

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6643347号
(P6643347)

(45) 発行日 令和2年2月12日 (2020.2.12)

(24) 登録日 令和2年1月8日 (2020.1.8)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 M 1/00 (2006.01)
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)
C 1 2 Q 1/6853 (2018.01)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 Z N A A
 C 1 2 Q 1/6844 Z
 C 1 2 Q 1/6853 Z
 C 1 2 N 15/11 Z

請求項の数 15 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2017-543687 (P2017-543687)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月30日 (2015.10.30)
 (65) 公表番号 特表2018-500927 (P2018-500927A)
 (43) 公表日 平成30年1月18日 (2018.1.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/011605
 (87) 国際公開番号 W02016/068663
 (87) 国際公開日 平成28年5月6日 (2016.5.6)
 審査請求日 平成29年6月20日 (2017.6.20)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0149495
 (32) 優先日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)

前置審査

(73) 特許権者 514252784
 イファ ユニバーシティ・インダストリー
 コラボレーション ファウンデーション
 大韓民国 120-750 ソウル ソデ
 ムン-グ イファヨデーギル 52
 (73) 特許権者 517151073
 コリア・アドバンスト・インスティテュー
 ト・オブ・サイエンス・アンド・テクノロ
 ジー
 大韓民国、64141 テジョン、ユソ
 ン-グ、テハク-ロ 291
 (74) 代理人 100110423
 弁理士 曾我 道治
 (74) 代理人 100111648
 弁理士 梶並 順

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的遺伝子検出用微細流動装置、その製造方法、及びこれを用いた検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板と、

前記基板上に形成された試料溶液が外部から流入する流入口と、

前記試料流入口と連結されて流入した試料溶液を収容する第1流路と、

前記第1流路と連結された第2流路と、

前記第2流路と連結された排出口と、

前記第2流路上のコーティングと、

前記第2流路のコーティング上に固定されたプライマーと、

前記プライマーに相補的に結合されたテンプレートとを含み、

前記テンプレートは標的遺伝子と相補的に結合する結合部位、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位を含み、

前記標的遺伝子と相補的に結合する結合部位はテンプレートの両末端に分離されて形成され、前記プライマーに相補的に結合する結合部位は分離されて形成された前記ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位の間に形成された、標的遺伝子検出用微細流動装置であって、

前記第2流路は2乃至20個であり、前記第1流路の末端で各々の第2流路が分岐され、

各々の第2流路上に固定されたプライマーに結合された標的遺伝子検出用テンプレート

10

20

は互いに同一または相異なる遺伝子に結合する、標的遺伝子検出用微細流動装置。

【請求項 2】

前記第 2 流路は 5 - ヒドロキシドーパミン塩酸、ノルエピネフリン、エピネフリン、ピロガロールアミン、D O P A (3,4-Dihydroxyphenylalanine)、カテキン、タンニン類、ピロガロール、ピロカテコール、ヘパリン - カテコール、キトサン - カテコール、ポリエチレングリコール - カテコール、ポリエチレンジイミン - カテコール、ポリメチルメタクリレート - カテコール、ヒアルロン酸 - カテコール、ポリライシン - カテコール (Polylysine-catechol)、及びポリライシン (Polylysine) からなる群から選択された 1 以上でコーティングされた、請求項 1 に記載の標的遺伝子検出用微細流動装置。

【請求項 3】

前記プライマーは、チオール (thiol)、アミン (amine)、ヒドロキシル (hydroxyl)、カーボキシル (carboxyl)、イソチオシアネート (isothiocyanate)、N H S エステル、アルデヒド (aldehyde)、エポキシド (epoxide)、カーボネート (Carbonate)、H O B t エステル、グルタルアルデヒド (Glutaraldehyde)、カーバメート (carbamate)、イミダゾールカーバメート (imidazole carbamate)、マレイミド (maleimide)、アジリジン (aziridine)、スルホン (sulfone)、ビニルスルホン (vinylsulfone)、ヒドラジン (hydrazine)、フェニルアザイド (Phenyl azide)、ベンゾフェノン (benzophenone)、アントラキノン (anthraquinone)、及びジエン (Diene) 基からなる群から選択された 1 以上に末端が変形されたものである、請求項 1 に記載の標的遺伝子検出用微細流動装置。

【請求項 4】

前記コーティングは 5 - ヒドロキシドーパミン塩酸であり、前記プライマーは末端がチオールまたはアミン基に変形されたものである、請求項 1 に記載の標的遺伝子検出用微細流動装置。

【請求項 5】

前記標的遺伝子は、大腸菌 O - 1 5 7 : H 7 (Escherichia coli 0157 : H 7)、結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、炭疽菌 (Bacillus anthracis)、肺炎球菌 (Streptococcus pneumonia)、サルモネラ (Salmonella)、肝炎ウイルス A、B、C、D または E (Hepatitis A、B、C、D または E virus)、野兔病菌 (Francisella tularensis)、ペスト菌 (Yersinia pestis)、エルシニアエンテロコリチカ (Yersinia enterocolitica) 及びエボラウイルス (Ebola virus)、及びメルスコロナウイルス (MERS-Cov virus) からなる群から選択された 1 以上から由来した標的遺伝子である、請求項 1 に記載の標的遺伝子検出用微細流動装置。

【請求項 6】

前記テンプレートは、配列番号 1 乃至 4、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 16 からなる群から選択された、請求項 1 に記載の標的遺伝子検出用微細流動装置。

【請求項 7】

請求項 1 の標的遺伝子検出用微細流動装置と、

d N T P と、

リガーゼと、

等温核酸重合酵素と、を含む、標的遺伝子検出用微細流動装置キット。

【請求項 8】

前記リガーゼは D N A リガーゼであり、前記等温核酸重合酵素は p h i 2 9 ポリメラーゼである、請求項 7 に記載の標的遺伝子検出用微細流動装置キット。

【請求項 9】

染色試薬、高塩溶液 (high salt solution)、または蛍光試薬をさらに含む、請求項 7 に記載の標的遺伝子検出用微細流動装置キット。

【請求項 10】

請求項 1 の標的遺伝子検出用微細流動装置の前記テンプレートは、配列番号 1 乃至 4、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 16 からなる群から選択された、請求項 7 に

10

20

30

40

50

記載の標的遺伝子検出用微細流動装置キット。

【請求項 1 1】

標的遺伝子検出用微細流動装置を製造する方法であって、

(S 1) 基板、前記基板上に形成された外部から流入する流入口、前記流入口と連結されて流入した試料溶液を収容する第 1 流路、前記第 1 流路と連結された第 2 流路、及び前記第 2 流路と連結された排出口を含む微細流動装置を提供するステップ、

(S 2) 前記微細流動装置の第 2 流路をコーティングするステップ、

(S 3) 前記コーティングされた第 2 流路上にテンプレートと結合できるプライマーを固定化するステップ、及び

(S 4) 標的遺伝子と相補的に結合する結合部位、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、及びダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位を含むテンプレートを前記プライマーに結合させるステップを含み、

前記標的遺伝子と相補的に結合する結合部位はテンプレートの両末端に分離されて形成され、前記プライマーに相補的に結合する結合部位は分離されて形成された前記ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位の間に形成される、標的遺伝子検出用微細流動装置を製造する方法であって、

前記第 2 流路は 2 乃至 20 個であり、前記第 1 流路の末端で各々の第 2 流路が分岐され、

各々の第 2 流路上に固定されたプライマーに結合された標的遺伝子検出用テンプレートは互いに同一または相異なる遺伝子に結合する、標的遺伝子検出用微細流動装置を製造する方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 の標的遺伝子検出用微細流動装置を用いて標的遺伝子を検出する方法であって、

(S 1) 請求項 1 の標的遺伝子検出用微細流動装置を提供するステップ、

(S 2) 第 1 流路に試料溶液を流入させるステップ、

(S 3) 前記標的遺伝子検出用微細流動装置の第 2 流路に d N T P、リガーゼ、及び等温核酸重合酵素を添加するステップ、及び

(S 4) 増幅された遺伝子産物が凝集してハイドロゲルが前記第 2 流路及び前記排出口に形成され、該第 2 流路及び該排出口を塞ぐステップ、を含む、標的遺伝子を検出する方法。

【請求項 1 3】

前記ハイドロゲルの直径が 50 μ m ~ 5 mm である、請求項 1 2 に記載の標的遺伝子を検出する方法。

【請求項 1 4】

(S 5) 染色試薬、高塩溶液 (high salt solution)、または蛍光試薬を注入するステップをさらに含む、請求項 1 2 に記載の標的遺伝子を検出する方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 の標的遺伝子検出用微細流動装置の前記テンプレートは、配列番号 1 乃至 4、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 16 からなる群から選択された、請求項 1 2 に記載の標的遺伝子を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的遺伝子検出用装置、その製造方法、及びこれを用いた検出方法に関するものである。具体的に、本発明は遺伝子検出を通じての多様な病原菌を検出するための標的遺伝子検出用微細流動装置、その製造方法、及びこれを用いた検出方法に関するものである。

【0002】

より詳しくは、本発明は標的遺伝子を増幅させて微細流動装置の流路を選択的に塞ぐこ

10

20

30

40

50

とによって標的遺伝子検出が肉眼で識別可能な標的遺伝子検出用微細流動装置、その製造方法、及びこれを用いた標的遺伝子を検出する方法に関するものである。

【 0 0 0 3 】

本研究は、大韓民国未来創造科学部の財政支援を受けた韓国研究財団のバイオ医療技術開発事業及び跳躍研究者支援事業、保健福祉部の財政支援を受けた韓国保健産業振興院の保健医療技術研究開発事業の支援を受けて遂行された。

【背景技術】

【 0 0 0 4 】

今まで遺伝子を検出する技術はP C R方法を基礎にする方法が報告されてきた。直接P C Rを用いたS D T / R T - P C R (simple-direct tube RT-PCR) 方法及びP C R反応を阻害させる要素を除去し、感度を高めるために免疫学的方法を結合したI C / R T - P C R (Immunocapture RT-PCR) などが開発されて遺伝子検出に用いられてきた。

10

【 0 0 0 5 】

特に、病原菌感染による疾病に初期対処及び疾病の進行、拡散を防ぐためには、病原菌の感染の有無を迅速で、かつ正確に診断することが必要である。感染後、症状が表れる前である潜伏期の時、病原菌を診断できれば、伝染病の拡散を効果的に予防して大きい被害を止めることができる。

【 0 0 0 6 】

現在まで開発された方法は病原菌の診断のための培養と検出に多い時間と人力が消耗され、感染有無判断の正確度が落ちる問題点があるだけでなく、熱循環器 (Thermal cycler) 装置をはじめとして外部から電源供給が要求される機械または装置を必要とし、同時に多数の病原菌に対する検出が困難であるという問題点がある。

20

【 0 0 0 7 】

P C Rキットを用いた診断方法の場合、熱循環器 (Thermal cycler) 装置を必須的に必要とするだけでなく、P C Rを行う場合、各々のサイクリング温度、時間、緩衝液の条件などを一致させ難いので、多数の病原菌を一度に検出することが困難であるという問題点がある。

【 0 0 0 8 】

ここに、検出費用と時間を低減しながらも簡便で、かつ正確に病原菌などの標的遺伝子を検出することができる方法の開発が求められている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 9 】

【特許文献1】国内公開特許第2010-0053831号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は外部から電源供給や熱循環器 (thermal cycler) 装置をはじめとする特別な装置無しで、如何なる環境でも簡便で、かつ正確に標的遺伝子を検出することができる標的遺伝子検出微細流動装置、その製造方法、及びこれを用いた検出方法を提供するものである。

40

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

前記課題を解決するために、本発明は標的遺伝子検出微細流動装置、その製造方法、及びこれを用いた検出方法を提供する。以下、各々の発明に対して詳細に説明する。

【 0 0 1 2 】

標的遺伝子検出のための微細流動装置

本発明の一具体例によれば、

基板；

前記基板上に形成された試料溶液が外部から流入する流入口；

50

前記試料流入口と連結されて流入した試料溶液を収容する第 1 流路；
前記第 1 流路と連結された第 2 流路；
前記第 2 流路と連結された排出口；
前記第 2 流路上のコーティング；
前記第 2 流路のコーティング上に固定されたプライマー；及び
前記プライマーに相補的に結合されたテンプレートを含み、
前記テンプレートは標的遺伝子と相補的に結合する結合部位、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位を含み、

前記標的遺伝子と相補的に結合する結合部位はテンプレートの両末端に分離されて形成され、前記プライマーに相補的に結合する結合部位は分離されて形成された前記ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位の間に形成された標的遺伝子検出用微細流動装置を提供する。

【 0 0 1 3 】

即ち、言い換えると、本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置は、基板、流入口、第 1 流路、第 2 流路と連結された排出口を含む装置である。前記装置の第 2 流路はコーティングされており、コーティング上にはプライマーが固定されており、前記固定されたプライマーにはテンプレート（標的遺伝子検出用テンプレート）が結合されている。前記テンプレートの線形構造は「第 1 標的遺伝子結合部位」-「（ダンベル形態を形成するための）第 1 テンプレート内の相補的な結合部位」-「プライマー結合部」-「（ダンベル形態を形成するための）第 2 テンプレート内の相補的な結合部位」-「第 2 標的遺伝子結合部位」構造である。即ち、前記装置に固定されたプライマーに、テンプレートのプライマー結合部が結合されており、前記プライマー結合部の 1 末端には「第 1 標的遺伝子結合部位」-「（ダンベル形態を形成するための）第 1 テンプレート内の相補的な結合部位」が存在し、他の末端には「（ダンベル形態を形成するための）第 2 テンプレート内の相補的な結合部位」-「第 2 標的遺伝子結合部位」が存在する構造である。

