

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4045535号
(P4045535)

(45) 発行日 平成20年2月13日 (2008. 2. 13)

(24) 登録日 平成19年11月30日 (2007. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/447 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

GO 1 N 33/483 (2006. 01)

GO 1 N 33/50 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 27/26 3 1 5 Z

GO 1 N 27/26 3 0 1 A

C 1 2 Q 1/68 A

GO 1 N 33/483 F

GO 1 N 33/50 P

請求項の数 8 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-110503 (P2002-110503)
 (22) 出願日 平成14年4月12日 (2002. 4. 12)
 (65) 公開番号 特開2003-302373 (P2003-302373A)
 (43) 公開日 平成15年10月24日 (2003. 10. 24)
 審査請求日 平成17年4月11日 (2005. 4. 11)

(73) 特許権者 000002185
 ソニー株式会社
 東京都港区港南1丁目7番1号
 (74) 代理人 100112874
 弁理士 渡邊 薫
 (72) 発明者 由尾 啓
 東京都品川区北品川6丁目7番35号
 ソニー株式会社内
 (72) 発明者 山本 拓郎
 東京都品川区北品川6丁目7番35号
 ソニー株式会社内

審査官 柏木 一浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビーズを用いた生化学的分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも次の(1)、(2)、(3)の手順が含まれる生化学的分析方法。

(1) 光学的又は電氣的に識別可能とされたビーズ表面に固定された検出用一本鎖ヌクレオチドに対して、標的一本鎖ヌクレオチドをハイブリダイゼーション反応させる反応手順

(2) 前記反応手順を経て得られる前記ビーズが存在する電解液に対して直流電界及び/又は交流電界を印加する電界印加手順。

(3) 前記電界印加手順を経て得られる前記ビーズの泳動状態に基づき、前記相互反応を解析する相互反応解析手順。

【請求項 2】

少なくとも次の(1)、(2)、(3)の手順が含まれる生化学的分析方法。

(1) 光学的又は電氣的に同一種に識別されるビーズ毎に異なる検出用物質を固定し、該検出用物質に対して標的物質を相互反応させる反応手順。

(2) 前記反応手順を経て得られる前記ビーズが存在する電解液に対し、異なる前記検出用物質毎にそれぞれ独立の電解液流路で直流電界及び/又は交流電界を印加する電界印加手順。

(3) 前記電界印加手順を経て得られる前記ビーズの泳動状態に基づき、前記相互反応を解析する相互反応解析手順。

【請求項 3】

前記検出用物質は、一本鎖又は二本鎖のヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、低分子化合物、糖、リポソームその他の生体物質のいずれかであって、電解液中で電荷を有し、該電荷の駆動力により泳動可能な物質であることを特徴とする請求項2に記載の生化学的分析方法。

【請求項4】

少なくとも次の(1)、(2)、(3)、(4)の手順が含まれる生化学的分析方法。

(1) 光学的又は電氣的に識別可能とされたビーズ表面に固定された検出用物質に対して、標的物質を相互反応させる反応手順。

(2) ビーズ表面に結合している反応物質を電氣的に振動させることによって、検出用物質から反応不十分な標的物質を解離させる解離手順。

(3) 前記解離手順を経て得られる前記ビーズが存在する電解液に対して直流電界及び/又は交流電界を印加する電界印加手順。

(4) 前記電界印加手順を経て得られる前記ビーズの泳動状態に基づき、前記相互反応を解析する相互反応解析手順。

【請求項5】

少なくとも次の(1)、(2)、(3)の手順が含まれる生化学的分析方法。

(1) 光学的又は電氣的に識別可能とされた磁気ビーズ表面に固定された検出用物質に対して、標的物質を相互反応させる反応手順。

(2) 前記反応手順を経て得られる前記磁気ビーズが存在する電解液に対して直流電界及び/又は交流電界を印加する電界印加手順。

(3) 前記電界印加手順を経て得られる前記磁気ビーズを、電磁誘導によって発生する電流を検出することによって電氣的に識別することにより、前記磁気ビーズの泳動状態を検出し、該泳動状態に基づき、前記相互反応を解析する相互反応解析手順。

【請求項6】

少なくとも次の(1)、(2)、(3)、(4)の手順が含まれる生化学的分析方法。

(1) 光学的又は電氣的に識別可能とされたビーズ表面に固定された検出用一本鎖ヌクレオチドに対して、標的一本鎖ヌクレオチドをハイブリダイゼーション反応させる反応手順。

