(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월07일
(11) 등록번호 10-1272447
(24) 등록일자 2013년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/00* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7015412
(22) 출원일자(국제) 2005년11월29일
심사청구일자 2010년11월12일
(85) 번역문제출일자 2007년07월05일
(65) 공개번호 10-2007-0092724
(43) 공개일자 2007년09월13일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2005/021922
(87) 국제공개번호 WO 2006/062009
국제공개일자 2006년06월15일
(30) 우선권주장
JP-P-2004-00357224 2004년12월09일 일본(JP)
JP-P-2005-00184136 2005년06월23일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
Fixe, F. et al, Nucleic Acids Research, 2004, January 12, Vol. 32, No. 1, e9
전체 청구항 수 : 총 24 항

(73) 특허권자
스미토모 베이클라이트 가부시키가이샤
일본 도쿄도 시나가와쿠 히가시시나가와 2쵸메 5반 8고
기노시타 겐지
일본국 효고 고베시 니시쿠 미카타다이 1쵸메 3반치 7105고
가부시키가이샤 디엔에이 칩 겐큐쇼
일본국 가나가와 요코하마시 쯔루미쿠 스에히로쵸 1-1-43
(72) 발명자
기노시타 겐지
일본국 효고 고베시 니시쿠 미카타다이 1쵸메 3반치 7105고
(74) 대리인
서종완

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **ＤＮＡ 사슬 신장방법, ＤＮＡ 사슬 증폭방법 및 ＤＮＡ사슬 신장용 마이크로어레이**

(57) 요 약

인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 활성 에스테르기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 기판에 DNA 신장용 프라이머를 고정화시키고, 목적으로 하는 서열을 갖는 주형 DNA 단편 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된 반응계를, DNA 사슬을 열변성하는 온도까지 끌어올리고, 상기 반응계의 온도를 어닐링 처리하는 온도까지 내려서, 상기 반응계에서 DNA 사슬의 신장반응을 행한다.

특허청구의 범위

청구항 1

인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자구인성 치환기가 카르보닐기에 결합되어 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 플라스틱 기판 또는 유리 기판에 DNA 신장용 프라이머를 고정화시키고,

목적으로 하는 서열을 갖는 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편, DNA 사슬 신장용 효소계, 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된 반응계를, DNA 사슬을 열변성하는 온도(이하, 「열변성 처리온도」라고 한다)까지 끌어올리고,

상기 반응계의 온도를 어닐링 처리하는 온도(이하, 「어닐링 처리온도」라고 한다)까지 내려서,

상기 반응계에서 DNA 사슬의 신장반응을 행하고,

전체 처리를 동일한 액상계에서 행하는 것을 포함하며,

상기 고분자물질이, 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린-n-부틸메타크릴레이트-p-니트로페닐옥시카르보닐폴리에틸렌글리콜 메타크릴레이트 공중합체인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 반응계에서 어닐링 처리하여 DNA 사슬의 신장반응을 행할 때까지 세정 처리가 개재되지 않는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 주형이 DNA 단편인 경우에, 상기 DNA 사슬 신장용 효소계는, DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 주형이 RNA 단편인 경우에, 상기 DNA 사슬 신장용 효소계는, 역전사효소, 또는 DNA 리가아제 및 역전사효소의 조합 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 DNA 사슬 신장반응은 상기 반응계의 온도를 상기 어닐링 처리온도에서 상기 열변성 처리온도까지 서서히 상승시켜서 행해지는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 DNA 사슬 신장반응은 상기 반응계의 온도를 상기 어닐링 처리온도와 상기 열변성 처리온도 사이의 소정의 온도로 변화시켜서 행해지는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 프라이머는 소정의 표적 유전자의 특징서열을 포함하는 염기서열의 1염기를 다른 염기로 치환한 DNA 단편인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 프라이머는 소정 수의 염기서열로 되는 DNA 단편인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 주형 DNA 단편은 소정의 RNA를 역전사효소로 처리하여 얻어지는 cDNA 단편인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 반응계에 도입되는 시료에 포함되는 뉴클레오티드 모노머의 일종 이상이 라벨된 것인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 프라이머가 상기 기판의 카르복실산 유도기의 부위에서 공유 결합하여, 해당 기판의 표면에 고정화되는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 기판은 상기 고분자물질에 더하여, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 포함하는 제1 단위와, 부틸메타크릴레이트기를 포함하는 제3 단위를 갖는 제2 고분자물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 기판이 플라스틱 재료로 되는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장방법.

청구항 16

인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자구인성 치환기가 카르보닐기에 결합되어 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 플라스틱 기판 또는 유리 기판에 DNA 증폭용 프라이머를 고정화시키고,

목적으로 하는 서열을 갖는 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편, DNA 사슬 신장용 효소계, 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된 반응계를, DNA 사슬을 열변성하는 온도(이하, 「열변성 처리온도」라고 한다)까지 끌어올리고,

상기 반응계의 온도를 어닐링 처리하는 온도(이하, 「어닐링 처리온도」라고 한다)까지 내려서,

상기 반응계에서 DNA 사슬의 신장반응을 행하고,

DNA 사슬의 열변성 처리를 행하며,

또한 DNA 사슬의 어닐링 처리, 신장반응 및 열변성 처리를 행하고,

전체 처리를 동일한 액상계에서 행하는 것을 포함하며,

상기 고분자물질이, 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린-n-부틸메타크릴레이트-p-니트로페닐옥시카르보닐폴리에틸렌글리콜 메타크릴레이트 공중합체인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 증폭방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 반응계에서 어닐링 처리하여 DNA 사슬의 신장반응을 행할 때까지 세정 처리가 개재되지 않는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 증폭방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 주형이 DNA 단편인 경우에, 상기 DNA 사슬 신장용 효소계는 DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 증폭방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 주형이 RNA 단편인 경우에, 상기 DNA 사슬 신장용 효소계는 역전사효소, 또는 DNA 리가

아제 및 역전사효소의 조합 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 증폭방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자구인성 치환기가 카르보닐기에 결합되어 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 플라스틱 기판 또는 유리 기판과,

상기 플라스틱 기판 또는 유리 기판의 표면에 고정화된 DNA 증폭용 프라이머를 포함하며,

상기 고분자물질이, 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린-n-부틸메타크릴레이트-p-니트로페닐옥시카르보닐폴리에틸렌글리콜 메타크릴레이트 공중합체인 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이.

청구항 22

삭제

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 기판이 플라스틱 재료로 되는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 프라이머는 5~50개의 염기서열로 되는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 프라이머가 상기 기판의 카르복실산 유도기의 부위에서 공유 결합하여, 해당 기판의 표면에 고정화되는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 기판의 고분자물질이 부틸메타크릴레이트기를 포함하는 제3 단위를 갖는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이.

청구항 27

제21항 또는 제26항에 있어서, 상기 기판은 상기 고분자물질에 더하여, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 포함하는 제1 단위와, 부틸메타크릴레이트기를 포함하는 제3 단위를 갖는 제2 고분자물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이.

청구항 28

제21항에 있어서, 상기 기판에는 일정 구획 내에 복수의 스포트가 설치되어 있고, 각 스포트에 프라이머가 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 프라이머 DNA 사슬을 소정의 플라스틱 기판 표면에 고정화하여 DNA 사슬을 신장하는 DNA 사슬 신장방법, DNA 사슬 증폭방법 및 이들 방법에 사용되는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비특허문헌 1에는 소정의 아미노-실란 시약을 사용하여 수식된 유리기판의 표면에, 프라이머가 되는 DNA 사슬을 공유 결합시킨 DNA 마이크로어레이로 고상 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 의한 DNA 증폭을 행하는 기술이

개시되어 있다.

[0003] 또한, 비특허문헌 2에는, 유리기판 대신에 폴리(메틸메타크릴레이트)를 사용하고, 표면에 DNA 단편을 고정화시킨 DNA 마이크로어레이를 사용하여, 소정의 DNA 사슬과의 하이브리드 특성 및 PCR 유사 환경하에 있어서의 열안정성이 평가되어 있어, 신규한 PCR 기술에 적용할 수 있는 디바이스의 가능성을 시사하는 기재가 되어 있다.

[0004] 비특허문헌 1 : Adessi, Celine et al, "Solid phase DNA amplification: Characterisation of primer attachment and amplification mechanisms", Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 20, No. 20, e87

[0005] 비특허문헌 2 : Fixe, F. et al, "Functionalization of poly(methyl methacrylate)(PMMA) as a substrate for DNA microarrays", Nucleic Acids Research, 2004, January 12, Vol. 32, No. 1, e9

발명의 상세한 설명

[0006] 발명의 개시

[0007] 본 발명자 등은 비특허문헌 1, 2 등으로 대표되는 각종 DNA 마이크로어레이를 사용하여 MPEC법(Multiple Primer Extension on a Chip)에 의한 DNA 사슬 신장반응을 행한 바, 프라이머에 주형 DNA 사슬을 결합시켜서, 즉 어닐링 처리하여 DNA 사슬을 신장시킨 후에, 열변성 처리를 행하면 주형 DNA와 함께 DNA 마이크로어레이 기판에 고정한 프라이머가 탈락된다고 하는 현상을 발견하고, 표면에 소정의 고분자물질을 배치한 기판을 사용함으로써 이 문제를 해결하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0008] 본 발명의 DNA 사슬 신장방법은, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자구인성 치환기가 카르보닐기에 결합해서 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 기판에 DNA 신장용 프라이머를 고정화시키고,

[0009] 목적으로 하는 서열을 갖는 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편, DNA 사슬 신장용 효소계, 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된 반응계를, DNA 사슬을 열변성하는 온도(이하, 「열변성 처리온도」라고 한다)까지 끌어올리고,

[0010] 상기 반응계의 온도를 어닐링 처리하는 온도(이하, 「어닐링 처리온도」라고 한다)까지 내려서,

[0011] 상기 반응계에서 DNA 사슬의 신장반응을 행하고,

[0012] 전체 처리를 동일한 액상계에서 행하는 것을 특징으로 하고 있다.

[0013] 이와 같이, 소정의 기판에 프라이머를 고정화시키고, 이 프라이머에 주형 DNA 단편을 어닐링 시키거나, 또는 주형 RNA 단편을 하이브리다이즈시켜서 DNA 사슬 신장반응을 행하면, 반응 후의 열변성 처리로 기판 상에서 이중가닥(double strand)으로 되어 있는 DNA로부터 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편이 떨어져, 프라이머로부터 신장된 단일 가닥(single strand) DNA가 기판 상에서 남게 된다.

[0014] 또한, 종래에서는 어닐링 처리한 후 신장반응 전에, 이중 가닥을 꼬지 않은 DNA 단편 또는 RNA 단편을 제거하기 위한 세정 처리가 필요하였지만, 기판 상에 비특이적으로 흡착되는 DNA 단편 또는 RNA 단편이 없기 때문에, 또한 이것에 의해 DNA 사슬 신장에 관련된 효소반응이 유효하게 행해지는 것으로 추측되어, 신장반응 전에 기판의 세정 처리가 불필요해진다.

[0015] 또한, 종래에 있어서, 하이브리다이제이션, 세정, 효소 및 모노머 첨가 신장의 각 처리를 행하고 있던 바와 같이, 하이브리다이제이션과 신장반응을 각각의 액상에서 행하고 있던 것을, 본 발명에 있어서는 하이브리다이제이션과 신장반응을 동일한 액상에서 행하는 것이 가능해진다.

[0016] 이 DNA 사슬 신장방법에 있어서, 기판의 제1 단위에 포함되는 인산 에스테르로부터 유도되는 기는, 포스포릴콜린기, 포스포릴에탄올아민기, 포스포릴세린기, 포스포릴이노시톨기, 포스포릴글리세롤기, 포스파티딜포스포릴글리세롤기 중 어느 하나로 할 수 있다.

[0017] 이와 같이, 기판의 표면에 인지질과 동일한 환경을 마련함으로써, 기판 표면에서 일어나는 DNA 사슬 신장반응이 세포 내와 동등한 환경하에서 행하는 것이 가능해진다. 따라서, DNA 사슬 신장을 보다 온화한 조건에서 행하는 것이 가능해진다.

[0018] 상기 DNA 사슬 신장방법에 있어서,

[0019] 상기 프라이머는 소정의 표적 유전자(target gene)의 특징서열을 포함하는 염기서열의 1염기를 다른 염기로 치

환한 DNA 단편이어도 된다.

[0020] 이것에 의해, 본 발명의 DNA 사슬 신장방법을, 1염기 치환 다형(SNP: single nucleotide polymorphisms) 해석에 적용할 수 있게 된다.

[0021] 또한, 상기 DNA 사슬 신장방법에 있어서,

[0022] 상기 프라이머는 소정 수의 염기서열로 되고, 각각의 프라이머는 전체 조합의 각각의 서열을 갖는 DNA 단편이어도 된다.

[0023] 이것에 의해, 본 발명의 DNA 사슬 신장반응을 하이브리다이제이션에 의한 염기서열 결정(SBH: sequencing by hybridizaiton) 해석에 적용할 수 있게 된다.

