

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-290107

(P2005-290107A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 8 F 220/56</b>	C 0 8 F 220/56	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 M 1/00</b>	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 2 9
<b>C 1 2 M 1/34</b>	C 1 2 M 1/34 Z	4 J 1 0 0
<b>C 1 2 N 15/09</b>	G O 1 N 33/53 Z N A M	
<b>G O 1 N 33/53</b>	G O 1 N 37/00 I O 2	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-104557 (P2004-104557)	(71) 出願人	000006035 三菱レイヨン株式会社 東京都港区港南一丁目6番41号
(22) 出願日	平成16年3月31日(2004.3.31)	(72) 発明者	長浜 千秋 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社横浜技術研究所内
特許法第30条第1項適用申請有り 平成16年3月31日に化学工学会 第69年会の講演要旨集にて発表		(72) 発明者	高橋 晴子 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社横浜技術研究所内
		(72) 発明者	秋田 隆 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社横浜技術研究所内
		(72) 発明者	迫原 修治 広島市安芸区矢野東二丁目24-2-103

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャプチャーブローブが固定されたゲル及びそれを用いたキャプチャーブローブ固定化ゲルマイクロアレイ

## (57) 【要約】

【課題】 高いハイブリダイゼーション効率を得られるような多孔質構造を持ち、且つ十分なゲル強度を持ったゲル及びそれを用いたマイクロアレイを提供する。

【解決手段】 置換(メタ)アクリルアミド誘導体、架橋剤及びキャプチャーブローブを共重合することにより得られるゲルを製造する。好ましくは、そのゲルは、置換(メタ)アクリルアミド誘導体と架橋剤のモル比が10/1~500/1の組成であり、ゲル中のポリマー濃度が15~40質量%である。このゲルはマイクロアレイに好適に使用される。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

置換（メタ）アクリルアミド誘導体、架橋剤及びキャプチャープローブを共重合して得られるゲル。

## 【請求項 2】

置換（メタ）アクリルアミド誘導体と架橋剤のモル比が10/1～500/1の組成である請求項 1 記載のゲル。

## 【請求項 3】

ゲル中のポリマー濃度が15～40質量%である請求項 1 又は 2 記載のゲル。

## 【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれかに記載のゲルが、管状体の中空部に保持されているゲル保持管状体。

10

## 【請求項 5】

請求項 1～3 のいずれかに記載のゲルが、基板上の区画に配置されたマイクロアレイ。

## 【請求項 6】

区画が複数の溝または貫通穴で形成されている請求項 5 記載のマイクロアレイ。

## 【請求項 7】

請求項 4 記載の管状体を複数本集束し、その集束物を繊維の長手方向と交差する方向で切断して得られるマイクロアレイ。

## 【請求項 8】

以下の工程を順次含むマイクロアレイの製造方法。

20

(1) 複数本の管状体をそれらの長手方向が一致するように集束する工程。

(2) 集束物の各管状体の中空部に、置換（メタ）アクリルアミド誘導体、架橋剤及びキャプチャープローブを含む溶液を充填し、中空部内で共重合反応する工程。

(3) 集束物の長手方向と交叉する方向で切断する工程。

## 【請求項 9】

置換（メタ）アクリルアミド誘導体と架橋剤のモル比が10:1～500:1の組成である請求項 8 記載の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はキャプチャープローブが固定されたゲル及びそれを用いたキャプチャープローブ固定化ゲルマイクロアレイに関する。該マイクロアレイは、遺伝子発現解析等に使用される。

## 【背景技術】

## 【0002】

遺伝子の分析手段として、特定のキャプチャープローブを使用して所望の遺伝子の変異解析及び発現解析を一括して実施できるDNAマイクロアレイが開発されている。DNAマイクロアレイとしては、例えば、2次元表面上にフォトリソグラフィーを用いてキャプチャープローブを逐次的に合成されたマイクロアレイ（特許文献1）、予め合成されたキャプチャープローブが2次元表面上にスポットティングされたマイクロアレイ（特許文献2）、樹脂板等の基板に複数の溝又は貫通孔が形成され、それらの溝又は穴の内部にDNAを含むゲルが保持されたマイクロアレイ（特許文献3）、平面基盤上にDNA等を含むゲルのスポットが配置されたマイクロアレイ（特許文献4）等が知られている。本発明者らの一部も中空繊維の中空部にゲルを保持した中空繊維配列体を作製し、該配列体の繊維軸と交叉する方向で切断することにより得られるマイクロアレイを開発している（特許文献5）。