(2) 前記反応手順を経て得られる前記ビーズが存在する電解液に対して直流電界及び/又は交流電界を印加する電界印加手順。

(3) 前記電界印加手順を経て得られる前記ビーズの泳動状態に基づき、前記相互反応を解析する相互反応解析手順。

(4) 電解液流路中を電極側に泳動してきた前記ビーズを回収し、該ビーズに結合している二本鎖ヌクレオチドの標的ヌクレオチド鎖をPCR増幅して、該標的ヌクレオチド鎖の塩基配列を決定する塩基配列決定手順。

【請求項7】

前記(2)の電界印加手順は、ビーズに保持された物質の電荷量に応じた移動速度の差異によりビーズを分別する手順であることを特徴とする請求項1記載の生化学的分析方法。

【請求項8】

検出用物質と標的物質の相互反応を検出する生化学的分析装置であって、

光学的又は電氣的に同一種に識別可能で同一種毎に異なる前記検出用物質が固定されたビーズを、該ビーズに保持された物質の電荷量に応じて、電界により同一種のビーズ毎に移動させるそれぞれ独立した電解液流路と、

前記電解液流路へ直流電界及び/又は交流電界を印加するための電界印加手段と、

前記ビーズの泳動状態を光学的又は電氣的に識別可能な読み取りセンサーと、

を備える生化学的分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の変異解析、遺伝子発現解析、多型解析、分子間相互反応のカイネティクス等に有用な生化学的分析方法に関する。詳しくは、ヌクレオチド等の物質を固定するための担体として機能するビーズの表面において、ハイブリダイゼーション反応等の相互反応を行った後に、電気泳動に基づきアクティブな反応を示したビーズを分別する手法を含む生化学的分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、「DNAチップ」と総称する。）と称されるバイオアッセイ用の分子集積基板が、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始めている。

10

【0003】

このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。

【0004】

DNAチップによる解析手法の一例を簡潔に説明すれば、ガラス基板やシリコン基板上に固相化されたDNAプローブに対して、細胞、組織等から抽出したmRNAを逆転写PCR反応等によって蛍光プローブdNTPを組み込みながらPCR増幅し、前記基板上においてハイブリダイゼーションを行い、所定の検出器で蛍光測定を行うという手法である。

20

【0005】

ここで、DNAチップは二つのタイプに分類できる。第1のタイプは、半導体露光技術を応用したフォトリソグラフィーの技術を用いて、所定の基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成していくものであり、アフィメトリクス社（Affymetrix社）によるものが代表的である（例えば、特表平4-505760号公報参照）。この種のチップは、集積度は高いが、基板上でのDNA合成には限界があって、数十塩基程度の長さである。第2のタイプは、「スタンフォード方式」とも称されるもので、先割れピンを用いて、予め用意されたDNAを基板上に分注・固相化していくことによって作製されるものである（例えば、特許3272365号公報参照）。この種のチップは、集積度は前者に比べて低い

30

【0006】

また、現在、プロテインチップを含むバイオセンサーチップと称される、薄い平板上に設けられた微小な検出表面部位に所定の検出用物質を固相化し、この検出用物質に対して、標的物質を含む溶液を微量通水し、両物質の相互反応を表面プラズモン共鳴原理や水晶発振子等の原理を用いて観察・分析するバイオセンサー技術が進展しており、抗体抗原反応やホルモン応答反応等の物質間相互反応の分析における有用な技術となっている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記した従来のDNAチップ技術は、二次元である基板の狭小なスポット部位においてDNAプローブ等のヌクレオチドを固相化（固定化）し、ハイブリダイゼーション反応を行う技術であるため、空間的にヌクレオチド分子の自由度が制限される。また、ハイブリダイゼーション反応の際に立体障害が発生する可能性がある。これらの理由から、従来のDNAチップ技術では、ハイブリダイゼーション反応の効率が悪く、反応時間が長い傾向があるという技術的課題があった。

40

【0008】

また、既述したバイオセンサー技術においては、ナノリッターレベルの極微量溶液の取り扱いが難しく、ハイスル・プット化するには、高度な熟練技術が必要となる等の技術的課題があり、加えて、当該技術を実施するための装置又はシステムが非常に高価であった。

50

【 0 0 0 9 】

そこで、本発明の主な目的は、光学的又は電氣的に識別可能なビーズ表面で、ハイブリダイゼーション等の物質間相互反応を行う技術と、電気泳動によるビーズ分別技術等を駆使することによって、反応効率を向上させるとともに、全体の手順が簡易な生化学的分析方法を提供することにある。

