

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5770366号  
(P5770366)

(45) 発行日 平成27年8月26日 (2015. 8. 26)

(24) 登録日 平成27年7月3日 (2015. 7. 3)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	M
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/533 (2006. 01)	GO 1 N 37/00	1 O 2
GO 1 N 33/534 (2006. 01)	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 33/531 (2006. 01)	GO 1 N 33/534	

請求項の数 16 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-508266 (P2014-508266)  
 (86) (22) 出願日 平成23年4月27日 (2011. 4. 27)  
 (65) 公表番号 特表2014-513797 (P2014-513797A)  
 (43) 公表日 平成26年6月5日 (2014. 6. 5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/003105  
 (87) 国際公開番号 W02012/148017  
 (87) 国際公開日 平成24年11月1日 (2012. 11. 1)  
 審査請求日 平成25年12月19日 (2013. 12. 19)

(73) 特許権者 511132476  
 ビーシーエル インコーポレイテッド  
 P C L, I n c.  
 大韓民国, 440-746, キョンギード  
 , スウォン-シ, チャンアング, チョン  
 チョンドン, ソンギュングァン ユニバ  
 ーシティ, リサーチ コンプレックス 2  
 , ルーム 83421  
 (74) 代理人 100090251  
 弁理士 森田 憲一  
 (74) 代理人 100139594  
 弁理士 山口 健次郎  
 (74) 代理人 100185915  
 弁理士 長山 弘典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオチップ製造用ゾルーゲルキット及びこれを利用したバイオチップの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の工程 ( a ) 及び ( b ) をその順序で実施することを含む、ゾル組成物のゲル化を利用したバイオチップの製造方法であって、

( a ) S o l B 1、S o l B 2 及び S o l B 3 で構成されたゾル組成物を基板上に分注した後、H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された S o l B H ( 溶液 I ) を分注する工程；及び

( b ) 緩衝液である S o l B S、標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質及び蒸留水を含む溶液 I I を基板上に分注した後、ゲル化させる工程、

ここで、

( i ) S o l B 1 は、メチルトリエトキシシラン ( M T E S )、エチルトリエトキシシラン ( E T r E O S )、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル ( T M O S )、オルトケイ酸テトラエチル ( T E O S ) 及びテトラメトキシシリケート ( T M S ) からなる群から選択された1種以上の第1シリケート単量体であり；

( i i ) S o l B 2 は、3 - アミノトリメトキシシラン ( 3 - A T M S )、ジグリセリルシラン ( D G S )、メチルトリメトキシシリケート ( M T M S )、ポリグリセリルシリケート ( P G S )、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N, N - ジスクシンイミジルカルボネート ( D S C )、1, 3, 5 - トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、3 - ( トリエトキシシリル ) プロピルコハク酸無水

物、N-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミド(SIT8189.5)、N-(トリエトキシシリルプロピル)グルコンアミド(SIT8189.0)50%、ブルコニックL121及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された1種以上の第2シリケート単量体であり；そして

(iii) SolB3は、アミノプロピルトリエトキシラン(APTES)、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン(GPTMOS)、N-トリエトキシシリルプロピル-O-ポリエチレンオキシドウレタン(PEOU)、グリセロール、PEG200、PEG400、PEG600、PEG1350及びPEG8000からなる群から選択された1種以上の添加剤であることを特徴とし、

(i) SolB1、SolB2、SolB3、SolBH、SolBS、または標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を混合する過程；(ii)前記過程(i)の混合液をボルテックスする過程；及び(iii)前記過程(i)または(ii)の混合液を安定化する過程からなる群から選択されるいずれか一つの前処理過程を含まないことを特徴とする、前記製造方法。

10

【請求項2】

前記方法は、アレイヤーなしに手でスポットティングを行うこと、又は非接触型アレイヤーを利用して行うことを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

前記SolB1、SolB2、SolB3、SolBH、SolBS、及び標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を分注する前に容器に入れて、ノズルを利用して吸い上げる形態で分注することを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

20

【請求項4】

SolB1、SolB2、SolB3、SolBH、SolBS及び標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を分注する前に、予め分注するノズルが連結されている大容量カートリッジに入れて、一回で分注する量が、ノズルを利用して吸い上げる形態での分注と比べて100倍以上であるため、大量生産が可能になることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項5】

前記基板は、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、プラスチック、シリコン、及びガラスからなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

30

【請求項6】

前記標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質は、核酸、蛋白質、ペプチド、低分子物質及び細胞からなる群から選択されたいずれか一つであることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項7】

前記基板は、露点より高い温度で最適化され、湿度50%より高い条件で分注することを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項8】

前記ゾル組成物：溶液I：溶液IIの分注量の比は、3：1：4から1：2：8の間の範囲であることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

40

【請求項9】

前記SolBH及びSolBSの濃度は、1mM～100mMであることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項10】

前記溶液IIは、SolBS：蒸留水：標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質の体積比が1：2：1と2：5：1との間の範囲であることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項11】

前記SolBSは、pH3～8の範囲のリン酸ナトリウムであることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

50

## 【請求項 1 2】

前記基板は、予めプラズマ表面処理されたり、エッチングされたり、又は P D M S やシリケート単量体、若しくは高分子物質で処理されることを特徴とする請求項 1 に記載の製造方法。

## 【請求項 1 3】

下記の工程 ( a ) ~ ( c ) をその順序で実施することを含む、ゾル組成物のゲル化を利用したバイオチップの製造方法であって、

( a ) S o l B 1、S o l B 2 及び S o l B 3 を含むゾル組成物に、H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された S o l B H ( 溶液 I ) を混合する工程；

( b ) 緩衝液である S o l B S と蒸留水を工程 ( a ) で混合された溶液と混合した後、- 2 0 ~ 4 で安定化させる工程；及び

( c ) 標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を含む溶液を工程 ( b ) で安定化された溶液と混合して基板上に分注した後、ゲル化させる工程、

ここで、

( i ) S o l B 1 は、メチルトリエトキシシラン ( M T E S )、エチルトリエトキシシラン ( E T r E O S )、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル ( T M O S )、オルトケイ酸テトラエチル ( T E O S ) 及びテトラメトキシシリケート ( T M S ) からなる群から選択された 1 種以上の第 1 シリケート単量体であり；

( i i ) S o l B 2 は、3 - アミノトリメトキシシラン ( 3 - A T M S )、ジグリセリルシラン ( D G S )、メチルトリメトキシシリケート ( M T M S )、ポリグリセリルシリケート ( P G S )、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N, N - ジスクシンイミジルカルボネート ( D S C )、1, 3, 5 - トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、3 - ( トリエトキシシリル ) プロピルコハク酸無水物、N - ( 3 - トリエトキシシリルプロピル ) - 4 - ヒドロキシブチルアミド ( S I T 8 1 8 9 . 5 )、N - ( トリエトキシシリルプロピル ) グルコンアミド ( S I T 8 1 8 9 . 0 ) 5 0 %、プルロニック L 1 2 1 及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された 1 種以上の第 2 シリケート単量体であり；及び

( i i i ) S o l B 3 は、アミノプロピルトリエトキシシラン ( A P T E S )、3 - グリシドキシプロピルトリメトキシシラン ( G P T M O S )、N - トリエトキシシリルプロピル - O - ポリエチレンオキシドウレタン ( P E O U )、グリセロール、P E G 2 0 0、P E G 4 0 0、P E G 6 0 0、P E G 1 3 5 0 及び P E G 8 0 0 0 からなる群から選択された 1 種以上の添加剤であることを特徴とする製造方法。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 又は 1 3 に記載の方法で製造されたバイオチップに前記標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質と相互作用可能な標的生物学的物質を含有する試料を添加する工程を含む標的生物学的物質の分析方法。

## 【請求項 1 5】

前記標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質は、核酸、蛋白質、ペプチド、低分子物質及び細胞からなる群から選択されたいずれか一つであることを特徴とする請求項 1 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記標的生物学的物質を探知できる放射性同位元素、蛍光染料、染料、または発光性物質で標識された蛋白質、抗体またはアプタマーと追加で反応させる工程を含むことを特徴とする請求項 1 4 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、特定溶液を順次混合して製造したゾル組成物を利用するか、または前処理過

10

20

30

40

50

程なしにこのような特定溶液を順次基板に直接分注して簡単にバイオチップを製造する方法及びバイオチップ製造用ゾル-ゲルキットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

バイオチップは、新しいナノテクノロジー (nanotechnology、NT)、バイオテクノロジー (biotechnology、BT)、情報テクノロジー (information technology、IT) が融合した技術の代表的な例である。バイオチップは、種々の生体物質を固体状支持体の表面に高集積微細配列 (high-density microarray) としたもので、表面に付ける生体物質によりDNAチップ、蛋白質チップ、セルチップ、及びニューロンチップなど種々のチップに分けられる。また、バイオチップは、微細流体学技術と併せてLOC (lab-on-a-chip) として発展している。バイオチップの細部技術としては、生体物質を固定させる技術、固体支持体を生体物質親和的に作る技術、生体物質を微細配列する技術、作られたチップ上で種々の生体反応を実施するアッセイ技術、反応結果を感知する技術、固定化対象である生体物質を作る蛋白質工学、遺伝子組換え技術などがある。

10

【0003】

蛋白質チップは、バイオチップ (biochip) の一種であり、種々の蛋白質を単位面積の固体状支持体の表面に高集積微細配列 (intense microarray) したものである。最近、既に関係されて商用化されたDNAチップの製作原理及び製作技術要素を導入して蛋白質チップを製作しようとする努力が払われている。一般に、商用化されたDNAチップの多くは、コーティング物質で表面を前処理したガラス板上にDNAを固定化させて製作したものである。DNAチップの製作に用いられる方法と類似する方法で蛋白質チップを製造する場合、即ちコーティング物質で表面を前処理したガラス板上に蛋白質を固定化して蛋白質チップを製造する場合は、固定される標的蛋白質の物理化学的特性の差によって多様な問題が発生している。

20

【0004】

初期蛋白質チップは、表面処理されたガラス板上に蛋白質をそのまま付着させた後、簡単な結合分析 (binding assay) を行うものであったが、固定化された蛋白質の活性可否により実際作動可否が左右されて、本来の目的を達成するのに困難が多かった (MacBeath and Schreiber, Science 289:1760, 2000)。このような問題点は前述した通り蛋白質が持つ固有な物理化学的特性の差によって発生する蛋白質の変成 (denaturation) 或いは不活性化、分解 (degradation) 等から引き起こされる。このような問題点を克服するために、DNAとは異なる蛋白質の特性に適した蛋白質付着表面処理技術及び蛋白質固定物質などに対する研究が行われている。これに対する研究は、蛋白質チップ表面上に固定反応を起こしながら、同時に蛋白質の活性を維持する方法を提供するのに焦点が合わせたもので、例えばパーキンエルマー (PerkinElmer) に最近買収されたパッカードバイオサイエンス (Packard Bioscience) のヒドロゲル (Hydrogel) <sup>T M</sup> コーティングスライド、プロリンクス (ProLink) のバーサルリンクス (versalinx) チップ、ザイオミックス (Zyomyx) のバイオチップのPDCチップなどが挙げられる。

30

【0005】

一方、ゾル-ゲル工程は、微細加工を介して微細構造を作るのに利用されてきた技術であり、特に無機物質に生体分子を化学的に付着させる代わりに穏やかな工程を介して結合網を形成して、この結合網中に生体分子を共有結合以外の方法で固定化するのに多く利用されてきた技術である (Gill I. and Ballesteros A., Trends Biotechnol., 18:282, 2000)。

40

【0006】

さらに、酵素をはじめとする多くの生体分子が塊状ゾル-ゲルマトリックス中に固定されて生体触媒やバイオセンサーの製作にも利用されており (Reetz, Adv. Mater., 9:943, 1997)、特に透明な光学的性質のために光学的発色検出にも利用されている (Edminston, et al., J. Coll. Interf. Sci., 163:395, 1994)。また、生体分子は、ゾル-ゲル反応によって固定化されると、化学的に安定化されるだけでなく、熱的にも非常に安定化さ

