

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6518238号
(P6518238)

(45) 発行日 令和1年5月22日 (2019.5.22)

(24) 登録日 平成31年4月26日 (2019.4.26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 15/10 (2006.01)
 G O 1 N 33/53 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6813 Z
 C 1 2 N 15/09 Z N A Z
 C 1 2 N 15/10 Z
 G O 1 N 33/53 D
 G O 1 N 33/53 M

請求項の数 9 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-526217 (P2016-526217)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月8日 (2014.5.8)
 (65) 公表番号 特表2016-534723 (P2016-534723A)
 (43) 公表日 平成28年11月10日 (2016.11.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/004107
 (87) 国際公開番号 W02015/060511
 (87) 国際公開日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 審査請求日 平成28年9月9日 (2016.9.9)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0125675
 (32) 優先日 平成25年10月22日 (2013.10.22)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 516120445
 キム・ソンチョン
 大韓民国 03733 ソウル ソデムン
 -グ トンニンムンゴンウォン-ギル 1
 7 110-ドン 202-ホ
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一
 (74) 代理人 100107733
 弁理士 流 良広
 (74) 代理人 100115347
 弁理士 松田 奈緒子
 (72) 発明者 キム・ソンチョン
 大韓民国 03733 ソウル ソデムン
 -グ トンニンムンゴンウォン-ギル 1
 7 110-ドン 202-ホ
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子と核酸の結合情報を生成するためのマーカー、その製造方法、並びにそれを用いた生体分子分析方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 分析のための生体試料を準備する段階と、

(b) 前記生体試料に、外部標準物質としてその生体試料には存在しない 2 種以上の互いに異なるタンパク質を定量して互いに異なる定量値で混合する段階と、(c) 前記外部標準物質が混合された生体試料に、その生体試料中の標的タンパク質及び外部標準物質に それぞれ特異的に結合することが可能な核酸リガンドを処理することにより、生体試料中の標的タンパク質と前記核酸リガンドとの複合体及び外部標準物質と前記核酸リガンドとの複合体の生成を誘導する段階と、

(d) 前記標的タンパク質に対する前記複合体の核酸リガンド、及び前記外部標準物質に対する前記複合体の核酸リガンドを検出する段階と、

(e) 前記 (d) 段階で得られる、標的タンパク質に対する核酸リガンドの検出結果と外部標準物質に対する核酸リガンドの検出結果とを比較して生体試料中の標的タンパク質を定量する段階とを含むことにより、

前記 2 種以上の外部標準物質の互いに異なる定量値を標的タンパク質の定量的分析に用いることができることを特徴とする、生体試料中のタンパク質の定量方法。

【請求項 2】

前記 (d) 段階は、

(d-1) 前記標的タンパク質に対する前記複合体の核酸リガンドと前記外部標準物質に対する前記複合体の核酸リガンドとを一緒に増幅して分析ターゲットプローブを製造す

10

20

る段階と、

(d-2) 前記分析ターゲットプローブを検出する段階とを含んでなることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記核酸リガンドはいずれも、標的タンパク質または外部標準物質に特異的に結合する領域と、その領域の上流に正方向プライマーが結合する既知配列の領域と、該領域の下流に逆方向プライマーが結合する既知配列の領域とを含み、

前記正方向プライマーが結合する配列領域、及び前記逆方向プライマーが結合する配列領域が全ての核酸リガンドの間に同一配列で存在することにより、

前記(d-1) 段階の増幅は一組のプライマーを用いて行われることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記(d-2) 段階は、

(d-2-i) 支持体と該支持体に固着された下記(i)及び(ii)の捕捉プローブとを含むバイオチップに前記分析ターゲットプローブを処理し、その捕捉プローブと分析ターゲットプローブとの間に特異的結合情報の算出を誘導する段階と、

(i) 一本鎖核酸として前記標的タンパク質に対するターゲットプローブを捕捉することが可能な捕捉プローブ、

(ii) 一本鎖核酸として外部標準物質に対するターゲットプローブを捕捉することが可能な捕捉プローブ、

(d-2-ii) 前記特異的結合情報から標的タンパク質の生体試料中の存在有無及び存在量を決定する段階とを含んでなることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記(d-2-i) 段階は、

前記標的タンパク質に対する前記複合体の核酸リガンドと同一の配列を有する核酸リガンドを増幅するとともに、前記外部標準物質に対する前記複合体の核酸リガンドと同一の配列を有する核酸リガンドを増幅することにより、この2つの増幅物を定量し混合して比較ターゲットプローブを製造し、その比較ターゲットプローブを定量して前記分析ターゲットプローブと混合し、その比較ターゲットプローブとその分析ターゲットプローブを含む混合ターゲットプローブをバイオチップに処理して行われ、

前記比較ターゲットプローブはCy3またはCy5で標識し、

前記分析ターゲットプローブは前記比較ターゲットプローブとは異なるCy3またはCy5で標識することを特徴とする、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記標的タンパク質または外部標準物質に特異的に結合する領域は、前記標的タンパク質または前記外部標準物質との特異的結合を可能にする程度の十分な長さを有することを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

前記核酸リガンドが一本鎖核酸であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記核酸リガンドが一本鎖RNAであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記標的タンパク質が試料中の未知の標的タンパク質、既知の標的タンパク質またはこれらの混合物であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体分子からなる生体試料にある生体分子の生物学的意義を予測するための標準物質及び核酸チップ、その製造方法、並びにこれを用いた生体分子分析方法及び装置に関する。また、本発明は、生体分子とリガンドの結合情報を生成するための外部マーカ

10

20

30

40

50

ー（すなわち、外部標準物質）及びバイオチップの製造方法、並びにこれを用いた生体分子分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体試料を構成する数多くの生体分子（タンパク質及び炭水化物）のプロファイルを生産する技術は、物理学、生化学及び生物情報学の発達に伴って広く開発されたが、従来の方法や機器の使用及び維持費、容易性、精度、敏感度、検査時間、及び過程の自動化などの問題により、効率のよい新規方法及び装置に対する必要性が非常に高い。

【0003】

生体分子を含む生体試料においてこれらの生体分子の量的な状態を総合化した情報、すなわち生体分子のプロファイル（profile）を生産する方法は、それ自体が究極的な目標ではなく目標を達成するための一つの手段であるが、微生物、細胞、組織などに有用に使用することができるため、医学、獣医学、環境工学、食品工学、農業などへと広範囲に応用されている。

10

【0004】

生体試料にある生体分子のプロファイルを用いて生物学的意義を分析するための臨床意思決定支援システム（Clinical Decision Support System）は、医師が患者診療の際に診断及び治療に関する意思決定（Decision Making）を行う過程を支援するシステムである。臨床意思決定支援システムは、事例ベースの機械学習推論システム（Case Based Machine Learning Inference System）とエキスパートシステム（Expert System）に大別される。事例ベースの機械学習推論システムは、疾患が判定された患者の臨床情報（Clinical Information）及び生物学的情報、すなわち生体分子プロファイルデータを収集した後、機械学習を利用して、与えられた臨床情報と生物学的情報などから疾患を推論または判別することができるようにするシステムである。エキスパートシステムは、医学専門家によって予め定められているルール（Rule）を使って疾病を診断するシステムである。

20

【0005】

核酸は、ヌクレオチドが共有結合により連結された線形的な多量体であり、ヌクレオチドは、小さな有機化合物であって、リン酸、糖及びプリン（アデニンまたはグアニン）またはピリミジン（シトシン、チミジン、ウラシル）である。核酸は一本鎖または二重鎖として存在し、一本鎖核酸は特定の物理的な条件の下でヌクレオチド間の水素結合及び相互作用により結合してユニークな立体構造を生成するが、このような立体構造は一本鎖の塩基配列によって決定される。

30

【0006】

一般に、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）などの核酸は、細胞構造及び酵素などの活性を有するタンパク質を発現するための情報の貯蔵体であるが、1982年、RNAが特定の構造を生成することにより酵素的活性も持っているという報告があった後、核酸の構造的な特性とそれに伴う特定の機能について多く報告されている。

【0007】

核酸は、4つの塩基の繰返しからなり、高い多様性を維持して多くの立体構造を生成する。このような立体構造は、特定の物質との相互作用によって複合体を生成することにより安定化される。

40

【0008】

核酸がタンパク質含有分子に対して一つの一本鎖核酸（リガンド）として作用することができるので、様々な塩基配列順に配列された一本鎖核酸が組み合せられたライブラリーから所定の選別過程と塩基配列決定を介して、高い結合親和性及び特異性で特定の物質に結合する核酸が選別されている。

【0009】

特定の物質に結合する核酸を選別する方法はSELLEX（Systematic Ev

50

olution of Ligand by Exponential enrichment) と呼び、選別された核酸はいわゆるアプタマー (aptamer) と呼ぶ (非特許文献 1)。

【0010】

このような S E L E X を介して、自然な状態で核酸に結合することが可能なタンパク質や、核酸に結合していないタンパク質などの様々な生体分子と非常に高い親和性で結合することが可能な核酸 (アプタマー) が選別されている。

【0011】

しかし、従来の S E L E X を用いた核酸選別方法は、特定の物質 (例えば、タンパク質) に特異的に結合する核酸の選別に先立って、優先的に当該タンパク質 (特定の物質) を大量に生産し、精製した後、生産されたタンパク質に一本鎖核酸のライブラリーを反応させ、選択及び増幅を繰り返し行って高い結合親和性の核酸 (アプタマー) を選定する方法であって、先ず、核酸を選別するための特定の物質を確保することが不可欠であった。したがって、従来の S E L E X を用いた核酸選別方法は、生体試料に含まれている数多くの未知の生体分子集団に意味を持つ集団としての核酸を選別し、利用することに関する技術思想は全く認識していない。生体分子一本鎖核酸の選択は様々な方法で行うことができるが、例えば、生体分子を固定させて複合体を収穫及び洗浄する方法や、キャピラリー電気泳動方法などがある。

【0012】

生体試料である組織、細胞塊、細胞及び微生物などを構成する未知の分子を含む生体分子のプロファイルは、物理・化学的な性質を利用して様々な方法で作られている。一般に、生体分子の分子量または p I 値などを用いて電気泳動を行うことにより、生体試料における生体分子の量的な状態である生体分子のプロファイルを確認している。

【0013】

また、プロファイルを分析して有用な生体分子を決定し、これを分離した後、MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) などこれらの構成成分を確認する方法などが行われている。最近では、SELDI-TOFMS (Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) によってタンパク質プロファイルに関する研究が盛んに行われている (非特許文献 2~4)

【0014】

また、最近では、プロテオームに対するハイスループットスクリーニング (High Throughput Screening) 技法でタンパク質チップ (Protein chip) またはアプタマーチップ (Aptamer chip) (非特許文献 5~6) が開発されて使われている。このようなハイスループットスクリーニングに使用される支持体としては、スライドガラス (glass slide)、バイオセンサーの感知表面、ビーズ、ナノ粒子などがある。

【0015】

タンパク質チップは抗体の配列状態を知っているため、前記タンパク質チップは特定の物質を区分及び定量することに使用できる。タンパク質チップの製作方法には、抗体を、マイクロアレイヤー (Microarrayer) を用いてスポットティング (spotting) して固定する方法がある。タンパク質チップ検出技術は、タンパク質チップが一つのチップでできる限り多くの情報を提供するための狭い面積に高密度で多数の抗体が集積されている状態で発生する非常に弱いシグナルを検出することができなければならない。また、タンパク質に対する生体情報が増えるにつれて、その集積度がさらに高まる傾向に発達しており、これを定量的に迅速かつ正確に検出するための新規方法が求められている。

【0016】

現在まで、検出方法は、主にレーザー誘起蛍光法 (laser induced fl

10

20

30

40

50

uorescence)が多く使われており、電気化学的検出方法などが開発されている。前述した様々な過程を介して、タンパク質チップを用いた生体試料における特定のタンパク質のプロファイルを生成及び分析する方法が開発されているが、高価な機器及び試薬を使用しており、複雑な過程を行わなければならないなどの問題があるうえ、抗体を製作することが可能な分子に対してのみ製作が可能であるという限界がある。

【0017】

アプタマーチップは、タンパク質チップとは、抗体を使用する代わりにアプタマー（核酸）を使用することが相違し、他の要素は非常に類似する。

【0018】

前述のように、タンパク質チップ及びアプタマーチップを用いた生体試料における生体分子の量的な状態、すなわちプロファイルを生成する方法が開発されているが、高価な機器及び試薬を使用しており、複雑な過程を行わなければならないなどの問題がある。特に、今までのタンパク質チップやアプタマーチップは、抗体またはアプタマーを製作することが可能な公知のタンパク質に対してのみ制限的に製作が可能であるという限界がある。

【0019】

生体試料は数百万個のタンパク質からなることが知られているが、現在知られているタンパク質の数は数万個に過ぎないので、生体試料において未知のタンパク質などといった未知の生体分子の量的状態、すなわちプロファイルを生成する技術の必要性は非常に高い。

【0020】

本発明者は、プロテオームに対するプロファイルを生成する reverse-SELEX（特許文献1参照）、アプタマーベースの核酸チップ（特許文献2参照）、及びアプタマーベースの核酸チップを用いた生物学的意義分析技術（特許文献3参照）などを提案したが、プロテオームプロファイルを生成するためのハイスループットスクリーニング分析の際に適切な標準物質及び精度管理方案を提示しておらず、プロファイルの生成及び分析に適切な精度管理を行うことができないという問題点があった。本発明はかかる問題点を解決するために提案された。

【0021】

生体試料の生体分子を総体的に分析する研究は、医学的に病気に関連した生体分子のプロファイルを分析することにより、疾病を診断することが可能な生体分子、治療成績を分析することが可能な生体分子、疾病の発症及び進行に重要な役割を果たす生体分子、疾病に対する感受性に関連した生体分子、及び新薬開発の標的分子を解明することに使用することができるだろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0022】

【特許文献1】韓国特許登録第10-0670799号

【特許文献2】韓国特許登録第10-0464225号

【特許文献3】韓国特許登録第10-0923048号

【非特許文献】

【0023】

【非特許文献1】Tuerk C. and Gold L. ; Science, 249, pp505-510, 1990

【非特許文献2】Adam et al., Cancer Research, 62, 3609-3614. 2002

【非特許文献3】Li et al., Clinical Chemistry, 48, 1296-1304. 2002

【特許文献4】Petricoin et al., The Lancet, 359, 572-577. 2002

【非特許文献5】Smith et al., Mol Cell Proteomics

10

20

30

40

50

, 11-18. 2003

【非特許文献6】McCaulley et al., Anal Biochem, 319 (2), 244-250. 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

本発明の目的は、内部精度管理しながら、2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子と分析一本鎖核酸の結合情報を生成するための標準物質、核酸チップ、これらの提供方法、並びにこれらを用いた生体分子分析方法及び装置を提供し、これらを用いて効率よく生成した結合情報から、生体分子に関連した疾病情報を含む各種生物学的意義を分析することができるようにすることにある。

10

【0025】

また、本発明の他の目的は、生体試料に含まれている生体分子とリガンドとの結合情報を生成することが可能な外部標準物質及びバイオチップを提供することにより、これらを用いて効率よく生成した結合情報から、生体分子に関連した疾患情報を含む各種生物学的意義を分析することができるようにすることにある。

【課題を解決するための手段】

【0026】

上記の目的を達成するために、本発明のある観点によれば、ランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核酸からなる核酸ライブラリーから選定された、2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子に結合する分析一本鎖核酸を核酸分析方法で分析するが、精度管理のための外部標準物質に結合する一本鎖核酸を核酸分析方法と一緒に分析することにより内部精度管理することの特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

20

【0027】

また、本発明の他の観点によれば、結合一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸の塩基配列を用いて合成された捕捉プローブが支持体に固着され、分析一本鎖核酸を選定するための、結合一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸の結合情報を生成することの特徴とする、核酸チップを提供する。

【0028】

また、本発明の別の観点によれば、分析一本鎖核酸を用いて前記生体試料にある生体分子を分析するための前記精度管理標準物質を使用し、前記精度管理一本鎖核酸を核酸分析方法で分析して内部精度管理することの特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

30

【0029】

また、本発明の別の観点によれば、生体試料にある生体分子に分析一本鎖核酸を反応させて製造される分析ターゲットプローブと、対照区の生体試料にある生体分子に前記分析一本鎖核酸を反応させて製造される比較ターゲットプローブとを混合することにより製造されたターゲットプローブで前記核酸チップを分析することの特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0030】

また、本発明の別の観点によれば、分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸の塩基配列を用いて製造された捕捉プローブが支持体に固着されており、前記生体試料にある生体分子の生物学的意義を分析するための、前記生体分子と前記分析一本鎖核酸の結合情報を生成することに使用されることを特徴とする、核酸チップを提供する。

40

【0031】

また、本発明の別の観点によれば、生体試料に含まれていない外来分子から構成されており、前記分析一本鎖核酸として前記生体試料にある生体分子の生物学的意義を分析するための分析過程の精度管理、及び生体試料に含まれている生体分子の定量分析を行うことに使用されることを特徴とする、標準物質を提供する。

【0032】

また、本発明の別の観点によれば、前記生体試料にある生体分子の生物学的意義を分析

50

するための、前記分析一本鎖核酸及び前記標準物質を使用することを特徴とする、生体分子分析キットを提供する。

【0033】

また、本発明は、分析一本鎖核酸及び標準物質を用いた生体分子分析方法によって生体分子を分析することを特徴とし、前記生体試料にある生体分子を準備する試料処理装置と、前記生体分子一本鎖核酸複合体を製造して増幅するモジュール、及び前記増幅された産物を分析するモジュールからなる増幅装置とを含む生体分子分析システムを有することを特徴とする、生体分子分析装置を提供する。

【発明の効果】

【0034】

10

上述した本発明に係る標準物質及び核酸チップ、並びにこれらを用いた2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子分析方法によれば、ハイスループットスクリーニング(High Throughput Screening)を利用した非常に簡単でかつ安価で且つ効率的な方法及び装置を用いて、微生物、細胞及びタンパク質を含む生体試料に含まれている生体分子に対するプロファイルを生産することができるので、医学、獣医学、環境工学、食品工学、農業などの広範囲な分野で生体分子の生物学的意義を分析するためのツールとして応用できるものと期待される。

【0035】

また、本発明に係る外部標準物質、バイオチップ、及びこれらを用いた生体分子分析方法によれば、ハイスループットスクリーニング(High Throughput Screening)を利用した非常に簡単で且つ安価で且つ効率的な方法を用いて、微生物、細胞及びタンパク質を含む生体試料に含まれている生体分子に対するプロファイルを生産することができるので、医学、獣医学、環境工学、食品工学、農業などの広範囲な分野で生体分子の生物学的意義を分析するためのツールとして応用できるものと期待される。