【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】

上記技術的課題を解決するために、まず、本願においては、(1) 光学的又は電氣的に識別可能とされたビーズ表面に固定された検出用物質に対して、標的物質を液相中で相互反応させる反応手順、(2) 前記反応手順を経て得られる前記ビーズが存在する電解液に対して直流電界及び/又は交流電界を印加する電界印加手順、これら(1)、(2)の手順を少なくとも含む生化学的分析方法を提供する。

10

【 0 0 1 1 】

ここで、本発明に係る生化学的分析方法では、微小なビーズを検出用物質及び反応物質(検出用物質と標的物質が結合した物質)の担体並びにカウンターウェイトとして機能させることによって、該ビーズ群を所定の電解液流路中に投入し、ビーズに保持された物質の電荷量に応じた駆動力による泳動を行って、ビーズの分別を行う。

【 0 0 1 2 】

即ち、ビーズに固定化された検出用物質とサンプル溶液中の標的物質がアクティブな反応を示した場合には、ビーズ表面に保持されている物質の電荷総量に応じてクーロン力の大小が発生し、このクーロン力の差異が移動速度の差になって現出する。より具体的には、ビーズに固相化された検出用物質とサンプル溶液中の標的物質がアクティブな反応を示した場合には、当該ビーズに保持された反応物質のクーロン力が歴然として大きくなる。

20

【 0 0 1 3 】

ここで、本発明において使用することができるビーズは、手段を問わず、光学的又は電氣的に識別可能な構成とされた微小なビーズである。また、各ビーズに固定された検出用物質の種類は予め記録しておくことも必要である。本発明では、光学的又は電氣的に識別可能とされたビーズ自体を検出すればよいので、従来は必須であった反応物質の蛍光標識やR I 標識は不要となる。

【 0 0 1 4 】

ビーズの光学的識別方法としては、ビーズの色調を変える方法を採用でき、例えば、2色のシアニン色素C y 3 , C y 5 を混合して染色を施し、各蛍光色素の含有割合によって色の階調が施されたビーズ群や、複数の蛍光色素を混合することなく組み合わせ、色分けしたビーズ群等を採用することができる。なお、ビーズは輪郭がはっきりしているので、光学的に高解像度で読み取ることができ、低価格の光学システムを採用できるという利点がある。

30

【 0 0 1 5 】

ビーズの電氣的識別方法としては、例えば、磁気ビーズを用い、電磁誘導によって発生する電流を検出することによって電氣的に識別することができる。磁気ビーズを用いる場合、例えば、泳動開始地点となる電極側に磁石を配置しておくことにより、電解液流路中に投入されたビーズ群を一旦電極側に留めおくことが可能となる。これにより、ビーズの泳動を開始する前のビーズ群の自由拡散を防止することができる。なお、ビーズの泳動の開始と同時に、前記磁石の磁力が磁気ビーズに及ばないように工夫する。

40

【 0 0 1 6 】

これにより、光学的又は電氣的にビーズを識別できる所定の読み取りセンサーを用いて、どの種のビーズが、迅速に移動し、又はゆっくりと移動し、又は移動しなかったのか、を的確に把握することができるので、標的物質と検出用物質の相互反応の有無、反応強度、親和性、塩基配列の相補性等を容易に追跡することができる。即ち、本発明に係る生化学的分析方法は、遺伝子の変異解析、遺伝子発現解析、多型解析、分子間相互反応のカイネティクスの解析、抗原抗体反応やホルモン応答反応等の解析に利用できる。

50

【 0 0 1 7 】

なお、ビーズ表面には、各種検出用物質を固定できるように、検出用物質との結合部位を備える物質をコーティングする。そして、前記コーティング処理後のビーズ表面には、一本鎖又は二本鎖の全長又は断片のヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、脂質、低分子化合物、糖、リボソームその他の生体物質等の検出用物質を固相化しておく。光学的又は電氣的に同一種として識別されるビーズ毎に、異なる前記検出用物質をそれぞれ固定しておくこともできる。

【 0 0 1 8 】

本発明では、異なる前記検出用物質毎に、それぞれ独立の電解液流路で前記電界印加手順を行ってもよい。

10

【 0 0 1 9 】

また、ビーズ表面に結合している反応物質を電氣的に振動させることによって、検出用物質から反応不十分な標的物質を解離させる手順を採用してもよい。例えば、電解液に A C (Alternating current) 電界をかけて、ビーズ表面に不十分な結合状態 (例えば、ミスハイブリ) で留まっている標的物質に振動を加え、物理的に検出用物質から解離させることができる。このような解離手順によれば、反応手順を経たビーズ群を、「アクティブな反応を示した物質を保持するビーズ」と「検出用物質のみが固定された未反応状態のビーズ」に大別することができる。この結果、電解液流路中においてビーズ群を一方の電極側と他方の電極側に二分することができる。