40

## 【0003】

ゲルを使用したマイクロアレイ（特許文献3～5参照）は、2次元表面にキャプチャープローブが固定されたマイクロアレイに比べて、一区画に固定化できるプローブ量が増加

50

する。よって、ハイブリダイゼーション効率に優れたマイクロアレイといえる。

【特許文献1】米国特許第5405783号

【特許文献2】米国特許第5601980号

【特許文献3】特開2000-60554

【特許文献4】米国特許第6682893

【特許文献5】特開2000-270877

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記ゲルマイクロアレイは、検査の対象となる試料（以下、検体）がゲルの多孔質構造中で十分に拡散し、ゲル中のキャプチャープローブと反応することにより、高いハイブリダイゼーション効率達成できる。しかし、これまでに知られているゲルマイクロアレイでは、ゲルの多孔質構造中を検体が十分に拡散できず、ゲル表面しか検査に使用されていない場合もあった。ゲルの多孔質構造の有効細孔径を大きくし、検体の拡散を向上させる目的で、ゲルを構成するモノマーの種類を検討、モノマー濃度の検討が行われている。しかし、ゲルの強度が弱くなる。そのようなゲルを基板表面や貫通孔に配置、保持した際、基板表面や貫通孔から脱落するという問題があった。よって、検体の拡散の向上及びゲル強度を両立できるゲルを作製することは困難であった。

10

【0005】

本発明は、高いハイブリダイゼーション効率を得られるような多孔質構造を持ち、且つ十分なゲル強度を持ったゲル及びそれを用いたマイクロアレイを提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記問題点を解決するために鋭意検討した結果、置換（メタ）アクリルアミド誘導体、架橋剤及びキャプチャープローブを共重合して得られるゲルが、高いハイブリダイゼーション効率を得られるような多孔質構造を持ち、且つ十分なゲル強度を持ったゲルであることを見出し、本発明を完成させた。

【0007】

即ち、本発明は、置換（メタ）アクリルアミド誘導体、架橋剤及びキャプチャープローブを共重合して得られるゲル、である。

30

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、高いハイブリダイゼーション効率を得られるような多孔質構造を持ち、且つ十分なゲル強度を持ったゲル及びそれを用いたマイクロアレイを提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明は、置換（メタ）アクリルアミド誘導体、架橋剤及びキャプチャープローブを共重合して得られるゲル、である。

40

【0010】

本発明において、「キャプチャープローブ」とは、デオキシリボ核酸（DNA）や、リボ核酸（RNA）、蛋白質、脂質等である。これらのキャプチャープローブは、市販品又は生細胞等から得ることができる。例えば、生細胞からのDNAの抽出は、Blinらの方法（Nucleic Acids Res.3.2303(1976)）等により、また、RNAの抽出は、Favaloroらの方法（Methods. Enzymol.65.718(1980)）等により実施することができる。

【0011】

また、DNAとしては、鎖状若しくは環状のプラスミドDNA又は染色体DNAが用いられる。さらには、制限酵素若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

50

## 【0012】

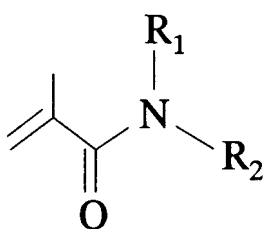
後述するように、キャプチャープローブは、置換（メタ）アクリルアミド誘導体及び架橋剤との共重合反応により、ゲルの網目構造に固定される。よって、キャプチャープローブには共重合反応可能な不飽和官能基が導入されている。不飽和官能基としては、（メタ）アクリルアミド基、グリシジル基等が挙げられる。不飽和官能基は、キャプチャープローブの機能を損なわない限り、いずれの部位に導入されていても良い。たとえば、キャプチャープローブが核酸の場合、不飽和官能基は核酸の末端、鎖中のいずれに導入されていても良い。核酸の鎖の末端に導入されていることが好ましい。

## 【0013】

「置換（メタ）アクリルアミド誘導体」とは、一般式 I で示される化合物をいう。

10

## 【化1】



20

30

## 【0014】

〔R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、水素原子、飽和アルキル基を示す（但し、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は同時に水素原子ではない）。一般式 I で示される置換（メタ）アクリルアミド誘導体は、架橋剤と共重合することにより、相転移温度（LCST）を持つポリマーとなるものをいう。〕

