による認識配列と、それに続く少なくとも２塩基の塩基配列を識別することを特徴とするＤＮＡ解析方法。
【請求項５】
請求項１に記載のＤＮＡ解析方法に於いて，前記認識配列に続く前記塩基配列が２塩基長から６塩基長であることを特徴とするＤＮＡ解析方法。
【請求項６】
請求項１に記載のＤＮＡ解析方法に於いて，前記認識配列に続く前記塩基配列は，２塩基から６塩基の全ての組合わせを含むことを特徴とするＤＮＡ解析方法。
【請求項７】
（１）ＤＮＡを制限酵素により切断して得たＤＮＡ断片の末端に既知の塩基配列のオリゴマーを結合する工程と，
（２）前記既知の塩基配列に相補的な配列と、前記既知の塩基配列に相補的な配列に続く、制限酵素の認識配列の相補配列と、前記制限酵素の認識配列の相補配列に続く、２塩基から６塩基の全ての組合わせの塩基配列とのそれぞれを持つ複数種類のオリゴマーを固

体表面に固定したＤＮＡプローブチップを用いて，前記オリゴマーと前記ＤＮＡ断片との間のハイブリダイゼーションの有無により前記ＤＮＡ断片の前記既知の塩基配列のオリゴマーが結合した末端の近傍の塩基配列を識別し，前記ＤＮＡ断片を前記ＤＮＡプローブチップ上で分画する工程とを有することを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項８】

（１）制限酵素を用いて２本鎖ＤＮＡを切断して２本鎖ＤＮＡ断片を得る工程と，

（２）既知の塩基配列を有し標識されたＤＮＡオリゴマーを前記２本鎖ＤＮＡ断片の３’末端部位に結合する工程と，

（３）前記ＤＮＡオリゴマーが結合された前記２本鎖ＤＮＡ断片から１本鎖ＤＮＡ断片を得る工程と，

（４）前記ＤＮＡオリゴマーの少なくとも一部に相補な塩基配列と，前記制限酵素による認識配列に相補な配列と，２塩基から６塩基の全ての組合わせの塩基配列のそれぞれの塩基配列とからなる，複数種類のＤＮＡプローブを用いて，前記１本鎖ＤＮＡ断片の，前記認識配列に続く２塩基から６塩基の塩基配列を，ハイブリダイゼーションの有無により認識して，認識した塩基配列の違いにより前記１本鎖ＤＮＡ断片を分離する工程とを有し，前記ＤＮＡプローブは，固相の分離された区画に種類毎に固定されるものであることを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項９】

請求項８に記載のＤＮＡ解析方法に於いて，プローブアレーの分離された各区画に，前記ＤＮＡプローブが種類毎に固定されることを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項１０】

請求項８に記載のＤＮＡ解析方法に於いて，分離された複数の区画が線状に配列され前記区画の配列方向で相互にずらすことができる複数の線状のプローブアレーの各区画に，前記ＤＮＡプローブが種類毎に固定されることを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項１１】

請求項８に記載のＤＮＡ解析方法に於いて，前記ＤＮＡプローブの種類毎に分離して扱うことができるプローブ媒体に，前記ＤＮＡプローブが種類毎固定されることを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項１２】

（１）制限酵素を用いて２本鎖ＤＮＡを切断して２本鎖ＤＮＡ断片を得る工程と，

（２）既知の塩基配列を有し標識されたＤＮＡオリゴマーを前記２本鎖ＤＮＡ断片の３’末端部位に結合する工程と，

（３）前記ＤＮＡオリゴマーが結合された２本鎖ＤＮＡ断片から１本鎖ＤＮＡ断片を得る工程と，

（４）前記１本鎖ＤＮＡ断片の，前記ＤＮＡオリゴマーの塩基配列及び前記制限酵素の認識配列に続く塩基配列を，ＤＮＡプローブとのハイブリダイゼーションの有無により認識し，認識された塩基配列の違いにより，前記１本鎖ＤＮＡ断片を分離する工程とを有し，前記ＤＮＡプローブは，固相の分離された区画に種類毎に固定されるものであることを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項１３】