[0024] 또한, 상기 DNA 사슬 신장방법에 있어서,

[0025] 상기 주형 DNA 단편은 소정의 RNA를 역전사효소로 처리하여 얻어지는 cDNA 단편이어도 된다.

[0026] 이것에 의해, 본 발명의 DNA 사슬 신장반응을 유전자 발현 프로파일(gene expression profile) 해석에 적용하여, 통상의 해석에 있어서 수고와 시간이 소요되는 샘플 조제를 거의 행하지 않고, 게놈 DNA 또는 전체 RNA로부터의 역전사산물 cDNA를 주형 DNA 단편으로서 사용하여 간편한 조작으로 행할 수 있게 된다.

[0027] 또한, 본 발명의 DNA 사슬 증폭방법은, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자구인성 치환기가 카르보닐기에 결합해서 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 기판에 DNA 증폭용 프라이머를 고정화시키고,

[0028] 목적으로 하는 서열을 갖는 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편, DNA 사슬 신장용 효소계, 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된 반응계를, DNA 사슬을 열변성하는 온도(이하, 「열변성 처리온도」라고 한다)까지 끌어올리고,

[0029] 상기 반응계의 온도를 어닐링 처리하는 온도(이하, 「어닐링 처리온도」라고 한다)까지 내려서,

[0030] 상기 반응계에서 DNA 사슬의 신장반응을 행하고,

[0031] DNA 사슬의 열변성 처리를 행하며,

[0032] 또한 필요에 따라 DNA 사슬의 어닐링 처리, 신장반응 및 열변성 처리를 행하고,

[0033] 전체 처리를 동일한 액상계에서 행하는 것을 특징으로 하고 있다.

[0034] 이와 같이, 소정의 기판에 프라이머를 고정화시키고, 이 프라이머에 주형 DNA 단편을 어닐링시키거나, 또는 주형 RNA 단편을 하이브리다이즈시켜서, DNA 사슬 신장반응을 행하면, 반응 후의 열변성 처리로 기판 상에서 이중 가닥으로 되어 있는 DNA로부터 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편이 떨어져, 프라이머로부터 신장된 단일 가닥 DNA가 기판 상에서 남게 되어, 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편은 다음의 어닐링 처리로 미반응의 프라이머와 이중 가닥을 형성하고, 다음의 DNA 사슬 신장을 행한다. 이것을 반복함으로써, MPEC법에 의한 DNA 사슬 증폭반응을 행할 수 있게 된다.

[0035] 또한, 종래에서는 어닐링 처리한 후 신장반응 전에, 이중 가닥을 꼬지 않은 DNA 단편 또는 RNA 단편을 제거하기 위한 세정 처리가 필요하였지만, 기판 상에 비특이적으로 흡착되는 DNA 단편 또는 RNA 단편이 없기 때문에, 또한 이것에 의해 DNA 사슬 신장에 관련된 효소반응이 유효하게 행해지는 것으로 추측되어, 신장반응 전에 기판의 세정 처리가 불필요해진다.

[0036] 또한, 종래에 있어서, 하이브리다이제이션, 세정, 효소 및 모노머 첨가 신장의 각 처리를 행하고 있던 바와 같이, 하이브리다이제이션과 신장반응을 각각의 액상에서 행하고 있던 것을, 본 발명에 있어서는 하이브리다이제이션과 신장반응을 동일한 액상에서 행하는 것이 가능해진다.

[0037] 이 DNA 사슬 증폭방법에 있어서, 기판의 제1 단위에 포함되는 인산 에스테르로부터 유도되는 기는, 포스포릴콜린기, 포스포릴에탄올아민기, 포스포릴세린기, 포스포릴이노시톨기, 포스포릴글리세롤기, 포스파티딜포스포릴글리세롤기 중 어느 하나로 할 수 있다.

[0038] 이와 같이, 기판의 표면에 인지질과 동일한 환경을 마련함으로써, 기판 표면에서 일어나는 DNA 사슬 증폭반응이 세포 내와 동등한 환경하에서 행하는 것이 가능해진다. 따라서, DNA 사슬 증폭을 보다 온화한 조건에서 행하는 것이 가능해진다.

[0039] 또한, 본 발명의 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이는, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자구인성 치환기가 카르보닐기에 결합해서 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 기판과,

[0040] 상기 기판의 표면에 고정화된 DNA 증폭용 프라이머를 포함하는 것이다.

[0041] 이와 같이, 소정의 기판에 프라이머를 고정화시키고, 이 프라이머에 주형 DNA 단편을 어닐링시키거나, 또는 주형 RNA 단편을 하이브리다이즈시켜서, DNA 사슬 신장반응을 행하면, 반응 후의 열변성 처리로 기판 상에서 이중 가닥으로 되어 있는 DNA로부터 주형 DNA 단편 또는 RNA 단편이 떨어져, 프라이머로부터 신장된 단일 가닥 DNA가 기판 상에서 남게 된다.

[0042] 또한, 종래에서는 어닐링 처리한 후 신장반응 전에, 이중 가닥을 꼬지 않은 DNA 단편 또는 RNA 단편을 제거하기 위한 세정 처리가 필요하였지만, 기판 상에 비특이적으로 흡착되는 DNA 단편 또는 RNA 단편이 없기 때문에, 또한 이것에 의해 DNA 사슬 신장에 관련된 효소반응이 유효하게 행해지는 것으로 추측되어, 신장반응 전에 기판의 세정 처리가 불필요해진다.

[0043] 또한, 종래에 있어서, 하이브리다이제이션, 세정, 효소 및 모노머 첨가 신장의 각 처리를 행하고 있던 바와 같이, 하이브리다이제이션과 신장반응을 각각의 액상에서 행하고 있던 것을, 본 발명에 있어서는 하이브리다이제이션과 신장반응을 동일한 액상에서 행하는 것이 가능해진다.

[0044] 이 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이에 있어서, 기판의 제1 단위에 포함되는 인산 에스테르로부터 유도되는 기는, 포스포릴콜린기, 포스포릴에탄올아민기, 포스포릴세린기, 포스포릴이노시톨기, 포스포릴글리세롤기, 포스파티딜포스포릴글리세롤기 중 어느 하나로 할 수 있다.

[0045] 이와 같이, 기판의 표면에 인지질과 동일한 환경을 마련함으로써, 기판 표면에서 일어나는 DNA 사슬 신장반응이 세포 내와 동등한 환경하에서 행하는 것이 가능해지는 동시에, 세정 처리가 불필요한 것에도 기여한다. 따라서, DNA 사슬 신장을 보다 온화한 조건에서 행하는 것이 가능해진다.

[0046] 본 발명에 의하면, DNA 마이크로어레이 상에서 DNA 사슬의 신장반응을 행하여 이중 가닥으로 한 후에, 열변성 처리로 DNA 마이크로어레이의 기판 상에서 단일 가닥 DNA를 남길 수 있게 된다.

[0047] 도면의 간단한 설명

[0048] 전술한 목적, 그 밖의 목적, 특징 및 이점은, 이하에 기술하는 적합한 실시의 형태, 및 그에 부수되는 이하의 도면에 의해 더욱 명확해진다.

[0049] 도 1은 본 발명의 제1 실시형태의 DNA 사슬 증폭방법을 나타내는 플로차트이다.

[0050] 도 2는 제1 실시형태에서 사용하는 DNA 마이크로어레이의 일부를 모식적으로 나타내는 도면이다.

[0051] 도 3은 DNA 마이크로어레이의 프라이머에 주형 DNA를 어닐링시킨 상태를 나타내는 도면이다.

[0052] 도 4는 프라이머 상에서 DNA 사슬의 신장반응을 행한 상태를 나타내는 도면이다.

[0053] 도 5는 신장반응 후 얻어진 이중 가닥을 변성한 상태를 나타내는 도면이다.

[0054] 도 6은 본 발명의 제2 실시형태의 DNA 사슬 신장방법을 나타내는 플로차트이다.

[0055] 도 7은 제2 실시형태의 일적용예를 나타내는 도면이다.

[0056] 도 8은 종래의 유전자 발현 프로파일 해석의 일례를 나타내는 도면이다.

[0057] 도 9는 제2 실시형태의 기타 일적용예를 나타내는 도면이다.

[0058] 도 10은 제2 실시형태의 기타 일적용예를 나타내는 도면이다.

[0059] 발명을 실시하기 위한 최선의 형태

[0060] 이하, 본 발명의 실시형태에 대해서 상세하게 설명한다.

[0061] (제1 실시형태)

[0062] 도 1은 제1 실시형태로서의 DNA 사슬 증폭방법의 순서를 나타내는 플로차트이다.

[0063] 이 DNA 사슬 증폭방법은 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자

구인성 치환기가 카르보닐기에 결합해서 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 기판에 DNA 증폭용 프라이머(이하, 「프라이머」라고 한다)를 고정화시키고(스텝 S10), 목적으로 하는 서열을 갖는 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편, DNA 사슬 신장용 효소계, 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된 반응계를, DNA 사슬을 열변성하는 온도(이하, 「열변성 처리온도」라고 한다)까지 끌어올리고(스텝 S30), 이 반응계의 온도를 어닐링 처리하는 온도(이하, 「어닐링 처리온도」라고 한다)까지 내려서(스텝 S40), 해당 반응계에서 DNA 사슬의 신장반응을 행하고(스텝 S50), DNA 사슬의 열변성 처리를 행하여(스텝 S60), 필요에 따라 DNA 사슬의 어닐링 처리, 신장반응 및 열변성 처리를 행하는(스텝 S40~스텝 S60의 반복) 것이다. 또한, 이들 각 처리를 동일한 액상계에서 행한다.

[0064] 스텝 S10에서는 도 2에 나타낸 바와 같이, 기판(12)의 표면에 DNA 증폭용 프라이머(14)를 고정시킨다.

[0065] 여기에서 사용되는 기판의 표면에는, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질이 존재하도록 되어 있다.

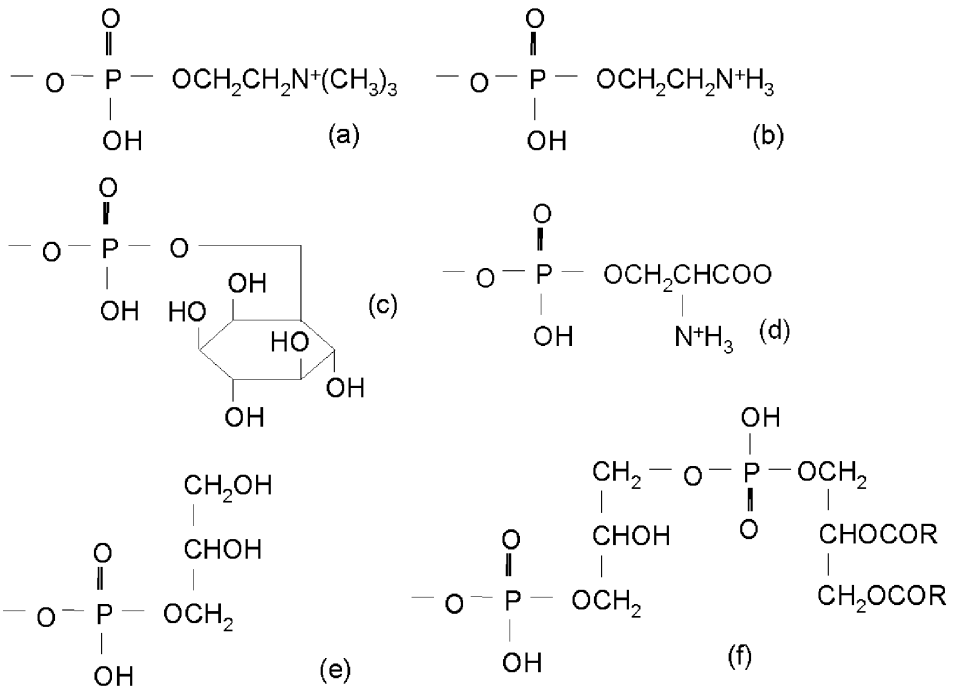
[0066] 이 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 포함하는 제1 단위와 카르복실산 유도기를 포함하는 제2 단위를 갖는 고분자물질은, DNA 사슬의 비특이적 흡착을 억제하는 성질과 DNA 사슬을 고정화하는 성질을 함께 갖는 폴리머이다. 특히, 제1 단위에 포함되는 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기는 주형 DNA 단편의 비특이적 흡착을 억제하는 역할을 하고, 제2 단위에 포함되는 카르복실산 유도기는 프라이머를 화학적으로 고정화하는 역할을 한다. 즉, 프라이머는 이 고분자물질로 되는 코팅층의 카르복실산 유도기의 부위에서 공유 결합하여, 해당 기판의 표면에 고정화된다.