【 0 0 1 4 】

試料内に標的遺伝子が存在する場合、標的遺伝子はテンプレートの第 1 標的遺伝子結合部位と第 2 標的遺伝子結合部位に同時に結合する。すると、第 1 テンプレート内の相補的な結合部位と第 2 テンプレート内の相補的な結合部位が互いに近くなって相補的な結合を形成するようになる。したがって、テンプレートが図 2 B で観察されるような、第 1 標的遺伝子結合部位と第 2 標的遺伝子結合部位との間にネッキ（nick）が存在するダンベル（dumbbell）形態になるものである。

【 0 0 1 5 】

即ち、本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置は、
基板；
前記基板上に形成された、試料溶液が外部から流入する流入口；
前記試料流入口と連結されて流入した試料溶液を収容する第 1 流路；
前記第 1 流路と連結された第 2 流路；
前記第 2 流路と連結された排出口を含む標的遺伝子検出用微細流動装置であって、
前記第 2 流路の表面はコーティングされており；
前記コーティング上にプライマーが固定され；
前記固定されたプライマーには標的遺伝子検出用テンプレートが結合されており、
前記標的遺伝子検出用テンプレートは、前記プライマーに相補的に結合するプライマー結合部、前記プライマー結合部の一末端に結合された第 1 テンプレート内の相補的な結合部位 - 第 1 標的遺伝子結合部位、及び前記プライマー結合部の他の末端に結合された第 2 テンプレート内の相補的な結合部位 - 第 2 標的遺伝子結合部位を含む、標的遺伝子検出用微細流動装置である。

【 0 0 1 6 】

本発明の一具体例によれば、前記第 2 流路は第 1 流路と連結されて 2 つ以上、好ましく

10

20

30

40

50

は2つ乃至20個に分岐される形状を有することができる。前記第2流路の分岐は検出対象である標的遺伝子に対するテンプレートの数によって変わることができる。例えば、標的遺伝子テンプレートが2であれば、これに対応して第2流路の分岐の数が2または標的遺伝子テンプレート及び対照群を含んで3でありうる。例えば、標的遺伝子テンプレートが1であれば、これに対応して第2流路の分岐の数が1または標的遺伝子テンプレート及び対照群を含んで2でありうる。

【0017】

前記試料排出口は第2流路の分岐数と同一でありうる。例えば、前記試料排出口は第2流路の分岐数のように2つ以上、好ましくは2つ乃至20個でありうる。

【0018】

本発明の一具体例によれば、第2流路上にプライマーの固定を容易にするために、第2流路はプライマーと互いに結合できる官能基を有するようにコーティングできる。前記プライマーやはり第2流路上の官能基と結合できる官能基を有するように変形できる。

【0019】

本発明の一具体例によれば、本発明の微細流動装置の第2流路はピロガロールアミン(Pyrogallol amine)、例えば5-ヒドロキシドーパミンHCl(5-hydroxydopamine HCl)によりコーティングできる。

【0020】

1つの前記プライマーの末端は多様な官能基を有するように変形できるが、例えば、チオール(thiol)、アミン(amine)、ヒドロキシル(hydroxyl)、カーボキシル(carboxyl)、イソチオシアネート(isothiocyanate)、NHSEステル、アルデヒド(aldehyde)、エポキシド(epoxide)、カーボネート(Carbonate)、HOBtエステル、グルタルアルデヒド(Glutaraldehyde)、カーバメート(carbamate)、イミダゾールカーバメート(imidazole carbamate)、マレイミド(maleimide)、アジリジン(aziridine)、スルホン(sulfone)、ビニルスルホン(vinylsulfone)、ヒドラジン(hydrazine)、フェニルアザイド(Phenyl azide)、ベンゾフェノン(benzophenone)、アントラキノン(anthraquinone)、及びジエン(Diene)基からなる群から選択された1以上に末端が変形できる。

【0021】

本発明の一具体例として、前記第2流路のコーティングが5-ヒドロキシドーパミン塩酸であり、前記プライマーは末端がチオールまたはアミン基に変形されたものでありうる。

【0022】

本発明の一具体例によれば、前記テンプレートは標的遺伝子、例えば、病原菌遺伝子の長さ、プライマーの長さなどを考慮して、多様に長さと配列をデザインすることができる。本発明の一具体例によれば、前記テンプレートの長さは40乃至160merでありうる。本発明で、前記テンプレートの長さがあまり短ければ不安定で、あまり長ければRCA効率が減少することがある。

【0023】

本発明の一具体例によれば、前記テンプレートは病原菌遺伝子と相補的に結合する結合部位(complementary to pathogen)がテンプレートの両末端に分離されて形成され、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位(complementary region to make dumbbell shape)が前記両末端の病原菌遺伝子と相補的に結合する結合部位に隣接して分離されて形成され、プライマーに相補的に結合する結合部位(Primer binding region)は前記ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位の間に形成される(図2のA参照)。

【0024】

本発明の一具体例によれば、テンプレートは10乃至40mer長さの標的遺伝子と相補的に結合する結合部位、10乃至40mer長さのプライマーに相補的に結合する結合部位、20乃至80mer長さのダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的

10

20

30

40

50

な結合部位を含む総40乃至160mer長さのテンプレートでありうる。

【0025】

本発明の一具体例によれば、標的遺伝子検出用微細流動装置に注入される試料溶液は血液、唾液、小便などの生体試料、食物、または水供給源であって、水質汚染、土壌汚染などを分析するための水や土壌試料など、多様な試料溶液になることができる。

【0026】

また、多様な試料溶液から核酸成分のみを抽出した溶液を標的遺伝子検出用微細流動装置に注入することもできる。この際、抽出は特定の方法に限定されず、フェノール-クロロホルム法などの液-液抽出法や担体を用いる固液抽出法を用いることができる。また、抽出はプロテインアーゼK/フェノール抽出法、プロテインアーゼK/フェノール/クロロホルム抽出法、アルカリ溶解法、アルカリ-SDS法、または溶菌酵素法を用いることができる。また、市販の核酸抽出方法QIAamp (QIAGEN社、ドイツ)などを用いることも可能である。例えば、フェノール、フェノール/クロロホルム混合物を用いることができる。

10

【0027】

本発明で標的遺伝子、例えば核酸配列または分子は単一または二重鎖であって、センスまたはアンチセンス鎖を示すことができるDNAまたはRNAでありうる。したがって、核酸配列はdsDNA、ssDNA、混合ssDNA、混合dsDNA、ssDNA (例えば、融解、変性、ヘリカーゼなどにより)で作られたdsDNA、A-、B-、またはZ-DNA、三重-鎖DNA、RNA、ssRNA、dsRNA、混ざったssRNA及びdsRNA、ssRNA (例えば、融解、変性、ヘリカーゼなどを通じて)で作られたdsRNA、メッセンジャーRNA (mRNA)、リボソームRNA (rRNA)、伝達RNA (tRNA)、触媒RNA、snRNA、マイクロRNA、または蛋白質核酸 (PNA) でありうる。

20

【0028】

本発明は使われた標的遺伝子、例えば、核酸 (例えば、配列または分子 (例えば、標的配列及び/又はオリゴヌクレオチド)) の類型または供給源により制限されない。核酸配列と関連して使われる時、本明細書で異に表現されない限り、用語 “ヌクレオチド” 及び “塩基” は互換的に使われる。

【0029】

また、本発明は前記標的遺伝子検出用微細流動装置；

dNTP；

リガーゼ；

及び等温核酸重合酵素を含む、標的遺伝子検出用微細流動装置キットを提供する。

30

【0030】

前記キットにおいて、dNTP、リガーゼ、及び等温核酸重合酵素は、遺伝子産物 (核酸) を増幅させるための増幅用組成物に含まれることができる。前記増幅用組成物は核酸を増幅するために必要な成分を全て含む混合物を意味し、核酸重合酵素 (ポリメラーゼ)、その活性または反応に必要な緩衝液、4種類のdNTP、補助因子、及び/又は基質をさらに含むことができる。前記核酸重合酵素は、DNA重合酵素、RNA重合酵素、逆転写酵素 (reverse transcriptase)、及びこれらの組み合わせでありうる。

40

【0031】

本発明の一具体例によれば、前記増幅用組成物はDNA重合酵素、反応緩衝溶液、dNTPsを含む核酸増幅用組成物を提供する。

【0032】

本発明の一具体例によれば、前記DNA重合酵素は、大腸菌DNA重合酵素I、クレノウ断片、phi29 DNA重合酵素、vent DNA重合酵素、T4、T7 DNA重合酵素、及びTaq重合酵素からなる群から選択されるものでありうる。

【0033】

本発明の一具体例によれば、前記緩衝溶液 (バッファ) はNEB (New England Biolab

50

）緩衝溶液系列、例えば、NEB緩衝溶液4、Bst DNAポリメラーゼ重合酵素緩衝溶液、T4 DNAリガーゼ緩衝溶液、T7 DNAリガーゼ緩衝溶液などが使用できるが、これに制限されるものではない。

【0034】

本発明の一具体例によれば、標的遺伝子検出用微細流動装置は、微細流動装置により検出される増幅された遺伝子産物のハイドロゲルの形成または濁度の変化を検出させることができる検出用組成物をさらに含むことができる。

【0035】

また、前記検出用組成物は増幅された遺伝子産物の肉眼識別を助けるための染色試薬として色を帯びる染色試薬であって、例えばゲルレッド (Gel-red)、ストレプタアビジンビード (Streptavidin bead)、トリパンブルーダイ (trypan blue dye)、エバンスブルーダイ (Evans Blue dye)、ヘマトキシリン - エオシン染色 (hematoxylin-eosin stain)、クリスタルバイオレット (crystal violet)、またはメチレンブルー (methylene blue) を含むが、これに制限されるものではない。

10

【0036】

また、前記検出用組成物は増幅された遺伝子産物の凝集を増大させて濁度変化または沈殿を起こして肉眼識別を助けるためのものであって、高塩溶液 (high salt solution) でありうる。前記高塩溶液は、無機塩溶液、例えば、塩化マグネシウム ($MgCl_2$) 水溶液、塩化アンモニウム (NH_4Cl) 水溶液、アセト酸アンモニウム水溶液 (NH_4OAc)、塩化ナトリウム ($NaCl$) 水溶液、硫酸アンモニウム ($(NH_4)_2SO_4$) 水溶液、または中性アミノ酸溶液を含有する水溶液でありうるが、これに制限されるものではない。

20

【0037】

また、前記検出用組成物は蛍光試薬でありうる。

【0038】

本発明の一具体例によれば、前記装置の第2流路の直径は増幅された遺伝子産物 (塊り) が凝集して塞ぐことができる大きさでありうる。一具体例で、前記第2流路の直径は $1\mu m \sim 5mm$ の大きさで、他の一具体例で、前記第2流路の直径は $50\mu m \sim 5mm$ の大きさでありうる。また、一具体例で第2流路の直径は $0.25mm \sim 2mm$ の大きさで、他の一具体例で $0.5mm \sim 1.5mm$ の大きさでありうる。

30

【0039】

本発明の一具体例によれば、前記増幅された遺伝子産物 (塊り) は直径が約 $0.5\mu m \sim$ 約 $50\mu m$ の大きさを有することができる。また、本発明の一具体例で、前記増幅された遺伝子産物 (塊り) は互いに凝集してハイドロゲルを形成して直径が約 $50\mu m \sim 5mm$ の大きさを有することができる。本発明の他の一具体例で、前記増幅された遺伝子は互いに凝集して直径が約 $0.25mm \sim 2mm$ の大きさでありうる。

【0040】

本発明の一具体例によれば、本発明の微細流動装置の第2流路の表面は、ポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane)、金 (Au)、金属酸化物 (metal oxide) (SiO_2 、 TiO_2 、 Al_2O_3 、酸化インジウム - スズ (Indium-Tin Oxide))、セラミック (ceramic)、合成ポリマー (synthetic polymer) (ポリカーボネート、ポリウレタン、環状オレフィン共重合体 (cyclic olefin copolymer)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、ポリスチレン、ポリエチレン) のうち、いずれか1つからなることができる。

40

【0041】

本発明の一具体例によれば、前記コーティング物質はヒドロキシベンゼン類の単分子または高分子コーティングを含むことができる。また前記コーティング物質は、一例に、カテコールアミン高分子コーティングを含むことができる。ヒドロキシベンゼン類の単分子または高分子は優れる表面特性によって貴金属、金属酸化物、セラミック、及び合成高分子を含んだ広範囲な素材に容易にコーティングできる。前記ヒドロキシベンゼン類の単分