50

れると知られている (Dave, et al., Anal. Chem., 66:1120, 1994)。

【0007】

バイオセンサーの場合、前記ゾル - ゲル反応は、単純な固定だけでなく、固体支持体上に微細構造を形成してパターン化 (patterning) する方法で利用されている。この時、パターン化方法は、流体力学を利用して液相であるゾル状態でモールドで形を作ってゲル化させた後、モールドを外してパターンを作る。例えば、毛細管内マイクロ - モジュリング (micro-modulingin-capillaries、M I M I C) (Kim, J. Ferment. Bioeng., 82:239, 1995; Marzolin, Adv. Mater., 10:571, 1998; Schuller, et al., Appl. Optics., 38:5799, 1999) と呼ばれる技術は、メソコスピック (mesoscopic) シリカをパターン化する技術である。前記技術は、微細流体力学の基本的なパターン化に利用できる。

10

【0008】

しかし、蛋白質の活性は、pHなどの種々の因子によって影響を受けるため、ゾル - ゲル過程では、ゾル状態から蛋白質を添加して活性を維持する条件を設定することが重要である。このため、中性pHなど種々の穏やかな条件を利用して蛋白質とゾルを共に予め混ぜて蛋白質をパターン化する技術 (Kim, et al, Biotechnol. Bioeng., 73:331, 2001) が発表されているが、中性pHではゾル - ゲル過程が急激に進行して、添加剤の選択によって亀裂が起きたり不透明になるなどの問題点があった。また、蛋白質とゾルを共に予め混ぜる前処理過程などを経なければならぬため、スポットの濃度が不均一になりやすい問題点もあった。

【0009】

20

また、ゾル - ゲル工程に関する先行特許として、生体物質を含んだゾル混合物をチップ基材上でゲル化反応させることによって、生体物質がゲルマトリックスによって形成されたフォア中に担持され、ゲルマトリックスで形成されたスポットによってカプセル化された状態で、生体物質の反応性を向上させるゾル - ゲルバイオチップがあり、または、このようなゾル - ゲル工程を利用したバイオチップの製造において、固定された生体物質の変形を防いだり、感度を高めるゾル - ゲルバイオチップ用ゾル組成物のスクリーニング方法に関する特許があるが、製造方法が複雑で、ゾル組成物の製作過程において生体物質の活性低下、破壊などの問題点が生じてきた。

【0010】

そこで、本発明者等は、ゾル組成物の製造時生体物質の活性低下及び破壊を防止するために鋭意努力した結果、特定シリケート単量体及び添加剤を特定順序で順次混合して基板に分注するか、これらを順次基板に直接分注してゲル化させる場合、従来用いられた製造方法に比べてゲル化時間を遅らせて、より均一なバイオチップを製作できるだけでなく、前記成分によって生体物質の活性低下及び破壊が防止されて感度が非常に優秀なバイオチップを製作できることを確認して本発明を完成するようになった。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の主な目的は、ゾルゲル物質をキット化して特別な装備や技術がなくても誰でも簡単にバイオチップを作って分析できるようにするところにある。

40

本発明の他の目的は、特定ゾル組成物を順次混合して基板に分注するか、又はこれらを順次基板に直接分注するなどの製造方法を確立して、前処理過程なしに均一なバイオチップを製造する方法を提供するところにある。

本発明のさらに他の目的は、前記バイオチップを利用した標的物質の分析方法を提供するところにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記目的を達成するために、本発明は、一具現例で、(a)ゾル - ゲルキット (Sol Bキット) でSol B1、Sol B2、Sol B3、Sol BH、Sol BSで構成されている液体を順次混合して、探知物質 (例えば、蛋白質) と混ぜた後基板に分注する製造

50

方法、及び(b)前処理過程なしにバイオチップを製造するためにS o l B 1、S o l B 2、S o l B 3で構成されたゾル組成物を基板上に分注する工程；S o l B Hを分注する工程；S o l B S、探知蛋白質及び蒸留水を含む溶液を基板上に分注した後、ゲル化させる工程を含む、ゾル組成物のゲル化を利用したバイオチップの製造方法を提供する。

【0013】

この時、用いられるバイオチップ製造のためのS o l Bキット中S o l B 1、S o l B 2、及びS o l B 3としては、

(i) S o l B 1で、メチルトリエトキシシラン(methyltriethoxysilane、M T E S)、エチルトリエトキシシラン(ethyltriethoxysilane、E T r E O S)、ケイ酸ナトリウム(Sodium Silicate)、オルトケイ酸テトラメチル(tetramethyl orthosilicate、T M O S)、オルトケイ酸テトラエチル(tetraethyl orthosilicate、T E O S)及びテトラメトキシシリケート(tetramethoxysilicate、T M S)からなる群から選択された1種以上の第1シリケート単量体；

(i i) S o l B 2で、3-アミノトリメトキシシラン(3-aminotrimethoxysilane、3-A T M S)、ジグリセリルシラン(diglycerylsilane、D G S)、メチルトリメトキシシリケート(methyltrimethoxysilicate、M T M S)、ポリグリセリルシリケート(polyglycerylsilicate、P G S)、ポリビニルアセテート(polyvinylacetate)、ポリビニルピロリドン(polyvinylpyrrolidone)、グリセリルメタクリレート(glyceryl metaacrylate)、ヒドロキシエチルアクリレート(hydroxyethyl acrylate)、N,N-ジスクシンイミジルカルボネート(N,N'-disuccinimidyl carbonate、D S C)、1,3,5-トリメチルベンゼン(1,3,5-trimethylbenzene)、セチルトリメチルアンモニウムクロリド(cetyltrimethylammonium chloride)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(cetyltrimethylammonium bromide)、3-(トリエトキシシリル)プロピルコハク酸無水物(3-(triethoxysilyl)propyl succinic anhydride)、N-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミド(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide、S I T 8 1 8 9 . 5)、N-(トリエトキシシリルプロピル)グルコンアミド(N-(triethoxysilyl propyl)gluconamide、S I T 8 1 8 9 . 0)50%、プルロニックL121(pluronic L121)及び水酸化テトラメチルアンモニウム(tetramethylammonium hydroxide)からなる群から選択された1種以上の第2シリケート単量体；及び

(i i i) S o l B 3で、アミノプロピルトリエトキシシラン(aminopropyltriethoxysilane、A P T E S)、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン(3-glycidoxypropyltrimethoxysilane、G P T M O S)、N-トリエトキシシリルプロピル-O-ポリエチレンオキシドウレタン(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane、P E O U)、グリセロール、P E G 2 0 0、P E G 4 0 0、P E G 6 0 0、P E G 1 3 5 0及びP E G 8 0 0 0からなる群から選択された1種以上の添加剤を含むことを特徴とする。

【0014】

具体的に、本発明は下記の工程を含む、ゾル組成物のゲル化を利用したバイオチップの製造方法であって、

(a) S o l B 1、S o l B 2及びS o l B 3を含むゾル組成物にH C l、H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub>及びC H<sub>3</sub>C O O Hからなる群から選択されたS o l B H(溶液I)を混合する工程；

(b) 緩衝液であるS o l B Sと蒸留水を工程(a)で混合された溶液と混合した後、-20~4で安定化させる工程；及び

(c) 標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を含む溶液を工程(b)で安定化された溶液と混合して基板上に分注した後、ゲル化させる工程、ここで、

(i) S o l B 1は、メチルトリエトキシシラン(M T E S)、エチルトリエトキシシラン(E T r E O S)、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル(T M O S)、オルトケイ酸テトラエチル(T E O S)及びテトラメトキシシリケート(T M S)からなる群から選択された1種以上の第1シリケート単量体であり；

( i i ) S o l B 2 は、3 - アミノトリメトキシシラン ( 3 - A T M S )、ジグリセリルシラン ( D G S )、メチルトリメトキシシリケート ( M T M S )、ポリグリセリルシリケート ( P G S )、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N , N - ジスクシンイミジルカルボネート ( D S C )、1 , 3 , 5 - トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、3 - ( トリエトキシシリル ) プロピルコハク酸無水物、N - ( 3 - トリエトキシシリルプロピル ) - 4 - ヒドロキシブチルアミド ( S I T 8 1 8 9 . 5 )、N - ( トリエトキシシリルプロピル ) グルコンアミド ( S I T 8 1 8 9 . 0 ) 5 0 %、プルロニック L 1 2 1 及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された 1 種以上の第 2 シリケート単量体であり ; そして

10

( i i i ) S o l B 3 は、アミノプロピルトリエトキシシラン ( A P T E S )、3 - グリシドキシプロピルトリメトキシシラン ( G P T M O S )、N - トリエトキシシリルプロピル - O - ポリエチレンオキシドウレタン ( P E O U )、グリセロール、P E G 2 0 0、P E G 4 0 0、P E G 6 0 0、P E G 1 3 5 0 及び P E G 8 0 0 0 からなる群から選択された 1 種以上の添加剤であることを特徴とする製造方法を提供する。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明は、また下記の工程を含む、ゾル組成物のゲル化を利用したバイオチップの製造方法であって、

( a ) S o l B 1、S o l B 2 及び S o l B 3 で構成されたゾル組成物を基板上に分注した後、H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された S o l B H ( 溶液 I ) を分注する工程 ; 及び

20

( b ) 緩衝液である S o l B S、標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質及び蒸留水を含む溶液 I I を基板上に分注した後、ゲル化させる工程、  
ここで、

( i ) S o l B 1 は、メチルトリエトキシシラン ( M T E S )、エチルトリエトキシシラン ( E T r E O S )、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル ( T M O S )、オルトケイ酸テトラエチル ( T E O S ) 及びテトラメトキシシリケート ( T M S ) からなる群から選択された 1 種以上の第 1 シリケート単量体であり ;

( i i ) S o l B 2 は、3 - アミノトリメトキシシラン ( 3 - A T M S )、ジグリセリルシラン ( D G S )、メチルトリメトキシシリケート ( M T M S )、ポリグリセリルシリケート ( P G S )、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N , N - ジスクシンイミジルカルボネート ( D S C )、1 , 3 , 5 - トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、3 - ( トリエトキシシリル ) プロピルコハク酸無水物、N - ( 3 - トリエトキシシリルプロピル ) - 4 - ヒドロキシブチルアミド ( S I T 8 1 8 9 . 5 )、N - ( トリエトキシシリルプロピル ) グルコンアミド ( S I T 8 1 8 9 . 0 ) 5 0 %、プルロニック L 1 2 1 及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された 1 種以上の第 2 シリケート単量体であり ; そして

30

( i i i ) S o l B 3 は、アミノプロピルトリエトキシシラン ( A P T E S )、3 - グリシドキシプロピルトリメトキシシラン ( G P T M O S )、N - トリエトキシシリルプロピル - O - ポリエチレンオキシドウレタン ( P E O U )、グリセロール、P E G 2 0 0、P E G 4 0 0、P E G 6 0 0、P E G 1 3 5 0 及び P E G 8 0 0 0 からなる群から選択された 1 種以上の添加剤であることを特徴とする製造方法を提供する。

40

#### 【 0 0 1 6 】

本発明は、また前記方法で用いられる、( i ) メチルトリエトキシシラン ( M T E S )、エチルトリエトキシシラン ( E T r E O S )、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル ( T M O S )、オルトケイ酸テトラエチル ( T E O S ) 及びテトラメトキシシリケート ( T M S ) からなる群から選択された 1 種以上の第 1 シリケート単量体である S o l B 1 を含む第 1 容器 ; ( i i ) 3 - アミノトリメトキシシラン ( 3 - A T M S )、ジグリセリルシラン ( D G S )、メチルトリメトキシシリケート ( M T M S )、ポリグリセリル