[0067] 제1 단위는 예를 들면 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린기, 6-메타크릴로일옥시헥실포스포릴콜린기 등의 (메타)아크릴로일옥시알킬포스포릴콜린기; 2-메타크릴로일옥시에톡시에틸포스포릴콜린기 및 10-메타크릴로일옥시에톡시노닐포스포릴콜린기 등의 (메타)아크릴로일옥시알콕시알킬포스포릴콜린기; 알릴포스포릴콜린기, 부테닐포스포릴콜린기, 헥세닐포스포릴콜린기, 옥테닐포스포릴콜린기, 및 데세닐포스포릴콜린기 등의 알케닐포스포릴콜린기; 등의 기를 가져, 포스포릴콜린기가 이들 기 중에 포함되어 있는 구성으로 할 수 있다.

[0068] 또한, 이들 기 중, 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린이 바람직하다. 제1 단위가 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린을 갖는 구성으로 함으로써, 기판 표면에 있어서의 주형 DNA 단편의 비특이적 흡착을 보다 한층 확실하게 억제할 수 있다.

[0069] 또한, 여기에서는 기본 골격으로서 하기 화학식 a에 나타내는 포스포릴콜린기인 예를 들었지만, 이 포스포릴콜린기를 하기 화학식 b의 포스포릴에탄올아민기, 하기 화학식 c의 포스포릴이노시톨기, 하기 화학식 d의 포스포릴세린기, 하기 화학식 e의 포스포릴글리세롤기, 하기 화학식 f에 나타낸 포스파티딜포스포릴글리세롤기 등의 인산기로 치환해도 된다(이하에 대해서도 동일).

[0070] [화학식 a~f]



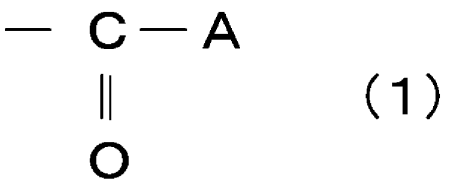
[0071]

[0072] 카르복실산 유도체는 카르복실산의 카르복실기가 활성화된 것으로, C=O를 매개로 이탈기를 갖는 카르복실산이다. 카르복실산 유도체는 구체적으로는, 알콕실기 보다도 전자구인성이 높은 기가 카르보닐기에 결합하여 구핵반응이 활성화된 화합물이다. 카르복실산 유도기는 아미노기, 티올기, 수산기 등에 대한 반응성을 갖는 화합물이다.

[0073] 카르복실산 유도체로서 더욱 구체적으로는, 카르복실산인 아크릴산, 메타크릴산, 크로톤산, 말레산, 푸마르산 등의 카르복실기가 산무수물, 산할로겐화물, 활성 에스테르, 활성화 아미드로 변환된 화합물을 들 수 있다. 카르복실산 유도기는 이러한 화합물에 유래하는 활성화된 기로, 예를 들면 p-니트로페닐기나 N-히드록시숙신이미드기 등의 활성 에스테르기; -Cl, -F 등의 할로겐; 등의 기를 가질 수 있다.

[0074] 또한, 카르복실산 유도기는 하기 화학식 1에 나타내어지는 기로 할 수 있다.

화학식 1

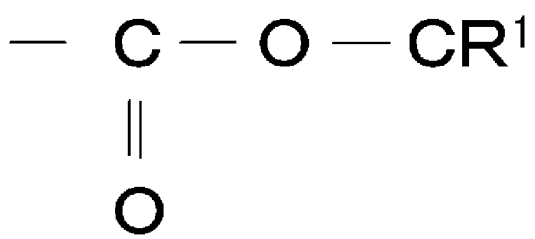


[0075]

[0076] (단, 상기 화학식 1에 있어서, A는 수산기를 제외한 이탈기이다.)

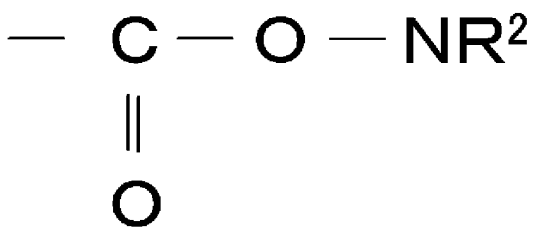
[0077] 상기 화학식 1에 나타내어지는 1가의 기는, 예를 들면 하기 화학식 p 또는 화학식 q로부터 선택되는 어느 하나의 기로 할 수 있다.

화학식 p



[0078]

화학식 q



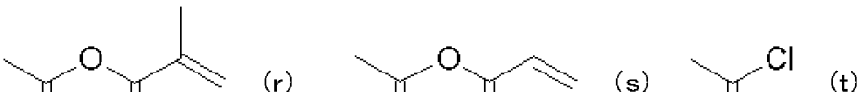
[0079]

[0080] (단, 상기 화학식 p 및 화학식 q에 있어서, R^1 및 R^2는 각각 독립하여 1가의 유기기이며, 직쇄상, 분지상, 및 환상 중 어느 것이어도 된다. 또한, 상기 화학식 p에 있어서, R^1은 C와 함께 고리를 형성하는 2가의 기여도 된다. 또한, 상기 화학식 q에 있어서, R^2는 N과 함께 고리를 형성하는 2가의 기여도 된다.)

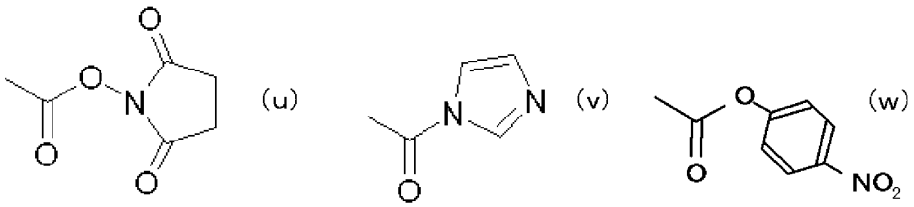
[0081] 상기 화학식 p에 나타내어지는 기로서, 예를 들면 하기 화학식 r, s, 및 w에 나타내어지는 기를 들 수 있다. 또한, 상기 화학식 q에 나타내어지는 기로서, 예를 들면 하기 화학식 u에 나타내어지는 기를 들 수 있다.

[0082] 상기 화학식 1에 나타내어지는 기는, 예를 들면 하기 화학식 r, 화학식 s 등에 나타내어지는 산무수물 유래의 기; 하기 화학식 t에 나타내어지는 산할로겐화물 유래의 기; 하기 화학식 u, 화학식 w에 나타내어지는 활성 에스테르 유래의 기; 또는 하기 화학식 v에 나타내어지는 활성화 아미드 유래의 기로 할 수 있다.

[0083] [화학식 r~w]



(r) (s) (t)



(u) (v) (w)

[0084]

[0085] 카르복실산 유도기 중 활성 에스테르기는, 온화한 조건에 있어서의 반응성이 우수하기 때문에, 바람직하게 사용된다. 온화한 조건으로서는, 예를 들면 중성 또는 알칼리성의 조건, 구체적으로는 pH 7.0 이상 10.0 이하, 보다 구체적으로는 pH 7.6 이상 9.0 이하, 더욱 구체적으로는 pH 8.0으로 할 수 있다.

[0086] 또한, 본 명세서에 있어서 규정하는 바의 「활성 에스테르기」는, 그 정의에 대해서 엄밀한 규정은 이루어져 있지 않지만, 관용의 기술표현으로서는 에스테르기의 알코올측에 산성도가 높은 전자구인성기를 가져서 구핵반응을 활성화하는 에스테르군, 즉 반응활성이 높은 에스테르기를 의미하는 것으로서, 각종 화학합성, 예를 들면 고분자화학, 펩티드합성 등의 분야에서 관용되고 있는 것이다. 또한, 펩티드합성의 분야에 있어서는, 이즈미야 노부오, 가토 데쯔오, 아오야기 하루히코, 와키 미치노리저, 「펩티드합성의 기초와 실험」, 1985년 발행, 마루젠에 기재되어 있는 바와 같이, 활성 에스테르법은 아미노산 또는 펩티드의 C 말단을 활성화하는 방법의 하나로서 사용되고 있다.

[0087] 실제적으로는, 에스테르기의 알코올측에 전자구인성 기를 갖고, 알킬에스테르 보다도 활성화된 에스테르기이다. 활성 에스테르기는 아미노기, 티올기, 수산기 등의 기에 대한 반응성을 갖는다. 더욱 구체적으로는 페놀에스테르류, 티오페놀에스테르류, N-히드록시아민에스테르류, 시아노메틸에스테르, 복소환 히드록시화합물의 에스테르류 등이 알킬에스테르 등에 비해 훨씬 높은 활성을 갖는 활성 에스테르기로서 알려져 있다.

[0088] 여기에서는, 고분자물질 중의 활성화 카르복실산 유도체기가 활성 에스테르기인 경우를 예로서 설명한다. 활성 에스테르기로서는, 예를 들면 p-니트로페닐기, N-히드록시숙신이미드기, 숙신산이미드기, 프탈산이미드기, 5-노

르보르넨-2,3-디카르복시이미드기 등을 들 수 있지만, 예를 들면 p-니트로페닐기가 바람직하게 사용된다.

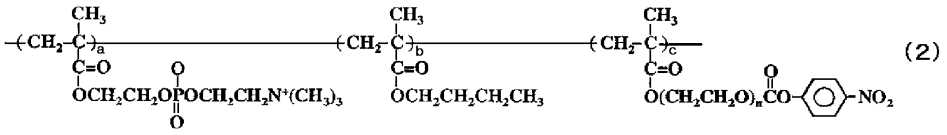
[0089] 표면에 프라이머가 고정화되는 기판의 경우, 제1 단위와 제2 단위의 더욱 구체적인 구성의 조합으로서, 예를 들면, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 포함하는 제1 단위가 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린기를 갖고, 활성 에스테르기가 p-니트로페닐기인 구성으로 할 수 있다.

[0090] 또한, 본 실시형태의 기판의 코팅층에 사용되는 고분자물질은, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기 및 카르복실산 유도기 이외에 다른 기를 포함해도 된다. 또한, 고분자물질은 공중합체로 할 수 있다. 구체적으로는, 고분자물질이 부틸메타크릴레이트기를 포함하는 공중합체인 것이 바람직하다. 이렇게 함으로써, 고분자물질을 적절히 소수화하여, 이 고분자물질의 기판 표면으로의 흡착성을 더욱 적합하게 확보할 수 있다.

[0091] 구체적으로는, 고분자물질을 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린(MPC)기를 갖는 제1 단량체와, p-니트로페닐옥시카르보닐폴리에틸렌글리콜 메타크릴레이트(NPMA)기를 갖는 제2 단량체 및 부틸메타크릴레이트(BMA)기를 갖는 제3 단량체와의 공중합체로 할 수 있다. 이들 공중합체인 poly(MPC-co-BMA-co-NPMA)(PMBN)은, 모식적으로 하기 화학식 2로 나타내어진다.

화학식 2

[0092]



(2)

2－메타크릴로일옥시에틸 포스포릴콜린(MPC)　　n－부틸 메타크릴레이트 (BMA)　　p－니트로페닐옥시카르보닐 폴리에틸렌글리콜 메타크릴레이트 (NPMA)

[0093] 단, 상기 화학식 2에 있어서, a, b, 및 c는 각각 독립하여 양의 정수이다. 또한, 상기 화학식 2에 있어서, 제1~제3 단량체가 블록 공중합되어 있어도 되고, 이들 단량체가 랜덤으로 공중합되어 있어도 된다.

[0094] 상기 화학식 2로 나타내어지는 공중합체는, 고분자물질의 적절한 소수화와, 주형 DNA 단편의 비특이 흡착을 억제하는 성질 및 프라이머를 고정화하는 성질과의 밸런스가 보다 한층 우수한 구성이다. 이 때문에, 이러한 공중합체를 사용함으로써, 기판 표면을 보다 한층 확실하게 고분자물질로 피복하는 동시에, 고분자물질이 코팅된 기판 상으로의 주형 DNA 단편의 비특이적 흡착을 억제하면서, 프라이머를 더욱 확실하게 공유 결합에 의해 고정화하여 기판 상으로 도입할 수 있다.

[0095] 또한, 상기 화학식 2로 나타내어지는 공중합체는 MPC, BMA 및 NPMA의 각 단량체를 혼합하고, 라디칼 중합 등의 공지의 중합방법에 의해 얻을 수 있다. 상기 화학식 2로 나타내어지는 공중합체를 라디칼 중합에 의해 제작하는 경우, 예를 들면, Ar 등의 불활성 가스 분위기에서 30℃ 이상 90℃ 이하의 온도조건으로 용액중합을 행할 수 있다.

[0096] 용액중합에 사용되는 용매는 적절히 선택되지만, 예를 들면, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 등의 알코올이나, 디에틸에테르 등의 에테르, 클로로포름 등의 유기 용매를 단독으로 또는 복수 혼합해서 사용할 수 있다. 구체적으로는, 디에틸에테르와 클로로포름을 체적비로 8:2로 한 혼합용매로 할 수 있다.