50

子及び高分子の具体的な例は、非制限的にドーパミン (dopamine)、5 - ヒドロキシドーパミン HCl (5-hydroxydopamine HCl)、ノルエピネフリン (norepinephrine)、エピネフリン (epinephrine)、ピロガロールアミン (Pyrogallol amine)、DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanine)、カテキン (catechin)、タンニン類 (tannins)、ピロガロール (Pyrogallol)、ピロカテコール (Pyrocatechol)、ヘパリン - カテコール (heparin-catechol)、キトサン - カテコール (chitosan-catechol)、ポリエチレングリコール - カテコール (Poly (ethylene glycol) -catechol)、ポリエチレンイミン - カテコール (Poly (ethyleneimine) -catechol)、ポリメチルメタクリレート - カテコール (Poly (methyl methacrylate) -catechol)、ヒアルロン酸 - カテコール (hyaluronic acid-catechol) などになることができる。

10

【0042】

また、前記コーティング物質はビニル基 (vinyl group) になることができる。

【0043】

コーティング方法には制限がない。例えば、コーティング用組成物を製造し、これを第2流路に詰めることによって、第2流路の表面がコーティングされるようにすることができる。更に他の例として、ビニル基コーティングを蒸気蒸着方式により第2流路にコーティングされるようにすることができる。

【0044】

本発明の一具体例によれば、本発明の微細流動装置は肉眼で標的遺伝子の増幅された遺伝子産物の識別が可能でありうる。本発明の一具体例で、前記検出は増幅された遺伝子産物が互いに凝集してハイドロゲルを形成するか、または濁度が変わる点から肉眼で識別可能でありうる。

20

【0045】

本発明の一具体例によれば、検出しようとする標的遺伝子は、動物、植物、細菌、ウイルス、または真菌から得られる。好ましくは、細菌、ウイルス、または真菌など、病原菌から得られる。

【0046】

本発明の一具体例によれば、前記検出しようとする標的遺伝子は病原菌遺伝子でありうる。前記標的遺伝子には、核酸配列を知る全ての病原菌を対象にすることができる。本発明の一具体例によれば、前記病原菌は鳥類毒感、サース (SARS)、溶血性尿毒症候群 (hemolytic uremic syndrome)、及び血便 (bloody diarrhea) (Escherichia coli O157:H7)、結核 (Mycobacterium tuberculosis)、炭疽病 (Bacillus anthracis)、肺炎 (Streptococcus pneumonia)、マラリア (Plasmodium)、サルモネラ (Salmonella)、肝炎 (Hepatitis A、B、C、D 及びE virus)、野兔病菌 (Francisella tularensis)、ペスト菌 (Yersinia pestis)、エルシニアエンテロコリチカ (Yersinia enterocolitica) 及び出血熱 (Ebola virus)、メルスコロナウイルス (MERS-Cov virus) の検出に有用である。また、本発明の一具体例によれば、前記病原菌は肺炎球菌、腸内球菌、葡萄球菌、熱帯熱原虫及び第3世界での結核またはマラリアバクテリアのような抗生剤抵抗を有する病原菌の検出にも有用である。

30

【0047】

以下の<表1>は、前記本発明の一具体例に従う検出可能な標的遺伝子、例えば、病原菌の種類、配列、及びこれと相補的に結合できる結合部位を含むテンプレートの配列を例示的に示す。(濃い字：標的病原菌遺伝子と相補的に結合する部分、イタリック体：テンプレート内の相補的な部分、イタリック体にアンダーライン：プライマーと相補的に結合する部分)

40

【0048】

【表 1】

病原菌の種類	配列番号	テンプレート配列(5' →3')	配列番号	病原菌の標的遺伝子配列
サルモネラ	1	5' -フォスフェイト-TG CTA TGC CGA C TCAAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT A GA GGC AT TA GCA TGC TAG TAT CGA CG T CCC ACG TAC CAA CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATTG AGT G-3'	5	5' -GAG TCG GCA TAG CAC ACT CA-フォス フェイト-3'
エルシニアエンテロコリチカ	2	5' -フォスフェイト-GC TCA CCC CAG T AAAAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT A GA GGC AT TA GCA TGC TAG TAT CGA CG T CCC ACG TAC CAA CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATTAG CTT TAC-3'	6	5' -TTA CTG GGG TGA GCG TAA AGC T-フォ スフェイト-3'
野兎病菌	3	5' -フォスフェイト-TG TTT CCA GTA T TTAAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT A GA GGC AT TA GCA TGC TAG TAT CGA CG T CCC ACG TAC CAA CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATTTT CCT CCG A-3'	7	5' -AAA TAC TGG AAA CAT CGG AGG AAA-フ ォスフェイト-3'
ペスト菌	4	5' -フォスフェイト-TC GAA TGC CAA C AAAAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT A GA GGC AT TA GCA TGC TAG TAT CGA CG T CCC ACG TAC CAA CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATTCTC TGA ACA-3'	8	5' -TTG TTG GCA TTC GAT GTT CAG AG-フ ォスフェイト-3'

10

20

【0049】

この場合、プライマーにはテンプレート配列に相補的に結合できる形態に5'-Thiol-AA
A AAA AAA GGG ACG TCG ATA CTA GCA TGC TA3' (配列番号9)を使用することができる。

【0050】

以下の<表2>は本発明の前記本発明の実施例3に従う検出可能な標的遺伝子、例えば、病原菌の種類、配列、及びこれと相補的に結合できる結合部位を含むテンプレートの配列を例示的に示す。

30

【0051】

【表 2】

病原菌の種類	配列番号	テンプレート配列(5' →3')	配列番号	病原菌の標的遺伝子配列
炭疽菌	10	5' -フォスフェイト-TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT AC G TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG A TT TGA GCG-3'	12	5' -TTC TCC ATT TCA AAC GCT CAフォス フェイト-3'
エボラウイルス	11	5' -フォスフェイト-GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TA C CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC-3'	13	5' -CGC GTG CGT CGT GCG ATT TCT CGT T- フォスフェイト-3'

40

【0052】

以下の<表3>は本発明の前記本発明の実験例5に従う検出可能なメルスコロナウイル

50

スの標的遺伝子配列及びこれと相補的に結合できる結合部位を含むテンプレートの配列を示す。

【 0 0 5 3 】

【表 3】

病原菌の種類	配列番号	テンプレート配列(5' →3')	配列番号	病原菌の標的遺伝子配列
メルスコロナウイルス(MERS-CoV)	16	5' -5' フォスフェイト/AGG GCA CAT CTC CGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TT A GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT A CG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT ATA CCC 3'	17	5' -CG GAG AUG UGC CCU GGG UAU/3' フォス フェイト-3'

10

【 0 0 5 4 】

本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置を用いて検出できる病原菌の種類は、前述したものに制限されるものではない。公知の病原菌の遺伝子から任意の遺伝子配列 (Pathogen sequence) を選択し、前記病原菌の遺伝子配列にネッキ (nick) を挟んで結合できる配列を2つ準備して、各々テンプレートの標的遺伝子結合部位配列 (第1標的遺伝子結合部位、及び第2標的遺伝子結合部位) とすることができる。このような方法によりテンプレートの標的遺伝子結合部位配列のみを取り替えて非常に多様な病原菌の遺伝子を検出することができる標的遺伝子微細流動装置を製造することができる。

20

【 0 0 5 5 】

本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置は肉眼でも病原菌の存在を十分に識別することができるが、使用目的によって本発明が属する技術分野の当業者は本発明の必須的特徴を変更せず、多様な具体的な形態に実施することができる。このような例に、当業者は使用目的によって本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置の検出感度を増加させるために、追加で、電極間の電流、電圧、電位差、抵抗変化などを測定する電気化学センサー、紫外線、可視光、蛍光、赤外線、ラマンなどの多様な光源を用いる光学センサー、金属、セラミック、高分子などの素材を活用したナノセンサー、または酵素、抗原、抗体などの生体感知物質を用いたバイオセンサーを含んで実施することもできる。

30

【 0 0 5 6 】

微細流動装置を製造する方法

本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置を製造する方法は、次のステップを含むことができる：

(S1) 基板、前記基板上に形成された外部から流入する流入口、前記流入口と連結されて流入した試料溶液を収容する第1流路、前記第1流路と連結された第2流路、前記第2流路と連結された排出口を含む微細流動装置を提供するステップ；

(S2) 前記微細流動装置の第2流路をコーティングするステップ；

(S3) 前記コーティングされた第2流路上にテンプレートと結合できるプライマーを固定化するステップ；及び

40

(S4) 標的遺伝子と相補的に結合する結合部位、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位を含むテンプレートを前記プライマーに結合させるステップ、

ここで、前記標的遺伝子と相補的に結合する結合部位は、テンプレートの両末端に分離されて形成され、前記プライマーに相補的に結合する結合部位は分離されて形成された前記ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位の間に形成される。

【 0 0 5 7 】

本発明の一具体例によれば、本発明の微細流動装置の第2流路の表面はポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane)、金 (Au)、金属酸化物 (metal oxide) (SiO₂、TiO₂、Al₂O₃、酸化インジウム - スズ (Indium-Tin Oxide))、セラミック

50

(ceramic)、合成ポリマー (synthetic polymer) (ポリカーボネート、ポリウレタン、環状オレフィン共重合体 (cyclic olefin copolymer)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、ポリスチレン、ポリエチレン) のうち、いずれか 1 つからなることができる。

【0058】

本発明の一具体例によれば、前記 (S2) 前記微細流動装置の第 2 流路をコーティングするステップで第 2 流路をコーティングする物質は水液滴の移動を助けるために親水性物質でコーティングされることができ、第 2 流路上にプライマーを固定することができる官能基を有する多様な物質でありうる。本発明の一具体例によれば、第 2 流路上にプライマーの固定を容易にするために第 2 流路はプライマーと互いに結合できる官能基を有するようにコーティングできる。前記プライマーやはり第 2 流路上の官能基と結合できる官能基を有するように変形できる。

10

【0059】

本発明の一具体例によれば、前記第 2 流路をコーティングする物質は、ヒドロキシベンゼン類の単分子または高分子コーティングを含むことができる。また、前記コーティング物質は、一例に、カテコールアミン高分子コーティングを含むことができる。ヒドロキシベンゼン類の単分子または高分子は優れる表面特性によって貴金属、金属酸化物、セラミック、及び合成高分子を含んだ広範囲な素材に容易にコーティングできる。前記ヒドロキシベンゼン類の単分子及び高分子の具体的な例は、非制限的にドーパミン (dopamine)、5 - ヒドロキシドーパミン HCl (5-hydroxydopamine HCl)、ノルエピネフリン (norepinephrine)、エピネフリン (epinephrine)、ピロガロールアミン (Pyrogallol amine)、DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanine)、カテキン (catechin)、タンニン類 (tannins)、ピロガロール (Pyrogallol)、ピロカテコール (Pyrocatechol)、ヘパリン - カテコール (heparin-catechol)、キトサン - カテコール (chitosan-catechol)、ポリエチレングリコール - カテコール (Poly (ethylene glycol) -catechol)、ポリエチレンイミン - カテコール (Poly (ethyleneimine) -catechol)、ポリメチルメタクリレート - カテコール (Poly (methyl methacrylate) -catechol)、ヒアルロン酸 - カテコール (hyaluronic acid-catechol) などになることができる。または、ビニル基やはりコーティングのために使用できる。

20

【0060】

本発明の一具体例によれば、本発明の微細流動装置の第 2 流路はピロガロールアミン (Pyrogallol amine)、例えば 5 - ヒドロキシドーパミン HCl (5-hydroxydopamine HCl) によりコーティングできる。

30

【0061】

微細流動装置を用いた病原菌遺伝子検出のための検出方法

本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置を用いて標的遺伝子を検出する方法は、次のステップを含むことができる：

(S1) 標的遺伝子検出用微細流動装置を提供するステップ；

(S2) 第 1 流路に試料溶液を流入させるステップ；及び

(S3) 前記標的遺伝子検出用微細流動装置の第 2 流路に dNTP、リガーゼ、及び等温核酸重合酵素を添加するステップ。

40

【0062】

本発明の一具体例によれば、前記方法は、(S4) 増幅された遺伝子産物が凝集して直径 50 μm ~ 5 mm の大きさを有するハイドロゲルが第 2 流路及び排出口に形成されるステップをさらに含むことができる。

【0063】

本発明の一具体例によれば、前記テンプレートは病原菌遺伝子の長さ、プライマーの長さなどを考慮して多様に長さと配列をデザインすることができる。本発明の一具体例によれば、前記テンプレートの長さは 40 乃至 160 mer でありうる。本発明で、前記テンプレートの長さがあまり短ければ不安定で、あまり長ければ RCA 効率が減少することが

50

ある。

【0064】

本発明で、プライマーは第2流路上にテンプレートを固定するプライマーであって、意味と遺伝子を増幅させるための開始物質としてプライマーを全て意味する。

【0065】

本発明の一具体例によれば、前記標的遺伝子検出用微細流動装置のテンプレートがダンベル型 (dumbbell shape) を形成することができる。

【0066】

本発明の一具体例によれば、前記(S3)ステップで、dNTP、リガーゼ、及び等温核酸重合酵素を添加すれば、試料溶液内に標的遺伝子が存在する場合、回転環増幅が起こる。即ち、テンプレートに標的遺伝子と相補的に結合する結合部位に標的遺伝子が結合すれば、テンプレートがダンベル形態を形成し、等温核酸重合酵素 (Polymerase) による増幅が起こることができる。前記RCA方法は室温、例えば、15 ~ 35、好ましくは、25 ~ 35の温度で増幅されることができ、一具体例で30で起こることができる。

