

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成 17 年 9 月 22 日 (2005.9.22)

【公開番号】特開 2003-302373 (P2003-302373A)

【公開日】平成 15 年 10 月 24 日 (2003.10.24)

【出願番号】特願 2002-110503 (P2002-110503)

【国際特許分類第 7 版】

G 0 1 N 27/447

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/483

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/543

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/66

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/92

【F I】

G 0 1 N 27/26 3 1 5 Z

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/483 F

G 0 1 N 33/50 P

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/543 5 4 1 A

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/66 Z

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/92 Z

G 0 1 N 27/26 3 0 1 A

【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 4 月 11 日 (2005.4.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも次の (1)、(2) 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) 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。

【請求項 2】

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 1 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 4】

光学的又は電氣的に同一種に識別されるビーズ毎に、異なる前記検出用物質を固定することを特徴とする請求項 1 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 5】

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うことを特徴とする請求項 4 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 6】

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含む請求項 1 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 7】

前記ビーズは、磁気ビーズであることを特徴とする請求項 1 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 8】

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を特徴とする請求項 7 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 9】

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に、

前記(2)の手順後に、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請求項 1 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 10】

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 に記載の生化学的分析方法。

【請求項 11】

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。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

【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。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

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。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

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。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

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傾向標識やRI標識は不要となる。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

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。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

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。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 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。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 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。

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 2 0 】

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。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 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。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 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。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

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。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

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DNA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。旧0028

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

ビーズ表面は、従来のDNAチップの基板上的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。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

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。

【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

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、当該ビーズ 1 が保持する負電荷量が増加するので、該ビーズ 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。

【手続補正 21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

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ビーズ毎に、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。

【手続補正 22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

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ビーズ 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 中のビーズ 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。

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 1】

なお、ビーズ 1 として磁気ビ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ビ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ビーズ 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。

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 2】

ここで、上記電解液 R に、例えば、D C 電界をかけると、ビーズ 1 群は、ビーズ 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ビーズ群を模式的に示し、符号 1 b は、アクティブな反応を全く示さなかったビーズ群、符号 1 c は、反応が不充分であったビーズ群を示している。

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 3】

ビーズ 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、一方のビーズ 1 b 群は、ゆっくりと移動する。即ち、ビーズ 1 a とビーズ 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ビーズ 1 の色調に基づくバンドが電解液流路 4 に形成される。どの種のビーズが速く移動して正電極部 4 2 側に集まり、どの種のビ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。

【手続補正 2 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 4】

ここで、電解液 R に D C 電界 をかける前又は同時に、低・中周波数の A C 電界をかけることによって、ビーズ 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。

【手続補正 2 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 4 7 】

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。

【 手 続 補 正 2 8 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 4 8

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 4 8 】

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 1 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。

【 手 続 補 正 2 9 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 5 5

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 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。

【 手 続 補 正 3 0 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 5 6

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 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。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。

【 手 続 補 正 3 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 符 号 の 説 明

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 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

【手続補正 3 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 4】