50

シリケート ( P G S )、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N, N - ジスクシンイミジルカルボネート ( D S C )、1, 3, 5 - トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、3 - ( トリエトキシシリル ) プロピルコハク酸無水物、N - ( 3 - トリエトキシシリルプロピル ) - 4 - ヒドロキシブチルアミド ( S I T 8 1 8 9 . 5 )、N - ( トリエトキシシリルプロピル ) グルコンアミド ( S I T 8 1 8 9 . 0 ) 5 0 %、プルロニック L 1 2 1 及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された 1 種以上の第 2 シリケート単量体である S o l B 2 を含む第 2 容器 ; ( i i i ) アミノプロピルトリエトキシラン ( A P T E S )、3 - グリシドキシプロピルトリメトキシシラン ( G P T M O S )、N - トリエトキシシリルプロピル - O - ポリエチレンオキシドウレタン ( P E O U )、グリセロール、P E G 2 0 0、P E G 4 0 0、P E G 6 0 0、P E G 1 3 5 0 及び P E G 8 0 0 0 からなる群から選択された 1 種以上の添加剤である S o l B 3 を含む第 3 容器 ; ( i v ) H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された S o l B H を含む第 4 容器 ; 及び ( v ) 緩衝液である S o l B S を含む第 5 容器で構成されて、前記 S o l B 1、S o l B 2 及び S o l B 3 を混合したゾル組成物に H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された S o l B H、緩衝液である S o l B S と蒸留水、探知するための生物学的物質を順に混合することによって、ゾル混合物がゲル化されることを特徴とするバイオチップ製造用キットを提供する。

10

#### 【 0 0 1 7 】

20

本発明は、また前記方法及びゾル組成物で製造したバイオチップ及びこれを利用して生体物質である標的物質を分析する方法で、前記方法で製造されたバイオチップに前記標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質と相互作用可能な標的生物学的物質を含有する試料を添加する工程を含む標的生物学的物質の分析方法を提供する。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 本発明のゾル組成物 ( S - S o l )、溶液 I 及び溶液 I I で製造したゾル混合溶液をアレイヤーで分注して製作したバイオチップを示す。

【 図 2 】 5 種の H I V 1 抗原を含んだスポットで H I V 患者の血清に対する反応を示す。1、2、3、4、及び 5 は、H I V 1 抗体診断のための抗原マーカーであり、順に p 2 4、p 3 1、g p 4 1、g p 1 2 0、及び g p 1 6 0 を示している。

30

【 図 3 】 連続的に希釈した抗原を含んだスポットで連続的に希釈した H I V 患者の血清に対する反応を示す。

【 図 4 】 5 種の H I V 1 抗原各々を含んだスポットで H I V s t a n d a r d 血清に対する反応を定量化してグラフであり。1、2、3、4、及び 5 は、H I V 1 抗体診断のための抗原マーカーで、順に p 2 4、p 3 1、g p 4 1、g p 1 2 0、及び g p 1 6 0 を示している。

【 図 5 】 感染後日付毎に採取した H I V 1 患者の血清に対して、本発明のバイオチップと既存の診断キットを利用した検出結果を比較した表である。

【 図 6 】 s c i F L E X A R R Y E R S 1 1 を利用して製作したチップの A x o n G e n e P i x s c a n n e r スキャン写真 ( A ) 及びカメライメージ写真 ( B ) である。

40

【 図 7 】 本発明に係るカプセル化構造中に探知蛋白質を含むと共に、表面に微細チャネルを持つバイオチップの形状を図式化したものである。

【 図 8 】 本発明に係るバイオチップ ( 右側 ) と従来方法によるバイオチップ ( 左側 ) の均質度を比較した写真である。

【 図 9 】 本発明に係るゾル混合物 ( A ) と任意の順序で溶液を混合した時のゾル混合物 ( B ) の均質度及びゲル化される速度を比較した写真である。

【 図 1 0 】 本発明に係る蛋白質チップを利用して特定蛋白質を分析した結果である。

【 図 1 1 】 本発明に係る蛋白質チップを利用して特定抗原を分析した結果である。

50

【図12】本発明に係る蛋白質チップを利用して特定疾病に対する抗体を分析した結果である。

【図13】本発明に係るゾル-ゲルチップを利用して特定化合物(ビスフェノールA)とDNAアプタマーの結合を確認した結果である。

【図14】本発明に係るゾル-ゲルバイオチップを商用化した製品のイメージである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。

一観点において、本発明は、下記の工程を含む、ゾル組成物のゲル化を利用したバイオチップの製造方法であって、

(a) Sol B1、Sol B2及びSol B3を含むゾル組成物にHCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HNO<sub>3</sub>及びCH<sub>3</sub>COOHからなる群から選択されたSol BH(溶液I)を混合する工程；

(b) 緩衝液であるSol BSと蒸留水を工程(a)で混合された溶液と混合した後、-20~4℃で安定化させる工程；及び

(c) 標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を含む溶液を工程(b)で安定化された溶液と混合して基板上に分注した後、ゲル化させる工程、

ここで、

(i) Sol B1は、メチルトリエトキシシラン(MTES)、エチルトリエトキシシラン(ETEOS)、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル(TMOS)、オルトケイ酸テトラエチル(TEOS)及びテトラメトキシシリケート(TMS)からなる群から選択された1種以上の第1シリケート単量体であり；

(ii) Sol B2は、3-アミノトリメトキシシラン(3-ATMS)、ジグリセリルシラン(DGS)、メチルトリメトキシシリケート(MTMS)、ポリグリセリルシリケート(PGS)、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N,N-ジスクシンイミジルカルボネート(DSC)、1,3,5-トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、3-(トリエトキシシリル)プロピルコハク酸無水物、N-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミド(SIT8189.5)、N-(トリエトキシシリルプロピル)グルコンアミド(SIT8189.0)50%、ブルロニックL121及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された1種以上の第2シリケート単量体であり；そして

(iii) Sol B3は、アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン(GPTMOS)、N-トリエトキシシリルプロピル-O-ポリエチレンオキシドウレタン(PEOU)、グリセロール、PEG200、PEG400、PEG600、PEG1350及びPEG8000からなる群から選択された1種以上の添加剤であることを特徴とする製造方法に関するものである。

【0020】

本発明において、前記Sol BHの濃度は、1mM~100mMであることを特徴とする。

【0021】

本発明において、前記Sol BSは、1mM~100mMの濃度範囲のNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>からなる群から選択された1種以上の溶液であってもよい。

【0022】

ゾル-ゲル法を利用してバイオチップを製作する従来の方法では、ゾル組成物、緩衝液、及び標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質などを任意の順序で任意に混合して、まずゾル混合溶液を作った後、真空処理などの後処理を経てゲル化させる方法が利用されてきた。また、ゾル組成物と緩衝液及び探知蛋白質を混合する方法は、ボルテックス(vortex)や超音波振動(ultrasonic)を利用する方法などがあり、ゾル-ゲルの形を作る

10

20

30

40

50

方法も基板用ウェル上にスポットを形成したり、表面をゾル - ゲルでコーティングしたり枠に注ぎ込んだ後、ゲル化させる方法などが利用されてきた。

【 0 0 2 3 】

このような方法は、ゾル組成物混合溶液で形成させたスポット毎に含有している標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質の濃度が一定でない場合があり、また実施者による濃度も違いが生じ、混合する時汚染の可能性が大きく、サンプルによりゾルゲル混合物の粘度が変化したりもするため、スポットの形成程度や形、大きさにおいて差がでる場合がある。従って、このような問題点を解決できる、均質のバイオチップを製造できる方法の必要性がある。

【 0 0 2 4 】

本発明のバイオチップ製作方法によると、ゾル - ゲル法を利用して、簡易でありながらも、標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質がスポット毎に均一な濃度をなしており、より正確で高い効率で生物学的物質の探知が可能である。

【 0 0 2 5 】

本発明のバイオチップの製造方法の一態様の具体的な説明は下記のとおりである。

まず、第1シリケート単量体である S o l B 1、第2シリケート単量体である S o l B 2 及び添加剤である S o l B 3 を順に混合してゾル組成物を製造する。

【 0 0 2 6 】

前記 S o l B 1 は、メチルトリエトキシシラン ( M T E S )、エチルトリエトキシシラン ( E T r E O S )、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル ( T M O S )、オルトケイ酸テトラエチル ( T E O S ) 及びテトラメトキシシリケート ( T M S ) からなる群から選択された1種以上の物質を用いてもよい。本発明の一実施例では、前記第1シリケート単量体の成分として T E O S を選択して用いた。

【 0 0 2 7 】

また、前記 S o l B 2 は、3 - アミノトリメトキシシラン ( 3 - A T M S )、ジグリセリルシラン ( D G S )、メチルトリメトキシシリケート ( M T M S )、ポリグリセリルシリケート ( P G S )、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N, N - ジスクシンイミジルカルボネート ( D S C )、1, 3, 5 - トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、3 - ( トリエトキシシリル ) プロピルコハク酸無水物、N - ( 3 - トリエトキシシリルプロピル ) - 4 - ヒドロキシブチルアミド ( S I T 8 1 8 9 . 5 )、N - ( トリエトキシシリルプロピル ) グルコンアミド ( S I T 8 1 8 9 . 0 ) 5 0 %、プルロニック L 1 2 1 及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された1種以上の物質を用いてもよい。本発明の一実施例では、前記第2シリケート単量体の成分として D G S を選択して用いた。

【 0 0 2 8 】

そして、前記 S o l B 3 は、添加剤として、アミノプロピルトリエトキシシラン ( A P T E S )、3 - グリシドキシプロピルトリメトキシシラン ( G P T M O S )、N - トリエトキシシリルプロピル - O - ポリエチレンオキシドウレタン ( P E O U )、グリセロール、P E G 2 0 0、P E G 4 0 0、P E G 6 0 0、P E G 1 3 5 0 及び P E G 8 0 0 0 からなる群から選択された1種以上の物質を用いてもよい。本発明の一実施例では、前記添加剤として P E G を選択して用いた。

【 0 0 2 9 】

前記第1シリケート、第2シリケート単量体及び添加剤は、単量体内部生体物質の性質や作ろうとするゾル - ゲルチップの形により必要に応じて適宜選択して用いてもよい。

【 0 0 3 0 】

本発明のバイオチップ製造用ゾル組成物において、第1シリケート単量体は、ゾル組成物の全体積対して約 2 ~ 3 0 体積 %、前記第2シリケート単量体は、約 2 ~ 8 体積 %、そして添加剤は、約 0 ~ 5 体積 % で含まれることが好ましい。この時、前記ゾル組成物は、吸入時有害であるため、風通しがいい所で製造する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 1 】

本発明の前記バイオチップ製造用前記ゾル組成物は、ゲル化させた時、孔隙による微細チャンネルを形成することを特徴とする。即ち、このようなチャンネルが分析する標的物質と相互作用を起こすことができるような手段になる。特に、前記 ( i i i ) 構成要素の添加剤は、ゲル内のチャンネルの大きさを調節するために利用される成分である。

## 【 0 0 3 2 】

本発明において、前記方法は、アレイヤーなしに手でスポッティングを行うこと、又は非接触型アレイヤーを利用して行える。

## 【 0 0 3 3 】

本発明において、工程 ( c ) で用いられる基板は、用いられる前に予め露点より高い温度で最適化され、ここで、露点より高い温度とは、基板に露を結び始める温度より高い温度を意味するものであり、湿度条件に応じてこのような露点は変わり、例えば、相対湿度 5 0 % 以上で大気温度が 2 0 の場合、8 . 6 であり、通常は湿度 7 0 ~ 8 0 % で 1 4 ~ 1 7 である。

10

## 【 0 0 3 4 】

本発明において、前記基板は、ポリメチルメタクリレート ( polymethylmethacrylate、P M M A )、プラスチック、シリコン、及びガラスなどであってもよい。

## 【 0 0 3 5 】

本発明において、前記標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質は、核酸、蛋白質、ペプチド、低分子物質及び細胞からなる群から選択されたいずれか一つでありうる。

20

## 【 0 0 3 6 】

本発明において、前記工程 ( a ) で混合された溶液、ゾル混合物は、温度 - 2 0 ~ 4 の条件で 3 0 分以上放置して安定化させることができ、アレイヤーでゾル組成物を入れる容器は、露点より高い温度、通常 1 4 ~ 1 7 ( 湿度 7 0 ~ 8 0 % 時露点温度以上 )、分注環境は、湿度 7 0 ~ 8 0 %、大気温度 2 0 の条件を合わせてゾルゲルに最適化させることができる。