[0097] 또한, 라디칼 중합반응에 사용되는 라디칼 중합개시제로서는, 통상 사용되는 것을 사용할 수 있다. 예를 들면, 아조비스이소부티로니트릴(AIBN), 아조비스발레로니트릴 등의 아조계 개시제; 과산화라우로일, 과산화벤조일, t-부틸퍼옥시네오데카노에이트, t-부틸퍼옥시피발레이트 등의 유용성(油溶性) 유기 과산화물; 등이 사용된다.

[0098] 더욱 구체적으로는, 디에틸에테르와 클로로포름을 체적비로 8:2로 한 혼합용매 및 AIBN을 사용하고, Ar 중 60℃에서 2~6시간 정도 중합을 행할 수 있다.

[0099] 또한, 본 실시형태에서는 고분자물질이 부틸메타크릴레이트기를 포함하는 제3 단위를 갖는 예를 설명하였는데, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 포함하는 제1 단위와 카르복실산 유도기를 포함하는 제2 단위를 갖는 고분자물질을 제1 고분자물질로 하고, 이것에 더하여, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 포함하는 제1 단위와 부틸메타크릴레이트기를 포함하는 제3 단위를 갖는 제2 고분자물질을 포함하고 있어도 된다.

[0100] 또한, 상기 제1 고분자물질의 제1 단위와 상기 제2 고분자물질의 제1 단위는 동일 구조여도 되고, 상이한 구조

여도 된다. 또한, 상기 제1 고분자물질이 부틸메타크릴레이트기를 포함하는 제3 단위를 포함할 때, 이 제1 고분자물질의 제3 단위와 상기 제2 고분자물질의 제3 단위는 동일 구조여도 되고, 상이한 구조여도 된다.

[0101] 이러한 제2 고분자물질은, 주형 DNA 단편의 비특이적 흡착을 억제하는 폴리머로서 사용된다. 이러한 폴리머로서는 예를 들면 포스포릴콜린기가 30 몰%, 부틸메타크릴레이트기가 70 몰%의 비율로 포함되어 있는 것인 MPC 폴리머(일본유지사제)를 사용할 수 있다.

[0102] 또한, 고분자물질이 상기 제1 고분자물질, 제2 고분자물질로 되는 경우, 이들 고분자물질이 혼합되어 있는 구성으로 할 수 있다. 각각의 고분자물질의 폴리머는, 예를 들면 에탄올용액에 용해할 수 있기 때문에, 각각의 폴리머용액을 혼합함으로써 용이하게 혼합 폴리머를 얻을 수 있다.

[0103] 이상과 같은 고분자물질로 되는 코팅층을 표면에 포함하는 기판은, 소정의 형상으로 가공된 기판의 표면에 고분자물질을 포함하는 액체를 도포하고, 건조함으로써 얻어진다. 또한, 고분자물질을 포함하는 액체 중에 기판을 침지하고, 건조해도 된다.

[0104] 또한, 기판으로서 플라스틱 재료를 사용한 경우에는, 형상이나 사이즈의 변경에 대한 유연성이 확보될 뿐 아니라, 유리기판인 것에 비해 저렴하게 제공할 수 있다고 하는 관점에서 바람직하다. 이러한 플라스틱 재료로서는, 표면처리의 용이성 및 양산성의 관점에서, 열가소성 수지를 사용할 수 있다.

[0105] 열가소성 수지로서는 형광 발생량이 적은 것을 사용할 수 있다. 형광 발생량이 적은 수지를 사용함으로써, DNA 사슬의 검출반응에 있어서의 백그라운드를 저하시킬 수 있기 때문에, 검출 감도를 더욱 향상시킬 수 있다. 형광 발생량이 적은 열가소성 수지로서는, 예를 들면, 폴리에틸렌, 플로프로필렌 등의 직쇄상 폴리올레핀; 환상 폴리올레핀; 불소 함유 수지; 등을 사용할 수 있다. 상기 수지 중에서도, 포화 환상 폴리올레핀은, 내열성, 내약품성, 저형광성, 투명성 및 성형성이 특히 우수하기 때문에, 광학적인 분석에 적합하여, 기판의 재료로서 바람직하게 사용된다.

[0106] 여기에서, 포화 환상 폴리올레핀이란 환상 올레핀 구조를 갖는 중합체 단독 또는 환상 올레핀과 α-올레핀과의 공중합체를 수소 첨가한 포화 중합체를 가리킨다. 전자의 예로서는, 예를 들면 노르보르넨, 디시클로펜타디엔, 테트라시클로도데센으로 대표되는 노르보르넨계 모노머, 및 이들 알킬 치환체를 개환중합하여 얻어지는 중합체를 수소 첨가하여 제조되는 포화 중합체이다. 후자의 공중합체는 에틸렌이나 프로필렌, 이소프로필렌, 1-부텐, 3-메틸-1-부텐, 1-펜텐, 3-메틸-1-펜텐, 1-헥센, 1-옥텐 등의 α-올레핀과 환상 올레핀계 모노머의 랜덤 공중합체를 수소 첨가함으로써 제조되는 포화 중합체이다. 공중합체에서는 에틸렌과의 공중합체가 가장 바람직하다. 이들 수지는 단독으로 사용해도 되고, 2종류 또는 그 이상의 공중합체 또는 혼합물이어도 된다. 또한, 환상 올레핀 구조를 갖는 단량체가 개환중합되어 얻어지는 포화 환상 폴리올레핀 뿐 아니라, 환상 올레핀 구조를 갖는 단량체의 부가중합에 의해 얻어지는 포화 환상 폴리올레핀을 사용하는 것도 가능하다.

[0107] 이상과 같은 고분자물질을 표면에 포함하는 플라스틱 재료로 되는 기판은, 소정의 형상으로 가공된 기판의 표면에 고분자물질을 포함하는 액체를 도포하고, 건조함으로써 얻어진다. 또한, 고분자물질을 포함하는 액체 중에 기판을 침지하고, 건조해도 된다.

[0108] 또한, 기판의 재료를 플라스틱으로 한 경우, 형상은 판상으로는 한정되지 않고, 예를 들면 필름상이나 시트상이어도 된다. 구체적으로는, 기판을 가요성 플라스틱 필름으로 하는 것도 가능하다. 또한, 기판은 하나의 부재로 구성되어 있어도 되고, 복수의 부재로 구성되어 있어도 된다.

[0109] 다음으로, 기판 표면으로의 프라이머의 고정화방법에 대해서 설명한다.

[0110] 예를 들면, (i) 기판 상의 고분자물질에 포함되는 복수의 활성 에스테르기 중, 적어도 일부의 활성 에스테르기와 프라이머를 반응시켜서 공유 결합을 형성시킴으로써, 기판 표면에서 프라이머를 고정화하고, 계속해서 (ii) 프라이머를 고정화한 것 이외의 기판 표면의 활성 에스테르기를 불활성화하는, 즉 나머지 활성 에스테르기를 불활성화함으로써, 프라이머를 기판의 표면에 고정할 수 있다. 이하, 각각의 공정에 대해서 설명한다.

[0111] 상기 공정(i)에 있어서, 주형 DNA 단편과 어닐링하는 프라이머를 기판 상에 고정화할 때는, 프라이머를 용해 또는 분산시킨 액체를 스포팅(spotting)하는 방법이 바람직하다. 고분자물질에 포함되는 활성 에스테르기의 일부가 프라이머와 반응하여, 프라이머의 사이에서 공유 결합이 형성된다.

[0112] 이 프라이머를 용해 또는 분산시킨 액체는, 예를 들면 중성에서 알칼리성, 예를 들면 pH가 7.6 이상으로 할 수 있다.

[0113] 또한, 스포팅 후, 기판 표면에 고정화되지 않은 프라이머를 제거하기 위해, 순수나 완충액으로 세정해도 된다.

[0114] 또한, 상기 공정(ii)에 나타낸 바와 같이, 세정 후에는 프라이머를 고정화한 이외의 플라스틱 기판 표면의 활성 에스테르의 불활성화 처리를 알칼리화합물, 또는 1급 아미노기를 갖는 화합물로 행한다.

[0115] 알칼리화합물로서는, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산나트륨, 탄산수소나트륨, 인산수소이나트륨, 수산화칼슘, 수산화마그네슘, 붕산나트륨, 수산화리튬, 인산칼륨 등을 사용할 수 있다.

[0116] 1급 아미노기를 갖는 화합물로서는, 글리신, 9-아미노아크아진, 아미노부탄올, 4-아미노부티르산, 아미노카프릴산, 아미노에탄올, 5-아미노-2,3-디히드로-1,4-펜탄올, 아미노에탄티올 염산염, 아미노에탄티올 황산, 2-(2-아미노에틸아미노)에탄올, 인산이수소 2-아미노에틸, 황산수소 아미노에틸, 4-(2-아미노에틸)모르폴린, 5-아미노플루오레세인, 6-아미노헥산산, 아미노헥실셀룰로오스, p-아미노마뇨산, 2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올, 5-아미노이소프탈산, 아미노메탄, 아미노페놀, 2-아미노옥탄, 2-아미노옥탄산, 1-아미노-2-프로판올, 3-아미노-1-프로판올, 3-아미노프로펜, 3-아미노프로피오니트릴, 아미노피리딘, 11-아미노운데칸산, 아미노살리실산, 아미노퀴놀린, 4-아미노프탈로니트릴, 3-아미노프탈이미드, p-아미노프로피오페논, 아미노페닐초산, 아미노나프탈렌 등을 사용할 수 있다. 이들 중, 아미노에탄올, 글리신을 사용하는 것이 바람직하다.

[0117] 또한, 기판에 고정화하는 프라이머에는, 활성 에스테르기와의 반응성을 높이기 위해, 아미노기를 도입해 두는 것이 바람직하다. 아미노기는 활성 에스테르기와의 반응성이 우수하기 때문에, 아미노기가 도입된 프라이머를 사용함으로써, 효율적으로 강고하게 기판의 표면 상에 프라이머를 고정화할 수 있다. 아미노기의 도입 위치는 프라이머의 분자쇄 말단 또는 측쇄여도 되지만, 분자쇄 말단에 도입되어 있는 것이, 상보적인 주형 DNA 단편과의 어닐링을 보다 한층 효율적으로 행할 수 있다고 하는 관점에서는 바람직하다.

[0118] 이상에 의해, 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자구인성 치환기가 카르보닐기에 결합되어 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 기판과, 기판의 표면에 고정화된 DNA 증폭용 프라이머를 포함하는 DNA 사슬 신장용 마이크로어레이, 즉 도 2에 나타낸 바와 같은 기판(12)의 표면 상에 프라이머(14)가 고정화된 DNA 마이크로어레이(10)이 얻어진다.

[0119] 도 1로 돌아가서, 스텝 S20에서는 스텝 S10에서 얻어지는 DNA 마이크로어레이(10)의 기판(12)의 표면에 고정화된 프라이머(14)에 어닐링시키는 DNA 사슬 신장용 주형 DNA 단편(16) 및 DNA 사슬 신장용 효소계, 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된다. 또한, DNA 증폭용으로 사용하는 주형으로서 DNA 단편 대신에, 주형 RNA 단편을 사용해도 동일한 작용효과를 갖는다.

[0120] 이 도입된 시료로 되는 반응계로서는, 주형이 DNA 단편인 경우에는, DNA 사슬 신장용 효소계는 DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제 중 어느 하나를 사용하고, 또한 주형이 RNA 단편인 경우에는, DNA 사슬 신장용 효소계는 역전사효소, 또는 DNA 리가아제 및 역전사효소의 조합 중 어느 하나의 존재하에서, 뉴클레오티드 모노머(dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등)를 함유하는 MPEC용 버퍼를 사용할 수 있다.

[0121] 또한, DNA 폴리머라아제 중에서도 특히 내열성 세균에 유래하는 DNA 폴리머라아제인 TaqDNA 폴리머라아제, TthDNA 폴리머라아제, PfuDNA 폴리머라아제 등을 사용하는 것도 가능하다.

[0122] 또한, 이들 뉴클레오티드 모노머의 일종 이상을 라벨해 둘 수 있다. 예를 들면, dTTP의 염기의 3번 위치를 형광라벨한 Cy3-dUTP를 뉴클레오티드 모노머로서 사용함으로써, 주형 DNA 단편의 아데닌(A)에 대응하는 신장(프라이머)측의 위치에 Cy3-dUTP가 삽입된다. 이것에 의해, 신장반응이 발생한 프라이머로부터 형성되는 DNA 단편이 Cy3-dUTP로 형광 염색되어, 이 DNA 단편의 검출을 행할 수 있게 된다.

[0123] 또한, 다른 뉴클레오티드 모노머를 라벨해도 되고, 또한 복수 종류의 뉴클레오티드 모노머를 라벨해도 된다. 또한, 라벨방법도 형광체의 도입 외에, 광흡수체 도입의 방법, 방사선 라벨의 방법(P^{32}-ATP, P^{32}-dATP), 효소표지 등의 비방사성 라벨의 방법 등으로도 DNA 사슬을 검출할 수 있다.