10

【0067】

本発明の一具体例によれば、前記回転環増幅により増幅された産物は、3個の脚を有する丸い形態の凝集した単一鎖のRCA産物を作ることができる。

【0068】

本発明の一具体例によれば、前記増幅された遺伝子は凝集した単一鎖の遺伝子産物を形成することができる。図2を参照すると、増幅された標的遺伝子産物はフック (hook) 形態の丸い部分と一定の長さを有するベルクロ (velcro) が連続した形態の凝集した単一鎖を形成することができる。前記一定の長さは0.5 μm ~ 50 μm大きさでありうる。前記全体的に増幅された標的遺伝子産物は丸い円形と一定の長さを有する脚を有する三脚形態でありうる。

20

【0069】

また、本発明の一具体例によれば、前記凝集した単一鎖の産物はハイドロゲルを形成することができる。

【0070】

また、前記RCA方法による増幅及びハイドロゲル形成の反応は3時間以上で起こることができ、一具体例で反応時間は3時間でありうる。

30

【0071】

本発明の他の具体例によれば、前記方法は、(S5)染色試薬、高塩溶液 (high salt solution)、または蛍光試薬を注入するステップをさらに含むことができる。

【0072】

本発明の一具体例によれば、前記染色試薬、高塩溶液、または蛍光試薬は検出をより容易にする作用をし、ゲルレッド (Gel-red)、ストレプタアビジンビード (Streptavidin bead)、トリパンブルーダイ (trypan blue dye)、エバンスブルーダイ (Evans Blue dye)、ヘマトキシリン - エオシン染色 (hematoxylin-eosin stain)、クリスタルバイオレット (crystal violet)、メチレンブルー (methylene blue)、塩化マグネシウム (MgCl₂) 水溶液、塩化アンモニウム (NH₄Cl) 水溶液、アセト酸アンモニウム (NH₄OAc) 水溶液、塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液、硫酸アンモニウム ((NH₄)₂SO₄) 水溶液、または中性アミノ酸溶液のうち、いずれか1つでありうる。例えば、染色試薬であるゲルレッド (Gel Red) またはビオチンと強く結合するストレプタアビジンビード (Streptavidin bead) でありうる。また、前記検出用組成物はMgCl₂、NH₄Clのような高塩溶液 (high salt solution) でありうる。

40

【0073】

本発明の一具体例によれば、前記試料流入口に検出対象である試料溶液がローディングされて、これは第1流路及び第2流路を通じて流れることができる。

【発明の効果】

50

【 0 0 7 4 】

本発明は外部から光源、電気エネルギーなどに影響を受けず、室温で特別な装置無しで単一標的遺伝子、例えば単一病原菌または同時に多数の標的遺伝子、例えば多数の病原菌を簡便に検出することができる。

【 0 0 7 5 】

したがって、本発明は病原菌検出のための装置の製造にかかる時間、費用が経済的で、携帯が可能で、高価の検出装備無しでも迅速な診断が可能である。

【 0 0 7 6 】

したがって、本発明は第3世界で結核またはマラリアなどの病原菌の診断、または世界を威嚇する多様な伝染性疾病（例えば、エボラウイルス、メルスウイルス）の診断だけでなく、生物学武器テロ及び環境汚染と関連した病原菌に対しても迅速で、かつ簡便な検出が可能であるので、現業で利用可能性が高い。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 7 】

【図1】本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置の平面図（左）及び斜視図（右）である。

【図2】本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置を用いて標的遺伝子を検出する方法を示す図である。A、B、C、D、Eは各々前記方法の各ステップを意味する。

【図3】本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置の製造方法及びこれを用いて標的遺伝子を検出する方法を示す図である。A、B、C、D、E、Fは各々前記方法の各ステップを意味する。

【図4】炭疽菌（*Bacillus anthracis*）に対するテンプレート（Template_B_A）によるチューブ内でのライゲーションを確認した電気泳動結果を示す。

【図5】実験例2の（1）で炭疽菌（*Bacillus anthracis*）に対するテンプレート（Template_B_A）によるチューブ（tube）内でのRCA産物（Product）を確認したSEM写真である。

【図6】実験例2の（2）でエボラウイルスに対するテンプレート（Template_E）によるチューブ内でのRCA産物を確認したSEM写真である。

【図7a】図7aはエボラウイルスに対するテンプレート（Template_E）によるハイドロゲル形成を確認したチューブ内での結果である。

【図7b】図7bは回転粘度計で測定した粘度に対するグラフを示す。

【図8a】図8aは微細流動装置の第2流路をコーティングせず、プライマーを固定させた場合の回転環増幅結果のAFMイメージである。

【図8b】図8bは5-ヒドロキシドーパミン塩酸で第2流路をコーティングし、プライマーを固定させた後、確認した回転環増幅結果のAFMイメージを示す。

【図9a】図9aは本発明の微細流動装置を用いた*Bacillus anthracis*検出結果を示す写真である。

【図9b】図9bはこれをImager（Gel DocTM EZ（Bio-rad））で確認した結果を示す写真である。

【図10a】図10aは本発明の微細流動装置を用いた*Bacillus anthracis*及びEbola virusの同時検出結果を示す写真である。

【図10b】図10bはこれをImager（Gel DocTM EZ（Bio-rad））で確認した結果を示す写真である。

【図11】本発明の微細流動装置を用いた*Bacillus anthracis*及びEbola virusのstreptavidinを用いた検出結果を示す。

【図12】本発明の微細流動装置のプライマーに結合されたテンプレートでネッキ（nick）のライゲーション及びRCAが起こる過程を具体的に示す模式図である。（A）、（B）、（C）、（D）は各々前記方法の各ステップを意味する。

【図13】実験例5のように第2流路が3個（陰性対照群、試料群、及び陽性対照群）になるように製作した本発明の微細流動装置を用いて標的遺伝子を検出する方法を示す模式

10

20

30

40

50

図である。

【図 1 4】標的メルス遺伝子検出用微細流動装置を用いてメルスウイルスを検出した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0078】

以下、本発明の理解を助けるために図面を参照して実施例に対して詳細に説明する。但し、以下の実施例は本発明の内容を例示するものであり、本発明の範囲が以下の実施例に限定されるものではなく、他の形態に具体化されることもできる。また、図面において、構成要素の幅、長さ、厚さなどは便宜をために誇張して表現されることもある。明細書の全体に亘って同一な参照番号は同一な構成要素を示す。また、一構成要素が他の構成要素の上にありとするとする時、これは他の構成要素の真上にある場合だけでなく、その中間に更に他の構成要素がある場合も含む。

10

【実施例】

【0079】

< 製造例 1 > テンプレート製造

(1) Template_BAの製造

Bacillus anthracisの病原菌遺伝子配列に基づいてBacillus anthracisに特異的なテンプレート (Template_BA)、即ち、Bacillus anthracisに特異的に結合するテンプレート (Template_BA) (配列番号 10) を製造した (Integrated DNA Technology, San Jose, CA, USA)。Template_BAは次のように標的遺伝子 (Bacillus anthracisの病原菌遺伝子) と相補的に結合する結合部位、即ち病原菌の相補的部位 (Pathogen complementary site) (20mer、白地に濃い字)、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位、即ち、テンプレート内の相補的な領域 (21mer x 2、総 42mer、イタリック体)、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、即ち、プライマー固定化領域 (Primer immobilization region) (37mer) で構成され、そのうち、プライマーに相補的に結合する結合部位をイタリック体にアンダーラインして示した。

20

【0080】

5' /5Phos/TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATTTGA GCG-3'

【0081】

30

(2) Template_Eの製造

エボラウイルスの病原菌遺伝子配列に基づいてエボラウイルスsに特異的なテンプレート (Template_E)、即ち、Ebola virusに特異的に結合するテンプレート (Template_E) (配列番号 11) を製造した。Template_Eは標的遺伝子 (Ebola virusの病原菌遺伝子) と相補的に結合する結合部位、即ち病原菌の相補的部位 (Pathogen complementary site) (25mer、白地に濃い字)、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位、即ち、テンプレート内の相補的な領域 (21mer x 2、総 42mer、イタリック体)、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、即ち、プライマー固定化領域 (Primer immobilization region) (37mer) で構成され、そのうち、プライマーに相補的に結合する結合部位をイタリック体にアンダーラインして示した。

40

【0082】

5' /5Phos/GA CGC ACG CGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC-3'

【0083】

< 実施例 1 > 標的遺伝子検出用微細流動装置

本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置の構成の一具体例を図 1 乃至 3 を参照して説明する。

【0084】

図 1 を参照すると、本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置は、基板 100；基板の上に形成された試料溶液が外部から流入する流入口 101；流入口と連結されて流入した試

50

料溶液を収容する第1流路102；第1流路と連結された第2流路103；第2流路と連結された排出口104を含む。前記第2流路103は第1流路と連結されて2つ以上（例えば、3個に）に分岐できる。図3を参照すると、本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置は、前記第2流路上に固定されたプライマー；及び前記プライマーに相補的に結合されたテンプレートを含む。図2を参照すると、前記テンプレートは標的遺伝子と相補的に結合する結合部位（例えば、complementary to pathogen）、前記プライマーに相補的に結合する結合部位（Primer binding region）、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位（dumbbell shape template）を含む。また、前記標的遺伝子と相補的に結合する結合部位はテンプレートの両末端に分離されて形成され、前記プライマーに相補的に結合する結合部位は分離されて形成された前記ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位の間に形成される。即ち、図2のAに示すように、前記テンプレートの線形構造は「第1標的遺伝子結合部位」-「第1テンプレート内の相補的な結合部位」-「プライマー結合部」-「第2テンプレート内の相補的な結合部位」-「第2標的遺伝子結合部位」構造である。図12のAに示すように、前記第2流路上に固定されたプライマーに、前記テンプレートのプライマー結合部が相補的に結合した状態にあるようになる。

10

【0085】

第2流路上にプライマーの固定を容易にするために第2流路はプライマーと互いに結合できる官能基を有するようにコーティングできる。前記プライマーやはり第2流路上の官能基と結合できる官能基を有するように変形できる。

20

【0086】

<実施例2> 標的遺伝子検出用微細流動装置（病原菌遺伝子検出用装置）の製造

実施例2-1. 単一標的遺伝子検出用微細流動装置の製造方法 { 単一病原菌（Bacillus anthracis）遺伝子検出用微細流動装置の製造方法 }

ステップ1：微細流動装置を提供するステップ

本発明の一実施例に標的遺伝子検出用微細流動装置（病原菌遺伝子検出用装置を製造する微細流動装置 { 1 III 3 in 1 uncoated Microscopy Chamber (ibidi) } を準備した。本発明の微細流動装置は、基板100；基板の上に形成された試料溶液が外部から流入する流入口101；流入口と連結されて流入した試料溶液を収容する第1流路102；第1流路と連結された第2流路103；第2流路と連結された排出口104を含む（図1参照）。前記第2流路103は第1流路と連結されて2つ以上（例えば、3個に）に分岐できる。

30

【0087】

ステップ2：微細流動装置の第2流路をコーティングするステップ

5 - ヒドロキシドーパミン塩酸（5-hydroxydopamine HCl）（Sigma Aldrich）を1 mg / ml で10mM Tris buffer（1M UltraPure 1M Tris-HCl pH 8.0/Invitrogen）に溶かした。その後、pHを8に合せてコーティング用組成物を製造した。前記コーティング用組成物で装置（1 III 3 in 1 uncoated Microscopy Chamber (ibidi)）の第2流路を詰めた。2時間後、DDW（Water Purification System/LABOGENE）で洗浄（washing）した。

【0088】

40

ステップ3：前記コーティングされた第2流路上にテンプレートと結合できるプライマーを固定化する（結合させる）ステップ

プライマーにはPrimer-5SS-polyA9（BIONEER）（配列番号9）を使用した。

前記プライマー100 pmol と5 M DTT（DL-Dithiothreitol/Sigma Aldrich）を準備した後、100 pmol プライマーに5 M DTT 5 μLを加えた後、総50 μLになるようにDDW（Water Purification System/LABOGENE）を追加した。プライマーの二硫化結合（disulfide bond）を切るために（broken）DTT処理を4時間の間進行後、3 K アミコンチューブ（amicon tube）（Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K / MILLIPORE）を用いて反応後に残っているDTTを除去した（eppendorf Centrifuge 5415R）（132,000 rpm、4、25分で1回遠心分離の以後40 μL DDWを入

50

れて、また132,000rpm、4、25分で遠心分離してDTTをきれいに除去するために総2回遠心分離した)。DTTを除去して残った溶液を3個の分岐を有する各々の第2流路(channel)103に5μL(1番流路;図1の第2流路の左側分岐)、5μL(2番流路;図1の第2流路の中間の分岐)、5μL(3番流路;図1の第2流路の右側分岐)の順に入れて2時間待った後、DDW(Water Purification System/LABOGENE)洗浄(washing)した。

【0089】

ステップ4: 標的遺伝子と相補的に結合する結合部位、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位を含むテンプレートを前記プライマーに結合させるステップ(プライマー-テンプレート結合ステップ)