## 【 0 0 3 7 】

このような安定化及び最適化過程を介して、ゾル組成物のゲル化する速度を遅らせてスポット形成を容易にし、ゲル化した後のスポットの割れを防いでチップ内の微細チャンネルがよく形成されるようにする。

30

## 【 0 0 3 8 】

本発明において、前記ゾル組成物と S o l B H と S o l B S の混合溶液、蒸留水、及び標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質は、各々 3 : 1 : 4 と 1 : 2 : 8 との間の範囲で混合され、前記 S o l B H 及び S o l B S の濃度は、1 m M ~ 1 0 0 m M であってもよい。

## 【 0 0 3 9 】

本発明において、前記 S o l B S : 蒸留水 : 標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質の体積比は、1 : 2 : 1 と 2 : 5 : 1 との間の範囲である。

## 【 0 0 4 0 】

本発明において、前記緩衝液は、p H 3 ~ 8 の範囲のリン酸ナトリウム ( sodium phosphate ) であってもよい。

40

## 【 0 0 4 1 】

本発明において、前記基板は、予めプラズマ表面処理されたり、エッチングされたり、又は P D M S やシリケート単量体、若しくは高分子物質で処理されることを特徴とする。

## 【 0 0 4 2 】

他の観点において、本発明は、下記の工程を含む、ゾル組成物のゲル化を利用したバイオチップの製造方法であって、

( a ) S o l B 1、S o l B 2 及び S o l B 3 で構成されたゾル組成物を基板上に分注した後、H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された S o l B H ( 溶液 I ) を分注する工程 ; 及び

50

(b) 緩衝液である Sol B S、標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質及び蒸留水を含む溶液 I I を基板上に分注した後、ゲル化させる工程、  
ここで、

(i) Sol B 1 は、メチルトリエトキシシラン (M T E S)、エチルトリエトキシシラン (E T r E O S)、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル (T M O S)、オルトケイ酸テトラエチル (T E O S) 及びテトラメトキシシリケート (T M S) からなる群から選択された 1 種以上の第 1 シリケート単量体であり；

(ii) Sol B 2 は、3 - アミノトリメトキシシラン (3 - A T M S)、ジグリセリルシラン (D G S)、メチルトリメトキシシリケート (M T M S)、ポリグリセリルシリケート (P G S)、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N, N - ジスクシンイミジルカルボネート (D S C)、1, 3, 5 - トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、3 - (トリエトキシシリル) プロピルコハク酸無水物、N - (3 - トリエトキシシリルプロピル) - 4 - ヒドロキシブチルアミド (S I T 8 1 8 9 . 5)、N - (トリエトキシシリルプロピル) グルコンアミド (S I T 8 1 8 9 . 0) 5 0 %、プルロニック L 1 2 1 及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された 1 種以上の第 2 シリケート単量体であり；

(iii) Sol B 3 は、アミノプロピルトリエトキシシラン (A P T E S)、3 - グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (G P T M O S)、N - トリエトキシシリルプロピル - O - ポリエチレンオキシドウレタン (P E O U)、グリセロール、P E G 2 0 0、P E G 4 0 0、P E G 6 0 0、P E G 1 3 5 0 及び P E G 8 0 0 0 からなる群から選択された 1 種以上の添加剤であり；

(iv) Sol B H 溶液は、1 m M ~ 1 0 0 m M の濃度範囲の H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された 1 種以上の溶液であり；そして

(v) Sol B S 溶液は、1 m M ~ 1 0 0 m M の濃度範囲の N a H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、N a<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub>、N a<sub>3</sub> P O<sub>4</sub> からなる群から選択された 1 種以上の溶液であることと特徴とする製造方法に関するものである。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明において、工程 (c) で用いられる基板は、用いられる前に予め露点より高い温度で最適化され、ここで、露点より高い温度とは、基板に露が結び始める温度より高い温度を意味し、湿度条件に応じてこのような露点は変わり、例えば、相対湿度 5 0 % 以上で大気温度が 2 0 であると、8 . 6 であり、通常は湿度 7 0 ~ 8 0 % で 1 4 ~ 1 7 である。

#### 【 0 0 4 4 】

このような最適化過程を介して、各溶液を順に分注時にゾル組成物のゲル化される速度を遅らせて、スポット形成を容易にし、ゲル化された後、スポットの割れを防いでチップ内の微細チャネルがよく形成されるようにする。

#### 【 0 0 4 5 】

本発明の方法によると、ゾル組成物の分注後、H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub> 及び C H<sub>3</sub> C O O H からなる群から選択された溶液 I の Sol B H をその上に分注する。溶液 I は、前記ゾル組成物のゲル化を誘導するための pH 環境を作る役割を果たす。前記 H C l、H<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、H N O<sub>3</sub>、または C H<sub>3</sub> C O O H の濃度は、5 ~ 3 0 m M が好ましい。p H 1 ~ 3 で適正させる。

#### 【 0 0 4 6 】

最後に、緩衝液である Sol B S、標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質、及び蒸留水を含む溶液 I I を基板上に分注してゲル化させる。

#### 【 0 0 4 7 】

本発明において、前記 Sol B S は、p H 3 ~ 8 の範囲のリン酸ナトリウムであってもよい。

#### 【 0 0 4 8 】

10

20

30

40

50

前記緩衝液及び2次蒸留水は、生体物質（例えば、蛋白質）の破壊を防ぐ機能を持つ。生体物質は、適正範囲から外れたpHでは、活性が低下したり破壊されやすく、ゾルのゲル化は、pHが高いほどゆっくり、pHが低いほどはやく進行されるため、生体物質の活性低下及び破壊を防ぎながら適正時間ゲル化を行えるようにpHを適正することが重要である。通常、生体物質はpH5～8の範囲で安定的に存在するため、特に、前記溶液IによるpH環境が、生体物質の破壊を防ぐために、前記緩衝液を用いる。用いられる緩衝液は、特に制限されることなく、添加する生体物質に当業者が適切に選択して用いられる。本発明では、pH3～8の範囲のリン酸ナトリウムバッファーを用いた。また、溶液IIに含まれている「標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質」または「生体物質」とは、検出しようとする対象物質（例、標的蛋白質）と相互作用できる生体内の物質のこ  
10  
をいい、例えば、核酸、蛋白質、ペプチド、低分子物質、または細胞などになりうる。このような探知蛋白質、または生体物質を、溶液IIに含ませるために、適当なバッファー（buffer）溶液が用いられる。即ち、実施のための生体物質をバッファー溶液に入れて、検出のためのサンプル溶液（sample solution）を作る。例えば、前記生体物質が蛋白質の場合には、PBS buffer（phosphate-buffered saline）を混ぜて用いて、酵素反応（enzyme reaction）がある時には、HEPES、NaCl、EDTAなどを必要に応じて適切に濃度を異ならせて混ぜて用いられる。本発明の一実施例では、前記対象物質（標的蛋白質）でHIV1（Human Immunodeficiency virus 1）患者の抗体を用いて、前記探知蛋白質で前記HIV抗体に結合できる5種の抗原マーカーをPBSバッファーに  
20  
混ぜて用いた。

【0049】

この時、前記溶液IIで緩衝液であるSolBS：蒸留水：標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質の混合される体積比は、1：2：1から2：5：1の間の範囲であることが好ましく、最も好ましくは1：2：1である。例えば、溶液II全重量基準に緩衝液は約20～30体積%、蒸留水は約40～60%体積%、標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質は20～30体積%であってもよい。本発明の一実施例では、緩衝液は10 $\mu$ L、蒸留水は20 $\mu$ L、探知蛋白質（標的蛋白質と相互作用する生物学的物質）を含む溶液10 $\mu$ Lで混合して用いた。

【0050】

本発明は、前記ゾル組成物、溶液I及び溶液IIを正確な量で順次分注することによっ  
30  
て均質なバイオチップを製作することを特徴とする。

【0051】

本発明で分注される、前記ゾル組成物：溶液I：溶液IIの分注量の比は、3：1：4から1：2：8の間であることを特徴とし、好ましくは3：1：4である。例えば、前記ゾル組成物の分注量は、25～35 $\mu$ Lが好ましく、約30 $\mu$ Lが最も好ましい。前記溶液Iの分注量は、5～15 $\mu$ Lが好ましく、約10 $\mu$ Lが最も好ましい。前記溶液IIの分注量は、35～45 $\mu$ Lが好ましく、約40 $\mu$ Lが最も好ましい。

【0052】

本発明に係るバイオチップ製造方法でゾル組成物と溶液I及び溶液IIを予め混合した後、基板に分注する時は、非接触型アレイヤー（non-contact arrayer）を用いるか、ピ  
40  
ペットあるいは他の道具を利用して直接手でスポッティングすることが好ましい。

【0053】

本発明において、前記製造方法は、前処理過程がないことを特徴とし、前記前処理過程は、(i)SolB1、SolB2、SolB3、SolBH、SolBS、または標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を混合する過程；(ii)混合した後、ボルテックス（vortexing）する過程；及び(iii)混合した溶液を安定化する過程からなる群から選択されるいずれか一つ以上であることを特徴とする。

【0054】

vまた、本発明において、前記SolB1、SolB2、SolB3、SolBH、SolBS及び標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を分注する前に容器に入れて、  
50

ノズルを利用して吸い上げる形態で分注してもよい。

【0055】

加えて、本発明において、Sol B1、Sol B2、Sol B3、Sol BH、Sol BS及び標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を分注する前に、予め分注するノズルが連結されている大容量カートリッジに入れて、一回で分注する量が、ノズルを利用して吸い上げる形態での分注と比べて100倍以上であるため、大量生産が可能になる。

【0056】

前処理過程なしに基板上に直接ゾル組成物と溶液I及び溶液IIを順次分注してチップを製作する時は、正確な量で分注するアレイヤー(arrayer)を用いて実施されてもよい。この時、前記ゾル組成物、溶液I、及び溶液IIを正確な体積で分注するのに用いられるアレイヤーとしては、非接触型アレイヤーが好ましい。

10

【0057】

バイオチップ上で探知物質を配列(array)させる方式により「接触型」と「非接触型」に分けられるが、接触型アレイヤーは、非常に細い空間の中にあるピン(pin)等を利用して探知蛋白質をチップ表面に配列させる。このような方法は、探知蛋白質が含まれた溶液がピンの外側に少しずつ抜け出して、表面に直接接触して配列する方式で、短い時間に種々の探知蛋白質を配列させることができる長所があるが、溶液の体積を正確に調節できないため、均一性が低くなりうる。それに対して、非接触型アレイヤーは、細い管に探知蛋白質が含まれた溶液を入れて、チップ表面の真上に位置させた後、管に一定圧力を与えることによって直接的な接触なしに表面の上に配列させる方法である。この方法は分注される溶液の体積を正確に決めることが可能な長所がある。従って、前処理過程なしにゾル組成物、溶液I及び溶液IIを順次分注してチップを製作する時、各溶液の分注される体積を比に合うように調節できるため、本発明ではこのような非接触型アレイヤーを用いることが好ましい。

20

【0058】

前記ゾル組成物；HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HNO<sub>3</sub>及びCH<sub>3</sub>COOHからなる群から選択された溶液I；及び前記標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質、緩衝液及び蒸留水の混合溶液の溶液IIを、正確な体積を分注する非接触型アレイヤーを利用して順次基板用ウェル上に分注させることができる。表面に分注されている小さいスポットに他の溶液が分注される時、溶液の表面張力のために、全溶液は広がることなく、スポットを形成することになるが、溶液が落ちる時発生する表面エネルギーが振動に転換されて、これによってスポット内で物質の流れ(対流)が発生して、二つの溶液が混ざりやすくなる。このような原理を利用して、本発明では、前処理なしに表面に直接スポットティングを介して、ゾル-ゲルチップを製作する自動化方法を考案した。

30

【0059】

例えば、Sciencion AG社のマイクロアレイヤー(Microarrayer)を用いることができる。特に、Sciencion AG社のデューポイントコントロールテクノロジー(dew point control technology)を利用すると、プレート表面に湿気が凝結されて生じる濃度の不確実性を極力防ぐことができより正確な体積及び大きさのスポットが製作可能である。本発明の一実施例では、前記アレイヤーとして、sciflexarrayers 11(Sciencion AG、ドイツ)を用いた。