## 【0015】

置換（メタ）アクリルアミド誘導体の内、N-置換（メタ）アクリルアミド誘導体としては、例えばN-エチルアクリルアミド（N-Ethylacrylamide）、N-シクロプロピルアクリルアミド（N-Cyclopropylacrylamide）、N-イソプロピルアクリルアミド（N-isopropylacrylamide）等である。N,N-ジ置換（メタ）アクリルアミド誘導体としては、例えば、N,N-ジエチルアクリルアミド（N,N-Diethylacrylamide）、N-メチル-N-エチルアクリルアミド（N-Methyl-N-Ethylacrylamide）、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド（N-Methyl-N-Isopropylacrylamide）、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミド（N-Methyl-N-n-propylacrylamide）等である。これらの置換（メタ）アクリルアミド誘導体を成分とするポリマーは、例えばアガロースゲル、アクリルアミドゲル等よりも大きな多孔質構造を形成する。

40

## 【0016】

「架橋剤」は、エチレン性不飽和結合を2個以上持つ多官能性単量体である。例えば、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、N,N'-ジアリル（1,2-ヒドロキシエチレン）-ビスアクリルアミド、N,N'-シスタミン-ビスアクリルアミド、N-アクリロイルトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等である。

50

## 【0017】

次に共重合反応について説明する。共重合反応に使用する架橋剤の量は、モノマーに対し、モル比で10:1~500:1の範囲で添加するのが好ましい。重合開始剤は、重合反応の際にキャプチャープロブの分解が生じないものであればいずれも選択できる。好ましい開始剤は2,2'-アゾビス〔2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン〕ジハイドロクロライドである。反応温度は使用する置換アクリルアミド誘導体の転移温度よりも十分に高い温度で実施する。例えばポリイソプロピルアクリルアミドの場合、重合反応は50 程度で実施する。

## 【0018】

上記重合反応により形成されるゲル中のポリマー濃度は、15~40質量%の範囲が好ましく、更に好ましくは25~40質量%である。

10

## 【0019】

このように作成されたゲルは、キャプチャープロブを保持するゲルとして、遺伝子解析のツールとして使用される。例えば、上述のゲルを中空管状体の中空部に充填することによりゲル充填中空管状体が作製できる。その管状体は特開平3-47097号公報に記載のごとく、遺伝子変異のツールとして使用できる。中空部へのゲルの保持は、キャピラリーゲル電気泳動に使用されるキャピラリーカラムを作製する要領で実施可能である。

## 【0020】

また、マイクロアレイの構成部材としても使用できる。例えば、平面基板上に重合前又は重合開始直後のキャプチャープロブを含むモノマー溶液を予め定めた区画にスポットティングすることによりマイクロアレイを製造することができる(特表平6-507486号、USP 5,770,721号公報参照)。区画が溝又は貫通穴により形成されている場合、それら溝又は貫通穴に、重合前又は重合開始直後のキャプチャープロブを含むモノマー溶液を添加し、区画内で重合反応を実施することによりマイクロアレイを作製することができる(特開2000-60554号公報参照)。

20

## 【0021】

さらには、固定化ゲルを充填した中空管状体を複数本、集束し、該集束物を管状体の長手方向に対して交叉する方向で切断を繰り返すことにより、マイクロアレイを作製することができる(WO 00/5376号公報参照)。複数の中空管状体を集束した後、集束物の各中空部にゲルを充填しても良い。その場合、以下の(1)~(3)の工程を順次行うことによりマイクロアレイが製造できる。

30

## 【0022】

(1) 複数本の管状体をそれらの長手方向が一致するように集束する工程。

## 【0023】

(2) 集束物の各管状体の中空部に、置換(メタ)アクリルアミド誘導体、架橋剤及びキャプチャープロブを含む溶液を充填し、中空部内で共重合反応する工程。

## 【0024】

(3) 集束物の長手方向と交叉する方向で切断する工程。

## 【0025】

中空管状体としては、ガラス管、ステンレス管、中空繊維等が例示できる。加工性、取り扱いの容易さを考慮すると中空繊維を使用することが好ましい。

40

## 【0026】

従来固定化ゲルでは、ハイブリダイゼーションの効率を高くするためには、ゲルの濃度を下げて網目の有効細孔径を大きくしなければならなかった。このためゲル強度が不十分となり、高いハイブリダイゼーション効率を得ることは困難であった。しかし、本発明のゲルは、従来ゲルと異なり、ゲル中のポリマー濃度の高い方が高いハイブリダイゼーション効率を得ることができ、且つ十分なゲル強度を得ることが可能となる。

## 【実施例】

## 【0027】

以下、実施例により更に詳細に説明する。

50

## 【0028】

## (1) 中空繊維束の作製

図1に示す配列固定器具を利用して中空繊維束を製造した。なお、図中のx、y、zは直交の3次元軸であり、x軸は繊維の長手方向と一致する。

## 【0029】

まず、直径0.32mmの孔(52)が、孔の中心間距離を0.12mmとして、縦横各10列で合計100個設けられた厚さ0.1mmの多孔板(50)2枚を準備した。これらの多孔板(50)を重ね合わせて、そのすべての孔(52)に、ポリカーボネート中空繊維(54)(三菱エンジニアリングプラスチック社製 カーボンブラック1質量%添加)を1本ずつ、通過させた。