20

【0036】

また、本発明に係る外部標準物質、バイオチップ、及びこれらを用いた生体分子分析方法によれば、生体分子の生物学的意義を分析する過程で、未知の生体分子の生物学的作用を把握し、その構造を決定し、解明することができるうえ、生体分子に特異的に結合する特定の一本鎖核酸を選別することができ、選別されたターゲット一本鎖核酸を用いたより精巧な生体分子の作用を把握するためのツールとして利用することが可能な環境を提供することができる。

30

【0037】

また、本発明に係る外部標準物質及びバイオチップを用いた生体分子分析方法によれば、医学的に疾病に関連した生体分子のプロファイルを分析することにより、疾病を診断することが可能な生体分子、治療成績を分析することが可能な生体分子、疾病の発症及び進行に重要な役割を果たす生体分子、疾病に対する感受性に関連した生体分子、及び新薬開発の標的分子などを非常に安価且つ簡便な方法によって効率よく解明することができる。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】前記2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子及び標準物質から生体分子結合一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸を決定した後、前記一本鎖核酸の塩基配列に基づいて製造された核酸チップを用いて分析一本鎖核酸を決定し、分析一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸から製造した核酸チップを用いて生体試料における生体分子の生物学的意義を分析する一連の過程を示す図である。

40

【図2】前記生体分子結合一本鎖核酸と精度管理一本鎖核酸を用いて核酸チップを製造して前記分析一本鎖核酸を決定する一連の過程を示す図である。

【図3】前記分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸を用いて生体試料における生体分子の生物学的意義を分析する核酸チップを製造し、生体試料にある生体分子と前記分析一本鎖核酸の結合プロファイルを生成する一連の過程を示す図である。

【図4】分析一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸で製造した核酸チップを用いて、生体試

50

料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析する過程で、標準物質 I によって精度管理する一連の過程を示す図である。

【図 5】分析一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸で製造した核酸チップを用いて、生体試料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析する過程で、標準物質 I I によって精度管理する一連の過程を示す図である。

【図 6】標準物質に相応する精度管理一本鎖核酸に相応するスポットを示す図である。

【図 7】本発明に係る核酸チップで生成されたヒト血清タンパク質プロファイルのデータベース及び人工ニューラルネットワークアルゴリズムを利用したプログラムで疾病を診断する過程を示す図である。

【図 8】本発明に係る標準物質及び核酸チップを用いて生成したヒト血清タンパク質プロファイルのデータベース及び人工ニューラルネットワークアルゴリズムを利用したプログラムで心血管疾患を診断した結果を示す図である。

10

【図 9】本発明に係る標準物質及び核酸チップを用いて生成したヒト血清タンパク質プロファイルのデータベース及び人工ニューラルネットワークアルゴリズムを利用したプログラムで肝臓を診断した結果を示す図である。

【図 10】本発明に係る標準物質及び核酸チップを用いて生成したヒト血清タンパク質プロファイルのデータベース及び人工ニューラルネットワークアルゴリズムを利用したプログラムで肝臓の転移を診断した結果を示す図である。

【図 11】本発明に係る標準物質及び核酸チップを用いて生成したヒト血清タンパク質プロファイルのデータベース上で、心筋梗塞患者の血清に特異的に存在するタンパク質のアミノ酸配列を決定する過程の順序を示す図である。

20

【図 12】本発明に係る標準物質及び核酸チップを用いて生成したヒト血清タンパク質プロファイルのデータベース上で、心筋梗塞患者の血清に特異的に存在するタンパク質のアミノ酸配列を決定した図である。

【図 13】本発明に係る核酸チップを用いて生成した小細胞肺癌細胞株の表面生体分子プロファイルを生成及び分析して確保した一本鎖核酸が小細胞肺癌細胞株に結合した結果を示す図である。

【図 14】本発明に係る核酸チップを用いた大腸菌 K C T C 1 2 0 0 6 及びサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311) の表面生体分子プロファイルを生成及び分析して確保した生体分子結合一本鎖核酸の特異性を示す図である。

30

【図 15】本発明に係る核酸チップを用いて選定された、大腸菌に特異的に結合する生体分子結合一本鎖核酸とナノ金粒子を用いて、大腸菌により汚染された食べ物における汚染程度を測定した結果を示す図である。

【図 16】本発明の外部標準物質及びバイオチップを用いて生物学的意義を生成する過程を示す概略図である。

【図 17】本発明のバイオチップの製造方法に関連した生体分子結合一本鎖核酸を決定する過程を示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0039】

40

本発明は、リガンドと生体分子の結合情報を生成することに使用される外部標準物質及びバイオチップの製造方法、並びにこれらを用いた生体分子分析方法を提供し、本発明に係る外部標準物質及びバイオチップは、生体試料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析するために使用できる。

【0040】

本発明に使用される用語の定義は次のとおりである。すなわち、外部標準物質は、分析しようとする生体試料に含まれない物質である外来分子であって、バイオチップの精度管理及び定量分析に使用することができる。

【0041】

捕捉プローブは、生体分子及び外部標準物質に結合するリガンドの情報を持っており、

50

バイオチップに固着される分子である。

【0042】

ターゲットプローブは、捕捉プローブに結合する分子であって、分析ターゲットプローブと比較ターゲットプローブとの組み合わせであるか、或いは分析ターゲットプローブから構成できる。分析ターゲットプローブは、分析生体試料にある生体分子に結合するリガンド由来の分析ターゲットプローブであってもよく、比較ターゲットプローブは、比較生体試料にある生体分子に結合するリガンドに由来するまたは人為的に由来するか、或いは人為的に生体分子及び外部標準物質に結合するリガンドプールから製造される比較ターゲットプローブであってもよい。好ましくは、ターゲットプローブは分析ターゲットプローブと比較ターゲットプローブから構成される。

10

【0043】

マーカーターゲットプローブは、マーカー分子に相応する捕捉プローブに結合し、外部標準物質に結合するリガンドに由来する分子であって、使用目的によって分析マーカーターゲットプローブと比較マーカーターゲットプローブに分けることができる。

【0044】

結合情報は、バイオチップを構成する捕捉プローブに相応するスポットからなるプロファイルを意味し、或いはそれぞれスポットの蛍光程度を意味する。

【0045】

本発明に係る外部標準物質及びバイオチップの製造方法は、分析しようとする生体試料に含まれない生体分子を決定し、決定された外来生体分子から外部標準物質を製造する第1段階、生体分子及び外部標準物質に結合するリガンドを決定する第2段階、生物学的意義を分析するリガンドを決定する第3段階、及び決定された前記リガンド情報を用いて構成された捕捉プローブを合成し、前記捕捉プローブを基板に固着する第4段階を含む。

20

【0046】

本発明に係る外部標準物質の製造方法は次のとおりである。バイオチップで生体試料を検査する場合は、転写体或いはプロテオームなどの検査が代表的な例である。転写体を分析する場合は、内部マーカーであるGAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 或いはActin mRNAなどが精度管理に使用されているが、明確な定量分析を目的として使用する内部マーカーはない。そして、プロテオームを分析する場合、有用な内部マーカーがない状況である。これにより、プロテオームを分析する場合に精度管理及び定量分析に困難さが多い。よって、本発明では、外部標準物質を用いて生体試料を分析するときに有用に使用することが可能な精度管理及び定量分析方法を提示しようとする。

30

【0047】

外部標準物質は、分析しようとする生体試料に含まれていない物質（或いは分子）であって、ヒト由来の生体試料を分析する場合、ヒト由来の生体試料に含まれない生体分子として、例えば植物特異生体分子を使用することができる。現在、ヒトゲノムプロジェクト及び植物の一種であるシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) ゲノムプロジェクトが終結して植物特異タンパク質が報告されている。本発明では、ヒト由来の生体試料を分析する場合、外部標準物質として植物特異タンパク質を使用することができる。

40

【0048】

また、本発明に係る生体分子に結合するリガンドは、次のとおりである。

【0049】

生体分子及び外部標準物質に結合するリガンドは、抗体、ペプチド、一本鎖核酸及びアプタマーなどがある。

【0050】

生体試料に含まれている生体分子と結合するリガンドとしてアプタマー（生体分子と三次構造で結合する一本鎖核酸）を使用する場合、生体分子結合一本鎖核酸を決定する方法は、生体分子が含まれている生体試料と、ランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核

50

酸とを反応させ、前記生体分子に結合する生体分子結合一本鎖核酸を決定する R E V E R S E - S E L E X 方法（韓国特許登録第 10-0923048 号参照）である。外部標準物質に結合するリガンドは S E L E X 方法で決定することができる。本発明では、アプタマーは分析一本鎖核酸または生体分子結合一本鎖核酸などと呼ばれている。

【0051】

また、本発明に係る生物学的意義を分析するバイオチップの製造方法は、決定された生体分子結合一本鎖核酸及び外部標準物質結合一本鎖核酸の塩基配列及びこれらの相補的な塩基配列の中から選択された少なくとも一つの塩基配列を用いて合成された捕捉プローブを基板に固着させる段階を含むことができる。

【0052】

本発明に係るバイオチップを用いて生物学的意義のあるリガンドを決定する方法は、バイオチップを準備する段階と、生体分子結合一本鎖核酸を生体試料にある生体分子と反応させて生体分子一本鎖核酸複合体を形成し、前記生体分子一本鎖核酸複合体を分離する段階と、分離された前記生体分子一本鎖核酸複合体から一本鎖核酸を分離し、増幅及び標識して分析ターゲットプローブを製作する段階と、標識した分析ターゲットプローブと比較ターゲットプローブとの混合ターゲットプローブをバイオチップの捕捉プローブと反応させ、前記標識を介して結合情報を得る段階と、得られたプロファイルと既に確保されている結合情報データとを比較して前記生体分子の生物学的意義を分析する段階とを含む。

【0053】

本発明の外部標準物質及びバイオチップを用いて生物学的意義を生成する過程の模式図を図 16 に示した。

【0054】

本発明に係る、外部標準物質、バイオチップ、及びこれらを用いた生体分子分析方法の基本的な原理を説明すると、生体分子及び外部標準物質に結合する一本鎖核酸の塩基配列情報を含む捕捉プローブをバイオチップに固着し、テストの対象となる生体分子とこれらに結合される一本鎖核酸とを反応させて生体分子一本鎖核酸複合体を形成した後、前記複合体から製作された分析ターゲットプローブと比較ターゲットプローブとを混合したターゲットプローブを反応させてバイオチップの捕捉プローブの結合プロファイルを取得してその特性を分析することにより、結果的に、生体分子に結合する一本鎖核酸に対する結合プロファイルの特性を分析するのである。したがって、生体分子結合一本鎖核酸の情報を持っているターゲットプローブを、バイオチップの捕捉プローブの相補的結合で捕獲すると、生体分子を分析するとき、生体分子一本鎖核酸複合体から分離した一本鎖核酸を増幅する過程によって製作された分析ターゲットプローブも複合体の一本鎖核酸のプロファイル情報と同一・類似の情報を内包した状態で生成されるため、本発明に係るバイオチップの捕捉プローブを用いてターゲットプローブを分析しても、所期の目的を達成することができる。

【0055】

また、前記生体分子の情報を得ることができる結合情報を得る段階は、前記外部標準物質を構成する外部分子をそれぞれ異なる量で生体試料に添加して分析ターゲットプローブを準備し、或いは、前記外部標準物質を構成する外部分子に結合するリガンド情報を持っている分析マーカーターゲットプローブをそれぞれ異なる量で前記分析ターゲットプローブに混合して前記ターゲットプローブを準備することにより、結合情報を生成することができる。比較ターゲットプローブは、生体分子に結合するリガンド及び外部標準物質に結合するリガンドからなるプールで製造して使用することができる。

【0056】

本発明に係るバイオチップを用いて生体分子を分析すると、関連結合情報データが蓄積され、これらのデータから、生体分子の生物学的意義の分析に寄与する特異的な一本鎖核酸が自然に明らかになり、これにより生体分子を分析することに意味を持つ一本鎖核酸を発掘することができる。

【0057】

本発明に係るバイオチップが適用できる前記生体試料としては、細菌、真菌、ウイルス、細胞株、組織などが含まれ、本発明に係るバイオチップによってその生物学的意義が分析できる生体分子としては、タンパク質、炭水化物、脂質、多糖体、糖タンパク、ホルモン、受容体、抗原、抗体、酵素及びヌクレオチド (nucleotide) よりなる群から選択された少なくとも一つの生体分子が含まれる。

【0058】

本発明に係るバイオチップ製造方法の第1段階は、生体分子が含まれている生体試料と、ランダムな塩基配列を有する一本鎖核酸（以下、「ランダム一本鎖核酸」という。）とを反応させ、未知の生体分子に結合するターゲット一本鎖核酸を決定する段階である。

10

【0059】

好ましくは、前記生体試料に含まれている生体分子に結合する一本鎖核酸を選定する段階は、生体試料の生体分子とランダム一本鎖核酸とを反応させて生体分子一本鎖核酸複合体を製造し、前記複合体を洗浄した後、生体分子と一本鎖核酸の結合親和性に基づいて所定以上の結合親和性を有する生体分子一本鎖核酸複合体を選択し、選択された前記複合体から一本鎖核酸を分離してこれを増幅する段階、及び増幅された一本鎖核酸をクローニングベクターに挿入して単一クローンを確保し、その塩基配列を決定することにより生体分子結合一本鎖核酸を決定する段階を含む。

【0060】

前記生体分子一本鎖核酸複合体の選択及び増幅は何回も繰り返し行うことができるが、未知の生体分子を含む生体試料は数多くの生体分子から構成されており、それらの量的な差が非常に多様なので、生体分子に結合する一本鎖核酸の選択及び増幅を繰り返し行う環状的な方法よりは、選択及び増幅を1回行い、洗浄過程を強化する線形的な方法で、前記生体分子に結合する一本鎖核酸を製作することがさらに好ましい。

20

【0061】

前記ランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核酸は、次のランダムな塩基配列を有する一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを用いて二重鎖DNAを製造した後、生体外転写 (in vitro transcription) を介してランダム一本鎖RNAに製造することができる。

【0062】

5' - GGGAGAGCGGAAGCGTGCTGGGCC N40 CATAACC
CAGAGGTCGATGG ATCCCCC - 3'

30

【0063】

ここで、下線付き塩基配列は核酸ライブラリーにおける固定配列部位であり、N40は各位置にA、G、T、Cなどの塩基が同じ濃度で存在することを意味する。

【0064】

PCR (Polymerase Chain Reaction) に用いられるFWプライマー (5' - GGGGGGAATTCCTAATACGA CTCACCTATAGGGA GAGCGGAAGCGTGCTGGG - 3') は、上記の塩基配列の下線付き塩基の5' 末端と塩基対合をすることができ、バクテリオファージT7のRNAポリメラーゼのためのプロモーター塩基配列を含んでいる。

40

【0065】

PCRのREプライマー (5' - GGGGGGATCCATCGACCTCTGGGT TATG - 3') は、上記の塩基配列の下線付き塩基の3' 末端と塩基対合をすることができる。

【0066】

好ましくは、本発明のバイオチップ製造方法において、生体分子結合一本鎖核酸は、2' - F - 置換ピリミジンを含む一本鎖RNAであり、生体外転写で合成し、精製して準備する。

【0067】

50

合成されたランダム一本鎖核酸は、例えば、 10^{15} 塩基配列/Lの濃度で生体試料に処理して生体分子と30分間反応させることができる。

【0068】

前記ターゲット一本鎖核酸は、RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) して得た産物をクローニングベクターに挿入して大腸菌クローンを確保し、その塩基配列を決定することができる。

【0069】

この際、反応温度は、SELEX実行温度よりも低い温度であることが理想的であり、好ましくは20℃～37℃の温度である。

【0070】

一般に、タンパク質及び一本鎖核酸を過量で処理することにより、生体分子に結合する一本鎖核酸の非特異的な結合を防止し、好ましくは、酵母tRNA (yeast tRNA)、サケ精子DNA (salmon sperm DNA) またはヒト胎盤DNA (human placental DNA) を使用することができる。

【0071】

本発明に係る生物学的意義のある生体分子結合一本鎖核酸を選定するためのバイオチップの製造方法における第2段階は、第1段階で決定された一本鎖核酸及び前記外部標準物質結合一本鎖核酸の塩基配列とこれらの相補的な塩基配列の中から選択される少なくとも一つの塩基配列を用いて捕捉プローブを合成し、合成された捕捉プローブを基板上に固着させることにより、本発明のバイオチップを製作する。

【0072】

捕捉プローブは、ハイブリダイゼーション程度に非常に大きな影響を及ぼす核心要素なので、その塩基配列構成の決定は非常に重要である。本発明のバイオチップに固着されるそれぞれの捕捉プローブは特徴的な塩基から構成され、捕捉一本鎖核酸とターゲット一本鎖核酸との結合体は適切なTm値を維持しなければならない。これにより、結合体のハイブリダイゼーション程度は、蛍光標識したターゲットプローブによる汚染なしに自分のシグナルを維持することに十分でなければならない。

【0073】

したがって、捕捉プローブの塩基配列は、前記第1段階で核酸ライブラリーのランダム一本鎖核酸から選別された生体分子結合一本鎖核酸及び外部標準物質結合一本鎖核酸の塩基配列に基づいて決定することができる。具体的に、捕捉プローブは、核酸ライブラリーのランダムな部分に該当する40個のヌクレオチド或いはその一部を使用するが、一部を使用する場合には、人為的な塩基配列を追加することができる。好ましくは、捕捉プローブは10bp～20bpの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの一本鎖核酸である。

【0074】

バイオチップを用いて生体試料を分析する場合、ターゲットプローブは二重ターゲットプローブ或いは単一ターゲットプローブを使用する。一般に、転写体を分析する場合、疾病部位由来の生体試料を分析生体試料とし、正常な部位を比較生体試料として、前者で分析ターゲットプローブを、後者で比較ターゲットプローブをそれぞれ製作し、それらを混合した後、ターゲットプローブとして使用する。ところが、適切な比較生体試料がない場合は、分析生体試料に由来する単一ターゲットプローブをターゲットプローブとして使用する。

【0075】

また、本発明の比較ターゲットプローブは、捕捉プローブと相補的な塩基配列である核酸であって、生体分子に結合するリガンドと外部標準物質に結合するリガンドのプールから合成する一本鎖核酸でありうる。好ましくは、比較ターゲットプローブは80bp～140bpの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの一本鎖核酸である。