40

【0060】

即ち、本発明では、バイオチップ製作時に、前記非接触型アレイヤーを利用して基板に各々の溶液を正確な体積だけ分注するだけで、バイオチップをより手軽に作ることで、従来方法のようにゾル-ゲルモノマー(sol-gel monomer)、緩衝液、探知蛋白質サンプルなどを予め混合する(premixing)等の前処理過程が必要ないため、より均質なバイオチップの製作が可能になる。

【0061】

一方、本発明で用いる基板は、ゾル組成物がゲル化された時、透明になる性質を利用したものであるため、前記基板用ウェル(well)、またはスライドも、良い透明度を維持で

50

きる材料で作られたものがよい。例えば、透明性が非常に良いポリメチルメタクリレート（PMMA）成分と同じプラスチック、シリコンやガラス成分で製作されたものが用いられる。

【0062】

また、本発明で用いられる基板は、ゾル混合溶液がゲル化されながら基板に固定されるように表面処理されなければならない。本発明のバイオチップの重要な条件中一つは、ゾル混合溶液がゲル化されながら基板に強く固定されて、標的物質が入っている溶液と反応させる時、スポットが落ちてはいけない点である。従って、前記バイオチップを利用した標的物質分析において、標的物質と反応させた後、強い洗浄過程が必要で、従って、このような物理的力を克服するためには、スポットの強い固定が必須で、このために表面処理されなかったプラスチック基板、プラズマで表面処理されたプラスチック基板や表面処理されなかったガラス基板、表面処理されたガラス基板（例えば、エッチング（etching）されたガラス基板など）、あるいは多孔質構造を持つシリコンチップなどを利用することが好ましい。

10

【0063】

本発明において、基板は予めプラズマ表面処理されるか、エッチングされるか、PDMSやシリケート単量体、または高分子物質で処理されたものであってもよい。

本発明のバイオチップ製造方法において、アレイヤーを用いるに当たり注意しなければならない事項は下記のとおりである。

【0064】

20

第一に、DNAチップとは異なり、前記バイオチップはゾルという特殊な材料を用いて時間経過に伴ってゲル化される性質があるため、アレイヤーを利用して分注する途中でゾルがゲル化しないようにできるだけ早いうちに分注させることが大変重要である。

第二に、湿度と温度である。基板にスポットがつくと同時に周囲の湿気量と温度に応じて前記スポットがゲル化される速度及びスポットの活性が左右されるため、最初の湿度と温度が大変重要になる。従って、常時前記ゾル-ゲルを利用したバイオチップを製作時には、アレイヤー周辺の湿度と温度を事前に整えることが大変重要になる。

【0065】

本発明で好ましい湿度は、約50%以上、または、より具体的には70~80%である。そして、好ましい温度は、約25以下、より具体的には常温の範囲と言える10~25の範囲である。特に、スポットのゲル化において最初の高い湿度が重要な要因であるため、必ずスポットの配列（arraying）前の湿度を80%程度に準備しなければならず、また、温度が25以上の場合には、ゾルのゲル化がはやく進行される傾向があるため、極力低い温度で実験した方がよい。

30

【0066】

このように事前の温度、湿度の準備と、早いうちに集積させることができるプログラムを準備した後、各溶液を工程毎に分注するようになる。

本発明において、標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質は、核酸、蛋白質、ペプチド、低分子物質、または細胞であってもよい。

【0067】

40

また他の観点において、本発明は、(i)メチルトリエトキシシラン(MTEOS)、エチルトリエトキシシラン(ETEOS)、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル(TMOS)、オルトケイ酸テトラエチル(TEOS)及びテトラメトキシシリケート(TMS)からなる群から選択された1種以上の第1シリケート単量体であるSo1B1を含む第1容器；(ii)3-アミノトリメトキシシラン(3-ATMS)、ジグリセリルシラン(DGS)、メチルトリメトキシシリケート(MTMS)、ポリグリセリルシリケート(PGS)、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N,N-ジスクシンイミジルカルボネート(DSC)、1,3,5-トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、3-(トリエトキシシリル)プロピルコハク酸無

50

水物、N-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミド(SIT8189.5)、N-(トリエトキシシリルプロピル)グルコンアミド(SIT8189.0)50%、プルロニックL121及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された1種以上の第2シリケート単量体であるSolB2を含む第2容器；(iii)アミノプロピルトリエトキシラン(APTES)、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン(GPTMOS)、N-トリエトキシシリルプロピル-O-ポリエチレンオキシドウレタン(PEOU)、グリセロール、PEG200、PEG400、PEG600、PEG1350及びPEG8000からなる群から選択された1種以上の添加剤であるSolB3を含む第3容器；(iv)HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HNO<sub>3</sub>及びCH<sub>3</sub>COOHからなる群から選択されたSolBHを含む第4容器；及び(v)緩衝液であるSolBSを含む第5容器で構成されて、前記SolB1、SolB2及びSolB3を混合したゾル組成物にHCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HNO<sub>3</sub>及びCH<sub>3</sub>COOHからなる群から選択されたSolBH、緩衝液であるSolBSと蒸留水、探知するための生物学的物質を順に混合することによって、ゾル混合物がゲル化されることを特徴とするバイオチップ製造用キットに関するものである。

10

## 【0068】

前記容器は、その材質に制限がなく、このようなキットは、ビン、桶(tub)、小袋(sachet)、封筒(envelope)、チューブ、アンプル(ampoule)等のような形態を取ってもよく、これらは部分的に、または全体的にプラスチック、ガラス、紙、ホイル、ワックスなどから形成されてもよい。容器は、最初は容器の一部であるか、または機械的、接着性、またはその他の手段によって容器に付着することができる、完全に、または部分的に分離可能な栓を取り付けてもよい。前記キットは、外部パッケージを含んでもよく、外部パッケージは、構成要素の使用に関する使用説明書を含んでもよい。

20

## 【0069】

また他の観点において、本発明は、前記方法で製造されたバイオチップを利用して標的生物学的物質を分析する方法に関するものである。

## 【0070】

具体的に、前記方法で製造されたバイオチップに前記標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質と相互作用可能な標的生物学的物質を含有する試料を添加する工程を含む標的生物学的物質の分析方法に関するものである。ここで、前記標的生物学的物質は、核酸、蛋白質、ペプチド、低分子物質、及び細胞からなる群から選択されたいずれか一つであることを特徴とし、前記標的生物学的物質を探知できる放射性同位元素、または蛍光染料、あるいは他の種類の標識物質で標識された蛋白質、アプタマーなどの生体物質と、追加で反応させる工程を含んでもよい。

30

## 【0071】

前記で説明したとおり、標的生物学的物質と反応させるバイオチップが準備された後、実際に標的生物学的物質が入っている溶液と反応させる。反応溶液は、96ウェル(well)タイプの場合、50~100µLの量が適切で、反応時間は1時間にする。標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質と相互作用する標的生物学的物質も生体内物質として、核酸、蛋白質、ペプチド、低分子物質、または細胞であってもよい。

40

## 【0072】

標的生物学的物質が入っている反応溶液は、スポット内の微細孔隙構造を介してスポット内に浸透し、カプセル構造中に固定されている生物学的物質と接触し、相互作用を介して結合することになる(1st incubation)。前記反応後、スポット内で標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質と結合した標的生物学的物質を分析するために、前記標的生物学的物質を探知できるように標識因子の標識蛋白質と反応させてもよい。本発明の一実施例では、蛍光染料(Cy3)が付着した標的蛋白質に対する抗体を用いた(2nd incubation)。この時、反応時間は30分にして、反応溶液の量は50~100µLにする。前記1st、2ndインキュベーション過程は、共に室温で行う。標的生物学的物質が入っている反応溶液が種々の物質が混ざっている混合物の場合

50

に、バイオチップに入っている標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質との非特異的結合を防ぐために、1stインキュベーション過程前にブロッキング(blocking)過程を行ってもよい。この過程に必要なブロッキング溶液は、スキムミルクやBSA (bovine serum albumin)、あるいはIgGのようなものを用いてもよい。

【0073】

前記1st、2ndインキュベーションを終えた後には、洗浄過程(washing)を経ることになるが、洗浄液の成分としては、通常のものを用いてもよく、本発明の一実施例では、0.2% Tween-20が含まれているPBSバッファーを用いた。洗浄機としては、ELISA用洗浄機を用いた。1st洗浄工程で、4回の洗浄を行って、2nd洗浄工程で4回の洗浄を実施する。前記洗浄工程を経た後、ウェルで溶液がすべて取り除かれるまで乾燥させる。

10

【0074】

乾燥過程が終わった後、蛍光染料を探知できるイメージスキャナを介して反応を起こしたウェルをスキャンして実際反応が合ったか否かがわかり、イメージをソフトウェアを利用して濃さを測定してみることによって、どの程度の反応を起こしたかが分かる。即ち、本発明の標的生物学的物質を分析する方法は、放射性同位元素、蛍光染料、発光性物質、染料、あるいは他の種類の標識物質などで標識された蛋白質、またはアプタマーなどの生体物質と、追加で反応させる工程を含む。この時、アプタマーとは、高い親和性で標的生物学的物質と相互作用する生物学的物質を特異的に認知できる小さい一本鎖オリゴ核酸を称する。

20

さらに本発明は、前記製造方法によって製造されたバイオチップを含む検出用キットを含む。

【0075】

探知生物学的物質検出用キットは、瓶、筒、小袋、封筒、チューブ、アンプル等のような形態であってもよく、これらは部分的にまたは全体的にプラスチック、ガラス、紙、ホイル、ワックスなどから形成される。容器は、最初は容器の一部であるか、または機械的、接着性、またはその他の手段によって、容器に付着できる、完全にまたは部分的に分離可能な栓を取り付けることができる。前記キットは外部パッケージを有することができ、外部パッケージは構成要素の使用に関する使用説明書を含んでもよい。

30

【実施例】

【0076】

以下、実施例を通して、本発明をより一層詳細に説明する。この実施例は単に本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこの実施例によって制限されると解釈されないことは当業界の通常の知識を有する者には自明である。

実施例1：バイオチップ製造用各構成溶液の製造

次の表1に例示された成分から中各々一つずつを選択したSol B1 20  $\mu$ L、Sol B2 6  $\mu$ L、及びSol B3 4  $\mu$ Lを混合してゾル組成物を製造した。尚、溶液Iとしては10  $\mu$ LのSol BHを準備した。

【0077】

【表 1】

各溶液の成分区分	成分
S o l B 1	メチルトリエトキシシラン (MTE S)、エチルトリエトキシシラン (E T r E O S)、ケイ酸ナトリウム、オルトケイ酸テトラメチル (TMOS)、オルトケイ酸テトラエチル (TEOS)、及びテトラメトキシシリケート (TMS) からなる群から選択された 1 種の第 1 シリケート単量体
S o l B 2	3-アミノトリメトキシシラン (3-ATMS)、ジグリセリルシラン (DGS)、メチルトリメトキシシリケート (MTMS)、ポリグリセリルシリケート (PGS) ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリドン、グリセリルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、N, N-ジスクシンイミジルカルボネート (DSC)、1, 3, 5-トリメチルベンゼン、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、3-(トリエトキシシリル) プロピルコハク酸無水物、N-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミド (SIT8189.5)、N-(トリエトキシシリルプロピル) グルコンアミド (SIT8189.0) 50%、プルロニック L121 及び水酸化テトラメチルアンモニウムからなる群から選択された 1 種の第 2 シリケート単量体
S o l B 3	アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES)、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GPTMOS)、N-トリエトキシシリルプロピル-O-ポリエチレンオキシドウレタン (PEOU)、グリセロール、PEG200、PEG400、PEG600、PEG1350 及び PEG8000 からなる群から選択された 1 種の添加剤
S o l B H	HC1、H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 、HNO <sub>3</sub> 及び CH <sub>3</sub> COOH からなる群から選択された 1 種