【 0 0 2 0 】

20

また、前記解離手順を採用することによって、既存の D N A チップ、プロテインチップその他のバイオセンサーチップにおいて必須とされる洗浄、乾燥手順が全く不要となるという利点がある。即ち、洗浄液の組成や洗浄条件の選定に関する余計な配慮が不要となり、また、洗浄、乾燥手順自体も不要であるので、分析作業全体を簡略化できる。

【 0 0 2 1 】

検出用物と標的物質が共に一本鎖ヌクレオチドであって、前記反応手順がハイブリダイゼーション反応である場合では、前記 (2) の手順後に、電解液流路中を一方の電極側に泳動してきた前記ビーズを回収し、該ビーズに結合している二本鎖ヌクレオチドの標的ヌクレオチド鎖を P C R 増幅して、該標的ヌクレオチド鎖の塩基配列を決定することもできる。

30

【 0 0 2 2 】

なお、本願においてハイブリダイゼーションなる用語は、デオキシリボ核酸 (D N A) 、リボ核酸 (R N A) 、ポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドを包含する全ての天然又は合成の核酸並びに核酸誘導体の間における全ての相補鎖形成反応を包含する。

【 0 0 2 3 】

次に、本発明は、上記方法発明に加えて、光学的又は電氣的に識別可能なビーズに保持された物質の電荷量に応じて、該ビーズを電界により移動させる電解液流路と、前記電解液流路へ直流電界及び / 又は交流電界を印加するための電界印加手段と、を備える生化学的分析装置を提供する。なお、ビーズの前記回収作業を容易化する目的で、使用する電解液流路には、電極側に集まってきたビーズを槽外に簡易に排出・回収できる構造を付設してもよい。

40

【 0 0 2 4 】

以上のように、本発明は、基板上の狭小なスポット部位においてハイブリダイゼーションを行う構成である D N A チップとは全く異なる構成の網羅的遺伝子解析手段、並びに薄板状のセンサーチップの狭小な検出表面で物質間の相互反応を進行させるバイオセンサーチップとは全く異質な構成の網羅的相互反応解析手段を提供するという技術的意義を有している。

【 0 0 2 5 】

ビーズ表面は、従来の D N A チップの基板上のスポット部位やセンサーチップの薄板上の検出表面部位に比して、表面積が大きく、また反応空間も広いので、物質の自由度が大

50

きく、相互反応の際の立体障害も大きな問題にならない。このため、ハイブリダイゼーションその他の相互反応を効率良く進行させ、反応を短時間で完了させることができる。

【 0 0 2 9 】

【 発明の実施の形態 】

以下、添付図面にに基づき、本発明の好適な実施形態について説明する。まず、図 1 は、本発明に係る生化学的分析方法で用いられるビーズの一実施形態を表す図、図 2 は、同ビーズのコーティング処理について説明する図、である。

【 0 0 3 0 】

図 1 , 図 2 中の符号 1 は、本発明に係る生化学的分析方法に好適な球形のポリスチレン製ビーズである。該ビーズ 1 は、2 種類の蛍光色素 Cy 3 (蛍光波長 5 7 0 n m、励起波長 5 4 3 n m)、Cy 5 (蛍光波長 6 7 0 n m、励起波長 6 3 3 n m) の含有割合を段階的に変えることによって染色が施され、本実施形態では、 $10 \times 10 = 100$ 階調のビーズ 1 群が作製されている。なお、ビーズ 1 の階調数は、必要に応じて適宜決定でき、100 階調に限定されない。

【 0 0 3 1 】

これらのビーズ 1 は、2 波長 (6 5 7 n m、7 2 0 n m) のレーザー光を出射する構成の光学センサーによって色調が読み取られ、識別可能とされる。なお、ビーズ 1 は光学的に識別可能な構成であれば採用可能である。なお、本発明では、光学的に識別できるビーズ 1 に換えて、磁気ビーズを用い、電磁誘導によって発生する電流を検出することによって識別方法を使用することも可能である。