（１）ＤＮＡを制限酵素により切断して得たＤＮＡ断片の末端に既知の塩基配列のオリゴマーを結合する工程と，

（２）前記既知の塩基配列の一部と前記制限酵素に特異的な切断認識部配列と前記切断認識配列に続く２塩基から６塩基からなる塩基配列に相補的な複数種類のプローブを固体表面に固定したＤＮＡプローブチップを用いて，前記プローブと前記ＤＮＡ断片の少なくとも一部との間のハイブリダイゼーションをさせる工程と、

（３）前記ハイブリダイゼーションの有無を検出する工程とを有することを特徴とするＤＮＡ解析方法。

【請求項１４】

前記２塩基から６塩基からなる塩基配列は、２塩基から６塩基からの塩基長を有する塩

基種の全ての組合せであることを特徴とする請求項１３に記載のＤＮＡ解析方法。
【請求項１５】
（１）ＤＮＡを制限酵素により切断して得たＤＮＡ断片の末端に既知の塩基配列のオリゴマーを結合する工程と，
（２）前記既知の塩基配列の一部と前記制限酵素に特異的な切断認識部配列とに相補的な塩基配列と、前記相補的な塩基配列に続く２塩基から６塩基からなる塩基配列とからなる複数種類のプローブを固体表面に固定したＤＮＡプローブチップを用いて，前記プローブと前記ＤＮＡ断片の少なくとも一部との間のハイブリダイゼーションをさせる工程と、
（３）前記ハイブリダイゼーションの有無を検出する工程とを有することを特徴とするＤＮＡ解析方法。
【請求項１６】
前記２塩基から６塩基からなる塩基配列は、２塩基から６塩基からの塩基長を有する塩基種の全ての組合せであることを特徴とする請求項１５に記載のＤＮＡ解析方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明はＤＮＡ塩基配列決定などのＤＮＡ解析法に関するものである。
【０００２】
【従来の技術】
従来、大きなＤＮＡ（例えば、10^5～10^6（１００Ｋ～１Ｍ）塩基長）の塩基配列決定には、まずＤＮＡを酵素を用いて切断し、プラスミドなどのベクター中にクローニング手法を用いて目的断片を挿入し、これを大腸菌に注入し寒天倍地で培養する。得られたコロニーを分別することにより断片化した目的ＤＮＡを分取していた。次いで分取したＤＮＡ断片を含むプラスミドを用いてＤＮＡ塩基配列決定をコロニーごとに行っていた。通常１回の塩基配列操作で決定できるＤＮＡ塩基長は３００～５００塩基であり、１Ｍ（10^6）塩基の決定には２０００ケ以上のコロニーを解析する必要がある。また、異なるコロニーを取ってきても同じＤＮＡ断片を含むコロニーを取る可能性もあり、２０００ケの数倍、即ち１万ケに近いコロニーを取り、解析する必要がある。
【０００３】
また、長いＤＮＡの解析法としてプライマーウォーキング（ｐｒｉｍｅｒ　ｗａｌｋｉｎｇ）（サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ）、第２５８巻、１７８７頁－１７９１頁、１９９２年）が知られているが、この方法はＤＮＡを端から４００塩基位ずつ決定していく方法である。すなわち決定したＤＮＡ鎖の末端近傍の配列を持つオリゴマーをプライマーとして用いて配列決定を順次行う方法である。１Ｍ塩基のＤＮＡを解析しようとすると２５００回の配列解析を行う必要があり、１回の解析に１日以上必要なので、全ての解析には数年を必要とする。
【０００４】
【発明が解決しようとする課題】
このように大きなＤＮＡの塩基配列決定は従来非常に手間と時間のかかるプロセスからなっていた。更に制限酵素による切断断片のサイズや種類によってはクローニング操作でベクター中に挿入しにくいものも存在し、全塩基配列決定が困難となる場合もあり、新しい手法の開発が望まれていた。本発明の目的は、長いＤＮＡあるいはＤＮＡ断片の混合物を効率良く解析するＤＮＡ解析方法を提供することにある。
【０００５】
【課題を解決するための手段】
本発明では上記目的を達成するために、本発明のＤＮＡ解析方法は、(１)長いＤＮＡを酵素などを用い、特定の配列部所で切断し、切断部に既知配列を持ち蛍光などで標識されたＤＮＡを接合するプロセス、(２)２本鎖ＤＮＡの少なくとも末端近傍を一本鎖とするプロセス、(３)末端の既知配列に続く目的ＤＮＡの配列を認識して、その配列の違いにより分離するプロセス、(４)分離されたＤＮＡを分取して配列決定するプロセス、の各プロセス