## 【0078】

次に、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> からなる群から選択された 1 種以上の S o l B S 10 μL 及び 2 次蒸留水 (double distilled water、DDW) 20 μL を混ぜる一方、HIV1 抗体と相互作用できる 5 種の探知蛋白質 (p24、p31、gp41、gp120、及び gp160) 約 10 ~ 200 ng ずつ PBS buffer に混ぜてサンプル溶液 10 μL を作り、これを前記混合物に添加した後、5 秒の間ボルテックスしてスピン - ダウンして溶液 II を製造した。

## 【0079】

【表 2】

ゾル組成物、溶液 I、溶液 II 及び探知蛋白質の構成成分	構成成分
ゾル組成物	S o l B 1 20 μL、S o l B 2 6 μL 及び S o l B 3 4 μL
溶液 I	S o l B H 10 μL
溶液 II	S o l B S 10 μL 及び DDW 20 μL 5 種の HIV1 抗原含む PBS solution 10 μL

## 【0080】

## 実施例 2 : バイオチップの製作

### (1) 基板用ウェルの準備

プラズマ表面処理されて市販されている PMMA 96 ウェルプレート を SPL 社 (韓国) から購入して準備した。

### (2) バイオチップ (蛋白質チップ) の製作

蛋白質チップを製作するために、スポットティングする前に、温度 16 °C、湿度 80% でアレイヤーをセットし、前記実施例 1 で取得されたゾル混合溶液を入れるソースウェル (source well) としては、一般 384 ウェルを準備し、標的ウェル (target well) としては、前記 (1) の PMMA 96 ウェルプレートを準備した。そして、設定した通り正確な体積を分注する sciFLEXARRAYER S11 (SciEnion 社、ドイツ) アレイヤーを準備した。

10

次に、sciFLEXARRAYER S11 (SciEnion 社、ドイツ) アレイヤーのソースプレート (source plate) に、前記実施例 1 での SolB1 20 µL、SolB2 6 µL、及び SolB3 4 µL を混合して製造したゾル組成物 30 µL、SolBH10 µL (溶液 I)、及び前記溶液 II 40 µL ずつ各々アレイヤーのソースプレートに入れた。

予め準備した PMMA 96 ウェルプレート上に、前記ゾル組成物、溶液 I、及び前記溶液 II を順に決まった体積量だけ分注した。分注される量がスポット当たり 450 pL 以下になるようにし、この時、ノズル PDC90 (SciEnion AG、ドイツ) を用いた。spotting frequency は、500 Hz にした。形成されたスポットの大きさは、約 300 µm 程度であった (スポット当たり 8 drops)。

20

#### 【0081】

図 6 に 532 nm で Axon GenePix scanner (Axon 社) でスキャンした写真 A 及びカメラが取り付けられた sciFLEXARRAYER によるイメージ写真 B を図示した。蛋白質チップ上の互いのスポット間隔 (dot pitch) は 600 µm であった。

#### 【0082】

##### 比較例 1 : 従来の蛋白質チップとの均質度比較

本発明の方法に係る蛋白質チップが、既に用いられている蛋白質チップと比較して顕著に優秀な均質度を持っているか否かを確認した。

30

まず、対照群として公知の既存の方法によって蛋白質チップを製作した。シリケート単量体 (Silicate monomer)、HCl、DW、SP、及びサンプル溶液を順次混合して製造した後、ピンアレイヤー (pin arrayer) を利用してソースプレートに分注された混合溶液を PMMA 96 ウェルプレートにスポットティングした。ピンアレイヤーとしては、OmniGrid Accent Arrayer (Genomic Solutions、米国) を用いた。

#### 【0083】

尚、実施例 1 及び 2 の方法で製作した本発明の方法により製作された蛋白質チップのカメライメージ写真 (図 6 の B) と、前記方法により製作された蛋白質チップが顕微鏡で観察される像をデジタルカメラで撮って比較した。

40

その結果、図 8 に示した通り、本発明の特定ゾル組成物の使用及び ; 溶液 I、溶液 II と混合する前処理工程なしに順次分注することによって製作された蛋白質チップの場合には、スポットの形及び大きさが一定に配列されているが、従来方法による場合、スポットの形や大きさが一定でなかった。即ち、本発明に係る蛋白質チップが既存の蛋白質チップよりその均一な程度が顕著に優秀であることを確認することができた。

#### 【0084】

##### 比較例 2 : 順序を異なるようにして混合した時の比較

本発明の方法に係る混合順に溶液を混合した時と順序を異なるようにして混合した時ゾル混合物の差を比較した。

本発明の混合順序に従って、SolB1、SolB2、及び SolB3 からなるゾル組

50

成物に順番どおり、S o l B HとS o l B S及び蒸留水とバッファー溶液を混ぜて混合物を準備し、比較のために同じ溶液を用いたが、S o l B Hを一番最後に混ぜて混合物を準備し、二つの混合物の差をデジタルカメラで撮って比較した。

その結果、図9に示された通り本発明の混合順序を守って混合物を準備した時には、溶液が互いに溶解しやすく、透明で長い間ゲル化が進行されなかったが(図9のA)、混合順序を異なるようにして準備した時は、溶液が溶けにくく、ゲル化もはやく進行されることを確認することができた(図9のB)。

#### 【0085】

実施例3：蛋白質チップを利用したH I V分析及び診断

前記実施例2で製作された蛋白質チップを10%スキムミルク溶液を利用してブロッキング(blocking)した後、各ウェルに希釈したH I V患者の血清を50 $\mu$ Lずつ入れて、室温で1時間1次培養した。1次培養が終わった後、血清を取り除き、E L I S A用洗浄機を利用して0.2%T w e e n - 2 0が含まれた洗浄液を入れて、5分間ボルテックス(vortex)する工程を4回繰り返した(1次洗浄)。前記1次洗浄後、C y 3蛍光物質で標識されており、ヒトの抗体を認知する - H u m a n抗体(-Human-Cy3、J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h)を希釈して50 $\mu$ Lを入れて、室温で1時間2次培養した。前記2次培養後、- H u m a n - C y 3を取り除き、E L I S A用洗浄機を利用して洗浄液を入れて、5分間ボルテックスする工程を4回繰り返した(2次洗浄)。

#### 【0086】

前記2次洗浄後、反応が終了したウェルを室温で10分以上放置して乾燥させ、レーザーキャナであるF U J I F L A - 9 0 0 0イメージキャナで反応が起きたスポットをスキャンした。また、イメージ分析プログラムであるI m a g e Q u a n t T Lを利用して反応が起きた各スポットの蛍光信号の強度を測定して定量化して、反応が起きた程度を分析した。

#### 【0087】

図2に示したとおり、患者血清により5個のマーカー(p 2 4、p 3 1、g p 4 1、g p 1 2 0及びg p 1 6 0(A b c a m社、F i t z e r a l d社から入手)が、各々血清に対して反応を示し、抗原マーカーが入らなかった陰性対照群チップは反応を示さなかった。

#### 【0088】

図3は、5種の抗原中最も反応が起きた4種の抗原(p 2 4、p 3 1、g p 4 1、g p 1 2 0)とH I V 1のO - t y p e抗原1種を連続的に希釈してウェルにスポットティングして、H I V標準血清を順に希釈したものと反応させた結果を示しており、予想通り数量化(quantification)が定量的に行われたことを確認することができた。前記結果を基に、本発明で製作した蛋白質チップ上で抗原-抗体反応が特異的に起きることが分かる。

#### 【0089】

図4は、5種の抗原を各々含むスポットでH I V 1標準血清に対する反応を定量化した結果を示す。図面のX軸は、標準血清を既存のE L I S A診断キットでH I Vを診断した時、測定されたタイター(Titer)を示しており、本発明の蛋白質チップの分析結果と既存診断チップで分析した結果が相関性があることを見せる。X軸のP R B 2 0 4 - 0 0は、B o s t o n b i o m e d i c a , I n c .から購入した患者の血清標準サンプルであり、製品名はA n t i - H I V 1 m i x e d t i t e r p e r f o r m a n c e p a n e lであり、製品番号はP R B 2 0 4 ( M )である。力価の値は、既存の診断キットで測定したs / c o値であり、s i g n a l t o c u t - o f f (陽性と陰性の基準値) r a t i oを示し、1以上である時陽性とする。図面のY軸は、スポットの蛍光信号の強度(「s i g n a l」)値を陰性対照群スポットの蛍光信号の強度(「c o n t r o l」)値で割った値である。

#### 【0090】

図5は、H I V感染した患者から日毎に採血したs e r o c o n v e r s i o n p a n e lに対する反応を既存の診断キットと比較した表である。患者の血清は、B o s t o

10

20

30

40

50

n b i o m e d i c a , I n c . から購入した標準サンプルであり、既存の診断キットを利用した検出結果も、標準サンプルと共に提供を受けた。このサンプルの製品名は、A n t i - H I V 1 s e r o c o n v e r s i o n p a n e l V で、製品番号は P R B 9 2 2 である。

感染してから間もない時には、既存の抗体診断 E L I S A 診断キットでは、H I V 感染を検出できなかったが、本発明の蛋白質チップでは抗原検出キット同様に感染初期から陽性と検出できることが分かる。

従って、前記バイオチップが、既存の抗体診断 E L I S A よりはるかに向上した感度を持っていることが分かる。

#### 【 0 0 9 1 】

実施例 4：蛋白質チップを利用したウェスタンブロット方法の代替

ウェスタンブロットと免疫染色法は、種々の蛋白質の混合物からある特定蛋白質を捜し出す技法で、探そうとする蛋白質に対する抗体を用いて抗原 - 抗体反応を起こすことによって、特定蛋白質の存在可否を明らかにする方法である。

一般に、ウェスタンブロット (western blot) で特定蛋白質を捜し出す過程は、蛋白質混合物を S D S - ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して大きさ毎に分離させた後、ニトロセルロース、またはナイロンメンブレンに移して、蛋白質を移されたメンブレンで抗原 - 抗体反応を利用して特定抗体に対する抗原を捜し出すが、この時用いる抗体は、放射性同位元素で標識するか、特定の酵素 (h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e など)、または蛍光を示す色素が結合していて、探そうとする蛋白質を可視化することができる。

#### 【 0 0 9 2 】

前記の通りに、複雑な工程を経なければならないウェスタンブロットの代りに、前記実施例 2 で製作された蛋白質チップを利用して、蛋白質混合物を固定化した後、蛍光を示す色素が結合している抗体でアッセイして、手軽に蛋白質混合物内で特定蛋白質を捜し出すことができた。

また、一般に、蛋白質を電気泳動する際に還元状態下で実施するため、蛋白質が変性 (denature) された状態で、抗体と結合をさせることになるが、特定抗体が蛋白質の本来の (native) 形態だけを認識するならば、一般的なウェスタンブロット (western blot) では、蛋白質を捜し出すことができなくなる問題があるが、本発明に係るゾル - ゲル蛋白質チップは、蛋白質を本来の形態で固定化させることができるため、より有用である。

#### 【 0 0 9 3 】

前記実施例 2 で製造されたゾル - ゲルチップを利用して、下記の実験を行った。

( 1 ) p 2 4 蛋白質のネイティブフォーム (Native form) 及び変性フォーム (denature form) に係る結合比較実験

( i ) 先に、ネイティブ形態にだけ結合して、変性形態には結合しない抗体を利用して実験した。その結果、ウェスタンブロットではバンドが見られなく、ゾル - ゲル蛋白質チップだけで陽性と示された。

( i i ) 同じ抗原に対する抗体であるが、変性形態に結合する抗体を利用してウェスタンブロットとゾル - ゲル蛋白質チップに実験した結果、全部陽性と示された。

従って、本発明に係るゾル - ゲルチップは、変性及びネイティブ形態共に確認できることが明らかになった。

( 2 ) p 2 4 蛋白質が発現した E . c o l i 粗抽出物を利用した実験

( i ) p 2 4 蛋白質が発現している E . c o l i 粗抽出物をゾル - ゲル蛋白質チップに濃度毎に (ライセート 1、2、3) 固定した後、発現した蛋白質に対する抗体でアッセイした結果、ゾル - ゲル蛋白質チップで陽性と示された (図 1 0 ) 。

