

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6455438号  
(P6455438)

(45) 発行日 平成31年1月23日(2019.1.23)

(24) 登録日 平成30年12月28日(2018.12.28)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/6834	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6834	Z
C 1 2 N	15/10	(2006.01)	C 1 2 N	15/10	1 1 0
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A

請求項の数 19 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2015-547897 (P2015-547897)	(73) 特許権者	518416045
(86) (22) 出願日	平成25年12月13日(2013.12.13)		ワン バイオームド ピーティーイー リ
(65) 公表番号	特表2016-501028 (P2016-501028A)		ミテッド
(43) 公表日	平成28年1月18日(2016.1.18)		シンガポール国, 259730 シンガ
(86) 国際出願番号	PCT/SG2013/000533		ポール, ブキッ ティマ ロード 385
(87) 国際公開番号	W02014/092653		ビー
(87) 国際公開日	平成26年6月19日(2014.6.19)	(74) 代理人	100107766
審査請求日	平成28年9月8日(2016.9.8)		弁理士 伊東 忠重
(31) 優先権主張番号	201209173-2	(74) 代理人	100070150
(32) 優先日	平成24年12月13日(2012.12.13)		弁理士 伊東 忠彦
(33) 優先権主張国	シンガポール(SG)	(74) 代理人	100091214
			弁理士 大貫 進介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固相デバイスにおける核酸の単離及び分析のためのラベルフリー方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固相デバイスにおける核酸分子の単離及び/又は分析のための方法であって、

(i) 核酸とDMAとの複合体を形成させる条件で、アジプイミド酸ジメチル(DMA)とともに核酸サンプルをインキュベートするステップと；

(ii) ステップ(i)の前記複合体を、前記固相デバイスのアミノ化された表面と接触させるステップと；

(iii) pH > 10を有する溶出溶液を使用して前記表面から前記核酸と前記DMAとの前記複合体を単離し、及び/又は前記複合体の前記核酸を分析するステップと；

を含む、方法。

【請求項 2】

前記核酸サンプルは、プロテアーゼで抽出される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記プロテアーゼはプロテイナーゼKである、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記核酸はメチル化DNAを含む、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記固相デバイスはマイクロ流体デバイスである、請求項1乃至4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

10

20

前記固相デバイスはリング共振器である、請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

( i ) 光学検出システムの検出器により測定された出力光強度を決定するステップと；  
 ( i i ) インキュベーションの間、前記光学検出システムの共振器の有効屈折率における変化を決定するステップと；  
 をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記リング共振器は導波管構造を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記複合体は、非メチル化シトシン残基において変性される、請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記複合体もしくは前記変性複合体は増幅される、請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記複合体もしくは前記変性複合体は検出される、請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

核酸サンプルにおける興味対象の核酸分子を単離するシステムであって、  
 ( i ) 前記核酸分子と D M A 化合物との間に複合体を形成するため、前記核酸分子に直接結合するためのアジプイミド酸ジメチル ( D M A ) 化合物；  
 ( i i ) その上に前記複合体を形成するため、前記核酸分子と前記 D M A 化合物との相互作用のためのアミノ化された固体表面；及び  
 ( i i i ) p H > 10 を有する溶出溶液；  
 を含む、

( A ) 前記固体表面は、光学検出センサであるリング共振器の上であり、前記核酸分子が前記 D M A に結合される場合、前記光学検出センサは改変読取を有し、それにより、前記光学検出センサは、前記核酸分子と前記 D M A 化合物との間に形成された前記複合体を感知するように構成され、及び / 又は

( B ) 当該システムは、前記核酸分子に結合するための D M A 架橋タンパク質仲介を含有しない、  
 システム。

【請求項 13】

当該システムはプロテアーゼをさらに含む、請求項 12 に記載のシステム。

【請求項 14】

前記プロテアーゼはプロテイナーゼ K である、請求項 13 に記載のシステム。

【請求項 15】

前記固体表面はマイクロ流体デバイスの上にある、請求項 12 乃至 14 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 16】

前記光学検出センサは、共振波長において共振するように構成される、請求項 12 に記載のシステム。

【請求項 17】

前記光学検出センサのための前記共振波長において光を提供可能な波長可変レーザをさらに含む、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 18】

前記光学検出センサもしくはリング共振器は導波管構造を含む、請求項 12 乃至 17 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記核酸分子が前記DMAに結合され、前記複合体を形成する場合、前記共振器はシフトする共振波長を有する、請求項12乃至18のいずれか一項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

好ましくは固相デバイスにおける核酸を単離する方法。

【背景技術】

【0002】

核酸は、疾病状態を同定する場合、重要な分析ツールである。DNAバイオマーカー（例えば、一塩基多型（SNP）、突然変異、及びDNAメチル化）は、研究者たちががんの原因を探るのを助けるための重要な手がかりを提供し、且つ疾病の初期段階の際に、並びに予測と監視のため及び疾病状態を診断及びモニタする大きな機会を提供する。例えばタンパク質などの他の成分と比べて、DNAの生理的濃度が極めて低いので（即ち、1マイクロリットルの全血内において数10ナノグラムのDNAと、数10マイクログラムのタンパク質との対比）、臨床サンプルからのDNAの効率的な抽出及び予備濃縮は、引き続き下流プロセス（例えば増幅及び検出）のために重要である。メチル化DNAに関して言えば、この問題はさらに拡大される。

【0003】

DNAメチル化は、遺伝子発現の制御及び正常真核細胞内のクロマチン構成において決定的な役割を果たす。DNAメチル化は、シトシン環の5位の炭素のメチル基の共有結合的付加により生じ、5-メチルシトシンをもたらす。これらのメチル基は、DNAの主溝内に向けられており、効果的に転写を阻害する。哺乳類DNAにおいて、約4%のゲノムDNAにおいて、主としてシトシン-グアノシンジヌクレオチド（CpGs）において、5-メチルシトシンが見られる。このようなCpGサイトは、ヒトゲノム全体で期待された頻度よりは低い頻度で生じるが、CpGアイランドと呼ばれるDNAの小さな範囲において、より頻繁に見られる。これらのアイランドは、遺伝子のプロモータ領域内もしくは近くに典型的には存在する（転写が開始される場所）。たいていのCpGサイトは、かなりメチル化されているバルクのゲノムDNAとは対照的に、生殖細胞系組織におけるCpGアイランド及び正常体細胞のプロモータは、メチル化されないままであり、遺伝子発現を生じさせる。DNAメチル化は、高度に関連したDNAメチルトランスフェラーゼ酵素（DNMT）のファミリーにより媒介される。当該酵素は、S-アデノシルメチオニン由来のメチル基をCpGジヌクレオチド内のシトシンへ転移する。DNMTにより確立されたメチル-シトシンは、メチル-CpG結合ドメイン（MBD）タンパク質MeCP2、MBDのための結合部位として役立つ（S.B. Baylin, DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clin. Pract. Oncol.* 2 (2005) 4-11.; M.T. McCabe, et al., Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 3927-3937.; M. Wielscher, et al. Methyl-binding domain protein-based DNA isolation from human blood serum combines DNA analyses and serum-autoantibody testing. *BMC Clin. Pathol.* 11 (2011) 11-20.; and B.R. Cipriany, et al. Real-time analysis and selection of methylated DNA by fluorescence-activated single molecule sorting in a nanofluidic channel. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 109 (2012) 8477-8482.). ヒストンアセチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、及びATP