【0076】

マーカータargetプローブは、外部標準物質を構成する外来分子に結合するリガンドに由来し、用途によって分析マーカータargetプローブと比較マーカータargetプロ

10

20

30

40

50

ープに区分することができる。外部標準物質を生体試料に混合して分析マーカーターゲットプローブを準備する場合は、分析ターゲットプローブを製造する過程で一緒に製造する。或いは、外部標準物質を生体試料と混合せずに使用する場合は、外部標準物質の捕捉プローブに結合することが可能な分析マーカーターゲットプローブを製作して前記分析ターゲットプローブに混合して使用することができる。比較マーカーターゲットプローブは、生体分子に結合するリガンド及び外部標準物質に結合するリガンドのプールから製造して使用することができる。

【0077】

本発明のターゲットプローブは、好ましくは、マーカーターゲットプローブを含む分析ターゲットプローブと、マーカーターゲットプローブを含む比較ターゲットプローブとを混合して使用することができる。

10

【0078】

また、本発明のバイオチップ製作方法において、基板は、ガラス、シリコンなどの無機物、またはアクリル系、PET (polyethylene terephthalate)、ポリカーボネート (polycarbonate)、ポリスチレン (polystyrene)、ポリプロピレン (polypropylene) などの高分子物質で製作されたものを使用することができ、好ましくは、ガラスで製作されたスライドガラスである。このとき、基板はアミン基またはアルデヒド基などでコートされたものを使用することができる。例えば、GAPS (Gamma Amino Propyl Silane) でコートされたスライドガラスである UltraGAPSTM Coated Slide (Corning 社) を用いて前記捕捉プローブを一定の規則で配列固着させてバイオチップを製作する。

20

【0079】

本発明に係るバイオチップの製造では、マイクロアレイシステム (Microarray system) を使用することができ、それぞれの捕捉プローブを緩衝液に溶かして濃度を調節する。この際、アレイ内の湿度は70～80%に維持してスポットティング (spotting) を行う。スポットティングされたスライドは加湿チャンバー (humidified chamber) で放置した後、UVクロスリンカー (crosslinker) でベーク (baking) する過程を行う。

【0080】

30

このように本発明に係るバイオチップは、関連技術分野で広く知られている方法で捕捉プローブをスライドガラスに固定させた後、スライドを直ちに遠心分離して乾燥させた後、使用するまで遮光状態で保管する。

【0081】

従来の公知の様々な方法 (M. schena; DNA microarray; a practical approach, Oxford, 1999) で、捕捉プローブが規則的に配列されたバイオチップを製作することができる。

【0082】

本発明に係るバイオチップは、同一・類似の精度で未知の生体分子の生物学的意義を分析することさえできれば、バイオチップに固着する捕捉プローブの数を小さくすることがバイオチップの製作費用及び分析効率性の面で好ましい。

40

【0083】

このような理由から、生体分子の生物学的意義の分析に対するそれぞれの捕捉プローブの寄与度を分析し、生体分子の生物学的意義を分析することができる範囲内で、分析された寄与度に基づいて捕捉プローブを選別することにより、本発明のバイオチップに固着する捕捉プローブの数を減少させる段階をさらに含むことができる。

【0084】

さらに、本発明は、内部精度を管理しながら、2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子と分析一本鎖核酸の結合情報を生成するための標準物質、核酸チップ、これらの製造方法、並びにこれらを用いた生体分子分析方法及び装置を提供し、本

50

発明に係る標準物質及び核酸チップは、生体試料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析するために使用されるものである。

【0085】

前記核酸チップは、1つまたはそれ以上の物質を同時に分析するために核酸から製造されたプローブが固着された支持体を指し示す。好ましくは、支持体が固体ガラスまたはナイロン基板である。核酸チップは、固体ガラスまたはナイロン基板上に製作された2次元プローブマトリクスの形で生産される。単一核酸チップにおいて出来る限り多くの特徴に対する分析を行うことが非常に好ましいが、これは単一基板におけるプローブの密度及びプローブの量が相当増加する必要があるためである。一般に、500nmよりも小さいプローブ固定位置を有する（すなわち、平方センチメートルあたり400プローブよりも大きい密度）マイクロアレイは高密度マイクロアレイと呼ばれ、そうでないマイクロアレイは「低密度」マイクロアレイと呼ばれる。一般に、核酸チップは、数百個～数十万個の非常に多様な塩基配列を有する核酸を小さな空間に配列させることにより固定された既知の核酸と未知の核酸試料とのハイブリダイゼーション（hybridization）を介して未知の試料内の核酸に関する情報を調べることに用いられる。核酸マイクロアレイは、既存のサザンブロット（Southern blot）、ノーザンブロット（Northern blot）、突然変異検索などを代替して、同時に少なくとも数百個以上の塩基配列部位を短時間内に検索することができるという利点を持っている。

【0086】

一般に、標準物質は、定性定量分析、各種試験、検査の際に比較のための内部精度管理物質であって、本発明では、分析しようとする2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子を分析一本鎖核酸を用いて分析するが、このような定性及び定量分析が内部精度管理を行うための物質を意味する。前記標準物質は分析しようとする試料に常に一定量だけ存在する物質が理想的であるが、そうでない場合、試料に含まれない物質である外来物質を使用することができ、好ましくは、分析しようとする試料が生体試料である場合、前記生体試料に含まれない外来生体分子から構成できる。精度管理は、管理用試料などの外的基準を使用せずに、毎回の測定で得られる一群の検査結果を分析して測定値の精度を管理していく内部精度管理を意味する。

【0087】

本発明では、2つまたはそれ以上の生体分子からなる試料にある生体分子と、ランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核酸とからなる核酸ライブラリーを反応させることにより確保されて決定された一本鎖核酸の塩基配列を有しており、安定した二次構造が予測される一本鎖核酸を結合一本鎖核酸と命名し、前記結合一本鎖核酸に基づいて製造された核酸チップで生物学的意義を分析するために確保されたプロファイルで選定された一本鎖核酸を分析一本鎖核酸と命名した。また、前記標準物質に結合する一本鎖核酸として前記精度管理の目的で決定された一本鎖核酸を精度管理一本鎖核酸と称した。このような一本鎖核酸はいずれもアプタイマーの一種である。

【0088】

本発明において、用語「アプタマー（aptamer）」は、低分子化合物からタンパク質まで様々な種類のレセプターに高い親和性及び特異性で結合することが可能な特性を有する小さな（20～60のヌクレオチド）一本鎖核酸（DNAまたはRNA）の断片を意味する。アプタイマーの開発は、SELEXと呼ばれる方法を用いて試験管で行われる。SELEXは、「Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment」の略字であって、1990年に初めて開発されたが（Tuerk, C. and Gold, L., 1990, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science 249 (4968), 505-510; Ellington, A. D. and Szostak, J. W., 1990, In vitro selection of

RNA molecules that bind specific ligands. Nature 346 (6287), 818-822)。この方法を用いて、特定の分子に高い結合親和性を有する核酸アプタマーを得る。アプタマーは、レセプターに対してナノモル乃至ピコモルレベルの高い結合親和性及び選択性を持っているという点で、抗体に類似する特性を有する核酸分子とされている。アプタマーはSELEXを介して試験管で選別する。SELEXの中心原理は、多数のランダムに存在する個体の中でも、特定の形質を有する個体のみが生存し、このように生存した個体は、その集団内で占める割合が益々高くなって結局集団を支配する進化の概念と非常に類似している。但し、SELEXでの個体は一本鎖核酸であり、選択圧は特定のレセプターに対する結合親和性である。したがって、まず、多数のランダム(random)配列を有する核酸ライブラリーを作らなければならない、このライブラリー内に存在するものと期待される特定のレセプターに対して高い結合親和性を有する個体を選び出すことができる分画過程が必要であり、選び出したアプタマーを増幅して核酸プール内での割合を増加させ、次のラウンドの選択を行うことができるように増幅段階が必要である。アプタマーのSELEXに対する具体的な方法及び試薬／材料などは公知になっている(Marshall, K. A. and Ellington, A. D., 2000, In vitro selection of RNA aptamers. Methods Enzymol 318, 193-214; Fitzwater, T. and Polisky, B., 1996, A SELEX primer. Methods Enzymol 267, 275-301)。また、本発明者は、2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子に、ランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核酸からなる核酸ライブラリーを反応させ、それぞれの生体分子に特異的に結合する一本鎖核酸を選定する方法を提案した(韓国特許登録第10-0923048号)。

【0089】

本発明は、ランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核酸からなる核酸ライブラリーから選定された、2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子に結合する分析一本鎖核酸を核酸分析方法で分析するが、精度管理のための外部標準物質に結合する一本鎖核酸を核酸分析方法と一緒に分析することにより内部精度管理することの特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0090】

また、本発明者は、前記生体試料にある生体分子とアプタマーとを反応させて生成された生体分子-アプタマー複合体にあるアプタマーを核酸分析方法で分析し、レセプターである生体分子を分析する方法(韓国特許登録第10-0670799号)を提案した。前記生体試料にある生体分子-アプタマー複合体にあるアプタマーを分析する核酸分析方法は、PCR(polymerase chain reaction)、LCR(ligase chain reaction)、SDA(strand displacement amplification)、TMA(transcription-mediated amplification)、bDNA(branched DNA)、Invader方法及びRCA(rolling circle amplification)などとすることができる。好ましくは、前記生体分子-一本鎖核酸複合体にある一本鎖核酸を鋳型としてPCRを行うことにより生成された増幅産物をさらに分析することができる。

【0091】

また、本発明は、前記精度管理標準物質が、前記生体試料に含まれていない生体分子であることを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

【0092】

図1を参照すると、前記生体試料にある生体分子及び標準物質と、ランダムな塩基配列からなるランダム一本鎖核酸とを反応させて前記結合一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸を決定し、前記結合一本鎖核酸の塩基配列に基づいて製造された核酸チップを用いて分析一本鎖核酸を決定し、前記分析一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸の塩基配列を用い

て製造された核酸チップを用いて生体試料における生体分子の生物学的意義を分析する一連の過程を分けることができる。

【0093】

前記核酸チップを用いて検査する生体試料は、転写体またはプロテオームなどが代表的な例である。死体を分析する場合、標準物質としてほぼすべての組織に一定の量で発現するGAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) または β -actin mRNAなどが内部精度管理の目的で使用されているが、明確な定量分析を目的として使用する標準物質はないため、定量分析の精度は外部精度管理に依存している。

【0094】

また、2つまたはそれ以上のタンパク質からなる生体試料におけるタンパク質に結合するリガンドを選定する方法は、本発明者によって提案されたReverse-SELEX (韓国特許登録第10-0923048号) やCell-select (Homann, M. and Goring, H. U., 1999, Nucleic Acids Res 27 (9), 2006-2014) がある。本発明は、前記reverse-SELEXで、2つまたはそれ以上の生体分子がある生体試料にある生体分子に結合するリガンドを効率よく選定するための精度管理目的の標準物質を提供しようとする。

【0095】

また、プロテオームを分析する場合、定量及び定性分析に使用することができる有用な標準物質がないため、プロテオームを分析するための精度管理及び定量分析に困難さが多い実情である。これにより、本発明で標準物質を用いて前記試料を分析するための、有用な内部精度管理及び定量分析方法を提示しようとする。

【0096】

好ましくは、本発明に係る標準物質は、前述した外部標準物質と同様にヒト由来の生体試料を分析する場合、ヒト由来の生体試料に含まれていない生体分子として植物特異生体分子を使用することができる。現在、ヒトゲノムプロジェクト、及び植物の一種であるシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) ゲノムプロジェクトが完了して植物特異タンパク質が報告されている。本発明では、ヒト由来の生体試料を分析するための標準物質として植物特異タンパク質を使用することができる。

【0097】

前記生体試料に含まれる生体分子及び標準物質に結合する物質は、抗体、ペプチドおよび一本鎖核酸などがあり、好ましくは一本鎖核酸である。

【0098】

本発明は、生体試料に含まれていない生体分子を決定し、決定された外来生体分子から精度管理一本鎖核酸を製造する段階と、前記生体試料に含まれている生体分子から前記結合一本鎖核酸を製造する段階と、前記精度管理一本鎖核酸及び前記結合一本鎖核酸の塩基配列を用いて合成された捕捉プローブが固着された支持体を製造する段階とを含んでなる、生体分子の生物学的意義を分析する分析一本鎖核酸を選定するための、前記生体試料、前記標準物質、前記結合一本鎖核酸、前記精度管理一本鎖核酸及び前記核酸チップを用いて生体分子と結合一本鎖核酸の結合プロファイルを生成するように生体分子分析一本鎖核酸を選定する方法を提供する。

【0099】

図2を参照すると、前記生体試料にある生体分子の結合一本鎖核酸と精度管理一本鎖核酸を選定して核酸チップを製造し、前記生体試料にある生体分子の生物学的意義を分析する前記分析一本鎖核酸を決定する一連の過程を分けることができる。

【0100】

本発明に係る前記標準物質に結合する一本鎖核酸の中で精度管理一本鎖核酸を決定する方法は、標準物質とランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核酸とを反応させて標準物質と一本鎖核酸を分離し、このような一連の選択と増幅を繰り返し行い、標準物質に結

10

20

30

40

50

合する一本鎖核酸を選定する標準S E L E X方法 (T u e r k C. and G o l d L., 1990, Science, 249; 505-510)で構成できる。

【0101】

また、本発明に係る2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料に存在する生体分子と結合する一本鎖核酸を選定する方法は、生体分子の含まれている生体試料とランダムな塩基配列を有するランダム一本鎖核酸とを反応させ、前記生体分子に結合する生体分子結合一本鎖核酸を決定するR e v e r s - S E L E X方法 (韓国特許登録第10-0923048号)を使用することができる。

【0102】

本発明で提供する前記結合一本鎖核酸を製造する方法は、前述した生体試料に含まれている生体分子に結合する一本鎖核酸を選定する方法と同様であるが、まず、前記生体分子に前記ランダムな塩基配列を有する一本鎖核酸を反応させて得た反応溶液にある生体分子一本鎖核酸複合体を選択する段階と、前記複合体から一本鎖核酸を分離して増幅することにより一本鎖DNAを製造する段階と、前記一本鎖DNAをクローニングベクターに挿入して単一クローンを確保し、前記一本鎖核酸の塩基配列を決定することにより、前記結合一本鎖核酸を製造する段階とを含んで、生体分子分析一本鎖核酸を選定することができる。

10

【0103】

本発明は、前記生体分子一本鎖核酸複合体を選択する段階が、前記反応溶液にある前記生成された生体分子一本鎖核酸複合体を洗浄し、前記生体分子と前記一本鎖核酸との結合親和性に基づいて、所定以上の結合親和性を有する前記生体分子一本鎖核酸複合体を選択することを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

20

【0104】

本発明は、前記生体分子一本鎖核酸複合体を選択する段階が、前記反応溶液をキャピラリー電気泳動して前記生体分子一本鎖核酸複合体を選択することを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

【0105】

本発明は、前記生体分子一本鎖核酸複合体を選択する段階が、前記反応溶液をニトロセルロース及びナイロンからなる構造体に処理して生体分子一本鎖核酸複合体を選択することを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

30

【0106】

本発明は、前記生体分子一本鎖核酸複合体の選択及び増幅を多数回繰り返し行うことを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

【0107】

本発明において、前記生体分子一本鎖核酸複合体の選択は、前記生成された生体分子一本鎖核酸複合体を洗浄し、前記生体分子と前記一本鎖核酸の結合親和性に基づいて、所定以上の結合親和性を有する前記生体分子一本鎖核酸複合体を選択する方法、前記反応溶液をキャピラリー電気泳動して前記生体分子一本鎖核酸複合体を選択する方法、または前記反応溶液をニトロセルロース及びナイロンの構造体に処理して生体分子一本鎖核酸複合体を選択する方法などで行うことができる。

40

【0108】

前記生体分子一本鎖核酸から分離された一本鎖核酸は、R T P C R (R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n - P C R)して得た産物をクローニングベクターに組み込んで大腸菌クローンを確保し、その塩基配列を決定することができる。

【0109】

本発明は、前記捕捉プローブが固着される支持体はスライドガラス、バイオセンサーの感知表面、ビーズ、ナノ粒子などを含むことを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

【0110】

本発明は、前記捕捉プローブが、前記結合一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸の塩基配

50

列とこれらの相補的な塩基配列の中から選択された少なくとも一つの塩基配列から構成して合成することを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

【0111】

本発明は、前記2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体分子にある生体分子と結合一本鎖核酸の結合プロファイルを生成する方法が、前記標準物質、前記生体試料、前記精度管理一本鎖核酸及び前記結合一本鎖核酸から標識物質のある分析ターゲットプローブを製造する段階と、前記捕捉プローブに相応する前記結合一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸を混合及び増幅して標識物質のある比較ターゲットプローブを製造する段階と、前記分析ターゲットプローブと前記比較ターゲットプローブとを混合して前記ターゲットプローブを製造する段階と、前記ターゲットプローブと前記支持体の前記捕捉プローブとをハイブリダイゼーション反応させて結合プロファイルを生成する段階とを含むことを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

10

【0112】

本発明は、前記分析ターゲットプローブを製造する方法が、それぞれ異なる量の前記標準物質からなる標準物質Iを前記生体試料に添加した分析試料を準備する段階と、前記分析試料と、前記結合一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸からなる一本鎖核酸とを反応させて生成された生体分子一本鎖核酸複合体及び標準物質一本鎖核酸複合体を分離する段階と、前記分離された複合体から一本鎖核酸を分離し、増幅及び標識して分析ターゲットプローブを製造する段階とを含むことを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

20

【0113】

本発明は、前記分析ターゲットプローブを製造する方法が、前記生体試料と前記結合一本鎖核酸とを反応させて生成された生体分子一本鎖核酸複合体から一本鎖核酸を分離する段階と、前記分離された一本鎖核酸に、それぞれ異なる量の精度管理一本鎖核酸からなる標準物質IIを混合して増幅及び標識で前記分析ターゲットプローブを製造する段階とを含むことを特徴とする、生体分子分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

【0114】

本発明は、前記生体分子の生物学的意義を分析するための分析一本鎖核酸の選別段階が、前記捕捉プローブの寄与度に基づいて、前記生体分子の生物学的意義を分析することができる範囲内で、前記捕捉プローブを選別することにより、前記支持体に固着する前記捕捉プローブの個数を減少させる段階をさらに含むことを特徴とする、生体分子の分析一本鎖核酸の選定方法を提供する。

30

【0115】

本発明は、前記結合一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸の塩基配列を用いて合成された捕捉プローブが支持体に固着された構成となっており、分析一本鎖核酸と前記結合一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸との結合情報を生成することを特徴とする、核酸チップを提供する。