を少なくとも有している。

【０００６】

配列の違いにより分離、分取するにはＤＮＡ鎖が相補的な配列と相補結合（ハイブリダイズ）する性質を利用する。ＤＮＡ切断部に結合した既知配列の一部と切断認識部配列とそれに続く２～６マー（２～６個の核酸が連がったオリゴマー）からなる配列に相補的な種々の種類のＤＮＡオリゴマーをその種類別に固体表面に固定し、目的ＤＮＡ断片をこれにハイブリダイズさせる。目的ＤＮＡは二本鎖状態なのでアルカリ変性させて一本鎖としたり、エキソヌクレアーゼ　IIIなどの酵素を用いて二本鎖の３'末端から部分分解し、末端部を５'端が突出した形の一本鎖としたり、λエクソヌクレアーゼを用い５'末端から分解し、末端部を３'端が突出した形とした後、固体表面に固定された種々の種類のＤＮＡオリゴマーとハイブリダイズさせ、目的ＤＮＡを分離する。これら目的ＤＮＡを上記のＤＮＡオリゴマーの種類ごとに分取して配列を決定するが、このプロセスは種々の種類のＤＮＡ断片について同時に行う。要約すると、試料を制限酵素により切断して得たＤＮＡ断片の末端に既知配列のオリゴマーを接続し、既知配列に続いて数塩基の長さの範囲にある塩基種の多くの（できれば全ての）組合せの配列を持つオリゴマーを固体表面に固定したＤＮＡプローブチップを用いて、オリゴマーとＤＮＡ断片との間にハイブリダイゼーションをおこさせる。ハイブリダイゼーションの有無を検出し、この検出結果からＤＮＡ断片の末端配列を知り、ＤＮＡ断片を分画、又はそのまま解析する。この方法により、長いＤＮＡ又はＤＮＡ断片の混合物を効率良く解析するＤＮＡ解析法を提供でき、多数の異なる配列を持ったＤＮＡ断片を同時に解析できる。

【０００７】

【作用】

１M塩基にもなる長いＤＮＡをそのままいきなり塩基配列決定することは困難である。そこで、特定の配列を認識して切断する酵素で分断し、これらＤＮＡ断片を分離して、解析を並行して行い短時間で解析するのが本発明の主旨である。６塩基を認識する制限酵素を用いた場合、切断されたＤＮＡ断片の塩基の数（塩基長）は数百程度である。各ＤＮＡ断片の末端は固有の配列を持っており、これを認識して相補配列とハイブリダイズさせて分画することが可能であるが、安定な相補結合の強さをもつハイブリダイズを行うには相補配列の長さとして１０マー以上が必要である。１０マーからなるオリゴマーの種類は4^{10}種すなわち約10^{6}種も存在するので、これらオリゴマーの種類を全て作り用意することは容易ではない。ＤＮＡ断片の種類は数百程度であることから、これらを識別し保持するためのオリゴマーとしては数千種のものがあればよい。すなわちオリゴマーの長さが５～６マーからなる全ての種類のＤＮＡを用いれば識別可能である。上記の５～６マーの配列に加えて制限酵素切断部配列と末端に結合した既知配列の一部又は全てを含むオリゴマー配列を用いることにより、上記した程度の種類のＤＮＡを用いて、目的ＤＮＡとの間で充分な安定度をもつ相補結合をするＤＮＡプローブを作ることができる。これら種々の種類のＤＮＡプローブが固定された固体表面に目的ＤＮＡ溶液を流すことにより、溶液中のＤＮＡを相補結合したＤＮＡプローブの種類別に保持、分画できる。分画されたＤＮＡは並行してシーケンス反応を行い、解析できる。混合ＤＮＡ断片種の数が数十の場合には識別用オリゴマーとして３～４マーのものを用いてもよい。