[0124] 이 효소표지의 방법에 있어서는, 비오틴(biotin)화 또는 디곡시게닌(DIG: 스테로이드계 천연물)을 결합한 핵산(예를 들면, biotin-dUTP, DIG-dUTP)을 사용하여 프라이머를 신장시킨 후, 형광 표지화한 알칼리포스파타아제 또는 알칼리포스파타아제 처리하여 니트로블루 테트라졸리움(NBT)과 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴인산(BCIP)액 중에서 수시간 반응시킴으로써 DNA를 검출할 수 있다.

[0125] 스텝 S30에서는, 시료가 도입된 반응계의 온도를 DNA 사슬의 열변성온도(melting temperature:Tm) 이상, 예를 들면 90℃~95℃까지 상승시킨다. 이 열변성 처리에 의해, 자기상보사슬(auto-complementary chain) 등에서 보이

는 접힌 구조를 갖는 주형 DNA 단편이나 프라이머가 직쇄상의 단일 가닥이 된다.

[0126] 계속해서, 스텝 S40에서는 반응계의 온도를 프라이머와 주형 DNA 단편이 어닐링되는 온도(어닐링온도), 예를 들면 4℃~65℃, 바람직하게는 50℃~65℃까지 하강시킨다. 이 어닐링 처리에 의해, 주형 DNA 단편의 일부와 상보적인 서열을 갖는 프라이머와, 이 주형 DNA 단편이 이중 가닥이 된다(도 3). 이 반응계에 대해, 세정 처리를 행하지 않고 그대로 스텝 S50으로 진행시킨다.

[0127] 여기에서, 종래에는 어닐링 처리한 후 신장반응 전에, 이중 가닥을 꼬지 않은 DNA 단편(또는 RNA 단편)을 제거하기 위한 세정 처리가 필요하였지만, 본 실시형태에서는 기판 상에 비특이적으로 흡착되는 DNA 단편(또는 RNA 단편)이 없기 때문에, 또한 이것에 의해 DNA 사슬 신장에 관련된 효소반응이 유효하게 행해지는 것으로 추측되어, 기판의 세정 처리가 불필요해진다. 이와 같이 하여, 하이브리다이제이션, 세정, 및 효소 및 모노머 첨가 신장의 각 처리를 행하고 있던 바와 같이, 하이브리다이제이션과 신장반응을 각각의 액상에서 행하고 있던 것을, 본 실시형태에서는 하이브리다이제이션과 신장반응을 동일한 액상계, 즉 반응계를 그대로 사용할 수 있다.

[0128] 스텝 S50에서는, 어닐링 처리를 행한 반응계의 온도를, 상기 어닐링 처리온도에서 상기 열변성 처리온도까지 서서히 상승시키도록 제어한다. 또는, 해당 반응계의 온도를 상기 어닐링 처리온도와 상기 열변성 처리온도 사이의 소정의 온도, 예를 들면 65℃~75℃로 변화시키도록 제어한다. 이와 같이 반응계의 온도를 제어함으로써, MPEC법에 의한 DNA 사슬의 신장반응이 일어나는, 즉 주형 DNA 단편(16)에 상보적인 DNA 단편이 기판 상에 형성되어, DNA의 이중 가닥이 얻어지게 된다(도 4).

[0129] 여기에서는, 주형 DNA 단편에 대해 내열성 DNA 폴리머라아제를 사용한 예를 나타내었지만, DNA 사슬을 주형으로서 새로운 DNA 사슬을 합성하는 효소라면 특별히 한정되지는 않는다. 이와 같은 DNA 폴리머라아제로서는, 폴I형 DNA 폴리머라아제(대장균 DNA 폴리머라아제 I, 클레노우 단편 등), α형 DNA 폴리머라아제(피로코커스 푸리오사스(Pyrococcus furiosus) 유래 DNA 폴리머라아제, VENT DNA 폴리머라아제, KOD DNA 폴리머라아제, DEEP VENT DNA 폴리머라아제) 및 비α 비폴I형 DNA 폴리머라아제(국제공개 제97/24444호 팜플렛에 기재된 DNA 폴리머라아제) 등을 들 수 있다.

[0130] DNA 폴리머라아제 대신에, DNA 리가아제를 사용해도 DNA 사슬 신장반응을 행할 수 있기 때문에, DNA 사슬 증폭을 행하는 것이 가능하다.

[0131] 또한, 주형 RNA 단편을 사용한 경우, 주형 RNA 단편에 직접 기판 상의 프라이머를 작용시키고, 역전사효소를 사용하여 프라이머측에 DNA 사슬 신장시키는 것이 가능하다. 또한, 주형 RNA 단편에 역전사효소를 작용시켜서 일단 cDNA(상보적 DNA)를 합성(제1 사슬 합성)한 후, DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제를 작용시켜도, 프라이머측에 DNA 사슬 신장시키는 것이 가능하다.

[0132] 도 1로 돌아가서, 스텝 S60에서는 신장반응 후의 반응계를 DNA 사슬의 열변성온도, 예를 들면 90℃~95℃로 유지한다. 이 열변성 처리에 의해, 기판(12)의 표면에서는 이중 가닥 DNA로부터 주형 DNA 단편(16)(도 4)가 이탈되어, 단일 가닥 DNA 단편(18)이 남겨진 상태가 된다(도 5).

[0133] 스텝 S70에서는, 다음의 신장반응을 행할지의 여부가 판별된다. 이 판별은 온도 조정장치(서모사이클러) 등을 사용해서 반응횟수를 지정하여 그 횟수에 도달했는지의 여부를 자동으로 행해도 되고, 매회 조작자의 판단으로 행해도 된다.

[0134] 이 판별결과가 YES, 즉 다음의 신장반응을 행하는 경우에는 스텝 S40으로 돌아가서, 어닐링 처리(스텝 S40)~신장반응(스텝 S50)~열변성 처리(스텝 S60)가 반복되어, 미반응의 프라이머로 DNA 신장반응이 행해진다. 이 사이클을 1~50회 반복하는 결과, 기판 상에서 MPEC법에 의한 DNA 사슬 증폭이 행해진다.

[0135] 또한, 스텝 S70에서의 판별결과가 NO, 즉 다음의 신장반응을 행하지 않는 경우에는, 스텝 S80으로 진행시켜, 반응액을 버리고, DNA 마이크로어레이를 예를 들면 0.1 wt%의 SDS 용액을 사용해서 세정하여, 종료한다.

[0136] 이 DNA 사슬 증폭을 위해서는, 기판 상의 일정 구획 내에 복수의 스포트를 설치해 두고, 각 스포트에 프라이머를 고정화해 두며, 마이크로어레이를 형성해 두는 것이 바람직하다.

[0137] 또한, 기판의 표면에 고정화시키는 DNA 증폭용 프라이머의 길이를 목적이나 용도에 따라 임의로 결정할 수 있고, 예를 들면 5~50 염기로 할 수 있다.

[0138] (제2 실시형태)

[0139] 도 6은 제2 실시형태로서의 DNA 사슬 신장방법의 순서를 나타내는 플로차트이다. 도 6에 있어서, 도 1과 순서가

동일한 부분에 대해서는, 도 1과 동일한 부호를 붙이고, 설명을 생략한다.

[0140] 이 DNA 사슬 신장방법은 인지질의 친수부를 구성하는 인산 에스테르로부터 유도되는 기를 갖는 제1 단위와 전자 구인성 치환기가 카르보닐기에 결합되어 되는 카르복실산 유도기를 갖는 제2 단위를 포함하는 고분자물질을 표면에 갖는 기판에 DNA 신장용 프라이머(이하, 「프라이머」라고 한다)를 고정화시키고(스텝 S10), 목적으로 하는 서열을 갖는 주형 DNA 단편 또는 주형 RNA 단편, DNA 사슬 신장용 효소계, 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료가 도입된 반응계를, DNA 사슬을 열변성하는 온도까지 끌어올리고(스텝 S30), 이 반응계의 온도를 어닐링 처리하는 온도까지 내려서(스텝 S40), 이 반응계에서 DNA 사슬의 신장반응을 행하고(스텝 S50), 여기까지의 각 처리를 동일한 액상계에서 행하는 것이다.

[0141] 전술한 바와 같이, 스텝 S20에서는 기판의 표면에 고정화된 프라이머에 어닐링시키는 DNA 신장용 주형 DNA 단편 및 뉴클레오티드 모노머를 포함하는 시료를 도입하고, 이 시료 및 이 시료가 도입되어 되는 반응계는, 전술한 것과 동일한 것을 적용할 수 있다.

[0142] 또한, 스텝 S50에서의 신장반응 후에, 스텝 S55에서 반응액을 버리고, DNA 마이크로어레이를 예를 들면 0.1 wt%의 SDS 용액을 사용해서 세정하여, 종료한다.

[0143] 이하에, 본 실시형태의 DNA 사슬 신장방법의 적용예에 대해서 설명한다.

[0144] (SNP 해석)

[0145] 소정의 표적 유전자의 특징서열을 포함하는 염기서열과 상보적인 서열을 완전 매치서열로 할 때, 프라이머를 이 완전 매치서열의 1염기를 다른 염기로 치환함으로써, SNP 해석을 행하는 것이 가능해진다. 또한, 프라이머는 25염기 이내의 길이를 갖는 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0146] 즉, 스텝 S10에서, 어느 표적 유전자의 특징서열과 1염기 만 미스매치가 되는 DNA 단편을 프라이머로서 기판의 표면에 고정화한다. 이 때, 예를 들면 384웰(각 웰 256 스포트), 96웰(각 웰 1024 스포트)의 마이크로어레이를 사용하여, 각 스포트에 고정화된 프라이머의 서열을 파악해 두도록 한다. 스텝 S20에서, 이 특징서열을 포함하는 DNA 사슬을 주형 DNA 단편으로서 사용하여 샘플 도입을 행하고, 스텝 S30에서 열변성 처리를 행하며, 스텝 S40에서는 어닐링 처리를 행한다. 스텝 S50에서는 어닐링 처리에 의해 주형 DNA 사슬 단편과 이중 가닥을 형성한 프라이머에만 신장반응이 일어난다.

[0147] 또한, 전술한 바와 같이 스텝 S20에서 도입되는 샘플 중에 라벨된 뉴클레오티드 모노머를 포함시켜 둠으로써, 프라이머로부터 신장반응에 의해 얻어지는 DNA 단편이 라벨되어, 스텝 S55에서 세정 후의 기판에 남은 형광 DNA 단편을 포함하는 스포트의 검출을 행하여, 각 어레이에 고정화된 프라이머의 서열이 파악되고 있는 것으로부터, 검출된 스포트에 고정화된 프라이머의 서열을 알 수 있다. 이것에 의해, 신장반응이 일어난 프라이머의 염기서열을 알 수 있어, 상기 표적 유전자의 특징서열을 포함하는 주형 DNA 단편에 대한 1염기 다형을 해석하는 것이 가능해진다.

[0148] (SBH 해석)

[0149] 소정 수, 예를 들면 6~10 mer, 바람직하게는 8 mer의 염기서열을 갖는 프라이머를, 전체 조합, 예를 들면 8 mer의 프라이머를 사용한 경우에는, 전체 조합인 4^8=65536종류의 프라이머를 준비하고, 각각의 프라이머가 마이크로어레이의 하나의 스포트에 고정화시킴으로써, 염기서열결정(SBH)해석을 행하는 것이 가능해진다.

[0150] 즉, 스텝 S10에서 상기 각 프라이머를 마이크로어레이의 각 스포트에 각각 고정화한다. 이 때, 각 스포트에 고정화된 프라이머의 서열을 파악해 두도록 한다. 스텝 S20에서 미지의 염기서열의 DNA 단편을 주형 DNA 단편으로서 사용하여 샘플 도입을 행하고, 스텝 S30에서 열변성 처리를 행하며, 스텝 S40에서는 어닐링 처리를 행한다. 스텝 S50에서는 어닐링 처리에 의해 주형 DNA 사슬 단편과 이중 가닥을 형성한 프라이머에만 신장반응이 일어난다.

[0151] 또한, 전술한 바와 같이 스텝 S20에서 도입되는 샘플 중에 라벨된 뉴클레오티드 모노머를 포함시켜 둠으로써, 프라이머로부터 신장반응에 의해 얻어지는 DNA 단편이 라벨되어, 스텝 S55에서 세정 후의 기판에 남은 형광 DNA 단편을 포함하는 스포트의 검출을 행하고, 각 어레이에 고정화된 프라이머의 서열이 파악되어 있는 것으로부터, 검출된 스포트에 고정화된 프라이머의 서열을 알 수 있다. 이것에 의해, 신장반응이 일어난 프라이머의 염기서열을 알 수 있다.