10

20

30

40

50

依存性クロマチンリモデリング酵素との相互作用を介して、MBDは、メチル化DNAを、転写に関して抑圧的なコンパクトなクロマチン環境へ変換する。特に、MBDは、MeCP2タンパク質のメチルCpG結合ドメインである。MeCP2タンパク質は、いずれのシーケンス前後関係においてもメチル化CpGを対称的に結合し、メチル化依存性転写抑制を媒介することに関わっている。MeCP2は、もっぱら*in vivo*でメチル化DNAフラグメントを結合するという強力な証拠があるにも関わらず、*in vitro*におけるMeCP2のDNAメチル化依存性結合活性は、一般の*in vitro*DNA分析に好適なものにする、一致した文献内にも記載された[S. B. Baylin; McCabe, et al.; M. Wielscher, et al.; 及びB. R. Ciproiany, et al.]。

10

## 【0004】

DNAメチル化は、ヒトがんにおける腫瘍抑制遺伝子の発現のサイレンシングを起こす。エピゲノミクス(epigenomics)のフィールド内で増え続ける一連の作品(body of work)は、重要なヌクレオチドシーケンスの過剰メチル化と多くの異なるがんの出現との間のつながりを強化している。ヒトがん細胞におけるDNAメチル化パターンは、著しく歪んでいる。典型的には、がん細胞は、通常は細胞のメチル-シトシン含有量の大部分を有する遺伝子間領域について低メチル化を示す。その結果、転移因子(transposable elements)は活性化し、がん細胞で観察されたゲノム不安定性に貢献するかもしれない。同時に、がん細胞は、多くのCpGアイランド関連腫瘍抑制遺伝子のプロモータ領域内で過剰メチル化を示す。その結果、これらの調節遺伝子は、転写的に発現抑制され(サイレンス, silenced)、機能の損失をもたらす。依って、低メチル化及び過剰メチル化両方の効果により、DNAメチル化は、潜在的には、比較的まれであるコード領域突然変異よりも大きく、がん細胞のゲノムの景色に顕著に作用する[S. B. Baylin; McCabe, et al.; M. Wielscher, et al.; 及びB. R. Ciproiany, et al.]。DNAメチル化は、がん研究及びクリニックにとって非常に重要である。なぜなら、DNAメチル化は、がん転移の時点より前に、より早期のがん診断を可能にするからだ。一例は、RAR(制御遺伝子発現により多くの細胞タイプの成長を制御する甲状腺ステロイドホルモン受容体)である。乳がん、肺がん及び膀胱がんにおいて、RARのメチル化が報告されてきた

20

30

## 【0005】

複数のゲノムスケールメチル化スクリーニング技術の最近の発展は、正常な細胞及びがん細胞の双方において、DNAメチル化パターンについての我々の理解をかなり広げてきた。特に、MSP(メチル化特異的PCR)は、CpGアイランド内のCpGサイトの実質的にいずれかのグループのメチル化ステータスを迅速に評価することができる。このアッセイは、全ての非メチル化(メチル化されていない)シトシンをウラシルに変換する亜硫酸ナトリウムによるDNAの初期の変性、及びメチル化DNAと非メチル化DNAとの対比に関して特異的なプライマーを用いた引き続く増幅を伴う。MSPは、少量のDNAのみを必要とし、所与のCpGアイランド座の0.1%メチル化対立遺伝子(alleles)に感受性である。亜硫酸塩処理によるシトシンからウラシルへの化学的変性は、制限酵素の使用を回避するDNAメチル化の研究のための別方法を提供してきた。しかしながら、これらの方法は、技術的にかなり困難かつ労働集約的であり、且つ増幅産物のクローン化なしでは、テクニックは、サザン分析よりも感受性が劣る。検出のためにメチル化されるべき対立遺伝子の25%を必要とする。従って、ヒトゲノムDNAからのメチル化DNAの単離は、がんにおけるDNAメチル化分析の改善のために重要なステップであるが、まだ挑戦しているところである[J. G. Herman, J. R. et al., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG island. Proc. Nat. Acad. Sci USA. 93 (1996) 9821-9826.; S. Pan, et al., Double recogni

40

50

tion of oligonucleotide and protein in the detection of DNA methylation with surface Plasmon resonance biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 850-853.; and J.D. Suter, et al., Label-free DNA methylation analysis using opto-fluidic ring resonators. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1016-102].

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

今までのところ、ゲノムDNAからメチル化DNAを単離するための溶液相方法において、*E. coli*内のクローン化Hisタグ付きタンパク質の過剰発現の際に得られる組み換えMBDタンパク質が、DNAメチル化分析のために主として使われてきた。溶液相におけるPCR及びゲル分析のためのメチル化DNAを単離するため、NaCl勾配溶出ステップにより、アフィニティークロマトグラフィに似たやり方で固定化されながら、MBDタンパク質が好ましくは適用されてきた。企業からの商用プロトコルによれば、MBDタンパク質は、メチル化DNAの同時分析を可能にするアフィニティ系DNA精製のためのNi-セファロースもしくは磁気ビーズに付着した。MBD単離DNA (MBD isolated the DNA)が、DNAメチル化分析に特に好適であることが分かった(図1、黒線)。