【 0 0 3 2 】

次に、図 2 に示すように、ビーズ 1 は、様々な検出用物質を固定するために適したコーティング処理が施される。例えば、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、ストレプトアビジン、NTA (ニトリロ三酢酸) 等によってコーティング処理を行い、更にリンカーやキャプチャーを結合させる等して、ビーズ 1 の表層膜 101 を形成する。なお、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基は、これらの官能基との結合部位を備える分子の固相化に適しており、ストレプトアビジンはビオチン化した DNA 断片やビオチン化リガンドの固定に適しており、NTA は、His - Tag タンパク質の固定に適している。

【 0 0 3 3 】

次に、ビーズ 1 には、所定のバッファー溶液中において検出用物質を固定する。検出用物質は、一本鎖又は二本鎖のヌクレオチド (全長又は断片、DNA と RNA の双方を含む。)、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、低分子化合物、リボソームその他の生体物質のいずれかを分析目的に合わせて選択する。

【 0 0 3 4 】

検出用物質が一本鎖ヌクレオチドの場合は、標的ヌクレオチドとのハイブリダイゼーション反応の分析に利用でき、二本鎖ヌクレオチドの場合は、該ヌクレオチドの所定配列部位とレセプター分子との間の特異的結合等から構成されるホルモン応答反応等の分析に利用できる。なお、前記ホルモン応答反応は、内分泌攪乱物質の分析等に有用である。また、検出用物質がヌクレオチドの場合、ヌクレオチドの T_m (melting Temperature) 又は GC 含有率によってビーズをグルーピングし、グループ毎に反応場を区別することにより、最適なバッファー溶液の組成又は温度条件の下で、ハイブリダイゼーション反応を行わせるように工夫することができる。この工夫によれば、一律の反応条件でハイブリダイゼーションを行わなければならない既存の DNA チップに比して、ハイブリダイゼーション反応を高精度に行うことができる。

【 0 0 3 5 】

図 3 (A) には、ビーズ 1 に検出用物質 2 として機能する一本鎖ヌクレオチドが固定された状態のビーズを模式的に示されている。なお、ビーズ 1 の表面には実際は多数の一本鎖ヌクレオチドが固定されることになるが、図 3 では、説明の便宜上省略して示している。このように検出用物質 2 が固定されたビーズは、プローブビーズと称することも可能であ

10

20

30

40

50

ろう。

【 0 0 3 6 】

図 3 (B) は、検出用物質 2 として機能する一本鎖ヌクレオチドに対して、標的物質 3 である一本鎖ヌクレオチドがアクティブにハイブリダイゼーションした状態を模式的に示している。

【 0 0 3 7 】

この図 3 (B) に示す例では、検出用物質 2 と標的物質 3 がアクティブに相互反応を示した場合は、当該ピーズ 1 が保持する負電荷量が増加するので、該ピーズ 1 は、例えば、DC 電界をかけた電解液流路中では、迅速に正電極側に移動することになる。

【 0 0 3 8 】

図 4 は、電解液流路中におけるピーズ 1 の移動の様子を模式的に示した図である。

【 0 0 3 9 】

符号 4 で示す電解液流路は、槽状に形成してもよく、基板上に細長のキャピラリー状に形成する構成でも採用可能であり、またマルチチャンネル化しても良いのであって、流路の形態は狭く限定されない。光学的（又は電氣的に）同一種に識別されるピーズ毎に、異なる検出用物質を固定する場合は、それぞれ独立の電解液流路で電界による泳動を行うようにする。電解液流路 4 に DC 電界を印加する場合は、一端部に負電極として機能させる電極 4 1、他端部に正電極として機能させる電極 4 2 を形成し、導通可能とする。なお、電気泳動する物質の電荷によって、正負電極の配置は適宜決定する。

【 0 0 4 0 】

電解液流路 4 には低融点アガロースゲル等の電解液 R が充填されている。電極 4 1 の近傍には、ハイブリダイゼーション等の反応手順が完了したピーズ 1 群が含有されているサンプル溶液 S を添加する。このサンプル溶液 S は、電解液流路 4 に設けられた、開閉可能な開口部 4 4 から注入できるように工夫できる。電解液流路 4 中に添加されてきたサンプル溶液 S 中のピーズ 1 群は、電極 4 1 近傍の移動開始領域 4 3 に一次滞留させておくようにする。