10

## 【0030】

X軸方向に各繊維に0.1Nの張力をかけた状態で2枚の多孔板の位置を移動させて、中空繊維の一方の端部から20mmの位置と100mmの位置の2ヶ所に固定した。即ち、2枚の多孔板の間隔を80mmとした。

## 【0031】

次いで、多孔板間の空間の周囲3面を板状物(56)で囲った。このようにして上部のみが開口状態にある容器を得た。

## 【0032】

次に、この容器の上部から容器内に樹脂原料を流し込んだ。樹脂としては、ポリウレタン樹脂接着剤(日本ポリウレタン工業(株)ニッポラン4276、コロネート4403)の総重量

20

## 【0033】

(2) 末端にビニル基を有するオリゴヌクレオチド(末端ビニル化オリゴヌクレオチド)の調製

オリゴヌクレオチドの合成は、自動合成機 DNA/RNA synthesizer (PEバイオシステムズ社製 model 394)を用いて行った。合成の最終ステップで、5'末端にアミノ基〔NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-〕を導入し、以下に示すオリゴヌクレオチドA(配列番号1)を合成した。同様にオリゴヌクレオチドB(配列番号2)を自動合成機で合成し、5'端にcy5を導入した。5'末端のアミノ基の導入は、アミノリンクIITM(アプライドバイオシステムズ社製)を使用した。これらのオリゴヌクレオチドは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

30

## 【0034】

<オリゴヌクレオチドA>

cggtcaacgatcgcgagagagaatcttggatttgggtgccaagtcatatccatgacaaatcttct(配列番号1)

次に、オリゴヌクレオチドA(500nmol/ml)5μlとグリシジルメタクリレート0.5μlを混合し、70℃で2時間反応させた。反応終了後、HPLCで精製を行い未反応のGMA等を除去した。その後、水を加えて100nmol/mlの濃度に調製し、末端にメタクリレート基を有するオリゴヌクレオチド(GMA変性オリゴヌクレオチドA)を得た。

## 【0035】

## (3) 検体調製

サッカロマイセス セルビシエ(Saccharomyces cerevisiae)JCM7255をYPD培地(グルコース20g/L、酵母エキス10g/L、ポリペプトン20g/L pH6.0)100mlで30℃、1日培養を行った後、集菌した。集菌した菌体から染色体DNAを調製し、PCRの鋳型に用いた。Hot StarTaq DNA Polymerase(QIAGEN社製)を用いてPCRを行った。PCRの際に使用したプライマー、PCR液組成、温度条件は以下の通りである。

40

## 【0036】

<プライマー>

プライマー1(配列番号2): 5'-TAGTATTGACATTGGGTGATGGAGTTGATG-3'

プライマー2(配列番号3): 5'-(Cy5)CTACTGTGACTTGCCAATATGGTCTAAAAA-3'

<PCR液組成>

50

D.W. 67.5  $\mu$  l  
 10 $\times$  buffer 15  $\mu$  l  
 5 $\times$  Q-solution 30  $\mu$  l  
 dNTPmix (10mM of each) 3  $\mu$  l  
 primer 1 (10pmol/ $\mu$  l) 15  $\mu$  l  
 primer 2 (10pmol/ $\mu$  l) 15  $\mu$  l  
 Hot StarTaq DNA Polymerase 1.5  $\mu$  l  
 template (酵母ゲノム DNA) 3  $\mu$  l

< 温度条件 >

[ 1 ] 95 15分  
 [ 2 ] 94 1分  
 [ 3 ] 54 1分  
 [ 4 ] 72 1分  
 [ 5 ] 4 [ 2 ] ~ [ 5 ] を 50 サイクル。

【 0 0 3 7 】

PCR終了後、増幅産物をQIAquick PCR purification Kit (QIAGEN社製) を用いて精製し、100fmol/ $\mu$  l の濃度に調製した。

【 0 0 3 8 】

( 4 ) 重合溶液の調製

表 1 に示す重合溶液を調製した。重合溶液は調製中に重合が開始しないように氷冷しながら調製した。

【 表 1 】

重合液組成

重合液No.	実施例1		実施例2		比較例1		比較例2		比較例3		比較例4	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
単量体の種類	N		N		N		D		D		D	
単量体(質量%)	14.9		23.4		4.5		13.5		9		4.5	
架橋剤(質量%)	0.1		0.16		0.5		1.5		1		0.5	
単量体/架橋剤(モル比)	200/1		20/1		12.3/1		14/1		14/1		14/1	
開始剤(質量%)	0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1	
ポリマー濃度(質量%)	15		25		5		15		10		5	
オリゴヌクレオチドA(nmol/ml)	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0