( i i ) 特定蛋白質が発現していなかった E . c o l i 粗抽出物 ( N ) をゾル - ゲル蛋白質チップに固定した後、前記抗体でアッセイした結果、図 1 0 に示したように、ゾル - ゲル蛋白質チップで陰性と示された (図 1 0 ) 。

#### 【 0 0 9 4 】

図10で、Nは陰性対照群で、特定蛋白質が発現していなかったE. coli粗抽出物を固定したものであり、ライセート1は、特定蛋白質が0.09ug/ulの濃度で発現しているE. coli粗抽出物、ライセート2は、特定蛋白質が0.18ug/ulの濃度で発現しているE. coli粗抽出物、ライセート3は特定蛋白質が0.27ug/ulの濃度で発現しているE. coli粗抽出物を固定したものである。Pは、陽性対照群で、Cy3蛍光物質を固定したものである。

【0095】

(3)(i)p24蛋白質に対する抗体を濃度毎にゾル-ゲル蛋白質チップに固定した後サンドイッチアッセイ方法を利用して、p24蛋白質が過発現しているE. coli粗抽出物でアッセイして、再度抗体を結合させて確認した結果、ゾル-ゲルチップでは陽性と示された(図11)。

10

(ii)探索しようとする抗原に対する抗体を濃度毎にゾル-ゲル蛋白質チップに固定した後、サンドイッチアッセイ方法を利用して特定抗原が発現しなかったE. coli粗抽出物でアッセイして、再度抗体を結合させて確認した結果、ゾル-ゲルチップでは陰性と示された(図11)。

図11で、Nは陰性対照群で、抗体を固定しなかったチップであり、Ab1及びAb2は、抗体を濃度毎に(0.063ug/ul、0.125ug/ul)固定したものである。Pは陽性対照群で、Cy3蛍光物質を固定したものである。

(4)(i)探索しようとする疾病(AIDS)の抗体に対する抗原(p24、p31、gp41、gp120及びgp160)をゾル-ゲル蛋白質チップに固定した後、患者血清等特定抗体が含まれている物質(陽性血清)でアッセイして確認した結果、ゾル-ゲルチップで陽性と示された(図12)。

20

(ii)探索しようとする抗体に対する抗原をゾル-ゲルチップに固定した後、血清等特定抗体が含まれていなかった物質(陰性血清)でアッセイして確認した結果、ゾル-ゲルチップで陰性と示された(図12)。

【0096】

実施例5：化合物と結合する蛋白質、または特定物質の探索

図13に示された通り、特定化合物(ビスフェノールA)を実施例2で製作したゾル-ゲルチップに固定して、陰性対照群として化合物を溶解するのに用いるバッファー溶液だけをチップに固定した。そして、蛍光物質(cy3)で標識されており、ビスフェノールAと結合できる1本鎖DNAアプタマー(ピーシエル(株)社から購入)を利用して分析した。

30

【0097】

蛋白質-蛋白質の結合は、酵母ツーハイブリッド法(yeast two hybrid)や免疫沈降(IP)等で確認できるが、化合物と蛋白質の結合、または化合物とDNAの結合を手軽に確認できる方法は多くない。前記実験結果、実施例2で製作された蛋白質チップは、化合物やDNAをはじめとする低分子物質から蛋白質、抗体に至るまで様々な物質を固定することができ、種々の物質の結合を手軽に確認することができる。

【0098】

本発明に係る前記ゾル組成物のゲル化を利用して、バイオチップを製造する場合、SolB1、SolB2、及びSolB3で構成されるゾル組成物とSolBH、SolBS、DWとバッファー溶液を順に混合した後、低温で安定化させることによって、ゾル組成物のゲル化時間を遅らせて安定化されたゲル化(gelation)を導いて、ゾル溶液の分注が容易で、スポットの活性を維持することができる。また、事前に混合(premixing)する前処理過程なしにアレイヤーを利用した表面スポットティングだけ利用して手軽に均質なバイオチップ製作が可能であるという有利な効果があって有用である。

40

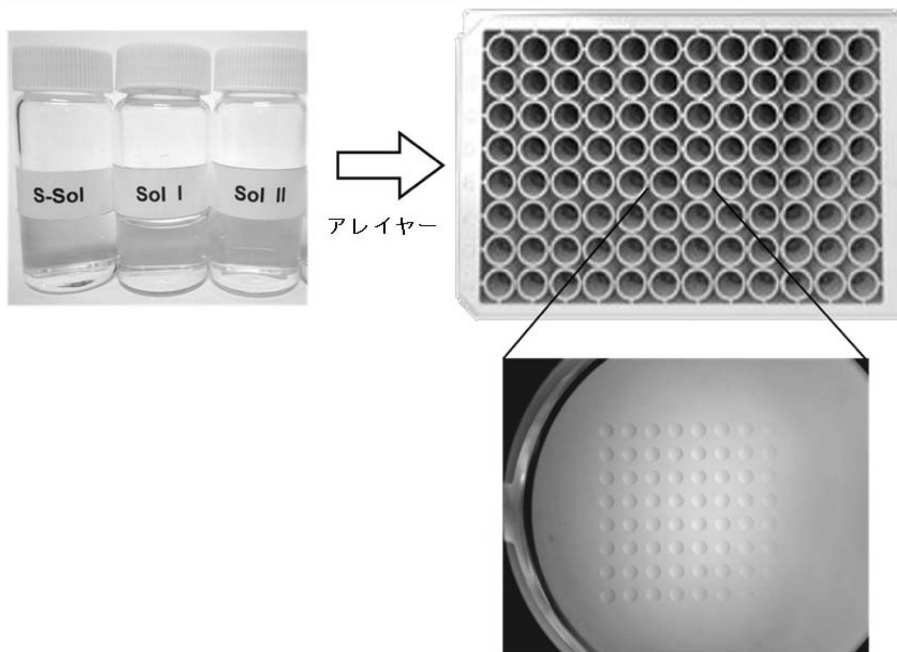
【0099】

以上、本発明の内容の特定の部分を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとっては、このような具体的な記術は単に望ましい実施様態であるだけであり、これによって本発明の範囲が制限されないことは明らかである。従って、本発明の実質的な範囲

50

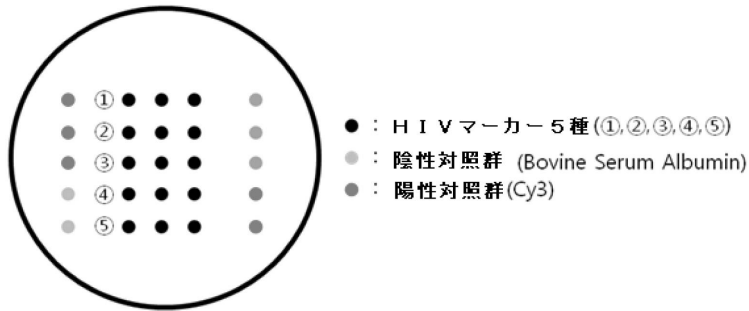
は添付された請求範囲及びその等価物によって定義される。

【図1】

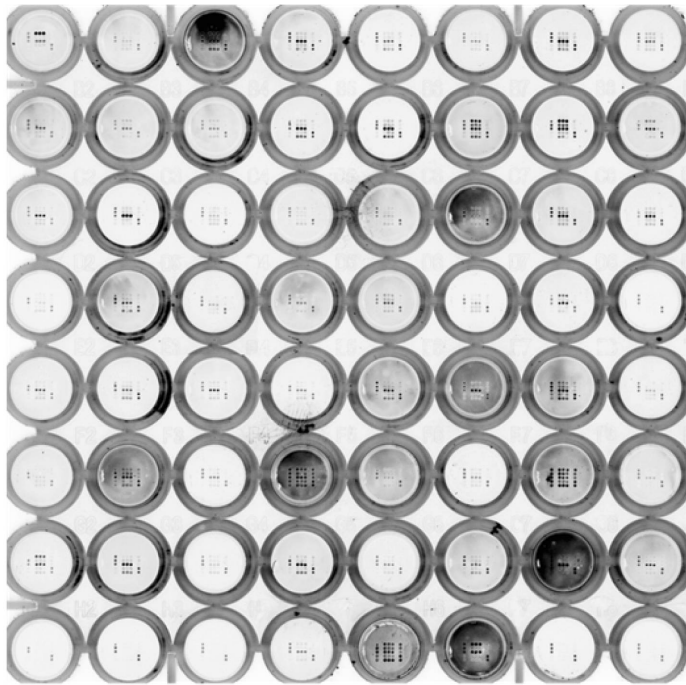


【 図 2 】

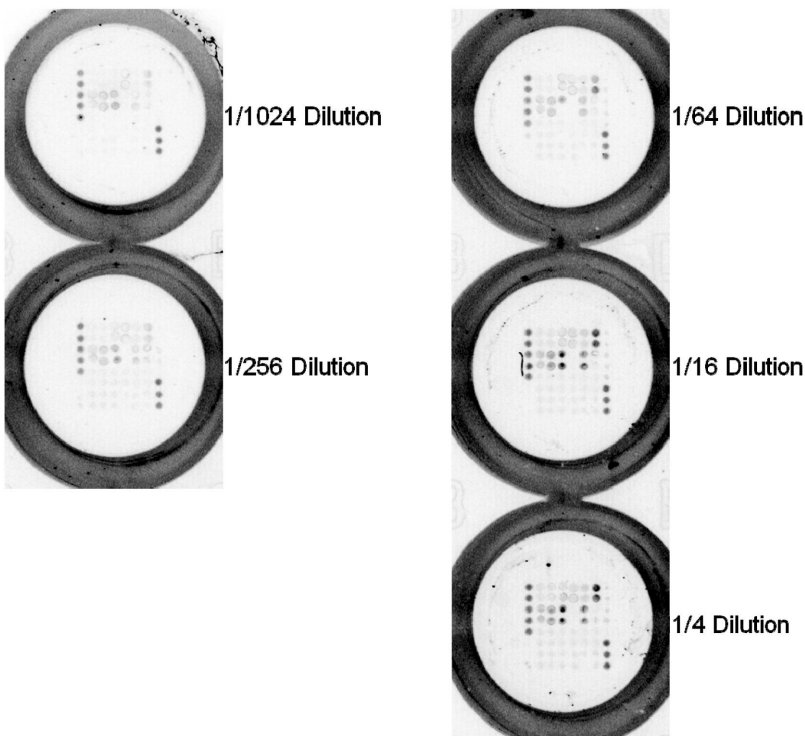
(A)



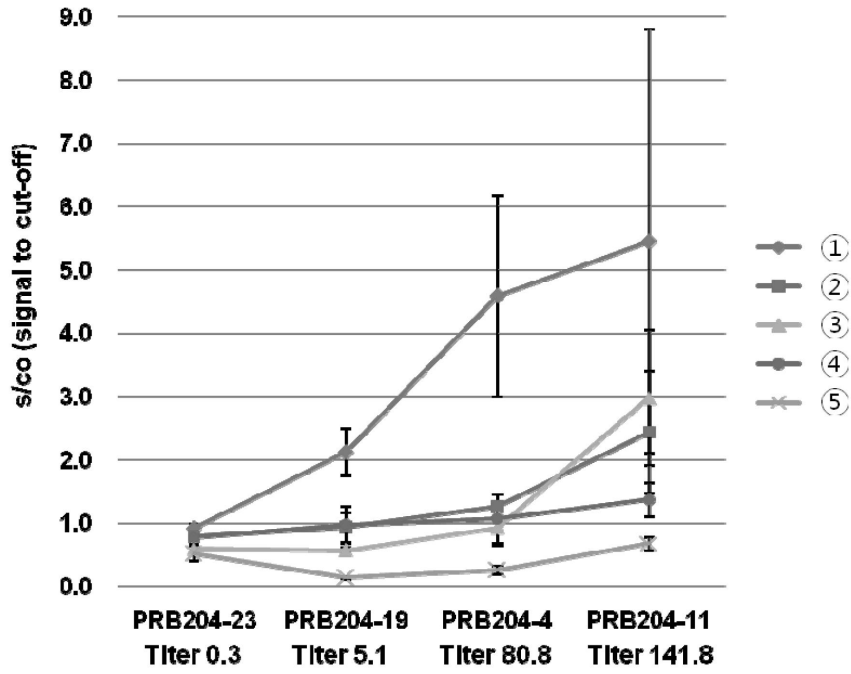
(B)