10

図1を参照すると、各々の排出口104を通じて第2流路103にテンプレートを加えて分岐されている第2流路103上に固定されたプライマーと各々のテンプレートを結合させて固定できるようにした。対照群(Negative Control)はテンプレートを加えないものを使用した。具体的に、3個の分岐を有する第2流路のうち、2番流路(図1の第2流路の中間の分岐)にはBacillus anthracisに対するテンプレート(Template_B_A)(配列番号10)を加え、1番流路及び3番流路は対照群(Negative Control)にした。具体的に、100Template_B_A 0.2μL(=20pmole)に1X PBS(lifetechnologies社によるgibco)を詰めて5μLになるようにした後、2番流路に入れて、1番流路及び3番流路は1X PBS(lifetechnologies社によるgibco)6μLで詰めた。2時間放置した後、DDW(Water Purification System/LABOGENE)洗浄した。

20

【0090】

実施例2-2.2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置の製造方法{2以上の病原菌(Bacillus anthracis及びEbola virus)遺伝子検出用微細流動装置の製造方法}

ステップ1: 微細流動装置を提供するステップ

本発明の一実施例に標的遺伝子検出用微細流動装置(病原菌遺伝子検出用装置を製造する微細流動装置{1113in1uncoated Microscopy Chamber(ibidi)})を準備した。本発明の微細流動装置は、基板100;基板の上に形成された試料溶液が外部から流入する流入口101;流入口と連結されて流入した試料溶液を収容する第1流路102;第1流路と連結された第2流路103;第2流路と連結された排出口104を含む(図1参照)。前記第2流路103は第1流路と連結されて2つ以上(例えば、3個に)に分岐できる。

30

【0091】

ステップ2: 微細流動装置の第2流路をコーティングするステップ

5-ヒドロキシドーパミン塩酸(5-hydroxydopamine HCl)(Sigma Aldrich)を1mg/mlで10mM Tris buffer(1M UltraPure 1M Tris-HCl pH 8.0/Invitrogen)に溶かした。その後、pHを8に合せてコーティング用組成物を製造した。前記コーティング用組成物で装置(1113in1uncoated Microscopy Chamber(ibidi))の第2流路を詰めた。2時間後、DDW(Water Purification System/LABOGENE)で洗浄(washing)した。

【0092】

40

ステップ3: 前記コーティングされた第2流路上にテンプレートと結合できるプライマーを固定化する(結合させる)ステップ

プライマーにはPrimer-5SS-polyA9(BIONEER)(配列番号9)を使用した。

前記プライマー100pmolと5M DTT(DL-Dithiothreitol/Sigma Aldrich)を準備した後、100pmolプライマーに5M DTT 5μLを加えた後、総50μLになるようにDDW(Water Purification System/LABOGENE)を追加した。プライマーの二硫化結合(disulfide bond)を切るために(broken)DTT処理を4時間の間進行後、3Kアミコンチューブ(amicon tube)(Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K/MILLIPORE)を用いて反応後に残っているDTTを除去した(eppendorf Centrifuge 5415R)(132,000rpm、4、25分で1回遠心分離の以後、40μL DDWを入れて

50

、また132,000rpm、4、25分で遠心分離してD T Tをきれいに除去するために総2回遠心分離した)。D T Tを除去して残った溶液を3個の分岐を有する各々の第2流路(channel)103に5μL(1番流路;図1の第2流路の左側分岐)、5μL(2番流路;図1の第2流路の中間の分岐)、5μL(3番流路;図1の第2流路の右側分岐)の順に入れて2時間待った後、D D W(Water Purification System/LABOGENE)洗浄(washing)した。

これにより微細流動装置の第2流路上にはプライマーが固定化できる(図3のA参照)。

【0093】

ステップ4: 標的遺伝子と相補的に結合する結合部位、前記プライマーに相補的に結合する結合部位、ダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位を含むテンプレートを前記プライマーに結合させるステップ(プライマー-テンプレート結合ステップ)

図1を参照すると、各々の排出口104を通じて第2流路103にテンプレートを加えて分岐されている第2流路103上に固定されたプライマーと各々のテンプレートを結合させて固定できるようにした。対照群(Negative Control)はテンプレートを加えないことを使用した。具体的に、3個の分岐を有する第2流路のうち、2番流路(図1の第2流路の中間の分岐)にはEbola virusに対するテンプレート(Template_E)を加え、3番流路(図1の第2流路の左側分岐)にはBacillus anthracisに対するテンプレート(Template_B_A)を加え、1番流路は対照群(Negative Control)にした。具体的に、100Template_E(配列番号11)0.24μL(=24pmole)に1X PBS(lifetechnologies社によるgibco)を詰めて6μLになるようにした後、3番流路に入れた。100Template_B_A(配列番号10)0.2μL(=20pmole)に1X PBS(lifetechnologies社によるgibco)を詰めて5μLになるようにした後、2番流路に入れて、3番流路は1X PBS(lifetechnologies社によるgibco)6μLで詰めた。1時間放置した後、D D W(Water Purification System/LABOGENE)洗浄した。

これによって、前記第2流路上に固定化されたプライマーとテンプレートが結合できる(図3のB参照)。各々の第2流路の分岐上に固定化されたプライマーに特定の病原菌の遺伝子が認識できる互いに異なるテンプレートが結合されることができ、これを通じて一回に多数の標的遺伝子が検出できるようにする。

【0094】

<実施例3> 標的遺伝子検出用微細流動装置を用いて標的遺伝子を検出する方法

標的遺伝子の検出原理 標的遺伝子検出用微細流動装置を用いて標的遺伝子を検出する方法の原理は、標的遺伝子(例えば、病原菌遺伝子)の存在時のみにネッキ(nick)が消えた閉じた型(closed form)のダンベル型(dumbbell shape)テンプレートがライゲーション(ligation)され、次いで回転増幅(Rolling circle amplification)(RCA)により増幅されて自家組立(self assembly)された精巧な構造体のパーティクルを形成することを基礎とする(図2参照)。

【0095】

図12は、図3B~図3Dの過程をより具体的な模式図で示したものである。即ち、図12Aは本発明の標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路上に固定されたプライマーにテンプレートが結合されている形態を示す。前記標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路内に流れて入った試料に標的病原菌遺伝子が存在すれば、前記標的病原菌遺伝子は前記テンプレートの第1標的遺伝子結合部位と第2標的遺伝子結合部位に同時に結合するようになる(図12B、図2B)。この際、第1標的遺伝子結合部位と第2標的遺伝子結合部位の両末端が互いに近くなって、その間に小さな隙間、即ちネッキ(nick)のみ存在するようになる。これと同時に、第1テンプレート内の相補的な結合部位と第2テンプレート内の相補的な結合部位やはり互いに近くなって、相補的な結合を形成するようになる。前記ネッキ(nick)は隣接した5'末端と3'末端とを連結する酵素であるリガーゼにより互いに連結されて、前記テンプレートは完全に閉じた形態(closed form)となってダン

10

20

30

40

50

ベル形態になる（図 1 2 C、図 2 C）。

【 0 0 9 6 】

等温核酸重合酵素は、前記閉じた形態の標的遺伝子検出用テンプレートを鋳型として d N T P が消尽される前まで核酸を無限反復して複製する回転環増幅（Rolling Circle Replication；RCA）を行う（図 1 2 D 及び図 2 D 参照）。複製された部分は標的遺伝子検出用テンプレートから落ちるため、標的遺伝子検出用テンプレートの配列が反復して存在する線形（linear）核酸が生成される。この線形核酸に存在する第 1 標的遺伝子結合部位と第 2 標的遺伝子結合部位の各々が標的遺伝子と結合し、回転環増幅反応が起こって、長くて、凝集した核酸塊りが生成され、これは第 2 流路のコーティングと共に凝集して大きいハイドロゲル塊りを形成する。形成されたハイドロゲル塊りが第 2 流路内に存在し、その第 2 流路に連結された排出口を塞ぐことを観察することができる。

10

【 0 0 9 7 】

実施例 3 - 1 . 単一標的遺伝子検出用微細流動装置を用いた標的遺伝子を検出する方法 { 単一標的遺伝子検出用微細流動装置を用いた単一標的病原菌（Bacillus anthracis）遺伝子を検出する方法 }

ステップ 1：実施例 2 - 1 による単一標的遺伝子検出用微細流動装置 { 単一病原菌（Bacillus anthracis）遺伝子検出用微細流動装置 } を提供するステップ

単一標的遺伝子検出用微細流動装置を提供（準備）した。具体的に、実施例 2 - 1 により単一標的遺伝子検出用微細流動装置 { 単一病原菌（Bacillus anthracis）遺伝子検出用微細流動装置 } を提供した。

20

【 0 0 9 8 】

ステップ 2：第 1 流路に試料溶液を流入させるステップ

（ 1 ）試料溶液準備

Bacillus anthracis の病原菌遺伝子配列に基づいて試料（Pathogen_BA）（配列番号 1 2）をBioneer（HPLC Purification）から注文して準備した。1 X P B S 内のPathogen_B_A 100で試料溶液を準備した。

【 0 0 9 9 】

以下の＜表 4＞は実施例 3 で使用したBacillus anthracisのテンプレート及び病原菌配列を示す。

【 0 1 0 0 】

30

【表 4】

病原菌の種類	配列番号	テンプレート配列(5' →3')	配列番号	Pathogen配列(5' →3')
Bacillus anthracis	10	5' -フオスフェイト-TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT T TA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT T CG ATT TGA GCG -3'	12	5' -TTC TCC ATT TCA AAC GCT CA-オスフェイト-3'

40

【 0 1 0 1 】

（ 2 ）第 1 流路に（ 1 ）で準備した試料溶液を流入させるステップ

（ 1 ）で準備した試料溶液 6 0 μ L を単一標的遺伝子検出用微細流動装置の流入口を通じて第 1 流路に流入させた。単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第 1 流路に流入した試料溶液は毛細管現象により第 1 流路を経て第 2 流路に移動した。2 時間放置した後、D D W（Water Purification System/LABOGENE）洗浄した。

【 0 1 0 2 】

ステップ 3：前記試料溶液に含まれた単一標的遺伝子 { 単一病原菌（Bacillus anthracis）遺伝子 } とテンプレートのライゲーションステップ；

第 1 流路に流入した試料溶液は毛細管現象により第 2 流路に流れた。

50

次に、単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路に2 X T7リガーゼ (ligase) 30 μ L、T7リガーゼ5 μ L、100 mM DTT 0.2 μ L、DDW (Water Purification System/LABOGENE) 24.8 μ Lで単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路を詰めた。装置の中の水分が蒸発することを防止するために、パラフィルムで封入したプラスチック容器の中に入れて試料溶液と反応させた。プラスチックの中は水に浸したチリ紙と25の水で詰めた。その後、攪拌培養器 (shaking incubator) (VS-8480 (VISION SCIENTIFIC CO)) 無攪拌 (non-shaking)、25で3時間の間反応させた。

【0103】

ステップ4：前記ライゲーションされた遺伝子産物の増幅ステップ (Rolling Circle Amplification) 10

【0104】

その後、25 mM dNTP 2 μ L、10 X T7 ligase reaction buffer (Biolabs) 6 μ L、phi29 polymerase (10 unit/ μ L) 50 μ L、pyrophosphatase 1 μ L、100 mM DTT 1 μ Lで単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路内を詰めた。単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路内の水分が蒸発することを防止するために、パラフィルムで封入したプラスチック容器の中に入れて反応させた。プラスチックの中は水に浸したチリ紙と30の水で詰めた。その後、攪拌培養器 (shaking incubator) (VS-8480 (VISION SCIENTIFIC CO)) 無攪拌 (non-shaking)、30、3時間条件で進行した。 20

【0105】

ステップ5：前記増幅された標的遺伝子産物の検出ステップ (標的遺伝子検出確認)

検出用組成物にGel red (GelRedTM/Biotium) 1 : 1000希釈水 (DDW (Water Purification System/LABOGENE) で希釈) 50 μ Lを流入口を通じて入れてあげた。Gel red (GelRedTM/Biotium) 1 : 200希釈水は第1流路を経て第2流路に流れた。Gel red (GelRedTM/Biotium) の希釈倍数は普通1 : 10000に希釈して使用するが、肉眼で色を見るために調節するものであり、これに制限されるものではない。

図9のaを参照すると、2番流路で赤く見えるものはDNA membraneであり、Gel redのような染色試薬を検出用組成物にして前記増幅された標的遺伝子産物の検出が可能であることが分かった。また、図9のbのように、Imager (Gel DocTM EZ (Bio-rad)) で見ると、単一標的遺伝子検出用微細流動装置内の2番流路で流れが塞がったことが容易に分かった。これを通じて本発明の単一標的遺伝子検出用微細流動装置を使用してThermo cyclerのような装置を使用せず、特別な温度変化を与えなくても温和な温度条件、例えば30 30

の温度条件で単一標的遺伝子、例えば、単一病原菌 (Bacillus anthracis) 遺伝子の検出が肉眼で可能であることを確認した。

【0106】

実施例3-2：2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置を用いた標的遺伝子を検出する方法 { 2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置を用いた単一標的病原菌 (Bacillus anthracis及びEbola virus) 遺伝子を検出する方法 }