【 0 0 4 1 】

なお、ピーズ 1 として磁気ピーズを採用することも可能である。この場合には、前記移動開始領域 4 3 に磁石 M を配置し、この磁石 N の磁力によって磁気ピーズ群を移動開始領域 4 3 内に確実に留めておくことができるようになる。そして、電解液 R に電界 E をかける際には、前記磁力を解除して、電界による泳動を行うようにすることができる。この結果、泳動開始前に、拡散やブラウン運動等によってピーズ 1 群が移動してしまうのを防止できるので、電界 E のみの作用によって生ずる移動を観察し易くなる。

【 0 0 4 2 】

ここで、上記電解液 R に、例えば、DC 電界をかけると、ピーズ 1 群は、ピーズ 1 に保持された物質の電荷量（クーロン力）に応じた速度で、正電極として機能する電極 4 2 側に移動することになる。図 4 中に示す符号 1 a は、アクティブな反応を示したピーズ群を模式的に示し、符号 1 b は、反応が不十分であったピーズ群、符号 1 c は、アクティブな反応を全く示さなかったピーズ群を示している。

【 0 0 4 3 】

ピーズ 1 a 群は、短時間の内に迅速に電極 4 2 に引き寄せられて移動し、一方のピーズ 1 b 群は、ゆっくりと移動する。即ち、ピーズ 1 a とピーズ 1 b、1 c では、保持されている物質の電荷量に応じて、その泳動の速度に歴然とした違いが生じ、その速度差に応じてピーズ 1 の色調に基づくバンドが電解液流路 4 に形成される。どの種のピーズが速く移動して正電極部 4 2 側に集まり、どの種のピーズがゆっくり移動するかを確認することによって、検出用物質 2 と標的物質 3 との反応状況を確認できる。

【 0 0 4 4 】

ここで、電解液 R に DC 電界をかける前又は同時に、低・中周波数の AC 電界をかけることによって、ピーズ 1 群に保持されている物質を電氣的に振動させ、アクティブな反応を示さなかった標的物質 3 を、検出用物質 2 から解離させるように工夫してもよい。

10

20

30

40

50

【0045】

この解離手順によって、反応不充分（ミスハイブリダイゼーション等）であったビーズ1 b群から標的物質3を解離させることができるため、電解液R中のビーズ1群を、アクティブな反応を示したビーズ1 a群と、アクティブな反応を全く示さなかったビーズ1 c群に二分することが可能となる。この結果、既存のDNAチップやバイオセンサーチップ等のような面倒な洗浄・乾燥手順を行う必要がなくなるので、作業効率が非常によい。

【0046】

次に、正電極部4 2側に移動したビーズ1 a群を回収し、読み取り装置によってビーズ1 aの色調を解析することによって、どの種の検出用物質と標的物質がアクティブな反応を示したかを容易に把握できる。

10

【0047】

なお、電解液流路4からのビーズ1群の回収は、ビーズが集まる電極4 2側の好適位置に設けた開閉可能な開口部4 5から自動的に取り出すことができるようにしてもよい。

【0048】

ここで、本発明に係る生化学的分析方法では、検出用物質2と標的物質3が、共に一本鎖ヌクレオチドであって、即ち上記反応手順がハイブリダイゼーション反応である場合には、電界による泳動に基づく上記分別手順の後に、電解液流路4中の電極4 2側に移動したビーズ1 a群を回収し、該ビーズ1 a群に保持された二本鎖ヌクレオチドの標的ヌクレオチド鎖をPCR増幅処理し、シーケンシングすることによって、該標的ヌクレオチド鎖の塩基配列を容易に知ることができる。

20

【0049】

【実施例】

本発明に係る生化学的分析方法の有効性を検証すべく、ビーズに一本鎖の25塩基のDNAプローブを固定してプローブビーズを作製した。このプローブビーズのcDNAプローブと所定のmRNAをハイブリダイゼーションさせたビーズとハイブリダイゼーションさせなかったビーズの両方を、同条件の電解液中に添加して電気泳動させ、その移動速度の差を調べた。両ビーズの移動速度の差異が観察できれば、本発明方法の有効性が実証されることになる。

【0050】

<ビーズの前処理>

30

まず、ダイナル(DYNAL)社のmRNADirectKit(製品番号:No.610.11と610.12)のDynabeads Oligo dt25の1mL入りチューブ(「1チューブ」と称する。)を軽く振って、底に沈んでいたビーズ群(比重1.6、直径2.8μm)を均一に懸濁させた。次に、1.5μLのマイクロセントリフュージチューブ(「2チューブ」と称する。)をダイナル(Dynal)社のMPCマグネットスタンドに立て、前記1チューブから10μLの懸濁液を採取し分注した。30秒経過後、ビーズがマグネットに引きつけられて懸濁液が清澄になったら、液体をピペットで吸い取って捨てる。2チューブをMPCマグネットスタンドから取り出して、容量10μLのLysis/Bindingバッファー液を注入し、該チューブを再び軽く振って再懸濁させ、保管した。