【0116】

本発明に係る前記核酸チップを用いた分析一本鎖核酸を選定する方法において、捕捉プローブは、支持体に固着される分子であって、生体分子及び標準物質に結合する一本鎖核酸であるか、或いはこれらの情報を持っている物質の中から選択される少なくとも一つの物質からなるものである。

40

【0117】

前記生体試料にある生体分子と一本鎖核酸との結合情報は、生体分子結合一本鎖核酸から製造されるターゲットプローブと捕捉プローブとの相補的結合によって発生するシグナルを指し示し、好ましくは、支持体を構成する捕捉プローブに相応するスポットからなるプロファイルであるが、それぞれスポットを構成する捕捉プローブに結合したターゲットプローブの結合一本鎖核酸にある標識物質から発生するシグナル、好ましくは蛍光程度を意味する。前記結合情報は、ターゲットプローブの分析ターゲットプローブ及び比較分析プローブのシグナルの組み合わせであり、究極的には生体試料における生体分子結合一本

50

鎖核酸の分布状態を示し、この分布状態から、一本鎖核酸に結合する生体分子の分布状態を推論することができる。

【0118】

また、本発明に係る生体試料における生体分子の生物学的意義を分析する分析一本鎖核酸を選定するための核酸チップでは、決定された分析一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸の塩基配列とこれらの相補的な塩基配列の中から選択される少なくとも一つの塩基配列を使用し、或いは、生体分子結合一本鎖核酸の塩基配列と完全に相補的に結合する塩基配列を有する捕捉プローブを使用して合成された捕捉プローブが支持体に固着されている。

【0119】

また、本発明において、捕捉プローブが固着できる支持体は、スライドガラス、バイオセンサーの感知表面、ビーズ、ナノ粒子などから選択することができ、好ましくはスライドガラスである。

【0120】

前記支持体の種類に応じて、捕捉プローブに結合する増幅産物のシグナルを分析する方法が選択できる。

【0121】

このように、本発明に係る核酸チップは、関連技術分野で広く知られている方法によって捕捉プローブをスライドガラスに固定させた後、スライドを直ちに遠心分離して乾燥させた後、使用するまで遮光状態で保管する。

【0122】

従来の公知の様々な方法 (M. schena; DNA microarray; a practical approach, Oxford, 1999) で、捕捉プローブが規則的に配列された核酸チップを製作することができる。

【0123】

核酸チップで生体試料を分析する場合、ターゲットプローブは、一般に転写体を分析する場合、疾病部位由来の生体試料を分析生体試料とし、正常部位由来の生体試料を比較生体試料として、前者から分析ターゲットプローブを、後者から比較ターゲットプローブをそれぞれ製作し、これらを混合した後、ターゲットプローブとして使用する。ところが、適切な比較生体試料のない場合は、分析生体試料に由来する単一ターゲットプローブをターゲットプローブとしても使用することができる。

【0124】

好ましくは、ターゲットプローブは、80bp～140bpの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの一本鎖核酸であってもよい。

【0125】

また、本発明では、分析ターゲットプローブは次のとおり2つの方法で製造することができる。それぞれ異なる量の標準物質からなる標準物質Iを生体試料に混合して分析ターゲットプローブを準備する場合と、前記生体分子一本鎖核酸から分離された一本鎖核酸に、それぞれ異なる量の精度管理一本鎖核酸からなる標準物質IIを混合して分析ターゲットプローブを準備する場合である。

【0126】

比較ターゲットプローブは、捕捉プローブと相補的な塩基配列である核酸であって、生体分子結合一本鎖核酸と精度管理一本鎖核酸で構成された一本鎖核酸プールから合成する一本鎖核酸でありうる。

【0127】

このような理由から、生体分子の生物学的意義の分析に対するそれぞれの捕捉プローブの寄与度を分析し、生体分子の生物学的意義を分析することができる範囲内で、分析された寄与度に基づいて捕捉プローブを選別することにより、生体分子を分析することに意味を持つ分析一本鎖核酸を発掘することができる。

【0128】

本発明は、前記分析一本鎖核酸を用いて前記生体試料にある生体分子を分析するための

10

20

30

40

50

前記精度管理標準物質を使用し、前記精度管理一本鎖核酸を核酸分析方法で分析して内部精度管理することを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0129】

また、本発明は、前記分析一本鎖核酸を用いて前記生体試料にある生体分子を分析することを核酸分析方法とすることを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0130】

図3を参照すると、前記分析一本鎖核酸と前記精度管理一本鎖核酸を用いて前記生体試料における生体分子の生物学的意義を分析する核酸チップを製造することにより、生体試料にある生体分子と前記分析一本鎖核酸の結合プロファイルを生成する一連の過程を分けることができる。

10

【0131】

本発明者は、前記生体試料にある生体分子とアプタマーとを反応させることにより生成された生体分子－アプタマー複合体におけるアプタマーを核酸分析方法で分析してレセプターたる生体分子を分析する方法を韓国特許登録第10-0670799-0000に開示した。前記生体試料にある生体分子－アプタマー複合体にあるアプタマーを分析する核酸分析方法は、PCR (polymerase chain reaction)、LCR (ligase chain reaction)、SDA (strand displacement amplification)、TMA (transcription-mediated amplification)、bDNA (branched DNA)、Invader方法、及びRCA (rolling circle amplification) などとすることができる。好ましくは、前記生体分子－一本鎖核酸複合体にある核酸をPCRして生成された増幅産物をさらに分析することができる。

20

【0132】

本発明は、前記精度管理標準物質が、前記生体試料に含まれていない生体分子であることを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0133】

本発明は、前記分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸の塩基配列を用いて合成された前記捕捉プローブを支持体に固着する段階と、前記標準物質、前記生体試料、前記精度管理一本鎖核酸、及び前記分析一本鎖核酸から標識物質のあるターゲットプローブを製造する段階と、前記ターゲットプローブを前記支持体の前記捕捉プローブにハイブリダイゼーション反応させて結合情報を得る段階と、前記得られた結合情報と既に確保されている結合情報データとを比較して前記生体分子の生物学的意義を分析する段階とを含むことを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

30

【0134】

また、本発明は、前記ターゲットプローブを準備する方法が、前記標準物質、前記生体試料、前記精度管理一本鎖核酸、及び前記分析一本鎖核酸から標識物質のある分析ターゲットプローブを製造する段階と、前記捕捉プローブに相応する前記分析一本鎖核酸と前記精度管理一本鎖核酸とを混合し、増幅して標識物質のある比較ターゲットプローブを製造する段階と、前記分析ターゲットプローブ及び前記比較ターゲットプローブからなるターゲットプローブを製造する段階とを含むことを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

40

【0135】

図4及び図5を参照すると、前記分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸を用いて核酸チップを製造し、前記生体試料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析する過程で、精度管理を目的として標準物質及び精度管理一本鎖核酸を用いて分析する一連の過程を分けることができる。

【0136】

本発明は、前記捕捉プローブが固着される支持体はスライドガラス、バイオセンサーの感知表面、ビーズ、ナノ粒子などを含むことを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

50

【0137】

本発明は、前記捕捉プローブが、前記分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸の塩基配列と完全に相補的に結合する塩基配列で構成されたことを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0138】

好ましくは、前記捕捉プローブは、前記分析一本鎖核酸と相補的に結合する塩基配列で構成されてもよく、前記分析一本鎖核酸は、前記生体試料を構成する前記結合一本鎖核酸から選定され、生体試料における生体分子の生物学的意義を分析するために用いられるアダプターである。従って、前記捕捉プローブは、前記複合体にある前記分析一本鎖核酸を鋳型としてPCRして得る増幅産物にある前記特定の分析一本鎖核酸の塩基配列と相補的に結合することができるので、究極的には前記複合体にある分析一本鎖核酸を分析し、その結果としてレセプターたるタンパク質を定量分析することができる。

10

【0139】

前記支持体の種類に応じて、捕捉プローブに結合する増幅産物のシグナルを分析する方法が選択できる。

【0140】

本発明に係る内部精度管理を行いながら、前記核酸チップを用いた生体分子の生物学的意義を分析する方法では、捕捉プローブは、支持体に固着される分子であって、生体分子及び標準物質に結合する分析一本鎖核酸であるか、或いはこれらの情報を持っている物質の中から選択される少なくとも一つの物質で構成されたものである。

20

【0141】

本発明は、前記生体分子一本鎖核酸複合体と前記標準物質一本鎖核酸複合体から分離された一本鎖核酸を標識及び増幅するための、標識物質のあるプライマーを使用することを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0142】

また、本発明に、生体分子一本鎖核酸複合体と標準物質一本鎖核酸複合体から分離された一本鎖核酸を標識及び増幅するための、標識物質のあるプライマー、及び特定の本鎖核酸を指示するタグのあるプライマーを使用することができる。

【0143】

「タグ」は、反応においてポリヌクレオチドを確認し及び／またはポリヌクレオチドの源泉を追跡するために用いられるユニークなヌクレオチド配列を意味する。タグ配列は、プライマーの5末端または3末端にありうる。捕捉プローブ塩基配列は、大きさ及び組成において広範囲に多変することができる。次の参考資料は、特定の具体例に適した一連の捕捉プローブ塩基配列を選択するためのガイドラインを提示する（米国特許第5,635,400号；Brenner et al, 2000, PNAS, 97: 1665-1670；Shoemaker et al, 1996, Nature Genetics, 14: 450-456；欧州特許公開0799897A1；米国特許第5,981,179号、およびこれに類似するもの）。特定の具体例において、捕捉プローブの塩基配列は、4～36個のヌクレオチド、または6～30個のヌクレオチド、または8～20個のヌクレオチドの範囲の長さを有することができる。

30

40

【0144】

本発明は、前記捕捉プローブが、前記分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸を指示するタグの塩基配列と完全に相補的に結合する塩基配列で構成されたことを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

【0145】

前記捕捉プローブは、タグと相補的な塩基配列を用いて製造することができる。このような捕捉プローブは、前記複合体にある分析一本鎖核酸を鋳型としてPCRして生成されたPCR産物にあるタグ塩基配列と完全に相補的に結合してPCR産物を分析することができ、前記捕捉プローブとPCR産物が生成するスポットのシグナルを分析して前記複合体の分析一本鎖核酸を分析することができる。

50

【0146】

前記比較ターゲットプローブは、前記捕捉プローブと相補的な塩基配列を有する核酸であって、生体分子結合一本鎖核酸と精度管理一本鎖核酸からなる一本鎖核酸プールから合成する一本鎖核酸であってもよい。

【0147】

一般に、核酸チップで転写体を分析する場合、ターゲットプローブは、疾病部位由来の生体試料を実験区たる分析生体試料とし、正常部位由来の生体試料を対照区たる比較生体試料として、前者から分析ターゲットプローブを、後者から比較ターゲットプローブをそれぞれ製造し、これらを混合した後、ターゲットプローブとして使用する。ところが、適切な比較生体試料がない場合は、分析生体試料に由来する単一ターゲットプローブをターゲットプローブとしても使用することができる。

10

【0148】

また、本発明では、分析ターゲットプローブは次のとおり2つの方法で製造することができる。それぞれ異なる量の標準物質からなる標準物質Iを生体試料に混合して分析ターゲットプローブを準備する場合と、前記生体分子一本鎖核酸から分離された一本鎖核酸に、それぞれ異なる量の精度管理一本鎖核酸からなる標準物質IIを混合して分析ターゲットプローブを準備する場合である。

【0149】

本発明は、前記分析ターゲットプローブを製造する方法が、それぞれ異なる量の前記標準物質からなる標準物質Iを前記生体試料に添加した分析試料を準備する段階と、前記準備した分析試料と、前記分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸からなる一本鎖核酸とを反応させて生成された生体分子一本鎖核酸複合体及び標準物質一本鎖核酸複合体を分離する段階と、前記複合体から分析一本鎖核酸を分離し、増幅及び標識して分析ターゲットプローブを準備する段階とを含むことを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

20

【0150】

本発明は、前記分析ターゲットプローブを準備する方法が、前記生体試料にある生体分子と前記分析一本鎖核酸とを反応させて生成された生体分子一本鎖核酸複合体を分離する段階と、前記分離された生体分子一本鎖核酸複合体から分離された分析一本鎖核酸に、それぞれ異なる量の精度管理一本鎖核酸からなる標準物質IIを混合し、増幅及び標識することにより、前記標識した分析ターゲットプローブを製造する段階とを含むことを特徴とする、生体分子分析方法を提供する。

30

【0151】

本発明は、実験区たる前記生体試料にある生体分子に前記分析一本鎖核酸を反応させて製造される分析ターゲットプローブと、対照区たる前記生体試料にある生体分子に前記分析一本鎖核酸を反応させて製造される比較ターゲットプローブとを混合して製造されたターゲットプローブで前記核酸チップを分析することを特徴とする、生体分子分析方法及び分析装置を提供する。

【0152】

実験区たる生体試料にある生体分子に結合する分析一本鎖核酸に由来するターゲットプローブを分析ターゲットプローブとし、対照区たる生体試料にある生体分子に結合する分析一本鎖核酸に由来するかまたは人為的に生体分子及び標準物質に結合する分析一本鎖核酸のプールから製造されるターゲットプローブを比較ターゲットプローブとする。好ましくは、ターゲットプローブは分析ターゲットプローブと比較ターゲットプローブから構成される。

40

【0153】

前記ターゲットプローブは、捕捉プローブと結合する分子であって、分析ターゲットプローブと比較ターゲットプローブとの組み合わせ、または分析ターゲットプローブのみで構成されてもよい。

【0154】

50

本発明は、前記標識物質として、ビオチン (B i o t i n)、C y 2、G F P、Y O - P R O - 1、Y O Y O - 1、カルセイン (C a l c e i n)、F I T C、F l o u r X、A L E X A 4 8 8、R h o d a m i n e 1 1 0、A B I 5 - F A M、O r e g o n G r e e n 5 0 0、O r e g o n g r e e n 4 8 8、R i b o G r e e n、R h o d a m i n e G r e e n、R h o d a m i n e 1 2 3、M a g n e s i u m G r e e n、C a l c i u m G r e e n、T O - P R O - 1、T O T O - 1、A B I J O E、B O D I P Y 5 3 0 / 5 5 0、D i l、B O D I P Y T M R、B O D I P Y 5 5 8 / 5 6 8、B O D I P Y 5 6 4 / 5 7 0、A l e x a 5 4 6、T R I T C、M a g n e s i u m O r a n g e、P h y c o e r y t h r i n R & B、R h o d a m i n e P h a l l o i d i n、C a l c i u m O r a n g e、P y r o n i n Y、R h o d a m i n e B、A B I T A M R A、R h o d a m i n e R e d、C y 3. 5、A B I R O X、C a l c i u m C r i m s o n、A l e x a 5 9 4、T e x a s R e d、N i l e R e d、Y O - P R O - 3、Y O Y O - 3、R - p h y c o c y a n i n、C - p h y c o c y a n i n、T O P R O - 3、T O T O - 3、D i D D i l C (5)、T h i a d i c a r b o c y a i n e、C y 5. 5、C y 5及びC y 3から選択される蛍光色素を使用することを特徴とする、生体分子分析方法及び分析装置を提供する。

10

【0155】

前記分析一本鎖核酸と前記生体試料にある生体分子とが反応して生成された複合体の分析一本鎖核酸を鋳型として、前記標識物質のあるプライマーを用いてPCRして確保した増幅産物を、前記捕捉プローブと反応させ、前記捕捉プローブは標識物質のある増幅産物の一本鎖核酸と相補的に結合して二重鎖核酸を生成する。したがって、前記捕捉プローブが構成するスポットは、標識物質に基づくシグナルが発生すると、このシグナルで分析一本鎖核酸を分析することができ、前記分析一本鎖核酸が生成された複体内のレセプターであるタンパク質を定量分析することができる。よって、標識物質は、様々な範囲で分析目的に応じて選択することができ、好ましくはC y 3またはC y 5を使用することができる。

20

【0156】

本発明は、前記分析一本鎖核酸及び前記精度管理一本鎖核酸の塩基配列を用いて製造された前記捕捉プローブが支持体に固着されており、前記生体試料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析するための、前記生体分子と前記分析一本鎖核酸の結合情報を生成することに使用されることを特徴とする、核酸チップを提供する。

30

【0157】

また、本発明に係る生体試料における生体分子の生物学的意義の分析に用いられる核酸チップでは、決定された分析一本鎖核酸及び精度管理一本鎖核酸の塩基配列と前記これらの相補的な塩基配列の中から選択される少なくとも一つの塩基配列を使用するか、或いは、生体分子結合一本鎖核酸と精度管理一本鎖核酸を指示するタグの塩基配列に完全に相補的に結合する塩基配列で構成された捕捉プローブを使用して合成された捕捉プローブが支持体に固着されている。

【0158】

従来の公知の様々な方法 (M. s c h e n a ; D N A m i c r o a r r a y ; a p p r a c t i c a l a p p r o a c h , O x f o r d , 1 9 9 9) で、捕捉プローブが規則的に配列された核酸チップを製作することができる。

40

【0159】

また、本発明に係る生体試料における生体分子の生物学的意義を分析する核酸チップは、前記分析一本鎖核酸と精度管理一本鎖核酸の情報をを用いて合成された捕捉プローブが支持体に固着されて構成される。

【0160】

本発明に係る核酸チップは、同一または類似する精度で未知の生体分子の生物学的意義を分析することさえできれば、核酸チップに固着される捕捉プローブの数を少なくするこ

50

とが核酸チップの製作費用及び分析効率性の面で好ましい。

【0161】

前記結合情報は、生体分子に結合する分析一本鎖核酸で製造されるターゲットプローブと捕捉プローブの相補的結合により発生するシグナルを指し示し、好ましくは、支持体を構成する捕捉プローブに相応するスポットからなるプロファイルであるが、それぞれスポットを構成する捕捉プローブに結合したターゲットプローブの一本鎖核酸にある標識物質から発生するシグナル、好ましくは蛍光程度を意味する。前記結合情報は、ターゲットプローブの分析ターゲットプローブ及び比較分析プローブのシグナルの組み合わせであり、究極的には生体試料における生体分子に結合した一本鎖核酸の分布状態を示し、この分布状態から、一本鎖核酸に結合する生体分子の分布状態を推論することができる。

10

【0162】

このような理由から、前記核酸チップを製造する方法は、生体分子の生物学的意義分析に対するそれぞれの捕捉プローブの寄与度を分析し、生体分子の生物学的意義を分析することができる範囲内で、分析された寄与度に基づいて捕捉プローブを選別することにより、本発明の核酸チップに固着される捕捉プローブの数を減少させる段階をさらに含むことができる。