ステップ1：実施例2-2による2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置 { 2以上の病原菌 (Bacillus anthracis及びEbola virus) 遺伝子検出用微細流動装置 } を提供するステップ 40

2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置を提供 (準備) した。具体的に、実施例2-2により2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置 { 2以上の病原菌 (Bacillus anthracis及びEbola virus) 遺伝子検出用微細流動装置 } を提供した。

【0107】

ステップ2：第1流路に試料溶液を流入させるステップ

(1) 試料溶液準備

Bacillus anthracisの病原菌遺伝子配列に基づいて試料 (Pathogen_BA) (配列番号1 2) をBioneer (HPLC Purification) から注文して準備した。1 X PBS内のPathogen_ 50

B_A 100で試料溶液を準備した。

【 0 1 0 8 】

(2) 試料準備

Bacillus anthracis及びEbola virusの病原菌遺伝子配列に基づいて試料 { (Pathogen_BA) (配列番号 1 2) 及び Pathogen_E (配列番号 1 3) } を各々 Bioneer (HPLC Purification) から注文して準備した。1 X P B S 内の Pathogen_B_A 100で試料溶液を準備した。また、1 X P B S 内の Pathogen_E 100で試料溶液を準備した。

【 0 1 0 9 】

以下の < 表 5 > は実施例 2 で使用した Bacillus anthracis 及び Ebola virus のテンプレート及び病原菌配列を示す。

【 0 1 1 0 】

【表 5】

病原菌の種類	配列番号	テンプレート配列(5' →3')	配列番号	Pathogen配列
Bacillus anthracis	10	5'-phosphate-TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC T AG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AG T ACT TCG ATT TGA GCG-3'	12	5'-TTC TCC AT T TCA AAC GCT CA-phosphate-3'
Ebola virus	11	5'-phosphate-GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG G TA GCA T GC TA G T AT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC-3'	13	5'-CGC GTG CG T CGT GCG ATT TCT CGT T-phosphate-3'

【 0 1 1 1 】

(2) 第 1 流路に (1) で準備した試料溶液を流入させるステップ

(1) で準備した試料溶液 6 0 μ L を単一標的遺伝子検出用微細流動装置の流入口を通じて第 1 流路に流入させた。単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第 1 流路に流入した試料溶液は第 1 流路を経て第 2 流路に移動した。第 2 流路の 2 番流路及び 3 番流路は Template_E の総 2 0 μ L のうちの 5 μ L 及び Template_B_A の総 2 0 μ L のうちの 5 μ L を入れてあげた。2 時間放置した後、D D W (Water Purification System/LABOGENE) 洗浄した。

【 0 1 1 2 】

ステップ 3 : 前記試料溶液に含まれた 2 以上の標的遺伝子 { 2 以上の病原菌 (Bacillus anthracis 及び Ebola virus 遺伝子) とテンプレートライゲーションステップ ;

単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第 2 流路に 2 X T 7 リガーゼ (ligase) 3 0 μ L、T 7 ligase 5 μ L、1 0 0 m M D T T 0 . 2 μ L、D D W (Water Purification System/LABOGENE) 2 4 . 8 μ L で単一標的遺伝子検出用微細流動装置の第 2 流路を詰めた。装置内の水分が蒸発することを防止するためにパラフィルムで封入したプラスチック容器内に入れて反応させた。プラスチックの中は水に浸したチリ紙と 2 5 の水で詰めた。その後、攪拌培養器 (shaking incubator) (V S - 8 4 8 0 (VISION SCIENTIFIC CO)) 無攪拌 (non-shaking)、2 5 で 3 時間の間反応させた。

これによって試料に存在する標的遺伝子 (病原菌の遺伝子) が特定テンプレートと相補的結合して環形テンプレートを形成することができる (図 3 の C 参照) 。

【 0 1 1 3 】

ステップ 4 : 前記ライゲーションされた遺伝子産物の増幅ステップ (Rolling Circle Amplification)

< 方法 1 >

その後、2 5 m M d N T P 2 μ L、1 0 X T 7 ligase reaction buffer (Biolabs) 6 μ L、phi 2 9 polymerase (1 0 u n i t / μ L) 5 0 μ L、pyro phosphatase

1 μ L、100 mM DTT 1 μ Lで2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路内のを詰めた。2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路内の水分が蒸発することを防止するためにパラフィルムで封入したプラスチック容器内に入れて反応させた。プラスチックの中は水に浸したチリ紙と30の水で詰めた。その後、攪拌培養器 (shaking incubator) (VS-8480 (VISION SCIENTIFIC CO)) 無攪拌 (non-shaking)、30、3時間条件で進行した。

【0114】

<方法2>

その後、25 mM dNTP 2 μ L、0.4 mM Biotin-14-dCPT 1 μ L、10X T7 ligase reaction buffer (Biolabs) 2 μ L、Phi29 polymerase (500 unit/ μ L) 5 μ L、Pyrophosphatase 1 μ L、100 mM DTT 0.8 μ L、DDW 6.2 μ Lで2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路内のを詰めた。2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路内の水分が蒸発することを防止するためにパラフィルムで封入したプラスチック容器内に入れて反応させた。プラスチックの中は水に浸したチリ紙と30の水で詰めた。その後、shaking incubator (VS-8480 (VISION SCIENTIFIC CO)) non-shaking、30、3時間反応条件で反応させた。

【0115】

前記方法1または方法2により回転環増幅 (rolling circle amplification) を通じて標的遺伝子 (核酸) が増幅できる (図3のD参照)。

【0116】

ステップ5：前記増幅された標的遺伝子産物の検出ステップ (標的遺伝子検出確認)

凝集した単一鎖形態の回転環増幅された遺伝子産物 (図3のE参照) が微細流動装置の第2流路の各々の分岐を選択的に塞ぐことができ、これによって遺伝子の検出が可能である。微細流動装置の第2流路に検出用組成物を入れてあげる場合、検出をより容易にすることもできる (図3のF参照)。

【0117】

<ステップ4の方法1に関連した検出方法>

検出用組成物にGel red (GelRed™/Biotium) 1:1000希釈水 (DDW (Water Purification System/LABOGENE)) で希釈) 50 μ Lを流入口を通じて入れてあげた。Gel red (Gel Red™/Biotium) 1:80希釈水は第1流路を経て第2流路に流れた。

図10のbのようにImager (Gel Doc™ EZ (Bio-rad)) で見ると、2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置内の2番流路及び3番流路で流れが塞がったことが容易に分かった。これを通じて本発明の2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置を使用してThermo cyclerのような装置を使用せず、特別な温度変化を与えなくても温和な温度条件、例えば30

の温度条件で2以上の標的遺伝子、例えば、2以上の病原菌 (Bacillus anthracis及びEbola virus) 遺伝子の同時検出が肉眼で可能であることを確認した。

【0118】

<ステップ4の方法2に関連した検出方法>

検出用組成物にStreptavidinビードを使用した。具体的に、Streptavidin Fluoresbrite YG Microspheres 2.0 Micro 1:20希釈水 (DDW (Water Purification System/LABOGENE)) で希釈) 50 μ Lを流入口を通じて入れてあげた。

図11のように、RCA産物による空気層により塞がるか、またはRCA産物のビオチンとストレプトアビジン (streptavidin) が反応して、さらに凝集したRCA産物により2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置内の2番、3番流路で流れが塞がったことが容易に分かった。これを通じて本発明の2以上の標的遺伝子検出用微細流動装置を使用してThermo cyclerのような装置を使用せず、特別な温度変化を与えなくても温和な温度条件、例えば30の温度条件で2以上の標的遺伝子、例えば、2以上の病原菌 (Bacillus anthracis及びEbola virus) 遺伝子の同時検出が肉眼で可能であることを確認した。

【0119】

<実験例1> 各ステップの電気泳動 (electrophoresis) 結果確認

前記製造例 1 で製造したTemplate_BAと病原菌 (Pathogen) との結合及びライゲーションを電気泳動結果で確認するための実験を進行した。前記実験例 1 では製造例 1 のテンプレートと病原菌に対する反応の有無を確認するためにチューブ (tube) で簡易に実験した。また、さまざまな反応条件をテストするために熱循環器 (Thermo cycler) を使用した。これと共に、前記製造例 1 で製造したTemplate_Eと病原菌 (Pathogen) との結合及びライゲーションを電気泳動結果で確認するための実験を進行した。チューブでの実験では、テンプレートをプライマーに固定させないので、各々のPathogen 3' 末端、即ち、病原菌遺伝子 3' の末端にPhosphateを付けなかった。

【 0 1 2 0 】

(1) アニーリング (Annealing) ステップの確認

1 0 0 Bacillus anthracisに対するテンプレート (Template_BA) (配列 番号 1 0) を D E P C (Sigma-Aldrich) を溶媒に使用して 1 Template_BAで希釈した。チューブ (Tube) に D D W (Water Purification System/LABOGENE) 3 . 2 μ L、1 0 X P B S p H 7 . 4 (lifetechnologies社によるgibco) 1 μ L、4 0 m M M g C l ₂ (Sigma-Aldrich) 5 μ L を順次に入れて 1 Template_BA 0 . 8 μ L (即ち、0 . 8 p m o l e) を入れた。その後、Thermo cycler (Bio-rad T100TM) で 9 5 $\rightarrow$ 4 に 1 時間の間温度を低めた。

その後、ローディング染料 (loading dye) (Gel Loading Dye Blue 6X / Biolabs) 2 μ L を入れて 1 5 % PAGE in 1 X Tris-borate-EDTA (T B E) バッファに電気泳動した後 (1 5 0 V、4 5 分)、ゲルレッド (Gel red) (GelRedTM / Biotium) で染色し、Gel DocTM EZ (Bio-rad) で電気泳動結果を確認した。

前記Template_BAの代わりにTemplate_E (配列番号 1 1) を使用するのを除いて同一な方式によりアニーリング (Annealing) ステップの確認実験を遂行した。

【 0 1 2 1 】

(2) 混成化 (Hybridization) ステップの確認

試料のBacillus anthracis (Pathogen_BA Not PhosP) (配列番号 1 4) とテンプレートの混成化を確認するために次の実験を行った。まず、チューブ (Tube) に D D W (Water Purification System/LABOGENE) 2 μ L、1 0 X P B S p H 7 . 4 (lifetechnologies社によるgibco) 1 μ L、4 0 m M M g C l ₂ (Sigma-Aldrich) 5 μ L を順次に入れて 1 0 Pathogen_BA_Not Phospと 1 0 Template_B_Aを各々 1 μ L ずつ入れた。その後、Thermo cycler (Bio-rad T100TM) で 9 5 $\rightarrow$ 4 に 1 時間の間温度を低めた。

その後、総 1 0 μ L のうち、1 μ L (即ち、0 . 8 p m o l e) を 1 X P B S 9 μ L で詰めた後、ローディング染料 (loading dye) (Gel Loading Dye Blue 6X/ Biolabs) 2 μ L を入れて 1 5 % PAGE in 1 X Tris-borate-EDTA (T B E) バッファに電気泳動した後 (1 5 0 V、4 5 分)、Gel red (GelRedTM / Biotium) で染色し、Gel DocTM EZ (Bio-rad) で電気泳動結果を確認した。

前記Template_BA (配列番号 1 0) の代わりにTemplate_E (配列番号 1 1) を使用し、Pathogen_BA_Not PhosP (配列番号 1 4) の代わりにTemplate_E_Not PhosP (配列番号 1 5) を使用することを除いて、同一な方式により混成化 (Hybridization) ステップの確認を遂行した。

【 0 1 2 2 】

(3) ライゲーション (Ligation) ステップの確認

チューブ (Tube) に D D W (Water Purification System/LABOGENE) 2 . 4 μ L、2 X T 7 ligase reaction buffer (Biolabs) 1 0 μ L、1 0 0 Pathogen_BA_Not PhosP (配列番号 1 4) 1 . 6 μ L、1 0 0 Template_BA (配列番号 1 0) 0 . 8 μ L を順次に入れて、Thermo cycler (Bio-rad T100TM) で 9 5 $\rightarrow$ 4 に 5 分間温度を低めた。その後、1 0 0 m M D T T {Epicenter RepliPhi Phi29試薬セット (0 . 1 μ L / μ L)} 0 . 2 μ L と T 7 リガーゼ (Biolabs) 5 μ L を入れてあげた。その後、Thermo cycler (Bio-rad T100TM) で 2 5 $\rightarrow$ 1 3 時間 $\rightarrow$ 6 5 $\rightarrow$ 2 0 分 $\rightarrow$ 1 0 に維持した。結果的に、4 ライゲーション生成物 (ligation product) 2 0 μ L が作られた。ライゲーション生成物 0

． 8 p m o l e にローディング染料 (loading dye) (Gel Loading Dye Blue 6X / Biolabs) 2 μ L を入れて、 1 5 % PAGE in 1X Tris-borate-EDTA (T B E) バッファに電気泳動した後 (1 5 0 V 、 4 5 分) 、 Gel red (GelRedTM / Biotium) で染色し、 Gel DocTM EZ (Bio-rad) で電気泳動結果を確認した。

前記 Template_BA (配列番号 1 0) の代わりに Template_E (配列番号 1 1) を使用し、 Pathogen_BA_Not PhosP (配列番号 1 4) の代わりに Template_E_Not PhosP (配列番号 1 5) を使用することを除いて、同一な方式により混成化 (Hybridization) ステップの確認を遂行した。