40

【0051】

<mRNAの抽出>

凍結保存されていたマウスの脳組織の保存液を10μL採取して、1.5mLのマイクロセントリフュージチューブに分注し、20μLのクロロホルムを添加し、30秒ボルテックスミキサーにて攪拌した。続いて、該チューブを遠心機にセットして、1万rpm条件で30秒遠心した。遠心終了後、チューブ上側の水層のみを注意深くピペットで吸い取り、RNaseフリーのマイクロセントリフュージに分注し、更にLysis/Bindingバッファー液を20μL添加した。次に、チューブを回転式ミキサーに取り付け、2分間回転させて細胞壁を溶解させた。次に、遠心機にかけ、1万rpmで1分間回転し、異物を沈降させ、上清を別のチューブに取り出した。

50

【 0 0 5 2 】

< 反応手順 (ハイブリダイゼーション) >

段落 0 0 4 9 で準備したビーズと、段落 0 0 5 0 の手順で準備した mRNA の抽出液を混合し、常温で 3 ~ 5 分反応させた。そして、ダイナル (D y n a l) 社の MPC マグネットスタンドに設置し、30 秒清澄するのを待った。次に上清を全て捨て、チューブを前記スタンドから外し、mRNA 抽出液を 10 μ l 分注した。チューブをローテーター又は揺動機に載置して、室温下 3 ~ 5 分間インキュベートした。続いて、チューブを前記スタンドに再び設置し、1 分間待機し、上清をピペットで吸引除去した。上記キットの洗浄バッファー液 A を 20 μ l 加え、軽く振って前記スタンドに立てて、上清を除く作業を 2 回繰り返してから、上記キットの洗浄バッファー液 B を 20 μ l 加え、同様の作業で 1 回洗浄した。このサンプル溶液を氷温保存した。

10

【 0 0 5 3 】

< 電気泳動による分別手順 >

段落 0 0 4 3 で得たサンプル溶液および段落番号 0 0 4 9 の手順で準備したビーズ、即ちハイブリダイゼーションさせなかったビーズを別々にアガロースゲル溶液に加え、これらを別々のスライドガラスにセットし、電界をかけながら各々顕微鏡で調べた。具体的には、前記サンプル溶液に 50 μ l の 2 % 低融点アガロースゲルの T A E 溶液を加えて軽く振って懸濁させた。懸濁液を 10 μ l 採取し、スライドガラスの中央に滴下し、懸濁液に泡が入り込まないようにカバーガラスを慎重に被せ、周囲を高融点 1 % アガロースゲルで閉塞した。そして、スライドガラスを顕微鏡に設置し、DC 電界を 20 v / c m 、10 m A の条件でかけ、 $\times 200$ 倍率でビーズ群の移動速度を観察した。

20

【 0 0 5 4 】

< 結果 >

上記実験の結果、アクティブなハイブリダーゼーションを示したビーズは、正電極側に速やかに移動した。一方、アクティブなハイブリダイゼーションを示さなかったビーズの電気泳動速度は、歴然として遅く、電界を 30 v / c m に上げてても速やかな電気泳動は観察できなかった。このことから、本発明に係る生化学的分析方法の有効性が実証できた。

【 0 0 5 5 】

以上、本発明の実施形態並びに実施例は、ビーズ上においてハイブリダイゼーションを行う反応系を代表例として説明してきたが、本発明に係る生化学的分析方法は、ハイブリダイゼーションに限定されることなく、低・高分子間の相互反応の解析に有用な方法であって、ビーズに保持された物質の電荷量 (クーロン力) の差異に基づいて電界による泳動を行って、光学的又は電氣的に識別可能なビーズを分別する技術的思想を備えるものを広く包含する。

30

【 0 0 5 6 】

【 発明の効果 】

本発明に係る生化学的分析方法によれば、光学的又は電氣的に識別できる構成のビーズ表面で物質間の相互反応を行わせ、このビーズを、電界を用いた泳動により分別し、所定の読み取りセンサーを用いて、どの種のビーズが、電極側に迅速に移動し、又はゆっくりと移動し、又は移動しないか、を的確に把握することが可能となるので、標的物質と検出物質の相互反応の有無、反応強度、親和性、塩基配列の相補性等を容易に追跡することができる。また、ビーズは輪郭がはっきりしているので、光学的に高解像度で容易に読み取ることができるため、低価格の光学システムを使えるという利点もある。