[0152] 여기에서, 도 7에 나타낸 바와 같이, 기판(41) 상에서 신장반응이 일어난 스포트를 검출한 후, 검출된 스포트에

고정화되어 있는 프라이머의 랜덤 서열군 45의 각 서열을 꺼내어, 서열 전후에서 1염기씩 옮겨 오버랩되도록 순번을 붙여 순번을 붙인 서열군 47이 얻어진다. 이 순번을 붙인 서열군 47에 나타내어진 순번에 따라, 각 프라이머의 선두 염기를 읽어가, 마지막 프라이머에 대해서는 전체 염기서열을 읽어 얻어지는 염기서열을 토대로, 미지의 염기서열 43을 갖는 주형 DNA 단편의 염기서열 49를 결정할 수 있다.

[0153] 또한, 프라이머가 6염기 길이인 경우는 4096종류의 프라이머를 준비할 필요가 있고, 프라이머가 7염기 길이인 경우는 16384종류의 프라이머를 준비할 필요가 있다. 이들 프라이머는 기능 미지(nc) RNA 및 마이크로(mi) RNA 등의 20 mer~50 mer의 비교적 소분자의 탐색, 유전자 서열 해석에 사용할 수 있다.

[0154] 또한, 프라이머가 8염기 길이인 경우는 65536종류의 프라이머를 준비할 필요가 있고, 프라이머가 9염기 길이인 경우 및 10염기 길이인 경우는, 각각 262144 및 1048576종류의 프라이머를 준비할 필요가 있다. 이들 프라이머는 통상의 유전자 서열 해석에 사용할 수 있다.

[0155] (유전자 발현 프로파일 해석)

[0156] 도 8은 유전자 발현 프로파일용 샘플로서, 라벨을 도입한 샘플을 조제 및 발현 프로파일 해석하기 위한 종래의 방법을 나타낸다.

[0157] 목적에 따른 생체 조직으로부터 전체 RNA(total RNA)를 추출한다. 또한 전체 RNA로부터는 역전사효소를 사용한 반응에 의해, cDNA를 합성한다(제1 사슬 합성). 역전사효소를 사용한 반응시에는 dNTP와 아미노알릴 dUTP를 일정 비율로 혼합한 것을 첨가하고, 아미노알릴 dUTP를 삽입한 cDNA를 합성한다.

[0158] 또한, 조직으로부터 얻은 전체 RNA량이 적은 경우는, 역전사반응에 의해 cDNA를 합성한 후, 이중 가닥의 cDNA(전사 주형 DNA 단편)를 합성하고(제2 사슬 합성), 그것을 주형으로서 RNA 폴리머라아제를 작용시켜서 안티센스 사슬의 RNA(aRNA)를 증폭시킨다. 이 RNA 증폭시에 dNTP와 아미노알릴 dUTP를 일정 비율로 혼합한 것을 첨가함으로써, 아미노알릴 dUTP를 삽입한 aRNA를 합성할 수 있다.

[0159] 계속해서, 상기 cDNA 또는 안티센스아미노알릴 RNA(aRNA)를 에탄올 침전한 후, 0.2 M 탄산나트륨 버퍼($NaHCO_3$-Na_2CO_3(pH 9.0))에 용해한다. DMSO에 용해해 둔 형광색소(Cy3 또는 Cy5)를 첨가하고, 통상적인 방법에 따라 cDNA 또는 aRNA에 삽입해 둔 아미노알릴 dUTP와 커플링 반응시켜, cDNA 또는 aRNA를 형광 표지한다. 유리(遊離)된 형광색소를 겔여과 칼럼 또는 필터 등을 사용하여 통상적인 방법의 정제에 의해 제거한 후, aRNA에 대해서는 추가로 프래그멘테이션 버퍼(fragmentation buffer)(종농도 0.04 M 초산 트리아미노메탄(pH 8.1), 0.1 M 초산 칼륨, 0.03 M 초산 마그네슘)를 첨가하고 95℃에서 15분간 반응 후, 크러시드 아이스(crushed ice)로 급냉하여 aRNA를 단편화한다. 겔전기영동 등의 방법에 의해 프래그먼트화를 확인한 후, 겔여과 필터로 정제·농축한다.

[0160] 다음으로, 조제한 cDNA 또는 aRNA와 마이크로어레이의 프라이머와의 하이브리다이제이션을 행한다. cDNA 또는 aRNA에 하이브리다이제이션 버퍼(최종농도 5×SSC, 0.5(v/v)% SDS, 4×Denhardt's solution) 및 포름아미드(Formamide)를 적절히 혼합하고, DNA 마이크로어레이와 45℃~60℃에서 하룻밤 하이브리다이제이션한다. 하이브리다이제이션 후, 2×SSC-0.1(v/v)% SDS 용액, 2×SSC 용액, 1×SSC 용액으로 5분씩 세정한 후, 형광독취장치(fluorescent image reader)(예를 들면, CRBIO(r)IIe; 히타치 소프트웨어 엔지니어링제)를 사용하여 화상을 스캔하고, 해석 소프트(예를 들면, DNASIS(r)Array; 히타치 소프트웨어 엔지니어링제)를 사용하여 시그날 강도를 정량화한다. 또한, 도 8에 있어서는 aRNA의 합성을 나타내고 있는데, 도중의 공정에서 얻어지는 cDNA가 해석에 충분한 양이라면 이 cDNA를 직접 해석해도 된다.

[0161] 이 방법에서는 복잡한 전처리공정을 행하기 때문에, 각각의 시료에서 조건 선정 등 설정 조건이 많아질 뿐 아니라, 전체 공정에서 적어도 5일~일주일은 소요되는 것이 신속한 유전자 검사에 있어서 문제였다.

[0162] 따라서, 본 실시형태에서는 미리 도 1의 스텝 S10과 동일한 방법으로 기판의 표면에, 해석 대상이 되는 유전자의 특징서열에 상당하는 염기서열을 갖는 DNA 단편을 프라이머로서 사용하고, 각각의 프라이머를 마이크로어레이의 하나의 스포트에 고정화시켜 둔다. 따라서, 전체 RNA에 역전사효소를 작용시켜서 cDNA를 얻는 제1 사슬 합성을 행한 후에, 제1 사슬 합성에 의해 얻어지는 cDNA(또는 필요에 따라 증폭시켜서 얻어지는 aRNA)를 주형 DNA 단편으로서 사용하고, DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제의 작용에 의해 기판 상의 프라이머측에서 신장반응을 행함으로써, 발현 유전자를 특정하는 것이 가능해진다.

[0163] 또한, 전술한 바와 같이, 전체 RNA를 주형으로서 상기 기판 상에 설치된 소정의 서열을 갖는 프라이머를 하이브리다이즈시키고, 역전사효소를 작용시킴으로써, 직접 기판 상의 프라이머측에서 신장반응을 행하는 것이 가능하

여, 이것에 의해서도 발현 유전자를 특정하는 것이 가능해진다.

[0164] 즉, 기지의 유전자가 갖는 특징서열과 상보적인 염기서열을 갖는 프로브가, 특정 세포 유래의 전체 RNA로부터 얻어지는 주형 DNA 단편 중의 존재 여부를 알 수 있다.

[0165] 즉, 전체 RNA에 대한 cDNA를 주형 DNA 단편으로서 사용하는 예를 들어 설명하자면, 스텝 S10에서 상기 각 프라이머를 마이크로어레이의 각 스포트에 각각 고정화한다. 이 때, 각 스포트에 고정화된 프라이머의 서열을 파악해 두도록 한다. 스텝 S20에서 전술한 바와 같이 하여 얻어지는 소정의 전체 RNA로부터 합성된 cDNA를 주형 DNA 단편으로서 사용하여 샘플 도입을 행하고, 스텝 S30에서 열변성 처리를 행하며, 스텝 S40에서는 어닐링 처리를 행한다. 스텝 S50에서는 어닐링 처리에 의해 주형 DNA 사슬 단편과 이중 가닥을 형성한 프라이머에만 신장반응이 일어난다.

[0166] 또한, 전술한 바와 같이 스텝 S20에서 도입되는 샘플 중에 라벨된 뉴클레오티드 모노머를 포함시켜 둠으로써, 프라이머로부터 신장반응에 의해 얻어지는 DNA 단편이 라벨되어, 스텝 S55에서 세정 후의 기판에 남은 형광 DNA 단편을 포함하는 스포트의 검출을 행하여, 각 어레이에 고정화된 프라이머의 서열이 파악되어 있는 것으로부터, 검출된 스포트에 고정화된 프라이머의 서열을 알 수 있다. 이것에 의해, 신장반응이 일어난 프라이머의 염기서열을 알 수 있어, 전체 RNA가 어느 유전자로부터 발현되어 얻어진 것인지, 즉 유전자 발현 프로파일을 해석하는 것이 가능해진다.

[0167] 이 방법에 의하면, 유전자 발현 프로파일(gene expression profile) 해석을, 통상의 해석에 있어서 수고와 시간이 소요되는 샘플 조제를 거의 행하지 않고, 게놈 DNA 또는 전체 RNA로부터의 역전사산물 cDNA를 주형 DNA 단편으로서 사용하여 간편한 조작으로 행할 수 있게 된다.

[0168] 이상의 용도 외에는, 마이크로새틀라이트 해석(microsatellite analysis), 염색체 이상 해석(CGH:Comparative Genomic Hybridization), 기능 미지(nc) RNA 탐색 등의 유전자 해석용 기본 툴으로의 적용;

[0169] 이들 툴을 사용한 장기·질환별 유전자 발현 해석 칩, 변이 원성 시험 키트(환경 호르몬), 유전자 재조합식품 검사 키트, 미토콘드리아 유전자 서열 해석 키트, 친자 감정·범죄 수사를 위한 해석 키트, 선천성 질환 해석 키트, 염색체·유전자 이상 해석 키트, 유전자 진단(착상 전·출생 전) 키트, 약물반응 관련 유전자 다형 해석 키트, 지질대사 관련 유전자 다형 해석 키트, 이비과·안과영역 유전자 다형 해석 키트 등의 용도별 커스텀 칩(custom chip)으로의 적용;

[0170] 암 예후 예측 칩, 의약품 개발(임상·창약)용 칩, 건강식품 개발용 칩 등의 진단·임상용 커스텀 칩으로의 적용;

[0171] 미생물 한도 시험이나 식품음료수 중의 미생물 검사 등의 약품·식품 제조공정, 및 우식(dental caries)·치주병 관련 균의 검출, 기회감염균(opportunistic infection bacteria)의 검출 등의 치과영역의 임상 검사, 및 식품공장·주방시설환경 검사, 음료·공중목욕탕, 우물물 등의 수질 검사에 있어서의 환경 검사, 및 감염증·식중독의 예방, 회사 종업원의 위생관리 등의 보건위생, 및 내성균을 포함하는 일반세균 동정, 간염 바이러스, 헬리코박터피롤리, 간염 클라미디아균, 에이즈 바이러스, SARS 바이러스, 웨스트나일바이러스, 노로바이러스(생굴 유래의 식중독), 인플루엔자바이러스, 진균·곰팡이 등의 임상 검사 등의 미생물 동정 검사 키트로의 적용 등을 들 수 있다.

실 시 예

[0172] (실험예 1)

[0173] 이하의 수법으로, 프라이머를 본 실시형태에 대응하는 플라스틱, 유리 기판 및 종래의 기판에 대응하는 알데히드 기판의 각 기판의 표면에 고정화하고, 각 기판 상에서 DNA 사슬 신장반응을 행하여, 프라이머의 DNA 사슬 신장반응을 검출하였다.

[0174] (플라스틱 기판의 제조)

[0175] 포화 환상 폴리올레핀 수지(5-메틸-2-노르보르넨의 개환중합체의 수소첨가물(MFR(Melt flow rate): 21 g/10분, 수소첨가율: 실질적으로 100%, 열변형온도 123℃)를 사용하여, 사출성형에 의해 슬라이드글라스 형상의 기판을 얻었다. 기판을 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴 콜린-부틸메타크릴레이트-p-니트로페닐 옥시카르보닐 폴리에틸렌 글리콜 메타크릴레이트(NPMA)공중합체(각 기는, 몰%로 25:74:1)의 0.5 중량% 에탄올용액에 침지함으로써, 기판 표면에 포스포릴 콜린기와 활성 에스테르기를 갖는 고분자물질을 도입하여, 플라스틱 기판을 얻었다.

[0176] (유리 기판의 제조)

[0177] 통상의 유리 기판을 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴 콜린-부틸메타크릴레이트-p-니트로페닐 옥시카르보닐 폴리에틸렌 글리콜 메타크릴레이트(NPMA)공중합체(각 기는, 몰%로 25:74:1)의 0.5 중량% 에탄올용액에 침지함으로써, 기판 표면에 포스포릴 콜린기와 활성 에스테르기를 갖는 고분자물질을 도입하여, 유리 기판을 얻었다.