【０００８】

【実施例】

本発明の一実施例を図を用いて説明する。解析しようとする２本鎖ＤＮＡ試料１としてλファージＤＮＡ（４８Ｋｂ）を用いた例を説明する。λファージＤＮＡを制限酵素ＥｃｏＲＩ（Ｇ↓ＡＡＴＴＣ：即ち、制限酵素ＥｃｏＲＩは塩基配列ＧＡＡＴＴＣを識別し、ＧとＡの間で切断する。以下、同様の意味の表現とする。）で切断し、分解物をエタノール沈殿により分取した後、５’突出端ＡＡＴＴを持ち２本鎖部分が

TGTAAAACGACGGCCAGTG

*ACATTTTGCTGCCGGTCACTTAA

の配列をもつ２本鎖状オリゴマーを酵素、ライゲース（ｌｉｇａｓｅ）を用いて切断部に結合させる。図１において２はＤＮＡ断片中の未知配列部分であり、＊は蛍光体等の標識体を示す。即ち、図１に示すように３'末端配列が＊ＡＣＡＴＴＴＴＧＣＴＧＣＣＧＧＴＣＡＣＴＴＡＡＧ……のＤＮＡ断片が生成する。λファージの場合、制限酵素ＥｃｏＲＩの切断個所は５個所と少なく、ＢａｍＨ　Ｉ（Ｇ↓ＧＡＴＣＣ）、Ｂａｌ　Ｉ（ＴＧＧ↓ＣＣＡ）、ＢｓｐＨ　Ｉ（Ｔ↓ＣＡＴＧＡ）などで同様に試料を切断し、ラインゲーションにより末端に既知配列をつける。この既知配列の３’末端近傍には蛍光体、あるいはエレクトロルミネッセンス試薬であるルテニウム鎖体などを標識しておく。もちろん放射性標識などを用いてもよい。本実施例では標識として、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ（モレキュラープローブ社商標、蛍光極大波長：約６１５ｎｍ）を用いた。これら酵素切断とライゲーションプロセスの後、λＤＮＡは４０弱の断片となる。これら反応生成物にエキソヌクレアーゼを加え５’末端を分解し、３’末端突出ＤＮＡ断片にした後、エタノール沈殿を用いてＤＮＡだけを分取し、１×ＴＢＥバッファー１０μｌ（マイクロリットル）中に保持する。

【０００９】

６ｍｍ×１０ｍｍの大きさのガラス表面に、文献（サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ）第２５１巻、７６７頁－７７２頁、１９９１年）と同様の手法で、種々の種類のオリゴヌクレオチド（ＤＮＡオリゴマープローブ３）を０．１ｍｍピッチで結合させたプローブチップ４を作製する。プローブチップ４には、全てで６０００個の区画ができる。図２は本実施例で使用するＤＮＡプローブの構造を示し、ＤＮＡプローブは、切断酵素の種類を識別する酵素認識配列５と、各ＤＮＡプローブ間で一部を共通配列とするためのユニバーサルプライマー部分６と、試料ＤＮＡ配列を分離認識する部分である配列分離認識部分７とを有している。図２のように制限酵素切断部（酵素認識配列部）５の配列４種（制限酵素の数だけある）とそれに続く固有配列（配列分離認識部分である固有配列認識部７）の部分（Ｘ’- -Ｘ’）の５マーの全ての配列（4^5＝１０２４）を含む１５マーのオリゴマーを、プローブチップ４の各区画ごとに種類を変えて結合する。固有配列認識部７の長さを５マーとしたがこれは２～６マーであればよい。固有配列認識部の長さがあまり短いと多種サンプルが重複して１つの区画にハイブリダイズしてしまう。逆に固有配列認識部７の長さが多過ぎると、必要なオリゴマーの種類が増大するため、上記のプローブチップ作製が大変となる。