20

【0007】

しかしながら、重亜硫酸塩変性なしのDNAメチル化に基づくラベルフリーバイオセンサの検出のための以前の研究は、これまで合成オリゴヌクレオチドについてのみ実証してきた。体液(例えば血液, 尿, もしくは唾液)内のゲノムDNAにおけるネイティブ(native)メチル化DNAの直接検出は、それらの極めて低い濃度のため難しい。トータルDNAにおける特異的遺伝子の数は、極めて低い。例えば、Suet al. は、約2コピーの突然変異腫瘍Kristin-ras DNAが、がん患者の尿もしくは血液サンプル50乃至200 $\mu$ L中で見つかることを報告した[Y. H. Su, et al., Block, Detection of mutated K-ras DNA in urine, plasma, serum of patients with colorectal carcinoma or adenomatous polyps, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137 (2008) 197-206]。報告されたラベルフリーバイオセンサの感度は、このような低濃度のネイティブDNAバイオマーカーを検出するには不十分である。従って、これらラベルフリーテクニックは、ターゲットDNAの増幅なしにin vitroでの診断(IVD)として使用されるのは不適切である。

30

【0008】

高感度なケイ素系マイクロリング共振器が、共振波長におけるシフトをモニタすることにより、生体分子(例えばタンパク質, メチル化DNA, 核酸)を検出するのに使用されたことが最近報告された。光学屈折率(RI)センサは、多数の用途のために広範囲に調査されており、生化学分析において突出した役割を果たす。既存の生化学RIセンサのうち、集積光導波管に基づく生化学RIセンサは、それらの高感度、小さいサイズ、及び高スケール集積ゆえに、非常に興味深い。最近、スロット導波管に基づくRIセンサは、2つの高屈折率ストリップの間に挟まれたサブ波長サイズの低屈折率領域(スロット領域)において高光強度を提供するという、スロット導波管の顕著な特性ゆえに、かなりの関心を集めてきた。感知領域としてスロットを使用することにより、慣用の導波管と比較して、より大きな光分析物(light-analyte)相互作用、及び従ってより高い感度が得られる。感知光は、数百ナノメートルまでの特徴的な崩壊長さ(decay length)と共に指数関数型崩壊を受けるエバネッセント場により、表面近くに集中される。依って、屈折率は、崩壊長さ以内で固定化された捕捉リガンドとの分析物の結合により影響を受ける。ケイ素マイ

40

50

クロリング共振器は、センサ表面近くの生体分子について高感度、ラベルフリー、リアルタイム多重化検出を提供する屈折率に基づく光学センサである。そのうえさらに、低コストとスケールアップ能力を確実にする標準CMOS技術を使用して、デバイスは製造される。当該方法は、高度の熟練者によってデバイスの表面上にプローブを固定化するという時間のかかるステップを必要とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の目的は、上述の困難の少なくともいくつかを改善することである。

【0010】

要約

10

【0011】

従って、本発明の第1の態様は、

(i) 核酸とDMAとの複合体(complex)を形成させる条件で、アジプイミド酸ジメチル(DMA)とともに核酸サンプルをインキュベートするステップと；

(ii) ステップ(i)の複合体を、固相デバイスの表面と接触させるステップと；

(iii) 前記複合体の核酸を単離及び/又は分析するステップと

を有する、固相デバイスにおける核酸分子の単離及び/又は分析のための方法を包含する。

【0012】

本発明の別の態様は、

(i) 核酸分子に直接結合可能なアジプイミド酸ジメチル(DMA)化合物；及び

(ii) 核酸とDMAとの相互作用のための固体(solid)表面

を有する核酸サンプルにおける興味対象の核酸分子を単離するシステムを包含する。

20

【0013】

以下の図面及び様々な非限定的実施形態の記載を参照するならば、本発明のその他の態様は、当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0014】

図面は、必ずしも正確な縮尺で描かれておらず、その代わりに、様々な実施形態の原則を説明する際、一般的に配置されるよりも強調されている。

30

【図1】 溶液相体固相法を使用するDNAの単離及び分析のためのワークフロー。

【図2】 固相デバイス上のDMAとの複合体及びメチル化DNA(#1)。固相デバイス上のMBDタンパク質との複合体及びメチル化DNA(#2)。

【図3】 固相デバイス上のメチル化DNAの単離(A)及び分析(B)の実験結果。

【図4】 DNAのみもしくはDMAのみを添加する場合と比較した、DMAとの分離の実験結果(A)。2つのがん細胞株におけるメチル化DNA-DMA複合体の波長シフト(B)。

【発明を実施するための形態】

【0015】

詳細な説明

40

【0016】

驚くべきことに、いずれの架橋タンパク質仲介なしに、DMA(アジプイミド酸ジメチル)は核酸に直接結合できる。DMAと核酸とのこの直接相互作用は、好ましくはケイ素、ガラス、ポリマーフィルム、プラスチックを包含する固相デバイス、又はいずれの好適な固相デバイス上、核酸もしくはメチル化DNAの単離及び分析のためのラベルフリー方法において使用できる。当該方法は、臨床応用(例えばヒトがん)におけるDNA検出のために非常に有用である。核酸とDMAとの直接結合は、メチル化DNAを包含する核酸を捕捉し且つ測定する、単純で費用対効果の高い化学的手段を提供する。

【0017】

従って、本発明の第1の態様は、

50

( i ) 核酸とDMAとの複合体を形成させる条件で、アジブイミド酸ジメチル ( DMA ) とともに核酸サンプルをインキュベートするステップと；

( i i ) ステップ ( i ) の複合体を、固相デバイスの表面と接触させるステップと；

( i i i ) 前記複合体の核酸を単離及び / 又は分析するステップと  
を有する、固相デバイスにおける核酸分子の単離及び / 又は分析のための方法を包含する。

【 0 0 1 8 】

当該方法は、リアルタイムのやり方で実施されるべき核酸の単離及び分析を可能にする。

【 0 0 1 9 】

本書で使用される用語「核酸」は、単離された核酸を意味する。核酸は、DNA, RNA, DNA:RNAハイブリッド, PNAその他であり得るが、好ましくはDNAである。

【 0 0 2 0 】

用語「固相デバイス」は、好ましくは液相内で核酸サンプルとDMAとの混合を可能にする固体表面を意味する。ケイ素, ガラス, ポリマーフィルム, プラスチック、又はいずれの好適な表面を包含する、核酸サンプルとDMAとの間の相互作用のため好適な空間を提供するいずれの容器が好適である。様々な実施形態において、固相デバイスはマイクロ流体デバイスを包含する。様々な他の実施形態において、固相デバイスはリング共振器を包含し、最も好ましくはそのリング共振器はケイ素系である。様々な実施形態において、リング共振器は導波管構造を有する。様々な他の実施形態において、当業者に知られた他の好適な固相デバイスは、例えば磁気ビーズなどであり得る。