[0178] (알데히드 기판의 제조)

[0179] 포화 환상 폴리올레핀 수지 5-메틸-2-노르보르넨의 개환중합체의 수소첨가물(MFR: 21 g/10분, 수소첨가율: 실질적으로 100%, 열변형온도: 123℃)을 사용하여, 사출성형에 의해 슬라이드글라스 형상의 기판을 얻었다. 이 성형물에 저온 산소 플라즈마 처리에 의해 표면에 친수화처리를 행하였다. 이어서, 아미노알킬실란으로서 γ-아미노프로필 트리에톡시실란을 메탄올 중에 5%의 농도로 용해시킨 것을 아미노기 도입 처리액으로서 조제하고, 이 용액 중에 2시간 침지한 후, 기판을 용액으로부터 꺼내 초순수 중에 침지하여 방치 후 기판을 꺼내서 건조하였다. 글루타르알데히드를 PBS(-) 중에 2%의 농도로 용해시켜 글루타르알데히드 용액을 조제하고, 아미노알킬실란처리를 행한 기판을 글루타르알데히드 용액 중에 침지하여 4시간 방치한 후, 기판을 꺼내 초순수 중에 침지하고, 세정 건조하였다. 이것에 의해, 표면에 알데히드기를 갖는 알데히드 기판이 얻어졌다.

[0180] (프라이머 고정)

[0181] 5' 말단이 아미노기로 수식된 올리고 DNA(20염기 사슬)를 0.25 M 탄산 버퍼(pH 9.0)를 사용해서 용해하고, 10 μM의 올리고 DNA용액을 조제하였다. 이 용액을 스포터(spotter)(히타치 소프트웨어 엔지니어링제 Marks-I)를 사용하여, 100 ㎛ 직경의 크로스컷 핀으로 플라스틱 기판, 유리 기판 및 알데히드 기판의 표면 상에, 각각 스포팅하였다. 올리고 DNA를 스포팅한 각 기판을 200 ㎕의 0.25 M 인산 버퍼(pH 8.5)로 내부를 적신 밀폐용기(10 cm×15 cm×3 cm) 중에서 하룻밤 침지하여, 올리고 DNA(프라이머)를 고정화시켰다.

[0182] (DNA 사슬 신장반응)

[0183] 도 6의 스텝 S20에서 도입하는 주형 DNA 단편으로서, 소정의 50 mer의, 미리 5' 말단을 Cy5에서 표지한 DNA 단편을 사용하여, 주형 DNA 단편의 농도가 100 pM이 되는 반응계로 하였다. 또한, DNA 사슬 신장용 효소계로서, DNA 폴리머라아제(다카라 바이오 주식회사제 Ex Taq)를 사용하였다.

[0184] 계속해서, 도 6의 스텝 S30의 열변성 처리, 스텝 S40의 어닐링 처리, 스텝 S50의 신장반응을 각각 95℃ 5분(변성)-95℃ 1분(변성)-50℃ 3분(어닐링 처리)-95℃ 1분(변성)으로 하였다.

[0185] 이하, 샘플 중에 Cy3-dUTP를 포함시켜 두고 각 기판에 있어서 행한 DNA 사슬 신장반응 검출에 있어서의 Cy3-dUTP 유래의 형광강도를 측정한 결과를 표 1에 나타낸다.

표 1

[0186]

프로브 염기수	형광강도(MPEC신장반응)		
	플라스틱	유리	알데히드 기판
20	6281	3383	1725
25	3602	2412	0

[0187] 본 실시형태에 대응하는 플라스틱 기판 및 유리 기판에서는, 기판 상에서의 DNA 사슬 신장이 검출된 한편으로, 종래의 기판에 대응하는 알데히드 기판에서는 DNA 사슬 신장은 검출되지 않은 것으로 생각된다.

[0188] (실험예 2)

[0189] 실험예 1에서 DNA 사슬 신장이 검출된 플라스틱 기판을 사용하여, 20 mer, 25 mer, 30 mer의 각 프로브에 대해서 MPEC법에 의한 DNA 사슬 신장을 1 사이클, 5 사이클, 10 사이클, 20 사이클로 행하고, DNA 사슬 증폭반응을 행하여, 각 세트의 사이클 종료 후에 형광강도를 측정하였다.

[0190] 또한, 도 1의 스텝 S30의 열변성 처리, 스텝 S40의 어닐링 처리, 스텝 S50의 신장반응, 스텝 S60의 열변성 처리를 각각 95℃ 5분(변성; 초회만)~95℃ 1분(변성)~50℃ 3분(어닐링)~95℃ 1분(변성)으로 하였다.

[0191] 이하에, 결과를 표 2에 나타낸다.

표 2

프로브 염기수	형광강도(MPEC법에 의한 신장반응 후)			
	MPEC사이클 수			
	1	5	10	20
20mer	6487	14012	35502	45668
25mer	3808	5348	15287	35469
30mer	2766	4340	9656	27939

[0192]

[0193] 소정의 고분자물질로 표면 처리한 플라스틱 기판에서는, 모든 길이의 프로브에서 DNA 사슬 증폭이 검출되었다.

[0194] (실험예 3)

[0195] 도 9에 나타낸 바와 같이, 5'-Cy5-AAGGCGGGAGGGAGCGCAATCCGGGAGTTTACAAATGGACAAACTTCTAT-3'의 5' 위치에서 21번째의 염기 C를 변이부위로 한 SNP 타이핑을 행할 목적으로, 합계 5종류의 프로브(21 mer)를 설계하고, 플라스틱 기판 상에 고정화하였다. 이 마이크로어레이를 사용하여, MPEC(multiple primer extension on a chip)반응에 의한 SNP 타이핑(신장반응)을 행한다.

[0196] 이 SNP 타이핑은 DNA 폴리머라아제(0.05 U/㎖), Cy3-dUTP(0.05 mM), 50 ㎕의 PCR 버퍼 중에 dATP, dCTP, dGTP(각 0.2 mM)의 존재하에서, 95℃(1분)~50℃(3분)의 온도 사이클로 행한다.

[0197] 이 신장반응의 결과, 상기 50 mer의 DNA 단편을 타겟으로 하여, 이 타겟과 상보적인 서열을 갖는 완전 매치 서열 프로브만이 신장되어, 그 결과 형광발색된다.

[0198] (실험예 4)

[0199] 실험예 1의 MPEC 반응을 p53 암억제 유전자의 검출에 응용한다.

[0200] 이 p53 유전자의 이상은 대장암이나 폐암에서 고빈도로 요구되고 있어, p53 유전자에 이상(1염기다형: SNP)이 있으면 항암제가 듣기 어려워져, 암세포의 세포사(아포토시스)를 일으키지 않아 암세포가 증식되게 된다.

[0201] 따라서, 정상의 p53 유전자 및 암세포의 p53 유전자를 사용한 SNP 타이핑(신장반응)을 행한다. p53 유전자의 993번째와 1069번째에 변이가 있는 것은 공지로, 이 위치의 염기를 3' 말단으로 하고, Tm 값이 거의 일정해지는 프로브 설계를 행하여, 플라스틱 기판 상에 고정한다. 설계한 합계 16종의 프로브 5'-ATGGGCGGCATGAACN-3',5'-TGAGGATGGGCCTCCN-3',5'-GGAACAGCTTTGAGGTGCN-3',5'-CCAGGACAGGCACAAACAN-3'(N=A,G,C,T)를 사용하여, MPEC 반응에 의한 SNP 타이핑을 행한다.

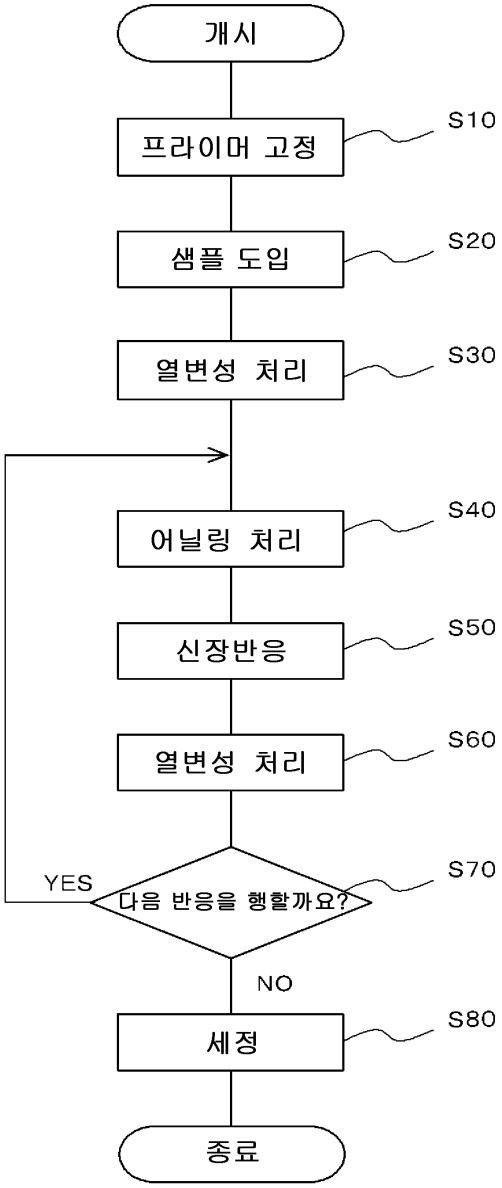
[0202] (실험예 5)

[0203] SBH법에 의한 염기서열 결정해석의 시뮬레이션 실험을 행한다.

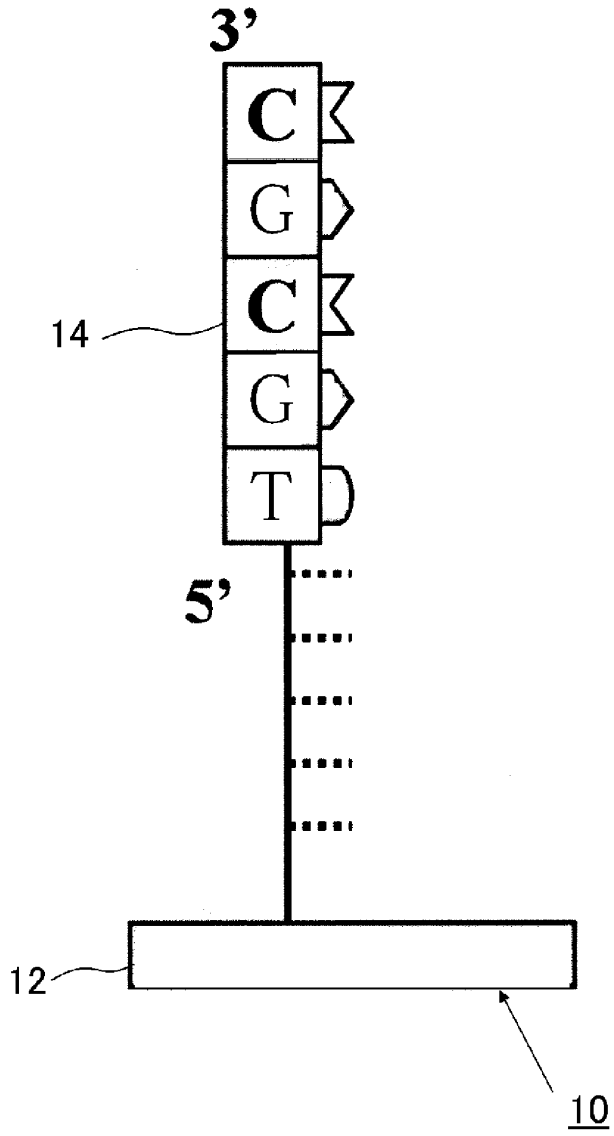
[0204] 도 10에 나타낸 바와 같이, 3' 말단이 Cy5로 라벨된 50염기 길이의 타겟의 염기서열을 결정할 수 있도록, 1염기씩 3'말단 방향으로 옮긴 8염기(8 mer)의 프로브(합계 50)를 플라스틱 기판 상에 고정한 마이크로어레이를 사용하고, MPEC 반응에 의한 SBH를 행한다. 각 프로브의 3' 말단의 1염기에 미스매치를 설정한 8염기(8 mer)의 50종류의 프로브도 더하여 기판 상에 고정하였다. 이 SBH 시뮬레이션용 어레이를 사용한 염기서열 결정을 행한다.