【００１０】

プローブチップ上にＤＮＡを含む液を注入し、ＤＮＡ断片をプローブチップ上のオリゴマーにハイブリダイズさせる。３７℃で約１時間放置し、充分にハイブリダイゼーション反応を進行させた後、バッファー液で洗浄する。プローブチップ上のハイブリダイゼーションの状態は図３に示す計測系で測定する。プローブチップ１０をレーザー８（ＹＡＧレーザー、発振波長：５３２ｎｍ、出力：１０ｍＷ）でコリメータレンズ９を通して照射し、フィルター１３付きの高感度２次元カメラ１１で、プローブチップ１０上の蛍光像を観測する。なお、レーザー光を細くしぼり、プローブチップの領域を走査するようなレーザー顕微鏡などを用いても同様の計測が可能である。図４は観測された蛍光像の画像の一例を模式的に示したもので、異なるＤＮＡプローブが分離された各区画に固定されたプローブアレー１４の分離区画のうち、目的ＤＮＡ断片がハイブリダイした区画１６から蛍光が観測されるので、その区画位置から末端の塩基配列を知ることができる。ハイブリダイゼーションの生じた各区画のＤＮＡを分取して活用してもよい。各区画からのＤＮＡの分取は、特願平４－４２８２９号の「ポリヌクレオチド捕捉用チップ」で記載の発明に基づいて行うことができる。また多量に分取したいときにはハイブリダイゼーションをおこした各区画にあるオリゴマーと同じ配列を表面に保持した磁気ビーズを順次試料溜中に投入し、ハイブリダイズさせては分画する操作を繰り返したり、図５に示すように、分離区画１５がアレー状に配置され、種々の種類のＤＮＡオリゴマプローブのそれぞれを異なる分離区画に保持（異なる複数の分離区画に同じ種類のＤＮＡオリゴマプローブが保持されてもよい）されたシート（薄板からなる線状ＤＮＡプローブアレー１７）を複数個用意し、複数

の線状ＤＮＡプローブアレー１７の位置をそれらの分離区画の配置方向でずらして重ね合わせて配置して、特定ライン上に分取の対象となるＤＮＡ断片に対応するプローブが固定された分離区画（目的ＤＮＡを補足するＤＮＡプローブ区画１９）が一列に並ぶようにしてＤＮＡ流路１８を形成し、ＤＮＡ流路１８に試料ＤＮＡを含む液を流すことにより、複数の目的ＤＮＡを順次捕捉することで効率良く分取する方法が可能である。また、細い棒の先端にＤＮＡオリゴマープローブを具備した種々のプローブ棒を用意し、必要な配列をもつプローブ棒を選択して束ねて試料液中につけ、ＤＮＡをハイブリダイズして分取してもよい。即ちシート状のプローブアレーの代わりにプローブ毎に分離して扱えるプローブ媒体を用いてもよい。分取の対象となるＤＮＡ断片に対応するプローブが固定された分離区画は、複数の線状ＤＮＡプローブアレー１７を２次元に配列して構成される２次元チップを図３、図４で説明したような装置によりあらかじめ解析、検査しておく。このように末端配列の知られたＤＮＡを単離し得ることができる。ＤＮＡの長さが１Ｋｂ～２Ｋｂあるいはそれ以下の時にはＰＣＲ（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）により試料ＤＮＡを増幅できるのでプローブチップ４、プローブチップ１０、プローブアレー１４、１７から直接分画し増幅したり、プローブチップ４、プローブチップ１０、プローブアレー１４、１７等の上に分画領域を他と仕切る障壁を設けてこれ等の上で直接ＰＣＲ増幅してもよい。ＰＣＲ用プライマーには既知配列を含む両末端に相補なオリゴマーを使用できる。プローブチップ上のＤＮＡオリゴマーからなるプローブが試料ＤＮＡの３’末端側にハイブリダイズし、プローブオリゴマーの３’末端側から試料ＤＮＡ鎖に沿って相補鎖合成できる時には、まず相補鎖をプローブチップ上に形成し、これを鋳型としてＰＣＲ増幅し、利用することもできる。この場合相補鎖から合成された試料ＤＮＡと相同な鎖を熱離脱変性させて取り出し、計測に用いる。