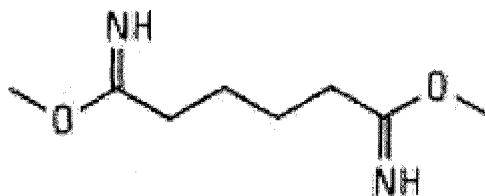
【 0 0 2 1 】

「核酸サンプル」は、いずれの生物学的サンプル、例えば液体血液、もしくは液体唾液、尿もしくは血液、頬のスワブ、毛髪、骨、歯、爪、いずれかの器官 ( 脳を包含する ) からの組織、筋肉、皮膚、腫瘍、未知の塊 ( lumps ) , 針生検を包含する生検、細胞もしくは細胞株を包含し得る。サンプルは、植物、菌類及び動物を包含するいずれの生物 ( biological organism ) から採取してよい。サンプルは、好ましくは哺乳類を包含する脊椎動物由来であり、及び最も好ましくはヒト由来である。サンプルは、好ましくはがん組織もしくはがんであること新生物 ( 乳がん、肺がん及びすい臓がん、前立腺がん、膀胱がん、子宮頸がん、鼻咽頭がん、肝細胞がん、胃 ( gastric ) がん、結腸がん、胃 ( stomach ) がん、骨がん、精巣がん、甲状腺がん、リンパ腫、白血病、又はいずれの他の既知の新生物を包含する ) を形成することが疑われる組織由来である。様々な実施形態において、サンプルは、がん性組織もしくは体液サンプルと比較するため、健康な非がん性組織もしくは体液から採取されてよい。様々な実施形態において、核酸は、当該技術において知られた方法を使用してサンプルから抽出されてきた。

【 0 0 2 2 】

アジブイミド酸ジメチル ( DMA ) は、6原子スペーサーアームの各末端にアミン反応性イミドエステルを含有する膜透過性架橋剤を構成する。DMAは、メチル化DNAを包含する核酸を直接結合するための非カオトロピック剤である。DMAは、式Iの構造を有する。

【 化 1 】



【 0 0 2 3 】

10

20

30

40

50

様々な実施形態において、DMAのNH基は、酸と共に。いずれの好適な対イオンと共に、例えば塩酸塩と共に、NH<sub>2</sub><sup>+</sup>基に変換可能であり、又は遊離の水素基を有するいずれの他の酸が好適である。

【0024】

いずれの理論に限定されないが、DMAにおける二官能性のイミドエステル(アミン反応性基)は、DNA分子内の遊離アミノ基と反応し、その結果DMAとDNAとの間に架橋をもたらすと仮定される。タンパク質のその上のDMAと核酸のアミン基との間の選択的反応は、DMAがプラスに荷電しており、従って消化されマイナスに荷電したタンパク質断片と比較して、マイナスに荷電したDNAに引き寄せられることに関係しているかもしれない。加えて、溶解(lysis)ステップの際の断片化DNAは、典型的には断片の各末端において一本鎖DNAのわずかな塩基対(「付着(sticky)」末端として知られる)を含有する。そしてDMAは、「付着」末端のアミン基と反応する。二官能性イミドエステルはさらに、捕捉DNAについて高い表面積と体積との比率を提供する。

10

【0025】

様々な実施形態において、当該方法は、当該技術で知られた表面処理を使用して、アミノ化されるべき固相デバイスの表面を官能化するステップをさらに有してよい。DMAと共に核酸サンプルをインキュベートするステップの前に、表面は官能化される。様々な実施形態において、表面は、アミノシラン、好ましくは3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)で官能化される。DMAは、共有結合を介してアミノ化された表面と相互作用する。DMAが核酸と共に複合体を形成する場合、結合が存続するか、強くなるのが観察される。DMAとDNAとの複合体はまた、アミン変性表面と反応し、安定した共有結合を形成する。結合は、高pH(> pH10)において可逆性のアミジン結合であり、pHを変更することにより複合体を捕捉及び放出するための手段として使用可能である。

20

【0026】

様々な実施形態において、DMAとのインキュベーションの前に、核酸サンプルは、プロテアーゼ、好ましくはプロテイナーゼKで抽出される。タンパク質のその上のDMAと核酸のアミン基との間の選択的反応は、プロテイナーゼKのプロテアーゼ活性と関連するかもしれない。プロテイナーゼKは、いずれも細胞を溶解し、且つタンパク質の殆どを消化し、サンプルからタンパク質を除去する。

30

【0027】

様々な実施形態において、核酸はメチル化DNAを構成する。用語「メチル化DNA」は、当該技術で知られた通常の意味を有する。デオキシリボ核酸(DNA)は、ヌクレオチドに沿った場所で1以上のシトシンもしくはアデニン上のメチル基の付加を包含する。

【0028】

様々な実施形態において、固相デバイスはマイクロ流体デバイスである。

【0029】

用語「マイクロ流体デバイス」は、マイクロチップ、マイクロチャネル構造、もしくは当該技術において知られたいずれの好適なラボオンチッププラットフォームを包含する。核酸を単離及び精製するため、並びにDNA増幅を改善するため、DMAテクニックを、固相系マイクロ流体デバイスに適用可能である。

40

【0030】

様々な他の実施形態において、固相デバイスはリング共振器である。

【0031】

様々な実施形態において、核酸の単離及び分析のための全ステップは、固相デバイス上で行われる。小さい寸法のため、低コスト製造、高感度及び高多重化能力は、マイクロリング共振器を、ポイントオブケア診断テスト(POCT)用使い捨てバイオセンサチップのための良い候補にする。

【0032】

様々な実施形態において、固相デバイスはリング共振器である場合、当該方法は、

50



( i ) 光学検出システムの検出器により測定された出力光強度を決定するステップと；  
 ( i i ) インキュベーションの間、前記光学検出システムの共振器の有効屈折率における変化を決定するステップと；  
 をさらに有してよい。

## 【 0 0 3 3 】

様々な実施形態において、当該方法は、複合体を溶出するステップをさらに有してよい。溶出ステップは、好ましくは、複合体と固相デバイスの表面との間に形成されたいずれかの共有結合を崩壊させることにより、メチル化DNAとDMAとの複合体を除去することを意味する。表面から核酸とDMAとの複合体を除去する手段は、高pH溶液 (> pH 10) の使用を包含する。表面から核酸とDMAとの複合体を除去するための高pH溶液の一例は、副題と官能化表面との間に形成されたいずれかの共有結合を崩壊させることを包含し、重炭酸ナトリウムである。