도면

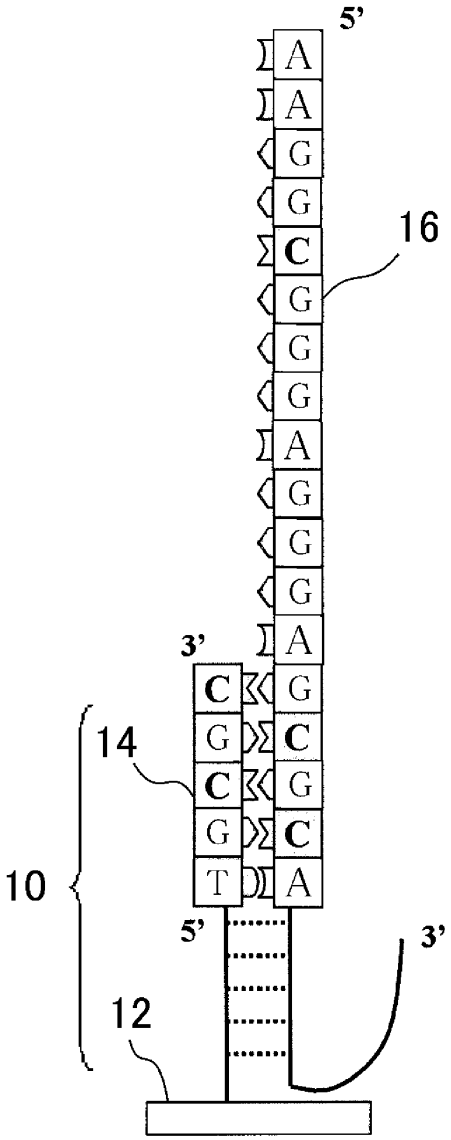
도면1


개시
프라이머 고정
S10
샘플 도입
S20
열변성 처리
S30
어닐링 처리
S40
신장반응
S50
열변성 처리
S60
다음 반응을 행할까요?
S70
YES
NO
세정
S80
종료

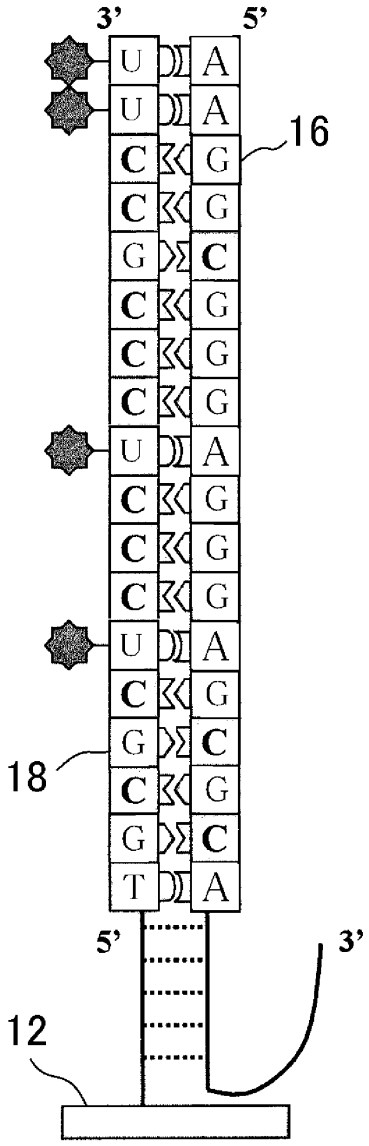
도면2



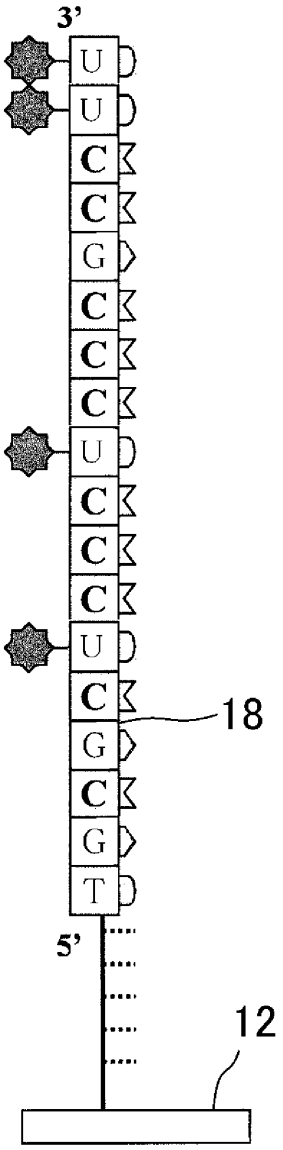
도면3



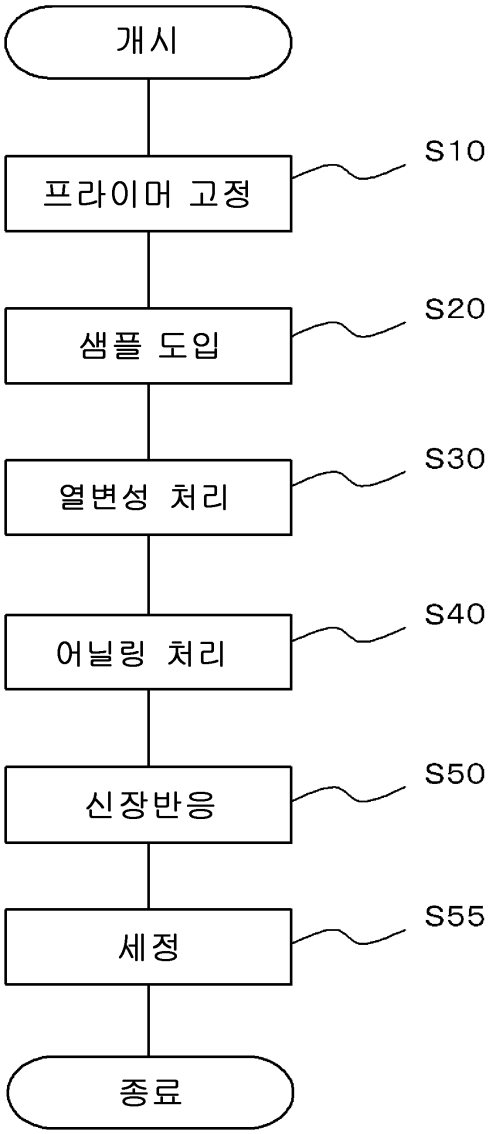
도면4



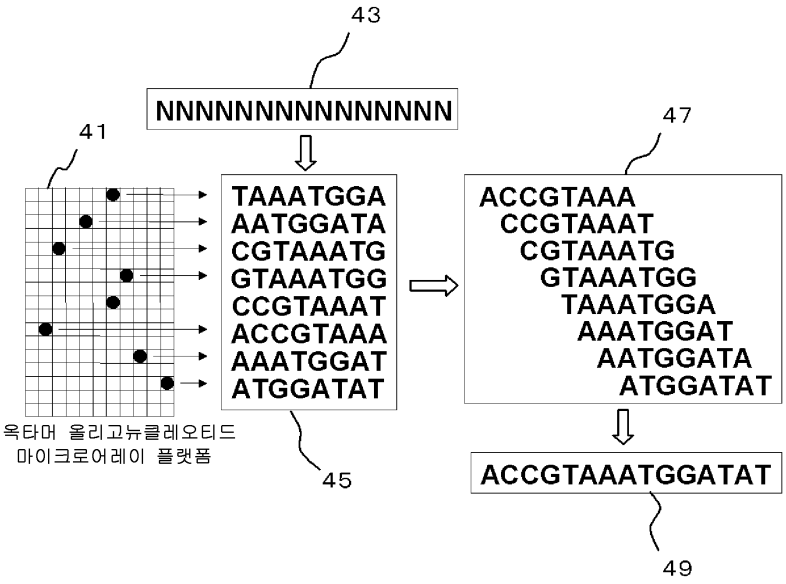
도면5



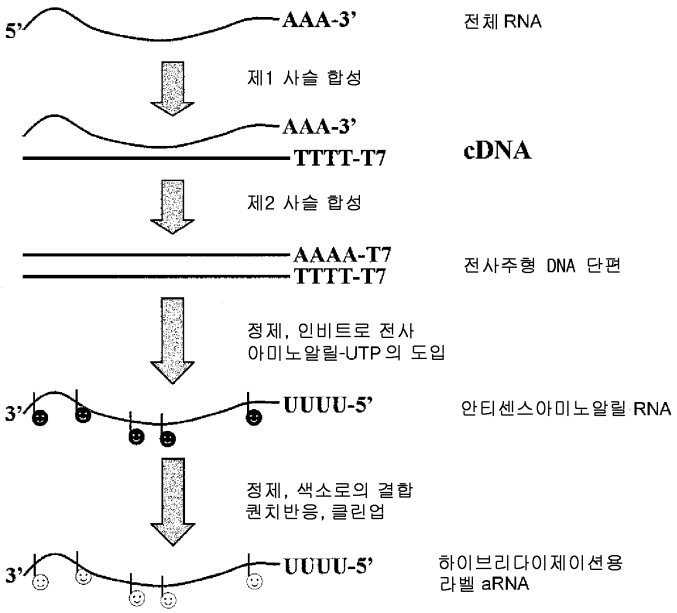
도면6



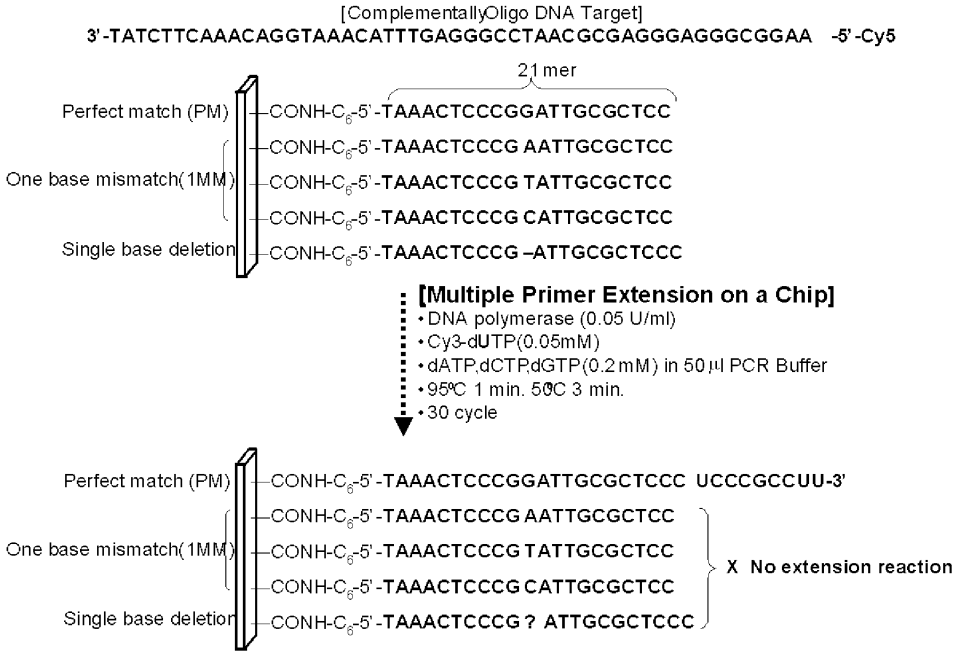
도면7


43
NNNNNNNNNNNNNNN
41
TAAATGGA
AATGGATA
CGTAAATG
GTAAATGG
CCGTAAAT
ACCGTAAA
AAATGGAT
ATGGATAT
45
옥타머 올리고뉴클레오티드
마이크로어레이 플랫폼
47
ACCGTAAA
CCGTAAAT
CGTAAATG
GTAAATGG
TAAATGGA
AAATGGAT
AATGGATA
ATGGATAT
ACCGTAAATGGATAT
49

도면8


5'
AAA-3'
전체 RNA
제1 사슬 합성
AAA-3'
TTTT-T7
cDNA
제2 사슬 합성
AAAA-T7
TTTT-T7
전사주형 DNA 단편
정제, 인비트로 전사
아미노알릴-UTP의 도입
3'
UUUU-5'
안티센스아미노알릴 RNA
정제, 색소로의 결합
퀀치반응, 클린업
3'
UUUU-5'
하이브리다이제이션용
라벨 aRNA

도면9


[ComplementallyOligo DNA Target]
3'-TATCTTCAAACAGGTAAACATTTGAGGGCCTAACGCGAGGGAGGGCGGAA -5'-Cy5
21mer
Perfect match (PM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCGGATTGCGCTCC
One base mismatch(1MM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG AATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG TATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG CATTGCGCTCC
Single base deletion
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG –ATTGCGCTCCC
[Multiple Primer Extension on a Chip]
• DNA polymerase (0.05 U/ml)
• Cy3-dUTP(0.05mM)
• dATP,dCTP,dGTP(0.2mM) in 50㎕ PCR Buffer
• 95℃ 1 min. 50℃ 3 min.
• 30 cycle
Perfect match (PM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCGGATTGCGCTCCC UCCCGCCUU-3'
One base mismatch(1MM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG AATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG TATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG CATTGCGCTCC
Single base deletion
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG ? ATTGCGCTCCC
X No extension reaction

도면10


[ComplementallyOligo DNA Target]
3'-TATCTTCAAACAGGTAAACATTTGAGGGCCTAACGCGAGGGAGGGCGGAA -5'-Cy5
5'-GGTGGATA-3'
GTGGATAG
TGGATAGA
GGATAGAA
GATAGAAG
ATAGAAGT
8-mer primers
CCCGCCTT
CCGCCTT T
CGCCTT TC
GCCTT TCT
CCTT TCTC
5'-CTT TCTCC-3'
MPEC 반응
5'-GGTGGATAGAAGTTTGTCCATTTGTAAACTCCCGGATTGCGCTCCCTCCCGCCTT TCTCC-3'