【 0 1 2 3 】

(4) 回転環増幅 (Rolling circle amplification)

10

チューブ (Tube) に D D W (Water Purification System / LABOGENE) 7 . 2 μ L 、 1 0 X T 7 ligase reaction buffer (Biolabs) 2 μ L { Epicenter Repli PHI Phi29 試薬セット (0 . 1 μ L / μ L) } の順に入れてライゲーションステップで作った 4 ライゲーション生成物 (ligation product) 2 μ L (8 p m o l e) を入れた。その後、 2 5 m M d N T P { Epicenter Repli PHI Phi29 試薬セット (0 . 1 μ L / μ L) } 2 μ L 入れて 1 0 0 m M D T T { Epicenter Repli PHI Phi29 試薬セット (0 . 1 μ L / μ L) } 0 . 8 μ L 、 Pyrophosphatase (1 0 0 U / m l Biolabs) 1 μ L 、 Phi29 polymerase { Epicenter Repli PHI Phi29 試薬セット (0 . 1 μ L / μ L) } 5 μ L を順次に入れた。その後、 Thermo cycler (Bio-rad T100TM) で 3 0 1 5 時間 $\rightarrow$ 6 5 1 0 分 $\rightarrow$ 4 に維持した。

20

【 0 1 2 4 】

(5) 電気泳動結果確認

D N A ラダー (Quick-Load LMW Ladder / Biolabs) を基準とし、前記 テンプレート (Template_BA) (配列番号 1 0) 、病原菌 (Pathogen_BA_Not PhosP) (配列番号 1 4) 、及び前記 (1) ~ (3) ステップで得た生成物を各々 0 . 8 p m o l e ずつローディングして電気泳動した結果を図 4 に示した。

図 4 を参照すると、テンプレート (Template) は、普通、線形 (linear form) 、即ち、線形テンプレート (Linear template) として存在するが (図 4 の a 参照) 、前記テンプレートは自家組立できる条件下でダンベル形態を形成するためのテンプレート内の相補的な結合部位間の相補的な結合することによって、アニーリング (annealing) されて自家組立された形態 (Self-assembled form) 、自家組立されたテンプレート (Self-assembled template) が作られることを確認することができた (図 4 の b 参照) 。自家組立された形態のテンプレート内の標的遺伝子と相補的に結合する結合部位と標的遺伝子、例えば病原菌 (Pathogen) 遺伝子が結合すれば、ネッキ (nick) が消えた閉じた型 (closed form) のダンベル形態のテンプレート (Dumbbell-shaped template) が形成されてライゲーション (ligation) されることを確認することができた (図 4 の c 参照) 。次に、ライゲーション生成物の回転環増幅 (Rolling circle amplification) (R C A) が起こることを確認することができた。

30

【 0 1 2 5 】

< 実験例 2 > R C A 生成物の S E M イメージ確認

40

(1) Bacillus anthracis 確認

前記製造例 1 で製造した Template_B_A を使用して実験例 1 の (4) の方法により収得した R C A 生成物 2 0 μ L に 2 M M g C l ₂ 2 μ L を入れて徐冷 (Slow cooling) (1 時間に亘って 9 5 $\rightarrow$ 4) したところ、約 1 m m 程度の白い D N A 球 (DNA ball) が生じた。ガラスウェア (glassware) (MARIENFELD) に D N A 球 (DNA ball) を載置し、 2 4 時間乾燥した後、 m i c a (Pelco Mica sheets、Ted Pella Corp.) に結合させて S E M (Tm3030 tabletop microscope / Hitachi High-Tech) 写真を撮った。図 5 のように精巧な単一鎖の D N A 塊りが形成されることを確認することができる。

【 0 1 2 6 】

(2) Ebola virus 確認

50

前記製造例 1 で製造したTemplate_Eを使用して実験例 1 の (3) の方法により取得した R C A 生成物 2 0 μ L に 5 M N H ₄ O A c 4 0 (SIGMA-Aldrich) を入れて 1 0 0 % の E t O H 5 0 0 で詰めた後、2 0 分間冷凍した。その後、遠心分離 (1 0 , 0 0 0 r p m、2 0 分、4) し、上層液を取って 4 0 残して、3 0 分間超音波処理 (BRANSON5510) した。ガラスに載置し、2 4 時間乾燥させた後、m i c a (Pelco Mica sheets、Ted Pella Corp.) に結合させて S E M (Tm3030 tabletop microscope/Hitachi High-Tech) 写真を撮った。図 6 のように増幅された遺伝子産物の凝集した鎖の塊りが形成されることを確認することができた。

【 0 1 2 7 】

< 実験例 3 > 回転環増幅された遺伝子産物のハイドロゲル形成確認

10

実験例 1 の回転環増幅 (Rolling circle amplification ; R C A) 反応により得た増幅された遺伝子産物がハイドロゲルを形成するかを確認するための実験を遂行した。病原菌には Bacillus anthracis (Pathogen_BA Not Phosp、配列番号 1 4) 及び Ebola virus (Pathogen_E Not Phosp、配列番号 1 5) を使用した。

前記実験例 3 では製造例 1 のテンプレートと病原菌に対する反応有無を確認するためにチューブ (tube) で簡易に実験した。また、さまざまな反応条件をテストするために熱循環器 (Thermo cycler) を使用した。

ハイドロゲル形成による粘度測定のためにチューブ (tube) とピペットチップ (pipette tip) を用いて粘度測定及び回転粘度計測定を遂行した。

【 0 1 2 8 】

20

(1) チューブ (tube) 及びピペットチップ (pipette tip) を用いた粘度測定

チューブをチューブの長軸を中心に 9 0 度角度に傾けた後、反応液体 (実験例 1 の (4) 回転環増幅の産物を含んだ溶液) の流れ性を測定した。6 0 秒間流れ性が確認されない場合、標的遺伝子、例えば、Pathogen遺伝子 (Template_BAまたはTemplate_E) 検出が確認されることを示す。

また、ピペットチップ (pipette tip) を用いて反応液体 (実験例 1 の (4) 回転環増幅の産物を含んだ溶液) を持ち上げる時 (吸い上げる時) の粘性変化によって反応液体 (実験例 1 の (4) 回転環増幅の産物を含んだ溶液) がピペットチップの表面に沿って吸い上げるようになることで、水のような粘性の場合にはチップに沿って吸い上げるものがないが、粘度が増加するほどチップの内に物質が吸い上げて、戻り性質が増加することを確認した (図 7 の a 参照) 。

30

前記製造例 1 で製造したTemplate_BAまたはTemplate_Eを用いた回転環増幅反応で全て 6 0 秒間ほとんど流れ性を表さない粘性を有するようになって、標的遺伝子、例えば、Pathogen遺伝子 (Template_BAまたはTemplate_E) の検出が可能であることが分かった。また、Template_BAより病原菌に相補的な長さがより長いTemplate_Eを用いた時、より粘度があるハイドロゲルが形成されることを確認した。

【 0 1 2 9 】

(2) 回転粘度計測定

前記製造例 1 で製造したTemplate_Eを用いて実験例 1 に開示された回転環増幅 (Rolling circle amplification ; R C A) 反応により得た増幅された遺伝子産物 に対する粘度変化を回転粘度計を用いて測定した。反応液体 (実験例 1 の (4) 回転環増幅の産物を含んだ溶液) の粘性変化増加及びstorage modulus (G ') 値とloss modulus (G ' ') 値の割合を測定し、これを図 7 の b に示した (x 軸 : Frequence (H z) 、 y 軸 : Pascal (P a)) 。ハイドロゲル形成による粘性変化増加から標的遺伝子、例えば、Ebola virus の検出が可能であることが分かった。

40

【 0 1 3 0 】

< 実験例 4 > 標的遺伝子検出用微細流動装置の第 2 流路をコーティングすることに伴う効果確認

実施例 3 - 1 の方法による標的遺伝子検出用微細流動装置を用いて標的遺伝子を検出する方法を遂行した後、第 2 流路の形態を原子探針顕微鏡 (A F M) (N X - 1 0、Park S

50

ystem)で調べた。ステップ2の工程を遂行しないこと(5-ヒドロキシドーパミン塩酸で第2流路をコーティングする過程無しで)を除外し、実施例2-1の単一標的遺伝子検出用微細流動装置の製造方法により製造した単一標的遺伝子検出用微細流動装置を使用して標的遺伝子を検出する方法(実施例3-1の方法)を遂行した後、第2流路の形態を原子探針顕微鏡(AFM)(NX-10、Park System)で調べた。

その結果、5-ヒドロキシドーパミン塩酸を用いたコーティングするステップ(5-ヒドロキシドーパミン塩酸で前処理するステップ)無しでプライマーを固定させた場合(図8のa)は、基板の表面に付着されたプライマーがほとんど存在しなくて標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路上で増幅が起こらなかった。一方、5-ヒドロキシドーパミン塩酸を用いたコーティングするステップ(5-ヒドロキシドーパミン塩酸で前処理するステップ)を遂行し、プライマーを固定させた後、標的遺伝子(核酸)を増幅させた場合(図8のb)には、標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路上で核酸の増幅が優れるに起こることが分かった。これを通じて5-ヒドロキシドーパミン塩酸がDNAプライマーを標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路に効果的に固定化できることが分かった。

これを通じて5-ヒドロキシドーパミン塩酸で標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路をコーティングする場合、チオール(thiol)基を含有しているプライマーと反応してプライマーが標的遺伝子検出用微細流動装置の第2流路上に効果的に固定されるので、以後の工程により核酸の増幅が増加できることが分かる。

【0131】

<実験例5> 標的遺伝子検出用微細流動装置を用いたメルス(MERS)ウイルス検出

(1) 標的メルス(MERS)遺伝子検出用微細流動装置の製造

実施例2のステップ1及びステップ2で記述したように、図1のように基板上に流入口、第1流路、3個の第2流路、及び各々の第2流路の端部に排出口が形成された装置を準備した。実施例2では、5-ヒドロキシドーパミン塩酸を第2流路内に注入して第2流路内をコーティングしたが、本実験例ではビニル基を蒸気蒸着方式によりプラスチック材質の第2流路にコーティングした。実施例2と同一な方法によりコーティングすることも可能である。その後、DDWで洗浄した。

次に、実施例2のステップ3のように、Primer-5SS-polyA9(BIONEER)(配列番号9)プライマーとDTTの混合液を流入口に注入した。DTTによってプライマーに存在するチオール基が露出し、露出したチオール基が第2流路上のビニルコーティング(または、5-ヒドロキシドーパミン塩酸コーティング)に結合された。その後、DDWで洗浄した。

次に、前記3個の第2流路上に固定されたプライマーに互いに異なるテンプレート100を0.2μL(=20pmole)が1XPBS(lifetechnologies社のgibco)に希釈した溶液を注入して、プライマーに各テンプレートが結合されるようにした。

具体的に、上面視して、左側の第2流路には製造例1(1)のTemplate_BA(Bacillus anthracisに対するテンプレート、配列番号10)を結合させた。前記第2流路は陰性対照群(Negative Control; NC)であって、微細流動装置に注入された試料内にメルスウイルスが含まれていても前記テンプレートと何らの反応を起こさないなので、回転増幅反応が起こらない。

中央の第2流路にはメルスウイルス(MERS-CoV)に対するテンプレートを結合させた。中央の第2流路は試料群(Sample)であって、微細流動装置に注入された試料内にメルス遺伝子が存在する場合のみに回転増幅が起こるようになる。一方、前記メルスウイルスに対するテンプレートの配列は、次の通りである。

【0132】

テンプレートMERS

5' /5Phos/AGG GCA CAT CTC CGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT ATA CCC-3'

【0133】

前記テンプレートMERS配列で、標的メルスコロナウイルス遺伝子に相補的な部分を

白地に濃い字で、テンプレート内の互いに相補的な部分をイタリック体で、プライマーに相補的に結合する部分をイタリック体にアンダーラインして表示した。

上面視して、右側の第2流路には第2流路上に固定されたプライマーに前記のようなメルスウイルスに対するテンプレートを結合させ、前記テンプレートに結合する標的メルス遺伝子を添加して、常に回転増幅が起こるようにした。左側の第2流路を陽性対照群（Positive Control；PC）とした。

【0134】

（2）標的メルス（MERS）遺伝子の検出

次に、前記メルスウイルスに対するテンプレートに結合するメルスウイルス遺伝子を含む試料を前記（1）で製造された微細流動装置の流入口に注入した。その後、ライゲーションが25℃で夜通し起こるようにし、回転増幅は25℃で4時間の間起こるようにした。一方、ライゲーション時間及び回転増幅時間は状況によって調節できる。例えば、結果を蛍光で確認する場合、ライゲーション時間及び回転増幅時間が遥かに縮めることも可能であり、例えば2時間の間ライゲーションが起こるようにし、2時間の間回転増幅が起こるようにした後、観察することができる。

10

実験例5のように、陰性対照群、試料群、陽性対照群の3個の第2流路を有する微細流動装置で起こる過程の模式図を図13に示した。

【0135】

結果は図14に示した。図14で、右側の陰性対照群の第2流路では排出口が塞がらなくて試料が流れて出て、中央の試料群の第2流路及び左側の陽性対照群の第2流路では回転増幅が起こって、ハイドロゲル塊りが形成され、排出口を塞ぐことが観察される。