10

## 【 0 0 3 4 】

様々な好ましい実施形態において、当該方法は、非メチル化シトシン残基において複合体を変性するステップをさらに有してよい。重亜硫酸塩変換を使用するDNAメチル化分析は、非メチル化シトシン残基において複合体を変性することが可能であり、入力DNAのピクトグラム量上で作用し、変換は、入力DNAの少なくとも50%、より好ましくは入力DNAの少なくとも60%、70%もしくは80%、最も好ましくは入力DNAの90%の変性をもたらす。

## 【 0 0 3 5 】

20

様々な実施形態において、複合体もしくは変性複合体は、当該技術において知られたいずれかの方法により増幅される。DNA増幅は、好ましくはメチル化及び/又は非メチル化DNAに特異的なプライマーとともに、PCRを包含する様々な異なる方法により実施され得る。実施例は、メチル化特異的PCR及びゲノムPCR増幅の効率は、当該方法を使用することにより増強されることを表す。

## 【 0 0 3 6 】

様々な実施形態において、当該方法は、複合体もしくは変性複合体を検出するステップをさらに有してよい。検出は、シーケンス化方法、サザンプロット分析(ただしこれらに限定されない)を包含する当該技術において知られたいずれかの方法、又は当該技術において知られたいずれか他の分析テクニックよりなされる。

30

## 【 0 0 3 7 】

本発明の別の態様は、

( i ) 核酸分子に直接結合可能なアジブイミド酸ジメチル(DMA)化合物；及び  
 ( i i ) 核酸とDMAとの相互作用のための固体表面  
 を有する核酸サンプルにおける興味対象の核酸分子を単離するためのシステムを包含する。

## 【 0 0 3 8 】

核酸サンプル、DMA及び固体表面は、前述したのと同じ意味を有する。

## 【 0 0 3 9 】

様々な実施形態において、固体表面は官能化される。官能化表面とは、当該技術において知られた表面処理を使用してアミノ化された表面である。様々な実施形態において、表面は、アミノシラン、好ましくは3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)で官能化される。

40

## 【 0 0 4 0 】

様々な実施形態において、固体表面はマイクロ流体デバイスの上である。様々な他の実施形態において、固体表面は、リング共振器の上である。

## 【 0 0 4 1 】

様々な実施形態において、リング共振器は光学検出センサである。ここで前記核酸分子が前記DMAに結合している場合、前記検出センサは、改変読取(altered reading)を有する、それにより核酸分子とDMAとの間に形成された複合体を感知するように、前記セ

50

ンサは構成される。

【0042】

様々な実施形態において、光学検出センサは、共振波長において共振するように、構成される。

【0043】

様々な実施形態において、システムは、光学センサのための前記共振波長において光を提供可能な波長可変(tunable)レーザをさらに有する。

【0044】

様々な実施形態において、光学センサ又はリング共振器は、導波管構造を構成する。

【0045】

様々な実施形態において、前記共振器は、前記核酸分子が前記DMAに結合し、前記複合体を形成する場合、シフトする共振波長を有する。

【0046】

以下において、「光学感知」が説明される。

【0047】

DNAメチル化の検出は、光学系システム、例えば当該技術において知られたものをしてよい。様々な実施形態において、光源は、光源、光学センサ、及び光学検出器を包含してよい。様々な実施形態において、光源はある範囲の波長を出力する。例えば、光源は、狭帯域を有する光を出力する比較的狭帯域幅光源であってよく、光源の波長は、光源の帯域の何倍も領域の上を掃引される。様々な実施形態において、波長の範囲は、(400 - 700 nm (可視), 700 - 400 (IR - A), 1260 - 1360 nm (Oバンド), 1360 - 1460 nm (Eバンド), 160 - 1530 nm (Sバンド), 1530 - 1565 nm (Cバンド), 及び1565 - 1625 nm (Lバンド))であってよい。この光源は、例えばレーザであり得る。このレーザは、出力されたレーザの波長を変化させる波長可変レーザであり得る。いくつかの実施形態において、レーザは、外部キャビティを有するダイオードレーザである。このレーザは、いずれの特定の種類に限定される必要はなく、例えばファイバレーザ、固体レーザ、半導体レーザ又は他のタイプのレーザもしくはレーザシステムであり得る。レーザそれ自体は、調節可能であり、且つスキャンもしくは掃引され得る波長を有し得る。あるいは、異なる波長を提供するため、追加の光学部品を使用し得る。いくつかの実施形態において、ある波長を有する光源出力光のために、導波管構造は十分に光学的透過性である。いくつかの実施形態において、導波管構造は、サンプル媒体(例えば水性媒体)内にあり、ある波長を有する光源出力光のために、媒体は実質的に光学的に透過性であり、それにより共振は光学共振器内で到達され得る。加えて、いくつかの実施形態において、光源出力は、複合体が非線形屈折率を有しない範囲内の波長を有する。同様に様々な実施形態において、光源は、コヒーレント光源であってよく、比較的長いコヒーレンス長さを有する光を出し得る。しかしながら様々な実施形態において、光源は、短いコヒーレンス長さを有する光を出力するコヒーレント光源であってよい。例えば特定の実施形態において、広帯域光源(例えばスーパー発光ダイオード(SLED))を使用してよい。このような場合、波長は掃引される必要がない。

【0048】

光源は、光学センサに対する光を提供する。光源を、制御装置により制御してよい。これら装置(electronics)は、例えば光源の波長を制御し、かつ特に光源にその光学出力の波長を掃引させてよい。

いくつかの実施形態において光源から出力された光の一部は、例えば光源の発光波長を決定するため、サンプルされる。

【0049】

いくつかの実施形態において、光学センサは、検出されるべき複合体の存在及び/又は濃度に基づき光学出力を変更するトランスデューサを有する光学センサは、導波管構造であり得る。光学センサは、集積光学デバイスで得あり得、チップ上に包含されてよい。光学センサは、干渉計構造(例えば、干渉計)であってよく、光学干渉の結果、出力信号を