【0163】

本発明に係る核酸チップを用いて生体分子を分析すると、関連結合情報データが蓄積され、このことから生体分子の生物学的意義の分析に寄与する特異的な一本鎖核酸が自然に明らかになり、これにより、生体分子を分析することに意味を持つバイオマーカーを発掘することができる。

20

【0164】

本発明は、前記生体試料に含まれていない外来分子からなっており、前記分析一本鎖核酸を用いて、前記生体試料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析するための分析過程の精度管理、及び生体試料に含まれている生体分子の定量分析に使用されることを特徴とする、標準物質を提供する。

【0165】

本発明は、前記生体試料にある生体分子の生物学的意義を分析するための前記分析一本鎖核酸及び前記標準物質を使用することを特徴とする、生体分子分析キットを提供する。

【0166】

本発明は、前記分析一本鎖核酸と前記標準物質を用いた生体分子分析方法によって前記生体分子を分析することを特徴とし、前記生体試料にある生体分子を準備する試料処理装置と、前記生体分子一本鎖核酸複合体を製造して増幅するモジュール及び前記増幅された産物を分析するモジュールで構成された増幅装置とを含む生体分子分析システムを有することを特徴とする、生体分子分析装置を提供する。

30

【0167】

本発明の生体分子分析方法をより効率よく行なうために、生体分子を含む試料から生体分子を分離する試料処理装置と、前記生体分子分析一本鎖核酸及び標準物質一本鎖核酸複合体を製造しこれを増幅するモジュール及び前記増幅された産物を分析するモジュールで構成された増幅装置とを含む、分析結合一本鎖核酸及び標準物質を用いた生体分子分析装置において、本発明のシステムは、混合チャンバー、溶解チャンバー及び反応チャンバーからなる試料処理装置及び増幅装置で構成され、これらが統合されて運営されることも可能である。

40

【0168】

関心対象の生体分子を含有しているとされるサンプルの分析は、一連のサンプル準備段階を伴い、混合チャンバー及び溶解チャンバーからなる試料処理装置で行われる。これらの段階には、ろ過、細胞溶解、生体分子、生体分子一本鎖核酸複合体の製造、及び試薬との混合を含むことができる。生体分子分析結果に対する確信を持つためには、サンプル準備過程の汚染に対する制御が有用であろう。核酸増幅反応のためのサンプルを調製し、サンプル調製の有効性を検証する方法を提供する。

50

【0169】

サンプルは、細胞、孢子、微生物、及びウイルスよりなる群から選択される標的エンティティを含有するものとされる。この標的エンティティは少なくとも一つの標的生体分子を含む。前記方法は、サンプルとサンプル調製対照群とを混合する混合チャンバーを有する装置内にサンプルを導入する段階を含む。サンプル調製対照群は、細胞、孢子、微生物及びウイルスよりなる群から選択される。該サンプル調製対照群は精度管理物質を含む。また、前記装置は溶解チャンバーと反応チャンバーを備える。サンプルは混合チャンバー内でサンプル調製対照群と混合される。

【0170】

また、前記方法は、サンプル調製対照群及びサンプル内に存在する場合の標的エンティティを溶解チャンバーで溶解処理して生体分子を精製する段階と、生体分子一本鎖核酸複合体を生成する段階と、溶解チャンバー内の生体分子一本鎖核酸複合体を反応チャンバー内で核酸増幅の条件に露出させる段階と、少なくとも一つの精度管理物質の存在有無を検出する段階とを含む。精度管理物質の肯定的検出の場合はサンプル調製過程が満足であったことを示すのに対し、精度管理物質を検出することができない場合はサンプルが不適切に調製されたことを示す。

10

【0171】

本発明は、核酸増幅反応のためのサンプルを調製し、そのサンプル調製の有効性を検証する増幅装置を提供する。サンプルは、細胞、孢子、微生物、及びウイルスよりなる群から選択される標的エンティティを含有するものとされる。この標的エンティティは、少なくとも一つの標的生体分子を含む。前記装置は、サンプルと混合されるサンプル調製対照群を収容する第1チャンバーのある本体を含む。サンプル調製対照群は細胞、孢子、微生物、及びウイルスよりなる群から選択され、このサンプル調製対照群は精度管理物質を含む。

20

【0172】

また、前記本体は、サンプル内に存在する場合の標的エンティティ及びサンプル調製対照群を溶解処理し、これらから生体分子を遊離させ、生体分子一本鎖核酸複合体を分離する溶解チャンバーを含む。また、遊離した生体分子と分析一本鎖核酸とを反応させて生体分子一本鎖核酸複合体を生成する溶解チャンバーを含む。また、前記本体は、増幅及び検出のための核酸を維持する反応チャンバーを含む。

30

【0173】

前記装置は、サンプル調製対照群と混合されたサンプルのある第1チャンバーから溶解チャンバー内へ流れるように案内し、溶解チャンバーで遊離した生体分子を反応チャンバー内へ流れるように案内する少なくとも一つの流れ制御器をさらに含む。

【0174】

いくつかの実施形態において、溶解チャンバーは、サンプルが溶解チャンバーを介して流れるときに、サンプル内に存在する場合の標的エンティティ及びサンプル調製対照群を捕獲する酵素、少なくとも一つのフィルター及び固相物質を収容し、前記装置は、溶解チャンバーを介して流れた使用済みのサンプル流体を収容する少なくとも一つの廃棄チャンバーをさらに含み、前記少なくとも一つの流れ制御器はまた、溶解チャンバーを介して流れた使用済みのサンプル流体を廃棄チャンバーへ流れるように案内することができる。

40

【0175】

いくつかの実施形態において、前記装置は、溶解チャンバーへ超音波を提供するために溶解チャンバーの壁に結合された超音波トランスデューサをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記装置は、サンプル調製対照群及び標的エンティティを破裂させるために溶解チャンバー内にビーズをさらに含む。

【0176】

本発明の別の態様によれば、本発明は、溶解過程の有効性を決定する方法を提供する。この方法は、細胞、孢子、微生物及びウイルスよりなる群から選択された標的エンティティを含有するものとされるサンプルをサンプル調製対照群と混合する段階を含む。標的

50

エンティティは、少なくとも一つの精度管理物質を含む。サンプル調製対照群は細胞、孢子、微生物及びウイルスよりなる群から選択され、このサンプル調製対照群は精度管理物質を含む。サンプル調製対照群とサンプル内に存在する場合の標的エンティティの混合物は溶解処理される。また、前記方法は、溶解処理中にサンプル調製対照群から生体分子が遊離したか否かを決定するように精度管理物質の存在有無を検出する段階をさらに含む。精度管理物質の肯定的検出の場合は、サンプル調製過程が満足であったことを示すのに対し、精度管理物質を検出することができない場合は、サンプルが不適切に調製されたことを示す。

【0177】

いくつかの実施形態において、前記方法は、溶解処理の前に、サンプル調製対照群及びサンプル内に存在する場合の標的エンティティを固相物質によって捕獲するための、サンプル調製対照群と混合されたサンプルが、固相物質を収容するチャンバーを介して流れるようにする段階を含む。

【0178】

いくつかの実施形態において、サンプルは、サンプルとサンプル調製対照群とを混合する前に予備濾過できる。いくつかの実施形態において、溶解処理は、サンプル調製対照群及び標的エンティティを超音波エネルギーに露出させることを含む。また、いくつかの実施形態において、溶解処理は、サンプル調製対照群及び標的エンティティを破裂させるためのビーズを攪拌させることを含む。いくつかの実施形態において、サンプル調製対照群は孢子である。いくつかの実施形態において、混合段階は、サンプル調製対照群を含む乾燥ビーズを分解することを含む。

【0179】

いくつかの実施形態において、溶解処理は化学的溶解剤と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、マーカー核酸配列は、マーカー核酸を（例えば、PCBによって）増幅し、増幅されたマーカー核酸配列を検出することにより検出される。いくつかの実施形態において、マーカー核酸配列は、マーカー核酸配列に結合できるプローブからのシグナルが限界値を超えるか否かを決定することにより検出される。

【0180】

増幅装置の反応容器の反応チャンバー内の反応混合物は核酸増幅条件に晒される。反応を利用したRNAまたはDNA鋳型の増幅は公知になっている[米国特許第4,683,195号;米国特許第4,683,202号;PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., 1990)]。DNAの核酸増幅は、DNAを熱変性させること、増幅されるDNA分節に側接する配列に2つのオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングすること、及びアニーリングされたプライマーをDNAポリメラーゼによって伸長させることを1サイクルとし、該サイクルの繰り返しを伴う。プライマーは、標的配列の対向する鎖(strand)にハイブリダイズする一方で、ポリメラーゼによるDNA合成がプライマー間の領域にわたって進行するように配向され、DNA分節の量を効果的に2倍にする。また、拡張生成物は補完的であり、プライマーを結合することができるため、個々の連続的なサイクルは、前のサイクルで合成されたDNAの量を実質的に2倍にする。これは、サイクル当たり 2^n （ここで、 n はサイクル数）の比率で特定標的分節の指数的蓄積をもたらす。増幅反応及びリガーゼ連鎖反応(ligase chain reaction; LCR)などの方法が、核酸配列を直接増幅させることに使用できる。また、等温増幅反応が公知になっており、本発明の方法に応じて使用できる。

【0181】

核酸増幅反応は、好ましくは、反応容器内の反応混合物を増幅反応に必要な温度に加熱及び／または冷却させる熱処理装置を用いて行う。また、このような熱処理装置は、サンプル調製対照群のマーカー核酸配列、及びサンプルでテストするための一つ以上の標的核酸配列を検出する一つ以上の検出機構を含むことができる。反応容器内の核酸配列を増幅及び検出するための光学検出器が組み込まれた好ましい熱処理装置(米国特許第6,36

9, 893号; 米国特許第6, 391, 541号)を使用することができる。また、反応混合物の温度を制御し、この反応混合物における核酸配列を検出するための本発明に適した多くのその他の公知の方法がある。

【0182】

また、サンプル調製対照群の精度管理物質、及びサンプルでテストするための一つ以上の精度管理物質の検出は、プローブを用いて行うことが好ましい。反応容器は、光学的に検出できるプローブからのシグナルが通過する一つ以上の透明または光透過性の壁を有することが好ましい。好ましくは、捕捉プローブが核酸配列を検出及び定量化することを使用できる。核酸捕捉プローブを採用する様々な数多くの分析法がある。これらの捕捉プローブの一部は、他の分子またはモイエティ (m o i e t y) との相互作用で変化により蛍光源の蛍光発光における変化を有するシグナルを生成する。

10

【0183】

増幅生成物の検出のための他の好ましい方法として、蛍光プローブは、蛍光レポーター染料 (f l u o r e s c e n t r e p o r t e r d y e) モジュールによって標識化されたオリゴヌクレオチドからなる。捕捉プローブの分裂はレポーター染料の蛍光強度の増加を発生させる。

【0184】

サンプル内における標的生体分子の検出またはその欠如を確信するために、サンプル調製の汚染を制御しなければならない。これは、サンプル調製対照群がサンプル内の標的エンティティ (例えば、生体分子を含有している標的細胞、孢子、ウイルスまたは微生物) と同じ処理を受けなければならない理由である。サンプル調製対照群の精度管理物質が検出されれば、サンプル調製は満足すべきであるとみなされる。精度管理物質の存在が検出できなければ、サンプル調製は不適切であるとみなされ、標的核酸配列に対するテストの結果は「未定」であるとみなされる。好ましくは、精度管理物質の存在有無は、ターゲットプローブに結合することが可能な捕捉プローブからのシグナルが限界値、例えば分析法に対して有効であるとみなされるように満足または超過しなければならない所定の蛍光発光の限界値を超過するかどうかを決定することにより検出される。

20

【0185】

流体制御装置は所望のプロトコルに基づいてコンピュータで制御できる。単一バルブを使用すると、只一つの失敗要素により高い製造歩留まりを生成することができる。流体制御及び処理構成部材の統合は、コンパクトな装置 (例えば、小型カートリッジの形態) を得ることができ、成形及び組立の自動化を容易にする。前述したように、そのようなシステムは、好ましくは希釈及び混合能力、中間洗浄能力及び確実な加圧能力を含むことができる。システム内の流体経路は、システム内の流体の汚染を最小限に抑え、かつ、そのような流体の収容及び制御を容易にするように通常閉鎖される。反応容器は、便利に取り外し及び交換が可能であり、いくつかの実施形態では廃棄可能である。

30

【0186】

本発明では、前記生体分子と分析一本鎖核酸の結合情報データを利用した生物学的意義分析のための構成は、患者群の前記生体分子と分析一本鎖核酸の結合情報、及び対照群の前記生体分子と分析一本鎖核酸の結合情報に関するデータの入力を受けてデータベースを構築するモジュールと、前記入力された結合情報データを用いて分析システムで前処理を行うモジュールと、前記前処理された結果を用いて患者のモデルを生成するモジュールと、前記生成されたモデルをロードし、来院した患者に適用してブラインドテスト (B l i n d t e s t) たる診断を行うモジュールと、交差検定を用いてシステムの性能を評価するモジュールとを含むことを特徴とする、生体分子分析方法及び装置を提供する。

40

【0187】

本発明では、前記生体分子と分析一本鎖核酸の結合情報データを利用した生物学的意義予測システムは、例示的に診断であるが、これに限定されない。

【0188】

本発明で生成される多くの生体分子と分析一本鎖核酸の結合情報データは、高次元の特

50

性を有する膨大な量の情報であって、細胞、組織または疾病に関連した様々な情報を生成することができる。前記入力されたデータを用いて分析システムで前処理を行うモジュールは、患者の状態に影響を及ぼす特徴を見つけ、分類性能を向上させるための多変量分析方法は、正確な治療及び診断のために重要変数を見つけて次元を縮小したり、特性の変形によって主要特質を見つけたりする特徴抽出 (Feature Selection) 手続きである。

【0189】

特徴抽出は、細部的に、クラス情報を学習に使用するかどうかによって教師無し学習 (Unsupervised Learning) 方式または教師付き学習方式 (Supervised Learning) がある。教師無し学習方式に主に活用されている PCA (Principal Component Analysis) または ICA (Independent Component Analysis) は、変数の特性を考慮して特質を抽出することができる。教師付き学習方式は、クラス情報と変数間の統計的な有意性または変数間の相関関係を活用して変数を選択する方式である。この方式は、与えられた特質集合に対して前方向 (Forward) または後方向 (Backward) に特質を順次追加または除去しながら分類器に適用させた性能を介して主要特質を算出することができる。

10

【0190】

前記前処理された結果を用いて学習を行って患者のモデルを生成するモジュールは、選択された特質を適切な分類器 (Classifier) を用いてクラスによって分類するための手続きを行う。

20

【0191】

本発明において人工ニューラルネットワーク (Artificial Neural Network) を使用したが、入力と出力に応じて行動を決定する特性のため、パターン認識、関数近似、分類技法などの様々な分野で応用されている。人工ニューラルネットワークは、その構造が複数の層 (layers)、ノード (nodes)、ニューラルネットワーク接続重みで構成される。本発明に使用されるニューラルネットワーク層間接続方式はフィードフォワード (Feed-forward) 方式である。入力パターンに応じて各ノードに対するニューラルネットワーク接続重みと活性化関数を用いて出力値を算出した。生成された結合情報を用いて特定の作業を処理したときに推定した値と実際の結果値とが異なる場合、算出された値を実際の結果値と比較しながら誤差を減らす過程を繰り返し行う方式が、フィードフォワード方式である。

30

【0192】

前記患者のモデルを生成する方法は、線形モデル (linear models)、サポートベクターマシン (support vector machines)、ニューラルネットワーク (neural networks)、分類及び回帰ツリー (classification and regression trees)、アンサンブル学習法 (ensemble learning methods)、判別式分析 (discriminant analysis)、最近隣方法 (nearest neighbor method)、ベイジアンネットワーク (Bayesian networks)、及び独立成分分析 (independent components analysis) よりなる群から選択されることを特徴とする、生体分子分析方法及び装置を提供する。

40

【0193】

正確かつ総合的なメカニズム (Mechanism) が解明されていない大多数の疾患については、事例をベースとする診断の重要性が非常に大きいといえる。ところが、特定の機械学習技法に限定して考案された、従来の事例ベースの機械学習推論システムは精度が低い。よって、改善されたシステムの開発が持続的に求められている。また、従来のシステムは、学習された臨床検査項目全体を利用した疾患判別機専用で考案されており、各疾患別臨床検査項目の重要度や優先順位を活用することが可能な方法を提供していない。

【0194】

50

本発明は、医師の正確な疾患診断を支援するための事例ベースの機械学習推論を用いた疾患診断及び検査項目選定システムに関するもので、患者の事例データベース (Data base) を介して訓練された人工ニューラルネットワーク (Neural Network) を利用した機械学習器である疾患判別器によって新しい患者の検査情報を分析して疾患を判別し、予備診断による各疾患の最終判別のための最小の重要検査項目を選定して提供するシステムに関するものである。機械学習推論を利用した疾患診断法は、機械学習技法を個別に適用して構成している。前記患者のモデルを生成する方法は、線形モデル (linear models)、サポートベクターマシン (support vector machines)、ニューラルネットワーク (neural networks)、分類及び回帰ツリー (classification and regression trees)、アンサンブル学習法 (ensemble learning methods)、判別式分析 (discriminant analysis)、最近隣方法 (nearest neighbor method)、ベイジアンネットワーク (Bayesian networks)、独立成分分析 (independent components analysis) などがある。

10

【0195】

本システムは、構成及び実務への応用の観点から、2つに分けて構成することができるが、診断のみのための独立 (stand alone) 型の診断システムと既存の病院情報システム、すなわち、OCS、PACS、LISなどと連携した統合システムで構成することができる。統合システムとの連動のためにはHL7及びDICOM規約に基づいてシステムを構成しなければならない。本システムは、初期モデルとしてのPMS (Patient Monitoring System) と連動して診断の精度を高めた。また、PMSだけでなく、OCS、EMR、PACSなどの様々な医療情報システムと連動したシステムとして開発し、様々な疾患因子を含んでいるより正確な診断システムとして開発することができる。

20

【0196】

本発明によれば、前記生体試料は細菌、真菌類、ウイルス、細胞株及び組織よりなる群から選択され、前記生体分子はタンパク質、炭水化物、脂質、多糖体、糖タンパク、ホルモン、受容体、抗原、抗体及び酵素よりなる群から選択された少なくとも一つであることを特徴とする、分析一本鎖核酸及び標準物質を用いた生体分子分析方法を提供する。