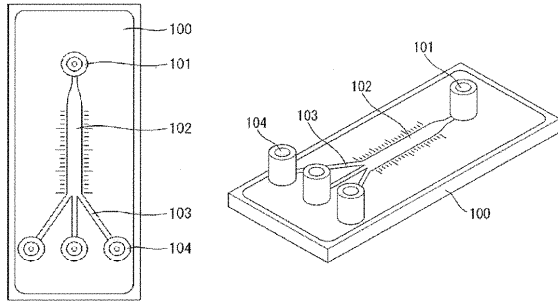
20

【符号の説明】

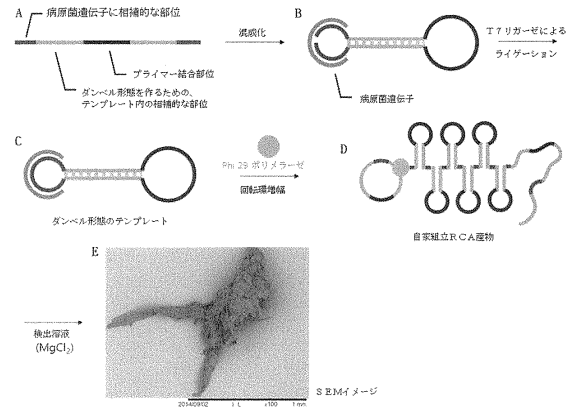
【0136】

- | | |
|-----|------|
| 100 | 基板 |
| 101 | 流入口 |
| 102 | 第1流路 |
| 103 | 第2流路 |
| 104 | 排出口 |

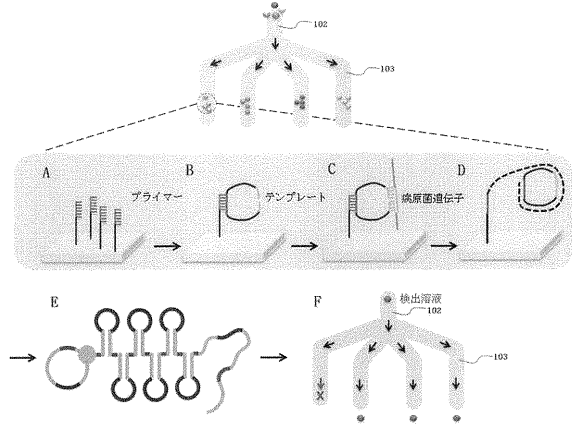
【図 1】



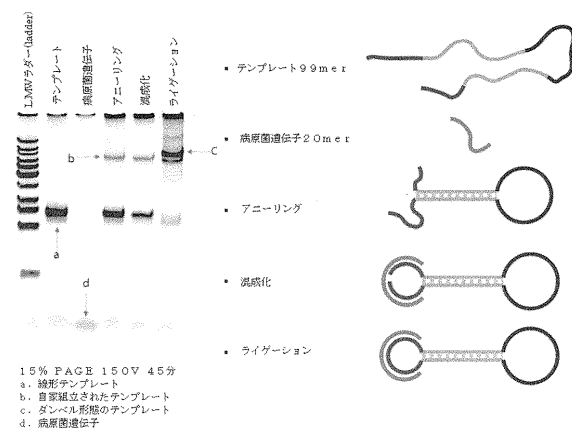
【図 2】



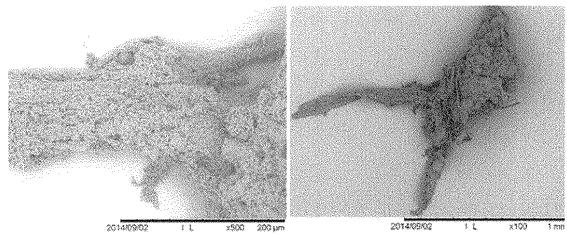
【図 3】



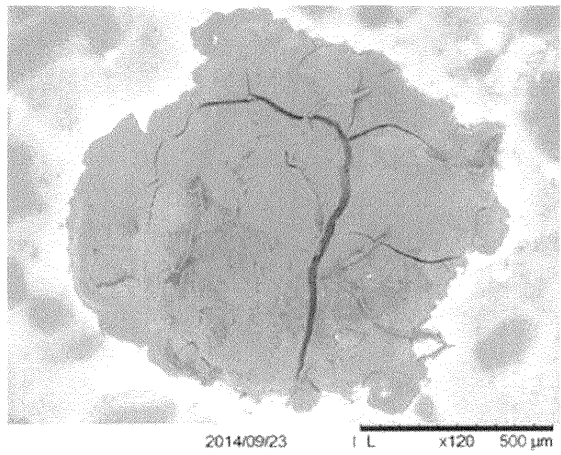
【図 4】



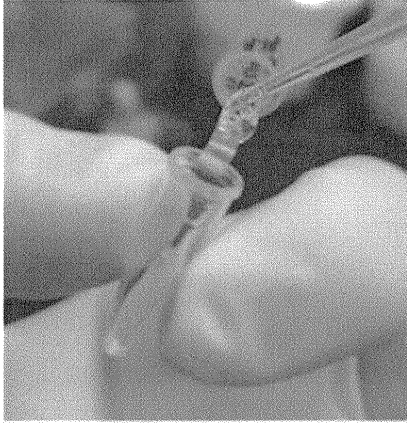
【図 5】



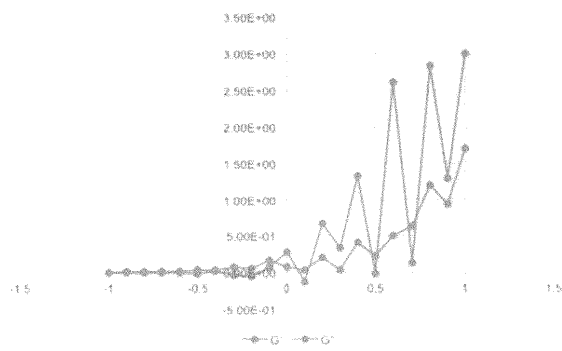
【図 6】



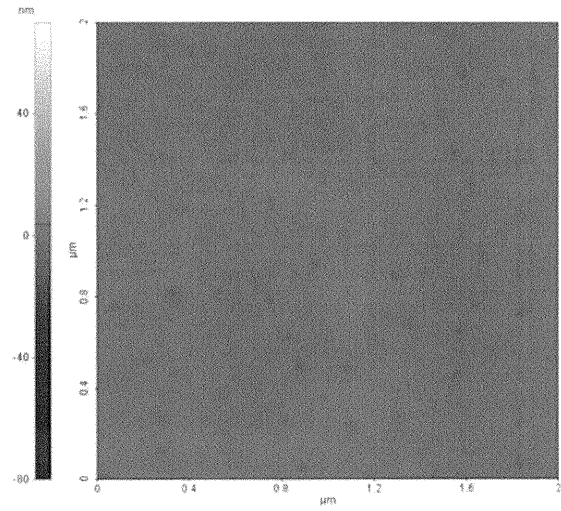
【図 7 a】



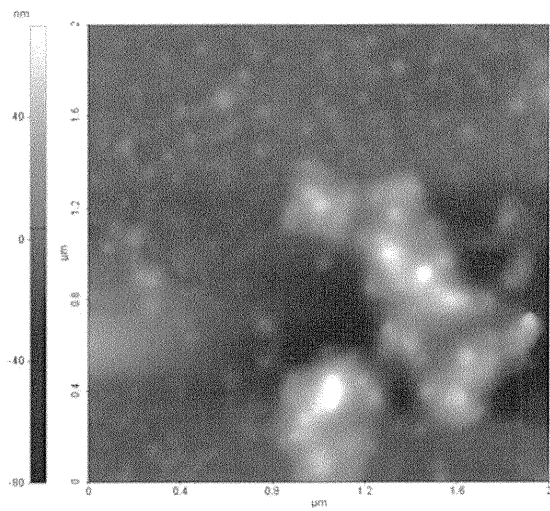
【図 7 b】



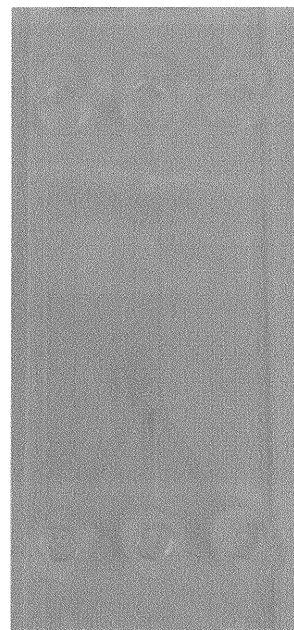
【図 8 a】



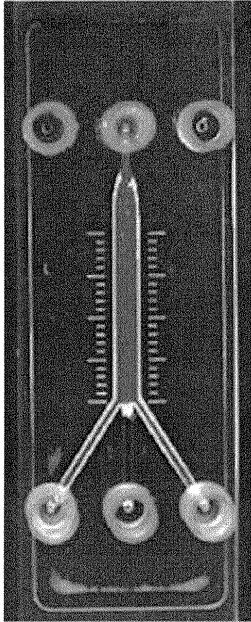
【図 8 b】



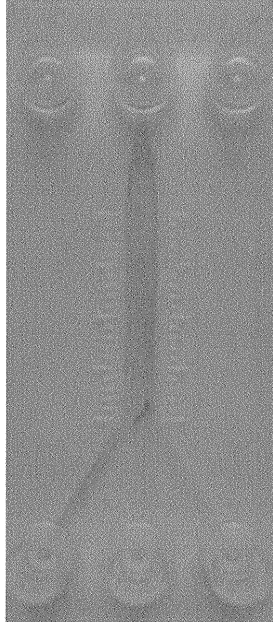
【図 9 a】



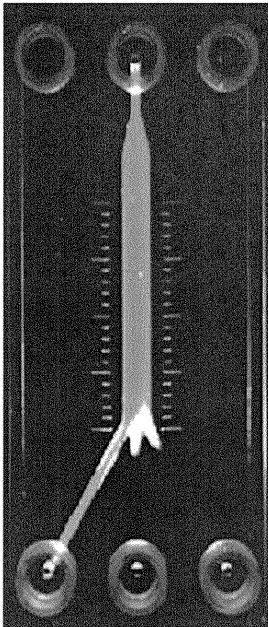
【図 9 b】



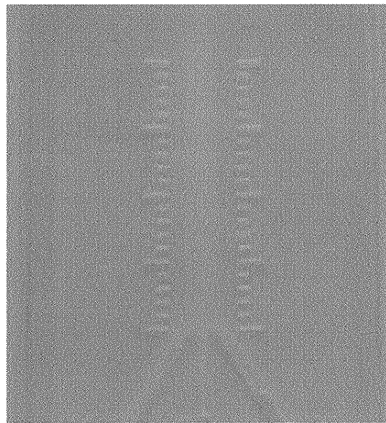
【図 10 a】



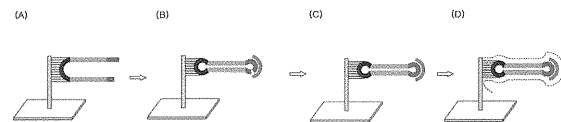
【図 10 b】



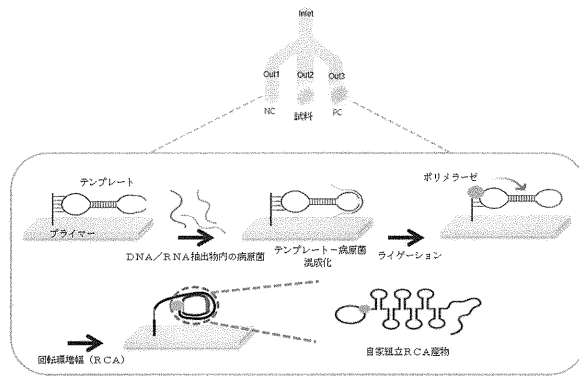
【図 11】



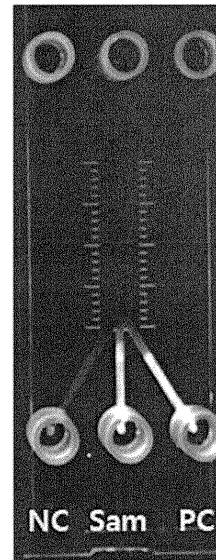
【図 12】



【図 13】



【図 14】



【配列表】

0006643347000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72)発明者 リー、ヒュクジン

大韓民国、04194 ソウル、マポ - グ、ベクビョン - ロ 205、104 - 504

(72)発明者 リー、ヘシン

大韓民国、34121 テジョン、ユソン - グ、ムンジ - ロ 14、1 - 202

(72)発明者 リー、ホヨン

大韓民国、35355 テジョン、ソ - グ、ドアンドン - ロ 177、114 - 1901

(72)発明者 ジュン、イル・ヨン

大韓民国、セジョン 30130、ナリ - ロ 38、705 - 2202

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 Anal. Bioanal. Chem., 2006, 386(7-8), pp.1975-1984

Nucleic Acids Res., 2010, 38(15), e156

Lab Chip, 2010, 10(10), pp.1262-1266

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10

C12Q 1/68 - 1/6897

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)