10

20

30

40

50

生成する。光学センサは、光学センサのアレイ内に包含され得る。

【0050】

光学検出器は、センサの光学出力を検出する。様々な実施形態において、光学検出器は、光学入力を電気出力に変換するトランスデューサを有する。この電気出力は、センサの出力を分析するための処理装置により処理されてよい。光学検出器は、フォトダイオード検出器を構成してよい。他のタイプの検出器を使用してよい。センサと検出器との間の光路内の集光光学系は、センサの光学出力の集光を容易にし、かつこの出力を検出器に対して向ける。追加の光学系（例えばミラー、ビームスプリッタ、もしくは他の部品）を、センサから検出器に至る光路内に含めてもよい。

【0051】

様々な実施形態において、光学センサは、チップ上に配置される一方、光源及び/又は光学検出器は、チップとは別になっている。光源及び光学検出器は、例えば、チップ上の光学センサを調べる(interrogates)、自由空間光通信を有する装置の一部であってよく、且つ以下により詳細に考察される。

【0052】

様々な実施形態において、溶液（例えばDNAサンプル溶液）は、光学センサを通過させて流す。検出器は、核酸とDMAとの間に形成された複合体が検出される場合、光学センサからの光学信号における変調を検出する。

【0053】

リング共振器は、核酸とDMAとの間に形成された複合体を検出するように製造され得る高感度光学センサを提供する。リング共振器の走査は、いずれの好適な構成を有してよい。様々な実施形態において、光学センサは、入力及び出力を有する入力/出力導波管と、及び入力及び出力との間に配置された入力/出力導波管の一部の近くに配置されたリング共振器とを有する。その近接は、入力/出力導波管とリング共振器（リング共振器は導波管でもある）との間の光学的結合を容易にする。この例において、入力/出力導波管は線状であり、リング共振器は円形であり、その結果入力から出力に至る入力/出力導波管における光電波は、リング共振器内へ結合され、その中で循環する。入力/出力導波管及びリング共振器のためのその他の形状もまた可能である。

【0054】

様々な実施形態において、導波管入力内へ注入された光は、例えば、時間にわたり掃引される狭帯域ピークを有する狭帯域由来の（又は広帯域光源、例えばスーパー発光ダイオード由来の）、ある範囲の波長を包含する。同様に、出力スペクトルは、導波管出力の形態を取る。この出力スペクトルの一部は、リング共振器の共振波長におけるスペクトル分布内の強度と波長との対比のプロットに拡張されてよい。

【0055】

その他の構成が可能であり、例えば、その他の層を加えても（取り除いても）よく、異なるようにパターン化してもよい。基板の一部は、線形導波管を有してよく、その上に形成されたリング共振器は、より大きな集積光学チップの一部であってよい。

【0056】

周知のように、光は導波管内において全内部反射を介して伝播する。導波管は、その導波管全体にわたり空間的に異なる強度パターンをもたらすモードをサポートする。電界の一部及びエバネッセントテイル(tail)と呼ばれる光学エネルギーは、導波管の境界の外側に存在する。導波管の近くに位置する対象物は、例えばこのエバネッセント場長さ以内に波長に影響する。特に、導波管のすぐそばの対象物は、導波管の屈折率に影響する。従って、このような対象物が導波管に密着しているか、いないかで、屈折率 $n$ は異なっていてよい。様々な実施形態において、例えば対象物の存在は、導波管の屈折率を増大させる。このやり方で、光学センサは、導波管構造の近くの対象物の存在により乱されてよく、それにより検出を可能にする。様々な実施形態において、粒子のサイズは、その間の相互作用を増強するためのエバネッセント場の長さ位である。

【0057】

10

20

30

40

50

リング共振器の場合、屈折率  $n$  の増加は、リング周辺を循環する光が進む光学路長を増大させる。長い波長は、共振器内で共振可能であり、従って共振周波数は、低い周波数へシフトされる。共振器の共振波長におけるシフトは、従って対象物が光学センサの近くに位置するかどうかを決定するため（例えば、リング共振器及び/又はリング共振器に最も近い線形導波管の領域）、モニタされる。核酸とDMAとの間に複合体が形成される結合イベントは、従って、導波管出力からスペクトル出力を得ること、及びその中の強度（もしくは減衰のピーク）の低下および強度におけるこれらの低下のシフトを同定することにより、検出され得る。

【0058】

様々な実施形態において、導波管及び/又はリング共振器はケイ素を有する。いくつかの実施形態において、導波管の表面は、二酸化ケイ素で自然に(natively)不動態化される。その結果、標準シロキサン化学が、導波管へ様々な反応性部分を導入するのに有効な方法であり得る。反応性部分は、次いで引き続き、ある範囲の標準バイオ接合(bioconjugate)反応により複合体を共有結合により固定するのに使用される。

【0059】

その上さらに、線形導波管、リング共振器、及び/又は追加のオンチップ光学系は、十分に確立した半導体製造方法を使用する（当該方法は、非常にスケラブル、費用対効果の高い、且つ再現性が高い。）、比較的安価なシリコンオンインシュレータ(SOI)ウエハ上に容易に製造され得る。加えて、これらのデバイスは、容易に製造され得、パイプレーションによる複雑化は、「フリースタANDING(freestanding)」キャビティと比較して減らされる。一例において、8" SOIウエハは、それぞれ約40,000個の個別にアドレス可能であるリング共振器を含有してよい。シリコンベースの技術を使用する1つの利点は、様々な実施形態が、約1.55  $\mu\text{m}$ のSi透明ウィンドウ（普通の光学テレコムコミュニケーション波長）内で作用し得ることであり、レーザ及び検出器が、固相デバイス上のがんサンプル由来プラグアンドプレイゲノムDNAとして、容易に商業市場で入手可能であることを意味する。

【0060】

様々な実施形態において、システムは、固相デバイス上のがんサンプル由来のゲノムDNAから核酸（例えばメチル化DNA）のラベルフリー分析及び単離のためのケイ素マイクロリング共振器を有する。DNAメチル化分析は、転移のポイントの前に初期のがん診断を可能にするので、がん研究及び臨床にとって非常に重要である。DNAメチル化を分析するため、高感度及び特異性方法を使用することによるゲノムDNA全体からのメチル化DNAの単離及び分析は、DNAメチル化の検出のための最重要ファクタである。最近のレポートは、共振波長におけるシフトをモニタすることにより、高感度ケイ素系マイクロリング共振器を、生体分子（例えばタンパク質、メチル化DNA、核酸）を検出するのに使用できることを示唆する。