30

【実施例】

【0197】

以下、添付図面と実施例を参照して、本発明に係る外部標準物質及びバイオチップの製造方法、並びにこれらを用いた2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子の分析方法を詳細に説明する。以下の実施例は、本発明を例示的に説明するものに過ぎず、本発明の範囲を制限するものと意図されていない。

【0198】

実施例1. ランダムな塩基配列を有する一本鎖核酸の製造

【0199】

次のランダムな塩基配列を有する一本鎖のDNAオリゴヌクレオチドを用いてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行って二重鎖のDNAを製造した後、生体外転写を介して一本鎖のRNAライブラリー (ランダムな一本鎖核酸) を製造した。

40

【0200】

00875'-GGGAGAGCGGAAGCGTGCTGGGCC N40 CAT
AACCCAGAGGTTCGATGGATCCCCC-3 (ここで、下線付きの塩基配列は核酸ライブラリーにおける固定配列部位であり、N40はそれぞれの位置にA、G、T、Cなどの塩基がランダムに存在する配列部位を意味する。)

【0201】

PCRに用いられる前記FWプライマーは、上記の塩基配列の下線付き塩基の5'末端

50

と塩基対合をすることができ、バクテリオファージT7のRNAポリメラーゼのためのプロモーター塩基配列を含んでいる。

【0202】

PCRに用いられる前記REプライマーは、上記の塩基配列の下線付き塩基の3'末端と塩基対合をすることができる。そして、FWプライマーとREプライマーは、後のクローニングのためにそれぞれEcoRIとBamHIなどの制限酵素切断塩基配列を含有することもできる。

【0203】

生体試料と反応するランダムな一本鎖核酸は、2'-F-置換ピリミジンを含むRNAライブラリーである。また、DNAライブラリー転写体とPCRプライマーを上述のように設計してPCR及び生体外転写方法によって製造した。

10

【0204】

1,000 pmolの一本鎖DNAを鋳型として、2500 pmolのPCRプライマー対(5P7)の存在下に、50mM KCl、10mM Tris-Cl (pH 8.3)、3mM MgCl₂、0.5mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP)、及び0.1U Taq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer、Foster City Calif.)を含有した緩衝液でPCRを行った後、QIAquick-spin PCR精製カラム(QIAGEN Inc.、Chatsworth Calif.)で精製した。

20

【0205】

2'-F-置換ピリミジンを含むランダムな一本鎖核酸は、生体外転写で合成し、精製して用意した。200 pmolの二重鎖DNA、40mM Tris-Cl (pH 8.0)、12mM MgCl₂、5mM DTT、1mMスベルミジン(spermidine)、0.002% Triton X-100、4%PEG8000、5U T7 RNAポリメラーゼ、ATP及びGTP(各1mM)、並びに2'-F-CTP及び2'-F-UTP(各3mM)を37℃で6~12時間反応させた後、Bio-Spin6クロマトグラフィーカラム(Bio-Rad Laboratories、Hercules Calif.)で精製した後、UVスペクトロメーターを用いて、精製された核酸の量及びその純粋度を検索した。

30

【0206】

実施例2. ヒト血清タンパク質に結合する生体分子結合一本鎖核酸の製造

【0207】

2-1. 生体分子一本鎖核酸複合体の確保

【0208】

2-1-1. 洗浄方法

【0209】

本発明において、2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料がヒト血清タンパク質の例示である。実施例1で合成されたランダムな一本鎖核酸の10⁻¹⁵塩基配列/Lの濃度溶液を200 pmol/Lの濃度で選択バッファー(50mM Tris-Cl (pH 7.4)、5mM KCl、100mM NaCl、1mM MgCl₂、0.1% Na₃)で80℃、10分加熱した後、氷に10分間放置した。使用した一本鎖核酸の5倍の酵母tRNA(yeast tRNA、Life Technologies社)及び0.2%BSA(bovine serum albumin、Merck社)を添加して反応溶液を用意した。

40

【0210】

外部標準物質の含まれている10µlの血清生体試料を90µlの前記反応溶液を添加し、ニトロセルロース膜ディスク(nitrocellulose membrane disc)を入れて30分間振とうしながら反応させた。上記で用意された一本鎖RNAを、血清生体試料が付着したディスクに処理し、30分間反応させた。

【0211】

50

反応の後、次の洗浄バッファーで洗浄過程を繰り返し行うことにより未結合一本鎖RNAを除去して、1回の選択過程によってヒト血清生体試料のヒト血清タンパク質に結合する一本鎖核酸の製作に使用するヒト血清タンパク質（生体分子）一本鎖核酸複合体を確保した。

【0212】

前記生体分子一本鎖核酸複合体を確保するために、洗浄バッファーとしては、0～1×SELEXバッファーまたは0～500mM EDTA溶液を使用した。確保した複合体に対してRT-PCRを行い、血清タンパク質に結合するRNA（生体分子結合一本鎖核酸）を指示するDNAプールを増幅製作した。この際、上述の選択及び増幅過程を多数回繰り返し行うことにより、生体分子結合一本鎖核酸を製作することもできる。また、外部標準物質に結合する一本鎖核酸の製造のために、ヒト血清タンパク質一本鎖核酸複合体と一緒に外部標準物質一本鎖核酸結合複合体を確保することもできる。

10

【0213】

また、確保されたRT-PCR産物であるDNAをプラスミドにクローニングして単一クローンを確保する過程で、生体分子結合一本鎖核酸の製作を完了した。これらの生体分子に結合する一本鎖核酸の塩基配列の決定はプラスミドを分離して行った。

【0214】

生体分子のプロファイルを生成するための本発明に係るバイオチップに使用する捕捉プローブの塩基配列は、ヒト血清タンパク質（生体分子）に結合する前記一本鎖核酸の塩基配列情報を用いて設計した。一本鎖核酸の選定及び捕捉プローブの製作のために、二次構造モデリングするMFOLDプログラムを用いて二次構造とその構造体の自由エネルギーを確認した後、最も安定度の高い二次構造を有する一本鎖核酸を選定したとともに、この選定された一本鎖核酸に基づいて捕捉プローブも設計した。

20

【0215】

外部標準物質は、植物特異タンパク質を5つ選定し、大腸菌発現システムを用いて、相応するタンパク質を発現させた後、タンパク質を分離し、SELEX方法によって、外部標準物質に結合する一本鎖核酸を確保した。前記確保された一本鎖核酸の塩基配列を用いて、外部標準物質に相応する捕捉プローブを設計した。

【0216】

2-1-2. キャピラリー電気泳動

30

【0217】

上記で合成されたランダムな一本鎖核酸の 10^{-5} 塩基配列/Lの濃度溶液を200pmol/Lの濃度で反応溶液[100mM Tris-HCl (pH 8.2)、200mM NaCl、及び10mM MgCl₂]に入れ、80℃で10分加熱した後、氷に10分間放置した。使用した一本鎖核酸の5倍の酵母tRNA (yeast tRNA、Life Technologies社) 及び0.2% BSA (bovine serum albumin、Merck社) を添加して反応溶液を用意した。

【0218】

10μlの血清生体試料を90μlの反応溶液に添加して30分間反応させた。前記反応混合溶液は緩衝溶液(50mM Tris-HCl、pH 8.2)を用いてキャピラリー電気泳動を施した。本発明のキャピラリー電気泳動を利用したすべての分析は、fused-silica capillary (Beckman Coulter、長さ37cm×内径75μm)を取り付けたP/ACE 5000 CE-LIF system (Beckman Coulter)を用いて行った。システムに付いている488nmの3mWアルゴンイオンレーザーで蛍光物質を励起(excitation)して520nmのフィルターを介して放出されたシグナルを、LIF system内の検出器(detector)によって捕集した。

40

【0219】

分析及びキャピラリーの処理に使用されるすべての溶液は、孔径0.2μmのフィルターによって濾過させた。キャピラリーは1N NaOHと蒸留水をそれぞれ5分間流して

50

洗浄した後で使用した。各電気泳動の間には1 N NaOH、蒸留水、緩衝溶液で2分ずつキャピラリーを洗浄した。

【0220】

ここに10 kVの電圧をかけて電気泳動を施し、その結果を分析した。キャピラリー電気泳動を用いて、生体分子一本鎖核酸複合体の生成を分析したグラフから、生体分子一本鎖核酸複合体が特異的に生成、分離されることを確認した。

【0221】

分離された複合体に対してRT-PCRを行い、血清タンパク質に結合するRNA（生体分子結合一本鎖核酸）を指示するDNAプールを増幅製作した。このとき、上述の選択及び増幅過程を多数回繰り返し行い、生体分子結合一本鎖核酸を製作することもできる。

10

【0222】

2-1-3. ニトロセルロースとナイロンの構造体

【0223】

上記で合成されたランダムな一本鎖核酸の 10^{15} 塩基配列/Lの濃度溶液を200 pmol/Lの濃度で反応溶液（100 mM Tris-HCl at pH 8.2、200 mM NaCl、及び10 mM $MgCl_2$ ）に入れ、80℃で10分加熱した後、氷に10分間放置した。使用した一本鎖核酸の5倍の酵母tRNA（yeast tRNA、Life Technologies社）及び0.2% BSA（bovine serum albumin、Merck社）を添加して反応溶液を用意した。

【0224】

20

10 µlの血清生体試料を90 µlの前記反応溶液に添加し、上記で用意された一本鎖RNAを30分間反応させて生体分子一本鎖核酸複合体を生成させた。

【0225】

ヒト血清生体試料（生体分子）に結合する生体分子結合一本鎖核酸を選定するために、前記反応混合溶液を、ニトロセルロース（nitrocellulose）とナイロン（nylon）からなる構造体に処理し、圧力を加えると、生体分子一本鎖核酸複合体はニトロセルロースフィルター上に存在し、結合していない一本鎖核酸はナイロン膜上に存在する。前記ニトロセルロースフィルターを回収し、様々な洗浄バッファーで洗浄工程を繰り返し行うことにより、ニトロセルロースフィルターにある未結合一本鎖核酸を除去して、一回だけの選択過程でヒト血清タンパク質（生体分子）一本鎖核酸複合体を確保した。

30

【0226】

生体分子一本鎖核酸複合体を確保するために、洗浄バッファーとしては、0~1×SELEXバッファーまたは0~500 mM EDTA溶液を使用した。確保した複合体に対してRT-PCRを行い、血清タンパク質に結合するRNA（生体分子結合一本鎖核酸）を指示するDNAプールを増幅製作した。このとき、上述の選択及び増幅過程を多数回繰り返し行うことにより、生体分子結合一本鎖核酸を製作することもできる。

【0227】

2-2. 生体分子結合一本鎖核酸の製造

【0228】

40

上述のように確保した複合体に対してRT-PCRを行うことにより、血清タンパク質に結合するRNA（生体分子結合一本鎖核酸）を指示するDNAプールを増幅製作した。このとき、前述の選択及び増幅過程を多数回繰り返し行って生体分子結合一本鎖核酸を製作することもできる。

【0229】

確保されたRT-PCR産物であるDNAをプラスミドにクローニングして単一クローンを確保する過程で、生体分子結合一本鎖核酸の製作を完了した。これらの生体分子に結合する一本鎖核酸の塩基配列の決定はプラスミドを分離して行った。

【0230】

生体分子のプロファイルを生成するための本発明に係る核酸チップに使用する捕捉プロ

50

ープの塩基配列は、ヒト血清タンパク質（生体分子）に結合する前記一本鎖核酸の塩基配列情報を用いて設計した。一本鎖核酸の選定及び捕捉プローブの製作のために、二次構造をモデリングするM F O L Dプログラムを用いて二次構造とその構造体の自由エネルギーを確認した後、最も安定度の高い二次構造を有する一本鎖核酸を選定したとともに、この選定された一本鎖核酸に基づいて捕捉プローブも設計した。

【0231】

確保されたR T - P C R産物であるD N Aをプラスミドにクローニングして単一クローンを確保する過程で、生体分子結合一本鎖核酸の製作を完了した。これらの生体分子に結合する一本鎖核酸の塩基配列の決定はプラスミドを分離して行った。

【0232】

生体分子のプロファイルを生成するための本発明に係る核酸チップに使用する捕捉プローブの塩基配列は、ヒト血清タンパク質（生体分子）に結合する前記一本鎖核酸の塩基配列情報を用いて設計した。一本鎖核酸の選定及び捕捉プローブの製作のために、二次構造をモデリングするM F O L Dプログラムを用いて二次構造とその構造体の自由エネルギーを確認した後、最も安定度の高い二次構造を有する一本鎖核酸を選定したとともに、この選定された一本鎖核酸に基づいて捕捉プローブも設計した。

【0233】

実施例3：精度管理一本鎖核酸の製造

【0234】

外部標準物質は、植物特異データベース（http://genomics.msu.edu/plant_specific/）から確保したA、B、C、D、及びEの5種の植物特異タンパク質で構成されている（表1参照）。

【0235】

【表1】

植物特異タンパク質

種類	遺伝子座 (Locus)	内容	Accession number
A	At1g65390.1	防御／免疫タンパク質 (defense/immunity protein)	G0:0003793
B	At5g39310.1	細胞伸長 (cell elongation)	G0:0009826
C	At4g15910.1	乾燥で誘導されるタンパク質 (D i 2 1) (Drought-Induced Protein) (Di21)	G0:0009414
D	At1g12860.1	B h l h タンパク質 (Bhlh Protein)	G0:0003677
E	At4g02530.1	葉緑体チラコイドルーメンタンパク質 (Chloroplast Thylakoid Lumen Protein)	G0:0009543

【0236】

選定された5種の植物特異タンパク質は、大腸菌発現システムを用いて、相応するタンパク質を発現させた後、発現されたタンパク質を分離し、標準S E L E X方法（E l l i n g t o n , A . D . and J . W . S z o s t a k . 1 9 9 0 . I n v i t r o s e l e c t i o n o f R N A m o l e c u l e s t h a t b i n d s p e c i f i c l i g a n d s . N a t u r e 3 4 6 : 8 1 8 - 8 2 2 ; G o l d , L . , P . A l l e n , J . B i n k l e y , D . B r o w n , D . S c h n e i d e r , S . R . E d d y , C . T u e r k , L . G r e e n , S . M a c d o u g a l , and D . T a s s e t 1 9 9 3 . R N A : t h e s h a p e o f t h i n g s t o c o m e , p p . 4 9 7 - 5 1 0 . I n : R . F . G e s t e l e n d and J . F . A t k i n s (e d s .) . T h e R N A W o r l d , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y .) によって、外部標準物質に結合する一本鎖核酸を確保した。これを精度管理一本鎖核酸と命名

し、これらの塩基配列で、精度管理一本鎖核酸に相応する捕捉プローブを設計した。

【0237】

実施例4. バイオチップ（核酸チップ）の製造

【0238】

スライドガラスの表面に固着させる捕捉プローブとして、実施例1で選定された塩基配列を有する3,000余個の生体分子結合一本鎖核酸に相補的な塩基配列及び精度管理一本鎖核酸に相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸（オリゴヌクレオチド）を有機合成して捕捉プローブ（バイオニア社）を用意した。

【0239】

GAPS (Gamma Amino Propyl Silane) がコートされたスライドガラスであるUltraGAPSTM Coated Slide (Cornin g社製) を用いて、捕捉プローブが一定の規則で固着された核酸チップを製作した。核酸チップの製作にはピン (pin) 方式のマイクロアレイヤーシステム (Microar rayer system、GenPak社製) を使用し、スポット間隔 (spot sp acing) はスポットの中心間 (center-to-center) 距離が370μ mとなるようにした。それぞれの捕捉プローブを標準溶液に溶かして濃度を調節した。このとき、アレイヤー内の湿度を70%に維持してスポットティング (spotting) を行った。スポットティングされたスライドは、加湿チャンバー (humidified chamber) で24~48時間放置した後、UV crosslinkerでベークする過程を行った。公知の方法で捕捉プローブをスライドガラスに固定させ、スライドを直ちに遠心分離して乾燥させた後、遮光状態で保管した。

【0240】

実施例5. ターゲットプローブの製造

【0241】

実施例1で製作されてバイオチップ（核酸チップ）の製造に使用された一本鎖核酸が挿入されたプラスミドと、実施例3で製作された精度管理一本鎖核酸が挿入されたプラスミドとを同量で混合してプラスミドプールを用意した。また、ヒト血清タンパク質などと結合する一本鎖核酸プールは、前記プラスミドプール及びPCRプライマーを設計製作してPCR及び生体外転写方法で次のとおり用意した。

【0242】

用意されたプラスミドプールで1pgのプラスミドを転写体として、100pM 5'-プライマー、100pM 3'-プライマー、dNTP混合物 (5mM dATP、5mM CTP、5mM dGTP、5mM dTTP) を含有したPCR反応溶液で、標準PCR方法によって94℃30秒、52℃30秒、72℃20秒を30サイクル繰り返し行って二重鎖核酸を合成し、QIAquick-spin PCR精製カラム (QIAGEN Inc.、Chatsworth Calif.) で精製した。

【0243】

2'-F-置換ピリミジンを含むRNA分子の一本鎖核酸を生体外転写で合成し、精製して用意した。

【0244】

200pmolesの二重鎖DNA、40mM Tris-Cl (pH8.0)、12mM MgCl₂、5mM DTT、1mMスペルミジン、0.002% Triton X-100、4% PEG 8000、5U T7 RNAポリメラーゼ、ATP及びGTP (それぞれ1mM)、並びに2'-F-CTP及び2'-F-UTP (それぞれ3mM) を37℃で6~12時間反応させた後、Bio-Spin6クロマトグラフィーカラム (Bio-Rad Laboratories Hercules Calif.) で精製した。

【0245】

標準物質がそれぞれ異なる量で含まれている標準物質IをPBS溶液に添加した。標準物質Iは、外来生体分子A、B、C、D、及びEなど、5種の植物特異タンパク質から構

10

20

30

40

50

成されている（表1参照）。標準物質Iは、外来生体分子A（0.01pg/ml）、外来生体分子B（1.0pg/ml）、外来生体分子C（100.0pg/ml）、外来生体分子D（10.0ng/ml）、及び外来生体分子E（1.0μg/ml）などから構成されている。

【0246】

分析に使用したヒト血清は、健康な人、及び安定狭心症である心血管疾患の患者の血清であり、10μlの血清生体試料を90μlの前記標準物質Iが添加されたPBS溶液に添加し、ニトロセルロース膜（nitrocellulose membrane）ディスクを入れ、30分間振とうしながら反応させて生体試料を用意した。先に製作された100～400ngの一本鎖核酸を投入して30分間反応させることにより、生体分子ー本鎖核酸複合体を生成した。