N:N-イソプロピルアクリルアミド

D:N,N-ジメチルアクリルアミド

架橋剤:N,N'-メチレンビスアクリルアミド

開始剤:2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライド

【 0 0 3 9 】

( 5 ) 重合液の充填及び重合

( 1 ) で得られた中空繊維束の中空繊維の中空部に ( 4 ) で調製した重合液を充填した。充填した重合液の種類、位置は、図 2 に示した。

【 0 0 4 0 】

充填後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移した。中空繊維束を 55 で 1 時間放置することにより重合反応を行った。

【 0 0 4 1 】

( 6 ) 薄片化

重合反応後、中空繊維束を、マイクロームを用いて、中空繊維の長手方向と垂直に交叉する方向で切断を繰り返した。その結果、厚さ約 500  $\mu$  m の薄片を得た。

10

20

30

40

50

## 【0042】

## (7) ハイブリダイゼーション

以下に示す(3)で調製した増幅産物を200 fmol/mlを含むハイブリダイゼーション溶液を調製した。

## 【0043】

## &lt; ハイブリダイゼーション溶液組成 &gt;

- ・ (3)で調製した増幅産物 200fmol/ml
- ・ 6 × SSC ( 0.75mol/L 塩化ナトリウム、0.075mol/l クエン酸ナトリウム、pH 7.0)
- ・ 0.2% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)

次に(7)で得られた薄片を上記ハイブリダイゼーション溶液に浸し、37℃、20時間、インキュベートした。

10

## 【0044】

## (8) 検出

ハイブリダイゼーション後の薄片を無蛍光スライドガラスにのせ、数滴滅菌水を薄片上に滴下し、カバーガラスをかぶせた。スライドガラスをDNAチップ検出器 (GeneTac V: Genomic Solutions社製) にセットし、Cy5用レーザーを用いて検出した。画像は1ピクセル10 μmの大きさに設定した。

## 【0045】

## (9) 蛍光強度の測定

スポットの蛍光強度を専用の解析ソフトで計算した。各スポットの蛍光強度を表2に示した。なお、3スポットの平均値をエリアNo.の蛍光強度とした。

20

## 【表2】

	A		B		A-B	ゲルの脱落
	エリアNo.	蛍光強度	エリアNo.	蛍光強度		
実施例1	1	13020	2	2329	10691	なし
実施例2	3	15977	4	2280	13697	なし
比較例1	5	16617	6	2311	14306	4スポット脱落
比較例2	7	3472	8	2398	1074	なし
比較例3	9	6682	10	2262	4420	なし
比較例4	11	11879	12	2258	9621	なし

30

## 【0046】

実施例1及び2は比較例2～4に比べて、高い蛍光強度を示した。また、比較例1は、実施例1及び2より高い蛍光強度を示したが、ゲルがスポットから脱落する確率が高かった。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0047】

【図1】配列固定器具を示した図である。

【図2】マイクロアレイのデザインを示した図である。

## 【符号の説明】

## 【0048】

- 50 多孔板
- 52 孔
- 54 中空繊維

50

5 6 板状物

【配列表フリーテキスト】

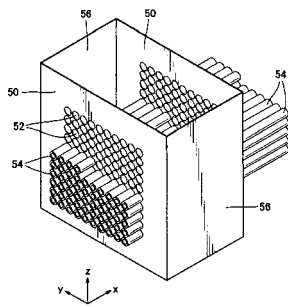
【0049】

配列番号1 合成DNA

配列番号2 合成DNA

配列番号3 合成DNA

【図1】



【図2】

E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	1	1	1	E	2	2	2	E
E	3	3	3	E	4	4	5	E
E	5	5	5	E	6	6	6	E
E	7	7	7	E	8	8	8	E
E	9	9	9	E	10	10	10	E
E	11	11	11	E	12	12	12	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E

数字は重合液のNoを示す。Eは空

【配列表】

2005290107000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 37/00

F I

C 1 2 N 15/00

F

テーマコード(参考)

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA04 CA05 CA06 CA09 HA08 HA12 HA14 HA19  
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03 FA12 FA15  
4J100 AM17P AM19P AM21P AM23Q AM24Q AM25Q BA03Q BA28Q BA50Q BC02P  
BD10R CA23 DA37 EA03 FA03 FA28 JA15 JA19