40

【 0 0 5 7 】

従って、本発明に係る生化学的分析方法は、遺伝子の変異解析、遺伝子発現解析、多型解析、分子間相互反応のカイネティクスの解析、抗原抗体反応や酵素応答反応等の解析に利用できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 本発明に係る生化学的分析方法で用いられるビーズ (1) の一実施形態を表す図

【 図 2 】 同ビーズ (1) のコーティング処理について説明する図

50

【図 3】(A) 検出用物質 (2) として機能する一本鎖ヌクレオチドが固定された状態のビーズ (1) を模式的に示す図

(B) 同一一本鎖ヌクレオチドに対して、標的物質 (3) である一本鎖ヌクレオチドがアクティブにハイブリダイゼーションした状態を模式的に示す図

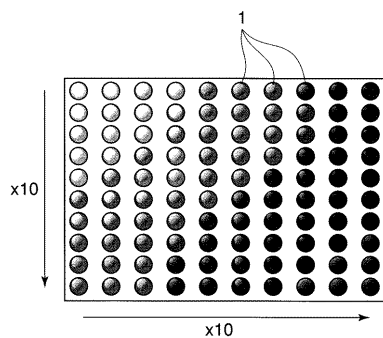
【図 4】電解液流路 (4) 中におけるビーズ (1) の移動の様子を模式的に示した図

【符号の説明】

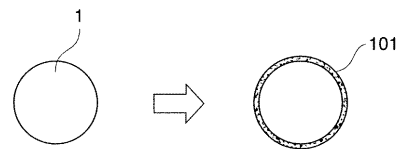
- 1 ビーズ
- 2 検出用物質
- 3 標的物質
- 4 電解液流路
- 4 1, 4 2 電極
- R 電解液

10

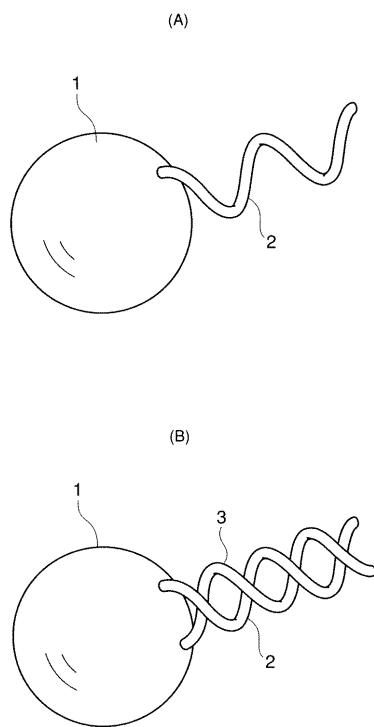
【図 1】



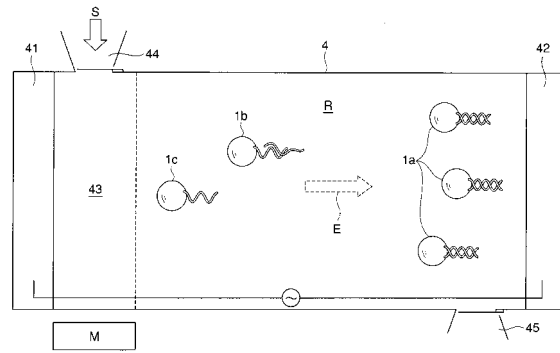
【図 2】



【図 3】



【図 4】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
G 0 1 N 33/66 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)		G 0 1 N 33/66	Z
G 0 1 N 33/92 (2006.01)		G 0 1 N 33/68	
		G 0 1 N 33/92	Z

(56)参考文献 特開平 0 8 - 2 5 6 7 5 5 (J P , A)
 特表平 0 7 - 5 0 3 0 7 2 (J P , A)
 特開昭 5 2 - 0 7 0 0 1 8 (J P , A)
 特表 2 0 0 2 - 5 0 3 3 3 4 (J P , A)
 特開 2 0 0 1 - 1 6 5 9 0 6 (J P , A)
 特開平 0 2 - 0 2 3 8 9 7 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 27/447
 C12Q 1/68
 G01N 33/483
 G01N 33/50
 G01N 33/53
 G01N 33/543
 G01N 33/566
 G01N 33/66
 G01N 33/68
 G01N 33/92