10

【0247】

用意された一本鎖核酸を、標準物質Iの含まれている血清生体試料が付着したディスクに処理し、30分間反応させた。選択バッファーまたは50mM EDTAで3回洗浄し、タンパク質ー本鎖核酸がついたディスクを分離して収獲した。

【0248】

前記収獲したタンパク質（生体分子）ー本鎖核酸がついたディスク、または分析ターゲットプローブとしての外部標準物質及び蛋白質（生体分子）ー本鎖核酸がついたディスクをRT-PCR溶液に入れ、逆転写を行った後、Cy-5で標識したプライマー（5'-Cy5-CGGAAGCGTGCTGGGCC-3'）を用いて増幅反応を行い、Cy-5で標識した一本鎖核酸である分析ターゲットプローブを用意した。血清タンパク質に対するプラスミドと外部標準物質に対するプラスミドとを同量で混合して得た前記プラスミドプールから用意された一本鎖核酸を用いて上記と同様の方法で逆転写し、Cy-3で標識したプライマー（5'-Cy3-CGGAAGCGTGCTGGGCC-3'）を用いて増幅反応することにより、Cy-3で標識した一本鎖核酸たる比較ターゲットプローブを用意した。前記2つの溶液を同量で混合して、分析ターゲットプローブ及び比較ターゲットプローブを含むターゲットプローブを製作した。

20

【0249】

実施例6．バイオチップ（核酸チップ）とターゲットプローブ溶液のハイブリダイゼーション反応

30

【0250】

実施例4で用意されたタープローブ溶液を本発明のバイオチップ（核酸チップ）の捕捉プローブに処理して60℃で4～12時間ハイブリダイゼーションし、42℃で0.1×SSC溶液で洗浄した。このとき、ハイブリダイゼーション溶液は、1M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム、0.5%SDS、または100μg/mlのサケ精子（salmon sperm）DNA、0.2%ウシ血清アルブミンまたは一本鎖核酸を含む。

【0251】

前ハイブリダイゼーション済みのスライドガラスに、実施例3で用意されたターゲットプローブ溶液を処理し、42℃で12時間ハイブリダイゼーション（Hybridization）を行った後、核酸チップを洗浄溶液で洗浄した。この際、洗浄溶液の組成は、例えば、1×SSC+0.2%SDS、1×SSC+0.2%SDS、0.5×SSC+0.2%SDS、0.01×SSC+0.2%SDSの順の段階であり、それぞれの段階ごとに42℃で30分間行った。

40

【0252】

実施例7．バイオチップ（核酸チップ）のスポット探索及び分析

【0253】

実施例4の洗浄が終了した後、スライドガラスを遠心分離で乾燥させ、使用した蛍光染料を励起（excitation）するための適切な波長のレーザー（Cy5、635nm）を有するレーザースキャナー（laser scanner、GenePix400

50

0、Axon社）を用いて探索した。蛍光イメージは、TIFF（multi image tagged image file）形式で保存した後、適切な画像分析（image analysis）ソフトウェア（GenePix Pro 3.0、Axon社製）で分析した。

【0254】

スポット（spot）当たりのシグナル強度（signal intensity、単位：quanta）は、周囲背景の基本的なシグナル（すなわち、背景シグナル）を差し引いたものを使用する、ここで、背景シグナルは、特定スポットの周囲にある4つのスポットからなるローカルバックグラウンド（local background）のシグナルを意味する。スポットの画素（pixel）の90%以上が背景シグナル+2標準偏差（S. D. ; standard deviation）を超えるシグナル強度を示すとき、そのスポットをデータ分析に含ませ、上記の条件を満たさなければ、データに含ませないスポット（bad spot）として分類し、分析に含ませないのが一般的である。

10

【0255】

標識効率（Labeling efficiency）による偏差（variation）は、内部標準（internal standard、IS）のシグナルを用いて正規化（例えば、Normalized Intensity = Probe Intensity / IS intensity）し、単一標識（monolabeling）をした場合にはCy5チャンネルのシグナル強度（signal intensity）でその結果を記録し、スポットティング（spotting）が2倍以上になった場合には平均値（median value of pixel-by-pixel）。シグナル強度（S）は、内部標準（IS）を用いて標識効率による偏差を正規化する。

20

【0256】

$S' \text{ (normalized value)} = S \text{ (Cy5-reference)} \times (\text{Cy5} - \text{IS})$

【0257】

上記の方法でピクセル密度の分析結果と実際の生体試料量との関係を解明し、その相関関係を確認することができる。核酸チップ蛍光データをイメージ化し、全体スポットのパターンから生体試料における生体分子プロファイルを確認する方法を提供することができる。スポットのパターンを階層クラスタリング（Hierarchical Clustering）及び人工ニューラルネットワーク（Artificial Neural Network）などの方法などで分析して使用することができる。スポットの蛍光程度は捕捉プローブとターゲットプローブが生成する二重鎖の性質によって多様である。スポットを構成する分析ターゲットプローブ及び比較ターゲットプローブの量に応じてスポットの蛍光程度が決定される。

30

【0258】

まず、実施例7による蛍光イメージは図6に示すとおりであり、標準物質は外来生体分子A、B、C、D、及びEなど、5種の植物特異タンパク質から構成されている。外来生体分子A（0.01 pg/ml）、外来生体分子B（1.0 pg/ml）、外来生体分子C（100.0 pg/ml）、外来生体分子D（10.0 ng/ml）及び外来生体分子E（1.0 µg/ml）を血清試料にそれぞれ入れ、分析を行った。標準物質に相応するスポットの蛍光程度は精度管理比較ターゲットプローブと精度管理用分析タープローブの量で決定される。精度管理用比較ターゲットプローブの量は知っているの、標準物質に相応するスポットの蛍光程度は、分析生体試料にある標準物質で作られる精度管理分析ターゲットプローブの量によって決定される。すなわち、標準物質に相応するスポットの蛍光程度は、分析生体試料に含まれている標準物質の量と関係がある。よって、これらの相関関係の標準曲線を作成して目的のスポットの蛍光程度を用いて目的のスポットを定量分

40

50

析することができる。

【0259】

本実験では、比較ターゲットプローブは一定の量から構成されており、スポットの蛍光程度は分析ターゲットプローブの量を示し、分析ターゲットプローブの量はヒト血清タンパク質一本鎖核酸複合体の量を表現する。また、前記複合体の量は生体試料にある生体分子の量を示す。したがって、スポットの蛍光程度から、スポットに相応する生体分子を含む生体試料における特定の生体分子の量を確認することができる。結果として、生成されたスポットの蛍光程度を分析して核酸チップの全体スポットのパターンを確認することにより、ヒト血清における血清タンパク質のプロファイルを確認することができる。

【0260】

すなわち、生成されるスポットが青－黄－赤のカラースペクトルを示すのは、捕捉プローブに結合したCy-3標識競合的阻害剤とCy-5標識ターゲットプローブとの割合が多様であって現れる現象であり、特定スポットのカラースペクトルの程度はヒト血清を構成する特定の血清生体試料に存在する特定の生体分子（タンパク質）の量を表わすので、核酸チップ上の全体スポットのカラースペクトルを示すイメージは特定の生体試料における生体分子のプロファイルに該当する。

【0261】

つまり、本発明の生体分子分析方法では、特定のスポットで捕捉プローブと結合して二重鎖を生成するターゲットプローブは、Cy-3で標識した比較ターゲットプローブとCy-5で標識した分析ターゲットプローブから構成されており、前者は一定の量で存在するが、後者はヒト血清における相応する生体分子に比例して存在する。これにより、特定のスポットは、後者が相対的に少量で存在する場合には青色、後者が前者と同様の量で存在する場合には黄色、後者が相対的に過量で存在する場合には赤色になる。

【0262】

核酸チップ上でスポットの蛍光程度が二重鎖内の分析ターゲットプローブの数によって異なり、これは生体分子の数と相関関係がある。よって、本発明の核酸チップを構成する全体スポットのカラースペクトルを反映するイメージは、未知の生体分子を含む生体試料の生体分子のプロファイルである。

【0263】

上述したテストの結果は図6のとおりである。図6に示すように、捕捉プローブが付着したスライドガラスにおいて、血清タンパク質に結合する一本鎖核酸に基づいた、捕捉プローブが付着した部位であるスポットは、様々な蛍光程度、青－黄－赤のカラースペクトルを生成する。

【0264】

実施例8．ビーズを用いた溶液アレイの製作及びプロファイルの生成

【0265】

ビーズは、ポリスチレン (polystyrene)、ポリメチルメタクリレート (polymethyl methacrylate)、ラテックス (latex)、シリカ (silica)、ポリビニルトルエン (polyvinyltoluene)、スチレンビニルトルエン重合体 (styrenevinyltoluene)、及びスチレンブタジエン重合体 (styrene-butadiene) よりなる群から一種を選択して使用することができる。前記マイクロビーズの大きさには制限がなく、ビーズの表面が改質されていないものとカルボキシル基で改質されたものの両方ともを使用することができる。

【0266】

前記固定化のために、マイクロビーズの表面をカルボキシル基で改質し、NHS/EDCの反応を用いて捕捉プローブを固定させる。

【0267】

ビーズの表面に付着させる捕捉プローブとしては、実施例1で選定された塩基配列を有する3,000余個の生体分子結合一本鎖核酸に相補的な塩基配列及び精度管理一本鎖核

10

20

30

40

50

酸に相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸（オリゴヌクレオチド）を有機合成して（Bioneer社）製造された捕捉プローブを用意した。

【0268】

8-1. ビーズアレイの製作

【0269】

前記捕捉プローブを用いて、各用意されたビーズ（xMAP carboxylated microspheres; Luminex Corp. Austin, TX）に捕捉プローブを固定することによりビーズアレイを製作した。

【0270】

実施例4で製作された捕捉プローブを蒸留水に溶かしてそれぞれ100 μMの濃度で各捕捉プローブを用意した。反応しようとするビーズを番号順によく混合した後、それぞれ40 μlを採取して用意した（各プローブに応じてそれぞれ異なる番号のビーズを準備し、よく混合して、プローブとの反応のためにビーズがよく混ぜられている状態で40 μlをピペットで採取し、新しいチューブに入れて準備する。）。0.1 M MES (pH 4.5) 20 μlを混ぜ、用意されたプローブを2 μl取ってビーズと混ぜた。その後、新しく作った10 ml/mlのEDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl, PIERCE) 溶液1 μlを入れて反応させた。暗所で約30分間よく振とうして反応させた。再び、新しく作った10 ml/mlのEDC 溶液1 μlをさらに入れ、約20分間さらに反応した。その後、各チューブに500 μlの0.02% Tween-20 溶液を入れてよく混ぜた。各チューブのビーズを遠心分離して上澄み液を取り除き、さらに500 μlの0.1% SDS 溶液を各チューブに加えた。各チューブのビーズを上述のように遠心分離して上澄み液を取り除いた。その後、150 μlのTE (pH 8.0) バッファーに溶かしてよく混ぜた後、4℃の暗室で保管した。

【0271】

8-2. プロファイルの生成

【0272】

実施例5と同様の方法で分析ターゲットプローブを用意したが、例外的に、ビオチン（Biotin）で標識したプライマー（5'-biotin-CGGAAGCGTGCTGGGCC-3'）を用いて増幅反応を行い、ビオチンで標識した一本鎖核酸である分析ターゲットプローブを準備した。

【0273】

前記分析ターゲットプローブを前記ハイブリダイゼーション溶液に溶かした後、実施例8-1で製造した混成ビーズとハイブリダイゼーション反応を行った。95℃で5分間反応を行った後、40℃で30分間反応した。このため、96 well Filter plateに反応の終結した反応物を移した後、前記洗浄バッファーを用いて3回洗浄した。洗浄の後、ストレプトアビジンフィコエリトリン（Sigma Aldrich社、S3402）を500倍希釈した溶液100 μlを用いて15分間暗室で攪拌させた。

【0274】

こうして用意された混成ビーズサンプルを用いてLuminex 100機械でウェルごとにビーズを読み取る。Luminex 100は、2つのレーザー（laser）を用いるが、一つのレーザーはビーズ番号を示し、もう一つのレーザーは反応されたフィコエリトリンの量を計算して数値で示した。相応するビーズを読み取りながら、それぞれの捕捉プローブに結合したターゲットプローブの量はビーズの平均蛍光強度（Mean fluorescent intensity; MFI）として決定される。

【0275】

実施例9. 心血管患者の血清タンパク質分析

【0276】

図6の結果から、ヒト血清タンパク質に結合するターゲット一本鎖核酸に基づいた核酸チップを用いてヒト血清における血清タンパク質のプロファイルを確認することができる

とともに、健康な人（Ａ）及び安定狭心症心血管疾患（Ｂ）の血清内生体分子のプロファイルが異なることを確認することができる。

【０２７７】

図７は患者の血液生体試料から本発明の核酸チップを用いて生産されたプロファイルを疾患群別にデータベース化する過程の順序を示すフローチャートである。図８は生産されたプロファイルを、疾患群別に構成されたデータベース、及び人工ニューラルネットワークを利用したプログラムで特定の人の血清に対して生体分子のプロファイルを生産し、疾病を診断するフローチャートである。

【０２７８】

図８に示すように、多くの生体試料から生産されるプロファイルで構築されたデータベースをバイオインフォマティクス技術で分析することにより、有用な情報を確保することができる。

【０２７９】

心血管疾患診断用データベースの構築に使用された血清生体試料の臨床上のデータは下記表２のとおりであり、健康な人３７名、安定狭心症３６名、不安定狭心症２７名及び心筋梗塞患者２７名の合計１２７名である。健康な人、及び安定狭心症、不安定狭心症及び心筋梗塞などの心血管患者の血清プロファイルデータベースを利用して、Lee ２－１（９９）と呼ばれる人の血清生体試料を検査した結果は図９のとおりであり、７２．５％の１０分割交差検証精度（１０－fold cross validation accuracy）で健康な人と予測することができる。

【０２８０】

【表２】

心血管疾患患者の臨床情報

	健康な人	安定狭心症	不安定狭心症	心筋梗塞
性別				
男性	３５	３５	２７	２７
女性	２	１	１	０
年齢				
４０～４９	１	０	１	０
５０～５９	１３	１７	１５	１７
６０～６９	２２	１８	１１	１０
７０～７９	１	１	１	０
合計	３７	３６	２８	２７

【０２８１】

肝癌診断用データベースの構築に使用された血清生体試料の臨床上のデータは表３のとおりであり、健康な人１９名、非転移性肝癌患者７２名及び転移性肝癌患者１１名であって肝癌患者は合計８３名であり、生体試料の総数は１０２例である。

【０２８２】

肝癌患者と健康な人の血清タンパク質プロファイルのデータベースから肝癌患者と健康な人の患者モデルを構成した後、前記肝癌患者のデータベースから転移性患者と非転移性患者の患者モデルを構成した。

【０２８３】

まず、肝癌患者及び健康な人の患者モデルと人工ニューラルネットワークを利用したプログラムとを用いてブラインド（B l i n d）患者が肝癌患者ではないかを判定することができるとともに、連続的に転移性患者及び非転移性患者の患者モデルを用いて、陽性肝癌患者に対して、さらに人工ニューラルネットワークを利用したプログラムで肝癌進行段階たる転移状態を確認することができる。これは転移状態などの疾病進行状態だけでなく、予後及び薬物反応性なども検査することができる。

【0284】

健康な人及び肝癌患者の血清プロファイルデータベースを用いて、K I Mというヒトの血清生体試料を検査した結果は図10のとおりである。93.0%の10分割交差検証（10-fold cross validation）精度で肝癌患者と予測することができる。

10

【0285】

さらに、転移有無を検査するための健康な人、非転移性肝癌患者及び転移性肝癌の血清タンパク質プロファイルデータベースを用いて、K I Mというヒトの血清生体試料を検査した結果は図8のとおりである。76.0%の10分割交差検証（10-fold cross validation）精度で非転移性肝癌患者と予測することができる。

【0286】

【表3】

肝癌の臨床情報

	健康な人	非転移性肝癌	転移性肝癌
性別			
男性	17	67	11
女性	2	5	0
年齢			
40～49	14	60	7
50～59	5	7	3
60～69	0	5	1
合計	19	72	11

20

30

【0287】

健康な人と心筋梗塞患者の血清プロファイルを比較して、心筋梗塞患者に特異的に存在するスポットを決定し、これに相応する一本鎖核酸にビオチン（b i o t i n）を付着させ、ストレプトアビジン（s t r e p t a v i d i n）と反応させた後、血清生体試料と反応させて複合体を分離し、しかる後に、電気泳動して生成されるバンドを分離して生体分子を同定する過程の順序を示すフローチャートは、図11である。選定された一本鎖核酸に結合するタンパク質を分離してM A L D I - T O F - T O F機器でタンパク質のアミノ酸配列を決定した図は図12である。

40

【0288】

前述の方法で生体試料を構成する生体分子に結合する一本鎖核酸に基づいた一本鎖核酸が付着した本発明の核酸チップを用いて、特定の生体試料における生体分子のプロファイルを探索及び分析した。

【0289】

また、医学的に有用な生体試料の生体分子を生産してデータベースを製作した後、特定

50

の人の血清プロファイルを生産し、人工ニューラルネットワークアルゴリズムを利用して製作したプログラムで心血管疾患の有無及びその種類、肝癌発病の有無及び転移程度を検査した。

【0290】

疾患群別に構成されたデータベースを比較分析して有用なスポットを決定し、これに相応する一本鎖核酸を調製し、相応するタンパク質を分離して同定した。

【0291】

実施例10. 細胞株の表面生体分子のプロファイルの生成及び応用

【0292】

10-1. バイオチップ（核酸チップ）の製作

10

【0293】

本発明において、2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料が細胞株の例示である。

【0294】

実施例2～実施例4の方法で、生体試料としての非小細胞肺癌細胞株の表面生体分子のプロファイルを生産する本発明のバイオチップを製作した。用意したランダムな一本鎖核酸を肺癌細胞株に反応させた後、洗浄バッファーを用いて細胞株（生体分子）一本鎖核酸複合体を洗浄し、非結合一本鎖核酸及び結合程度に応じて一本鎖核酸を解離させ、5, 000×gで遠心分離する過程を繰り返し処理した後、細胞株一本鎖核酸複合体を遠心分離方法で分離して非小細胞肺癌細胞株の表面生体分子と結合する一本鎖核酸を製作した。

20

【0295】

前記製作された一本鎖核酸からクローンを選定して塩基配列を決定し、分析して1, 000余個の一本鎖核酸を選定した。実施例2の方法で選定された1, 000余個の一本鎖核酸の相補的な塩基配列を有する捕捉プローブを合成し、固体支持体上に付着させて本発明の核酸チップを製作した。