【 図 3 】



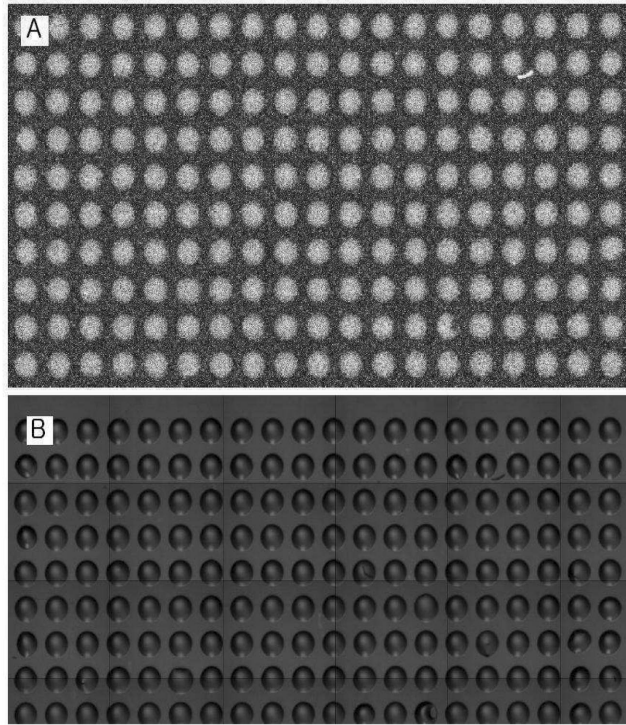
【 図 4 】



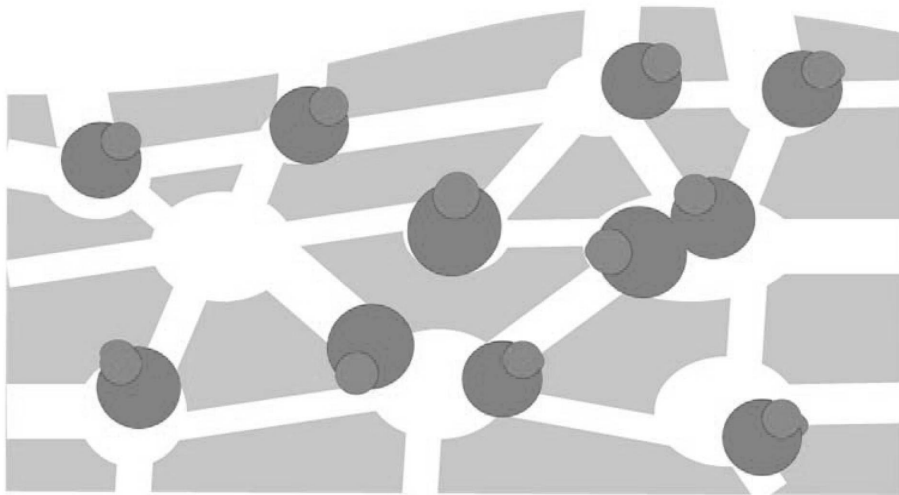
【 図 5 】

Standard sample		Anti-HIV test	US FDA licensed anti-HIV tests						HIV Ag (MAb)	Western blot
		PCL, Inc.	Abbott	CBC	CPI	Gen.Sys.	Org.Tek.	Syva	Abbott	Ortho
Member I.D.	Days Since 1st Bleed	Results	Results	Results	Results	Results	Results	Results	Results	Results
PRB922-01	0	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
PRB922-02	4	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
PRB922-03	7	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
PRB922-04	11	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS

【図6】

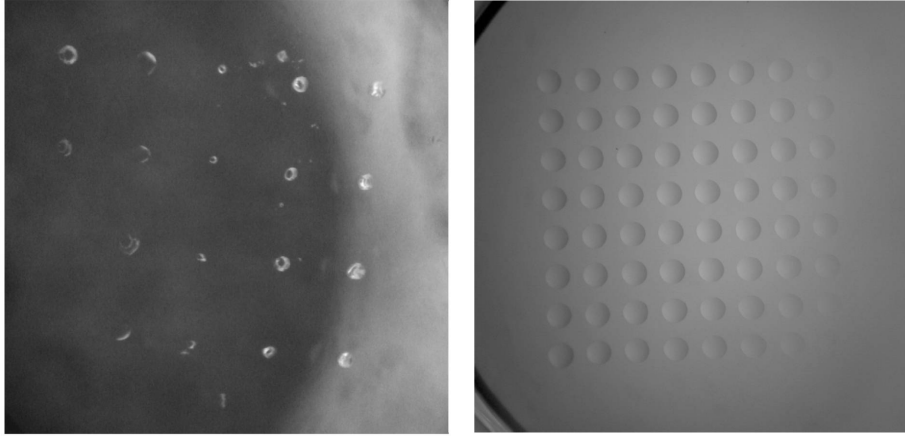


【図7】

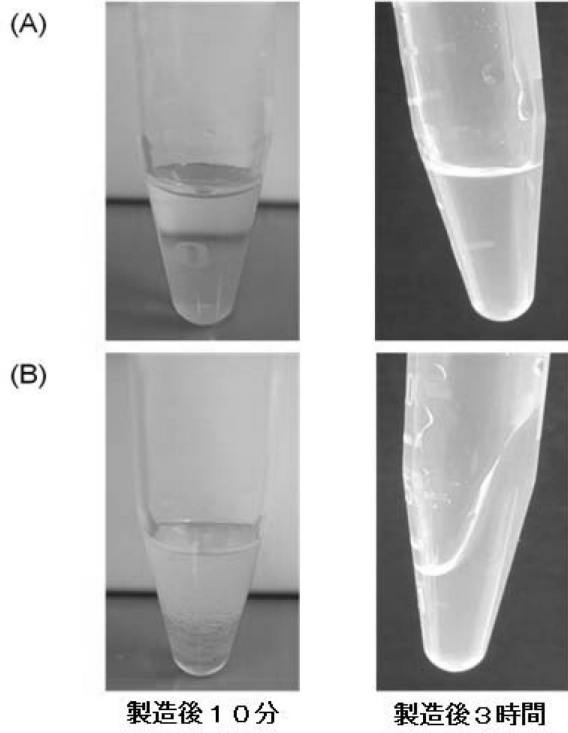


- カプセル化されたタンパク質
- 相互作用タンパク質または分析で添加された抗体

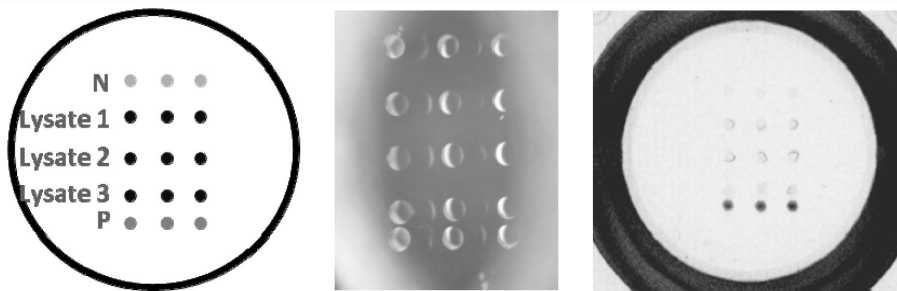
【 図 8 】



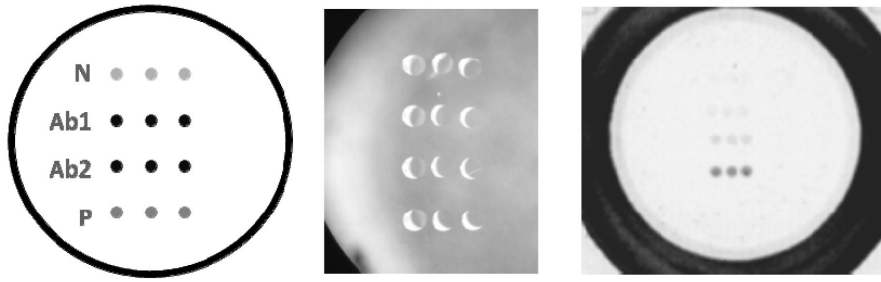
【 図 9 】



【 図 10 】

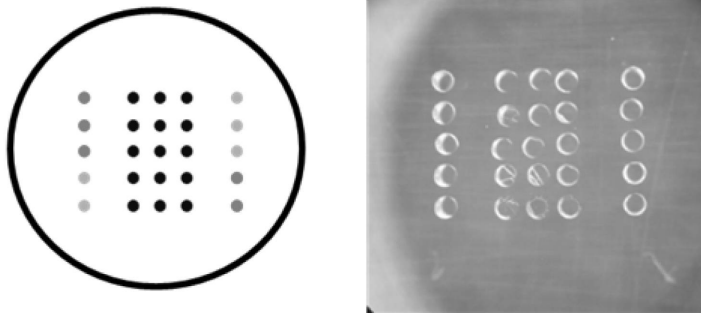


【図11】



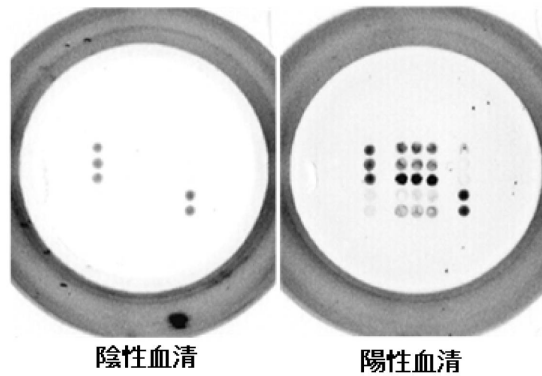
【図12】

1. ソルーゲルチップ準備

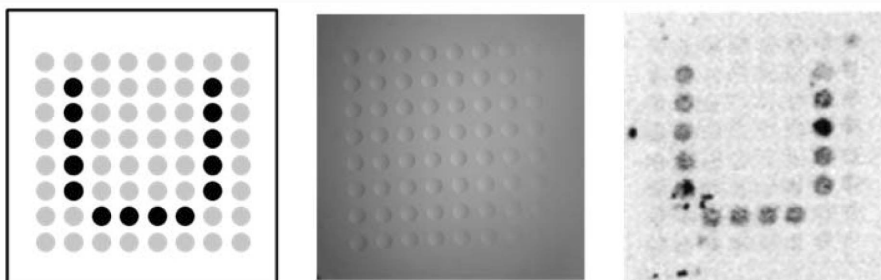


- : 特定疾病 (H I V) に対する 5 種類の抗原
- : 陰性対照群 (Bovine serum albumin protein)
- : 陽性対照群 (cy3)

2. H I V 1 に感染された患者の血清を利用してアッセイした結果



【図13】



- : ビスフェノール A
- : 陰性対照群 (バッファー溶液)

【図14】

結合アッセイ用溶液

# SoIB™ Complete Kit



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/531 B

(72)発明者 チョ ミンジョン  
大韓民国, 1 0 0 - 8 5 6 , ソウル, チュン - グ, チャンチュン - ドン 2 - ガ, 1 9 3 - 4 6 7  
, 4 0 2 ホ

(72)発明者 イ セラム  
大韓民国, 1 3 4 - 0 6 2 , ソウル, カンドン - グ, トウンチョン 2 - ドン, プラザ アパート  
メント, 2 - 2 0 7

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開2005-077153(JP,A)  
特表2009-524819(JP,A)  
特開2007-163163(JP,A)  
特表2005-529309(JP,A)  
特表2005-539215(JP,A)  
特表2006-507498(JP,A)  
米国特許出願公開第2003/0017560(US,A1)  
米国特許出願公開第2005/0053954(US,A1)  
米国特許出願公開第2009/0088329(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 5 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 1  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 4  
G 0 1 N 3 7 / 0 0