【0061】

様々な実施形態において、光は、第1の入力/出力導波管の入力へ向けられてよく、及び、第1のリング共振器の状態及び光の波長に依存して、第1の導波管の出力又は第2の導波管のいずれかに向けられてよい。例えば、第1のリング共振器の共振波長のため、光を出力における第1の導波管からの出力ではなく、第2の導波管内に結合してよい。第1のリング共振器から第2の導波管内に結合された光は、第3のリング共振器の状態に依存して、第2の導波管の出力もしくは第3の導波管内のいずれかに向けられてよい。例えば、第3のリング共振器の共振波長のため、光は、第3の導波管内に結合されてよく、次いで出力において出力される。光を第1の入力/出力導波管内に向ける光源が、広帯域スペクトルを出力する広帯域光源（例えばスーパー発光ダイオード）を有する場合において、前記の光は、より広いスペクトルの波長成分であり得る。

【0062】

その他の構成を使用できる。波長可変レーザもしくは他の波長可変光源を、入力現として使用してよく、波長可変レーザの出力の波長を掃引できる。あるいは、広帯域光源（例

10

20

30

40

50

えばスーパー発光ダイオード)を使用してよい。

【0063】

より多くのリング共振器を追加してよい。加えて、リング共振器を互いに対して、並びに入力/出力導波管に対して、異なるように配置してよい。

【0064】

リング共振器の様々な実施形態及びおそらく他のジオメトリは、繰り返し例えばこれらの周辺で、光を循環させ、光学路長を劇的に増大させる。その上さらに、構造内を循環する光子と、隣接する導波管を横切るものとの間の干渉は、高Qデバイスをもたらす非常に狭いスペクトル線の共振キャビティを生成する。得られる共振波長は、局所屈折率における変化に対して非常に感受性である。本書で考察したように、この感受性は、センサに小さな質量を検出させる。

10

【0065】

従って、提案された概念は、がん研究及び臨床応用におけるDNAメチル化分析のために非常に有用である。

【実施例】

【0066】

220nmの厚さの最上部ケイ素層及び248nm深さUVリソグラフィにより埋め込め込まれた2μmの厚さの酸化物層を有するケイ素マイクロリング共振器チップ200mmSOIウエハを購入し、次いで導波管及びグレーティングをその上でパターン化し、反応性イオンエッチング(RIE)プロセスにより埋め込まれた酸化物層までエッチングされ、次いで、1.5μmPECVD SiO<sub>2</sub>を最上部クラッド層として堆積させた。4個のリングからなるマイクロリングのアレイは、1つの共通の入力導波管に(貫通して)接続され、各リングは、専用出力導波管(ドロップ(drop))を有していた。リング4個の内3個を、センサリングとして使用し、選択された個々のセンサリングの上に、ドライエッチングとウェットエッチングとの組み合わせにより窓が開けられていた。リングのうち1個は、温度によって誘発されたドリフトをモニタするため、参照センサとして使用された。リングは、半径5μmを有するレーストラックスタイルのリングであり、結合長さは、共振のスペクトル重複を回避するため、2乃至2.042μmであった。3個のリングの出力信号は、シングルモード光ファイバプローブに対して垂直グレーティングカプラーにより収集された。挿入損失(IL)スペクトルを、EXFO IQS-12004BD WDMパッシブ部品テストシステムで測定した。

20

30

【0067】

まず、DMA(アジブイミド酸ジメチル)を、ケイ素マイクロリング共振器上でメチル化DNAを捕捉するための化学剤として使用し、モニタされ、リアルタイムなやり方で、メチル化DNA結合を分析した。DMAは、二官能性架橋試薬の使用により(ポリペプチド中の遊離アミノ基を共有結合することが知られている)、新規の抗鎌状化薬(antisickling)として記載されてきた。DMAでメチル化DNAを捕捉した後、メチル化DNAを重炭酸ナトリウムで溶出する(pH 10.6)。次いで、メチル化DNAの単離に関する効率を検証するため、重亜硫酸塩変性後、メチル化特異的PCRを実施する(図1、黒丸ドット)。以前に記載したものからプロトコルを変更した。手短かに言えば(図2、#1)、デバイスをまず、酸素プラズマで処理した。次いで、エタノール/H<sub>2</sub>O(95%/5%, v/v)混合物中2%3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)の溶液内に、2時間浸漬し、次いでエタノールと脱イオン水で完全にすすいだ。次いで、窒素流下で乾燥し、チップを硬化するため、120で15分間加熱した。

40

【0068】

プロテイナーゼK及びQIAamp DNA Mini Kit(Hilden, ドイツ)を使用してがん細胞株(T24及びMCF7)からゲノムDNAを抽出した。T24細胞株(ヒト膀胱移行細胞から誘導された上皮細胞株)、及びMCF7細胞株(ヒト乳腺細胞から誘導された上皮細胞株)を、ゲノムDNAの抽出のために使用した。がん細胞株ATCC(American type culture collection, M

50

anassas, VA) から購入した。

【0069】

次いで、センサチップをPBS中1  $\mu$ gのゲノムDNA及びDMA (10 mg/ml) の混合物と共に30分間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後5分ごとに、30分まで、波長シフトを収集した。結合後、表面なしに(free from the surface)、チップを10分間2回、それぞれPBS緩衝液で洗浄することにより、過剰なDNAターゲットをすすぎ、測定した。最後に、メチル化DNAが表面上に維持され、次いで、メチル化DNAを、重炭酸ナトリウムで溶出した(pH 10.6)

【0070】

あるいは、比較のため、溶液相内ではなく、固相上のメチル化DNAを捕捉するため、MBDタンパク質を使用した(図2、#2)。手短かに言えば、センサをまず上述のようにAPTESで官能化した。次いでセンサチップを、脱イオン水中1 mg/mL NHS-ピオチンと共に1時間インキュベートし、脱イオン水ですすいだ。ピオチンとストレプトアビジンとの間の結合アッセイを、PBS中のストレプトアビジン溶液(190 pM乃至950 nM)を適用することにより行った。センサチップを、PBS中1  $\mu$ gのゲノムDNA及びピオチン-MBDタンパク質混合物の混合物と共に30分間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、5分ごとに30分まで波長シフトを収集した。結合後、表面なしに(free from the surface)、チップを10分間2回、それぞれPBS緩衝液で洗浄することにより、過剰なDNAターゲットをすすぎ、測定した。最後に、メチル化DNAが表面上に維持され、次いで、メチル化DNAを、重炭酸ナトリウムで溶出した(pH 10.6)。全実験を室温で実施した。