【0296】

10-2. 細胞株の表面生体分子のプロファイルの生成

【0297】

実施例4の方法で製作された核酸チップを用いて小細胞肺癌細胞株（SCLC）の表面生体分子のプロファイルを生産した。小細胞肺癌細胞株と一本鎖核酸プールとを反応させた後、細胞株（生体試料）の生体分子一本鎖核酸複合体を洗浄及び分離した。前記複合体に結合された一本鎖核酸を実施例3の方法で増幅及び標識した。捕捉プローブと標識したターゲットプローブとを実施例4の方法で反応させた。前記ターゲットプローブに結合された標識物質の測定は実施例5の方法で行った。非小細胞肺癌細胞株の表面生体分子のプロファイルを確認した。

30

【0298】

生産されたプロファイルで、小細胞肺癌細胞株（SCLC）に強力に結合するものと推定される一本鎖核酸を選定し、FITCが付着した一本鎖核酸を合成して小細胞肺癌細胞株、非小細胞肺癌細胞株（NSCLC）、血液癌細胞株（MRC-5及びTHP-1）と反応させた後、蛍光撮影したイメージは、図13のとおりである。

40

【0299】

上述したように、本発明の核酸チップを用いて生産された小細胞肺癌細胞株のプロファイル进行分析して選定した一本鎖核酸が小細胞肺癌細胞株に結合することを確認することができた。

【0300】

実施例11. 大腸菌の表面生体分子のプロファイルの生成及び応用

【0301】

11-1. バイオチップ（核酸チップ）の製作

【0302】

50

生体試料である大腸菌 K C T C 1 2 0 0 6 と実施例 2 ～実施例 4 の方法で本発明の核酸チップを製作した。用意した一本鎖核酸と大腸菌とを反応させた後、洗浄バッファーを用いて大腸菌（生体分子）ー一本鎖核酸複合体を洗浄し、非結合一本鎖核酸及び結合程度に応じて一本鎖核酸を解離させ、5, 0 0 0 × g で遠心分離する過程を繰り返し処理した後、大腸菌ー一本鎖核酸複合体を遠心分離方法で分離して大腸菌の表面生体分子と結合する一本鎖核酸を製作した。

【0303】

前記製作された一本鎖核酸からクローンを選定して塩基配列を決定し、分析して1, 0 0 0 余個の一本鎖核酸を選定した。選定された1, 0 0 0 余個の一本鎖核酸の相補的な塩基配列で捕捉プローブを合成し、固体支持体上に付着させて本発明に係る核酸チップを製作した。

10

【0304】

1 1 - 2 . 大腸菌の表面生体分子のプロファイルの生成

【0305】

本発明において、2つ及びそれ以上の生体分子からなる生体試料が細菌の例示である。

【0306】

実施例 6 の方法で製作された核酸チップを用いて大腸菌 K C T C 1 2 0 0 6 の表面生体分子のプロファイルを生産した。

【0307】

大腸菌と一本鎖核酸プールとを反応させた後、大腸菌ーターゲット一本鎖核酸複合体を洗浄及び分離した。前記複合体に結合された一本鎖核酸を実施例 3 の方法で増幅及び標識した。捕捉プローブと標識したターゲットプローブとを実施例 4 の方法で反応させた。前記ターゲット一本鎖核酸に結合された標識物質の測定は実施例 5 の方法で行い、大腸菌の表面生体分子のプロファイルを確認した。

20

【0308】

大腸菌 K C T C 1 2 0 0 6 の表面生体分子のプロファイルを生産する方法と同様の方法でサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311) の表面生体分子のプロファイルを生産し、データベースを構築した後、階層クラスタリング方法に基づいて、大腸菌に特異的に結合する一本鎖核酸を選定した。前記一本鎖核酸の特異性を S P R 装置 (B I A c o r e 社) で測定した結果は、図 1 4 のとおりである。選定された一本鎖核酸がサルモネラ菌に比べて大腸菌に特異的に結合していることを確認した。

30

【0309】

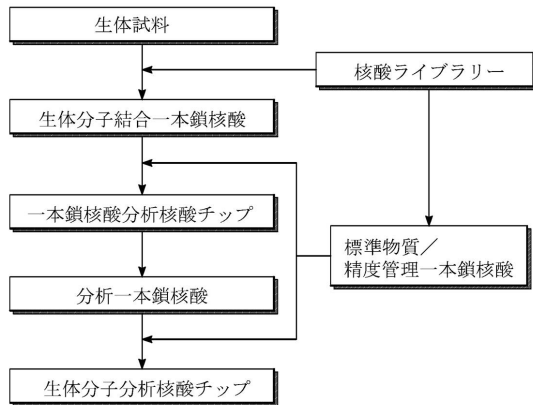
大腸菌に結合する一本鎖核酸及びナノ金粒子を用いて大腸菌を測定する方法（例えば、韓国特許出願第 1 0 - 2 0 0 6 - 0 0 7 2 4 8 0 号参照）で、上記で選定された一本鎖核酸を用いて溶液における大腸菌の有無及び食べ物における大腸菌の汚染程度を測定した結果は、図 1 5 のとおりである。食べ物を洗浄した S E L E X バッファーに一本鎖核酸を反応させ、ナノ金粒子を入れた後、N a C l 溶液を添加し、大腸菌のない溶液は透明な無色に近い青色であり、大腸菌に汚染された溶液は赤色に変化し、その程度は大腸菌の量に比例することを確認した。

40

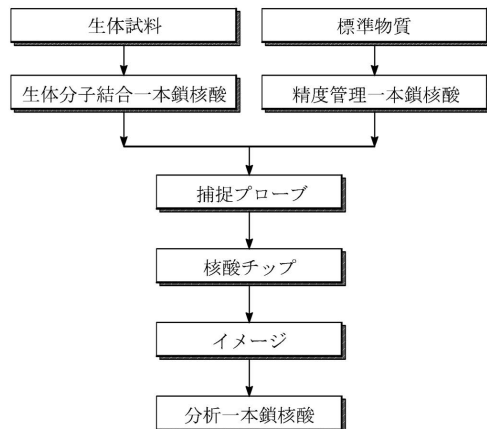
【0310】

以上、本発明についてその好適な実施例を中心に説明した。本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明が本発明の本質的な特性から逸脱しない範囲で変形した形態で実現できることを理解することができるであろう。よって、開示した実施例は、限定的な観点ではなく、説明的な観点から考慮されるべきである。本発明の範囲は、前述した説明ではなく、特許請求の範囲に示されており、それと同等の範囲内にあるすべての違いは本発明に含まれるものと解釈されるべきである。

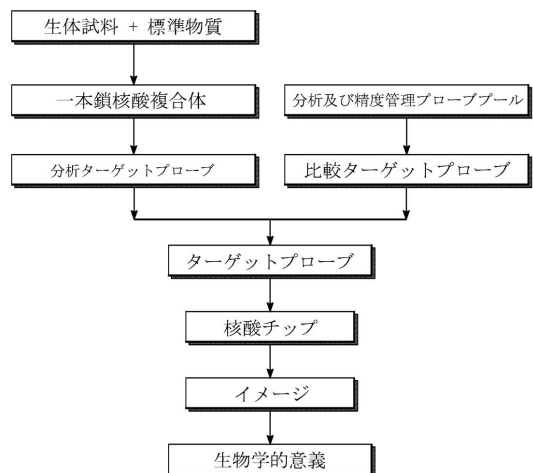
【図 1】



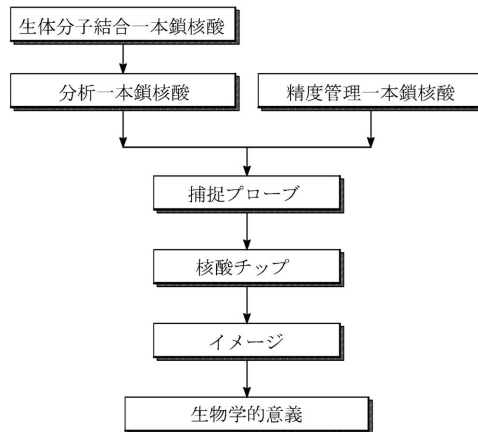
【図 2】



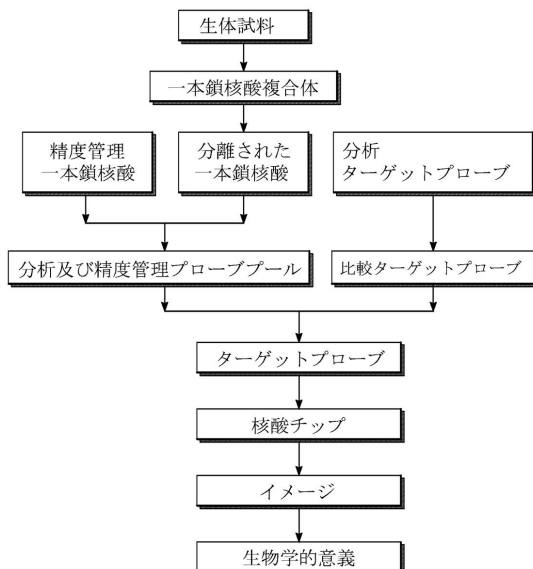
【図 4】



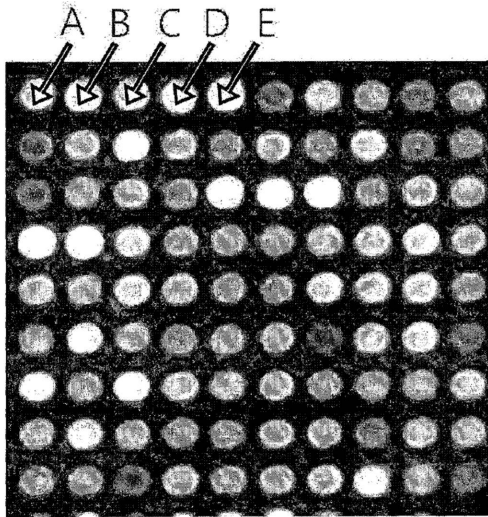
【図 3】



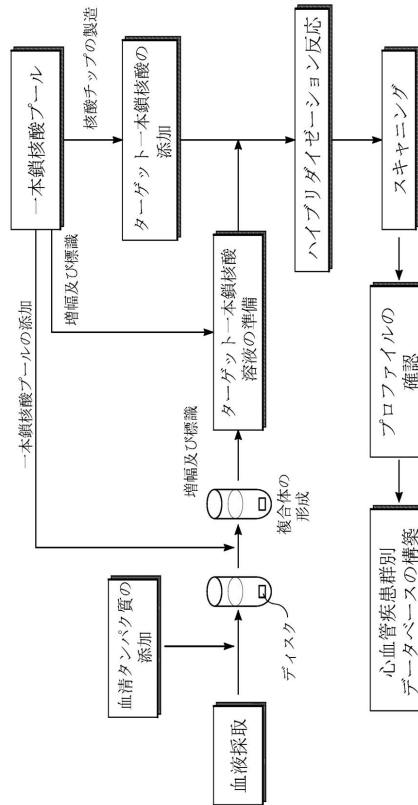
【図 5】



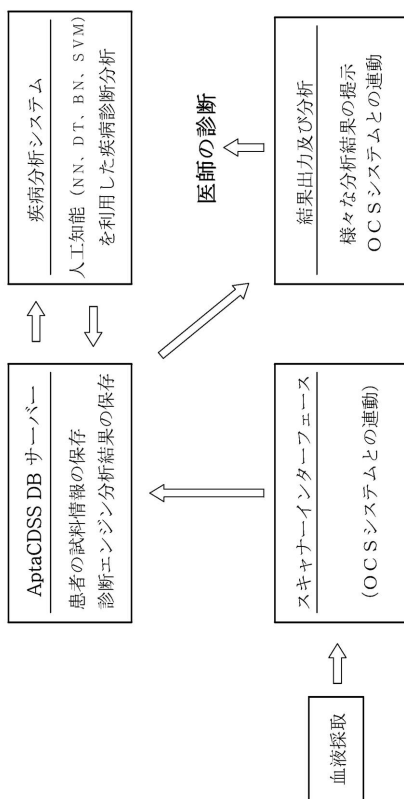
【図 6】



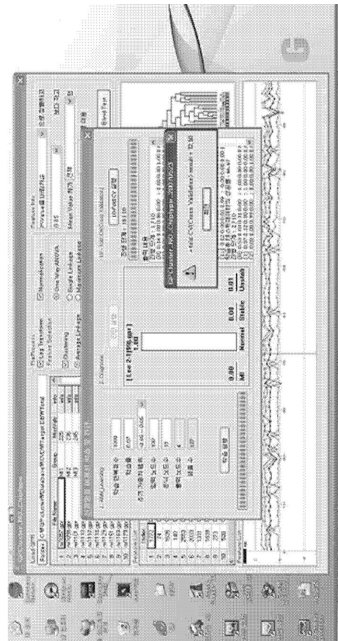
【図 7】



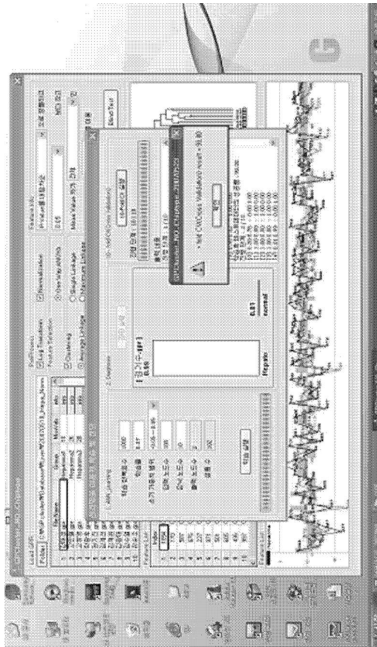
【図 8】



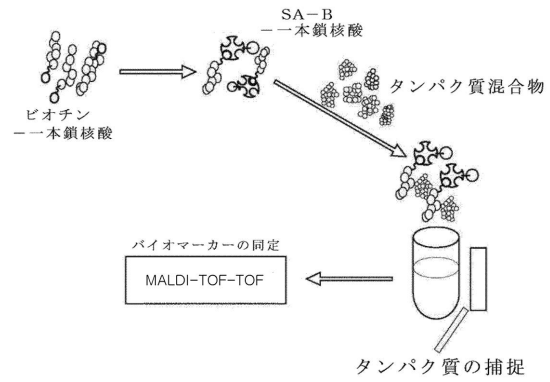
【図 9】



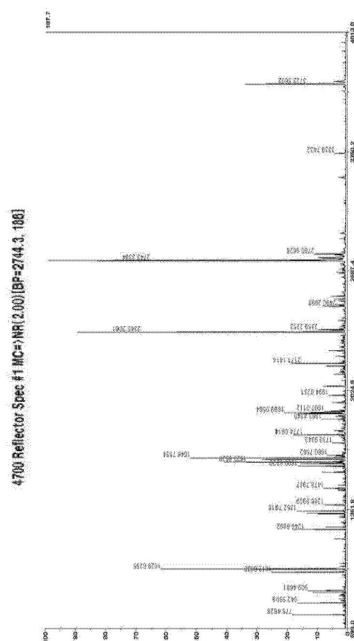
【図 10】



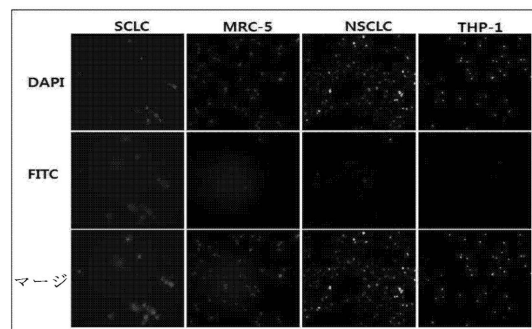
【図 11】



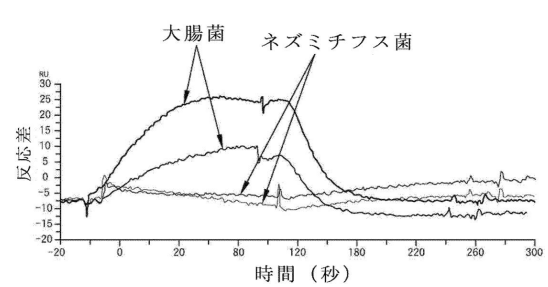
【図 12】



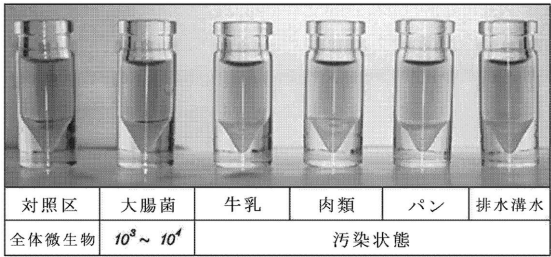
【図 13】



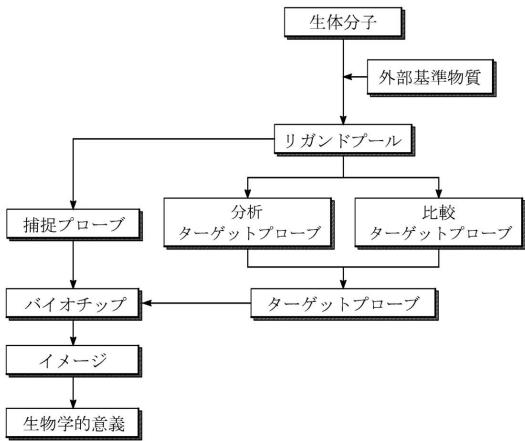
【図 14】



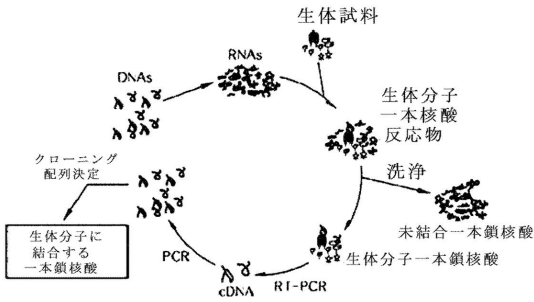
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



【配列表】

0006518238000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 M 1/00 A

審査官 上村 直子

(56)参考文献 国際公開第2005/108609 (WO, A1)
特表2008-520212 (JP, A)
特開2010-227048 (JP, A)
特開2010-057451 (JP, A)
米国特許出願公開第2004/0197779 (US, A1)
米国特許出願公開第2005/0003360 (US, A1)
Angewandte Chemie International Edition, 2006年, Vol.45, p.1576-1580

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1/6813
C 1 2 N 15/09
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)
W P I D S / W P I X (STN)