【００１１】

このように分画して得られたＤＮＡ断片から通常の方法に従って塩基配列決定用の反応を行い、ゲル電気泳動あるいは他の方法により配列を決定する。配列決定用のプライマーとして、ラインゲーションに用いたオリゴマーとの共通配列部分を活用できるので多くの種類を用意する必要が無い。配列決定反応及び配列決定操作（ゲル電気泳動による）は一度に多数の試料に関して行えるので、本発明により長いＤＮＡを分断・分画すればこれら分画された試料に関する配列決定を一度に行うことができる。制限酵素による試料の断片化はいくつかの組合せの異なる酵素で複数回行うと全ての配列を脱落無く決定することができる。また、一度の配列決定では充分な長さまで決定できない場合には、読み取ったＤＮＡ配列の終点近傍にハイブリダイズするプライマーを合成して、更に長い方の部分の配列を決定すればよい。

【００１２】

上記で説明した実施例では酵素切断部配列に続く５マーの塩基配列で目的ＤＮＡを選別分画したが、目的ＤＮＡ断片の種類が少ないときは２～４マーの塩基配列で選別分画することもできる。断片の種類が多い場合は、ゲル電気泳動などで１０種位ずつ大まかにグループに分離した後、各グループについて選別のための短い配列を持ったオリゴマープローブを使用して解析、検査してもよい。

【００１３】

上記の実施例では、エキソヌクレアーゼを用いて１本鎖にしたＤＮＡをハイブリダイゼーションにより確保したが、熱変性等で１本鎖にしてからハイブリダイゼーションさせて目的とするＤＮＡを確保してもよい。さらに引き続き相補鎖合成反応、及び熱変性を行うことでガラス上に固定されたＤＮＡ断片を得て、これを配列解析に活用してもよい。また、この状態で固体表面に固定されたプライマー（ＤＮＡオリゴマープローブ）とユニバーサルプライマーによるＰＣＲ増幅を行いコピー数を増やして解析に用いてもよい。

【００１４】

【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば長いＤＮＡを切断分割し、切断分割したＤＮＡの両末端の配列を知り、これを利用して各断片を分画することができる。更に分画された断片を

同時に解析することにより短時間に長いＤＮＡの解析をすることができる。例えば、１Ｍ塩基のＤＮＡを約５００個の平均鎖長２Ｋｂの断片にわけて並行解析すると、末端配列サーチ、分画に２～３日、配列決定をゲルキャピラリーアレーとプライマーウォーキングを用いて行うと３～４日で行えるので約１週間で解析でき、従来より百倍近い速さで解析することができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明によるＤＮＡ解析法を説明するフロー図。

【図２】本発明で使用するＤＮＡプローブの構造図。

【図３】本発明で使用するハイブリダイゼーション反応の有無を計測するための装置の構成の一例を示す図。

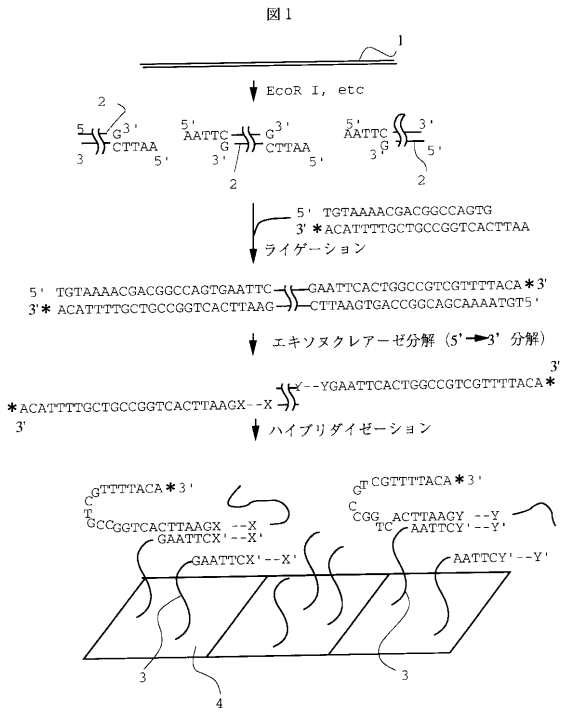
【図４】チップ上にハイブリしたＤＮＡからの蛍光パターンの一例を示す図。

【図５】線状ＤＮＡプローブアレーを組合せた分画方法を示す概念図。

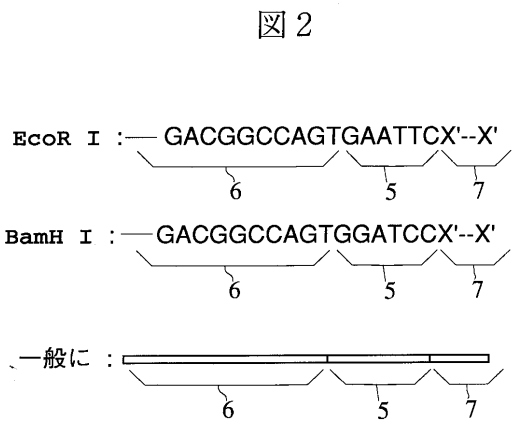
【符号の説明】

１…解析しようとする２本鎖ＤＮＡ、２…ＤＮＡ断片中の未知配列部分、３…ＤＮＡオリゴマープローブ、４…プローブチップ、５…酵素認識配列部、６…ユニバーサルプライマー部分、７…配列分離認識部分、８…レーザー、９…コリメーターレンズ、１０…プローブチップ、１１…高感度カメラ、１２…データ処理機、１３…フィルター、１４…プローブアレー、１５…分離区画、１６…ＤＮＡがハイブリダイズした区画、１７…線状ＤＮＡプローブアレー、１８…ＤＮＡ流路、１９…目的ＤＮＡを捕捉するＤＮＡプローブ区画。

【図１】

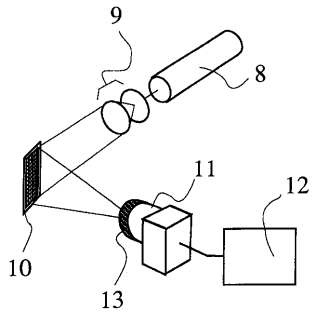


【図２】



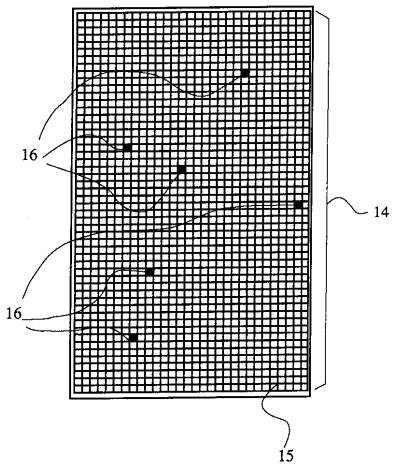
【図３】

図３



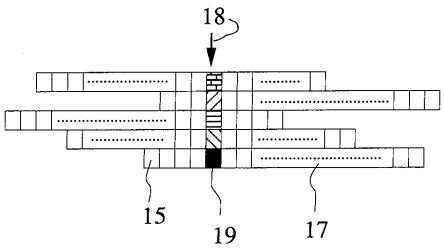
【図４】

図4



【図５】

図５



フロントページの続き

(72)発明者 高橋 智
東京都国分寺市東恋ケ窪１丁目２８０番地 株式会社日立製作所中央研究所内
(72)発明者 永井 啓一
東京都国分寺市東恋ケ窪１丁目２８０番地 株式会社日立製作所中央研究所内

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 特開平０１－１３７９８２（ＪＰ，Ａ）
特開平０１－１３７９８３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９２／０１６６５５（WO，Ａ１）
国際公開第９２／０１０５８８（WO，Ａ１）
国際公開第９３／００６２３９（WO，Ａ１）
特開平０６－０２２７９８（ＪＰ，Ａ）
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, １９８９年, vol.86, p.8902-8906
DNA Sequence, 2[5](1992) p.281-287

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N15/00-15/90
C12Q1/68
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
BIOSIS/WPI(DIALOG)