【0071】

図3は、当該方法に関する実験結果を表す。がん細胞株、例えばT24(膀胱)及びMCF7(胸部)から抽出されたゲノムDNAを、固相デバイスを使用することにより、メチル化DNAの単離のために使用した(図4B)。サンプルが添加され、官能化された固相表面上にメチル化DNAとDMAとの混合物が複合体を形成した場合、波長シフトは、高く観察された(図3A)。次いで、過剰なDNAを取り除くためPBSで洗浄することにより、シフトは部分的に減らされた。

【0072】

洗浄後、単離されたDNAは表面に対して共有結合した。最後に、DNAを、DNA分析のために重炭酸ナトリウムにより収集した。T24から抽出されたゲノムDNAからの溶出DNAを、従来PCR及びメチル化特異的(MS)-PCRにより遺伝子分析及びエピジェネティック分析のために使用した。当該方法の効率を検証するため、単離メチル化DNAを使用することにより、RAR 遺伝子のDNAメチル化の検出のために、メチル化特異的PCRを実施した。結果は、PCRバンドは、慣用方法よりも方法(#1)において強いことを表した(図3B)。

【0073】

要約すると、ケイ素マイクロリング共振器を包含する固相デバイス上のメチル化DNAの単離及び分析のための新規方法が記載される。DMAは、固相デバイス上、高特異性でメチル化DNAを捕捉するための化学剤である。当該方法は、高効率のメチル化DNA単離を提供できるだけでなく、ラベルフリー及びリアルタイム方式でメチル化DNAの分析のモニタリングを提供できる。当該方法は、がん研究及び臨床応用におけるDNAメチル化分析のために非常に有用でありえた。

【0074】

固相ベースの抽出試薬としてのDMAの効果を明らかにするため、DMA方法をにより精製されたもしくは抽出されたDNAを使用することにより、PCRベースのDNA増幅を実施した。遺伝子(RAR, HRAS, 及びAアクチン)について慣用のPCR及びリアルタイムPCRのため使用された全プライマーは、当該技術において知られている。遺伝子分析及びエピジェネティック分析のため提案されたテクニックの効率を検証するため、慣用のPCR及びMS-PCRを実施した。MS-PCR走査前のDNAの重亜硫酸

10

20

30

40

50

塩変換のため、我々は、提案されたテクニックにより生成されたDNA 50  $\mu$ LもしくはT24細胞株(ATCC)(ヒト膀胱移行細胞から誘導された上皮細胞株)から抽出されたゲノムDNA 1  $\mu$ gのいずれか、及びCpGenome DNA変性キット(Millipore, Billerica, MA)を使用した。T24ヒト膀胱がん細胞株をプラスチック培養皿内に、10%ウシ胎児血清(FCS)で補充された高グルコースダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, Life Technology)と共に、5%周囲CO<sub>2</sub>を有する37 湿潤インキュベータ内で維持した。がん細胞株を培養し、次いでQIAmp DNAミニキット(Qiagen, Hilden, ドイツ)由来プロテイナーゼKと共にAL緩衝液を使用することにより、ゲノムDNAを抽出した。手短かに言えば、HRAS遺伝子の遺伝子分析のため、各サンプルから溶出されたDNA 2  $\mu$ L(例えば複合体、DMA単独、及びDNA単独)を、1 $\times$ PCR緩衝液(Qiagen, Hilden, ドイツ), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mMデオキシヌクレオチド三リン酸, 25 pmolの各プライマー(HRAS遺伝子のため), 及び1ユニットのTaq DNAポリメラーゼ(Qiagen, Hilden, ドイツ)を含有する合計体積25  $\mu$ L中、95 で15分間; 95 で30秒、60 で30秒、及び72 で30秒の35サイクル; 及び72 で7分間の最終伸長ステップで増幅した。RAR 遺伝子のエピジェネティック分析のため、慣用方法(精製ステップなし)又は提案されたDMA方法いずれか由来の重亜硫酸塩変性DNA 2  $\mu$ Lを、1 $\times$ PCR緩衝液(Qiagen, Hilden, ドイツ), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mMデオキシヌクレオチド三リン酸, 25 pmolの各プライマー(RAR 遺伝子のため), 及び1ユニットのTaq DNAポリメラーゼ(Qiagen, Hilden, ドイツ)を含有する合計体積25  $\mu$ L中、95 で15分間; 95 で30秒、59 で30秒、及び72 で30秒の45サイクル; 及び72 で7分間の最終伸長ステップで増幅した。PCRアンプリコンを、臭化イチジウム(EtBr)(Sigma-Aldrich)を含有する2%アガロースゲル上にPCR生成物を分離するため使われてきたゲル電気泳動により視覚化した。Gel Doc System(Bio-Rad)を使用して、ゲルを視覚化した。ImageJ(National Institute of Health, USA)により、バンド強度を算出した。DNA濃度及び純度の決定は、UV分光光度計により行った。3種の異なる抽出方法の効率を検証するため、リアルタイムPCRを実施した。

#### 【0075】

RT-PCRのためのターゲットテンプレートを、全血又は尿サンプルから抽出されたヒトゲノムDNAから得た。リアルタイムPCRのため、LightCycler 2.0(Roche Diagnostics)で提供されるプロトコルから、以下の手順を改変する。手短かに言えば、5  $\mu$ LのDNAを、1 $\times$ PCR緩衝液(Qiagen, Hilden, ドイツ), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mMデオキシヌクレオチド三リン酸, 25 pmolの各プライマー(HRAS遺伝子のため), 及び1ユニットのTaq DNAポリメラーゼ(Qiagen, Hilden, ドイツ)を含有する合計体積25  $\mu$ L中、95 で15分間; 95 で30秒、60 で30秒、及び72 で30秒の35サイクル; 及び72 で7分間の最終伸長ステップで増幅した。RAR 遺伝子のエピジェネティック分析のため、慣用方法(精製ステップなし)又は提案されたDMA方法いずれか由来の重亜硫酸塩変性DNA 2  $\mu$ Lを、4  $\mu$ L LightCycler FastStart DNA Masterミックス, 25 pmolの各プライマー, 及び2  $\mu$ LのDNAテンプレートを含有する合計体積20  $\mu$ L中で増幅した。95 で10分間の初期プレインキュベーションサイクルの後、95 で10秒、及び60 で30秒の45サイクル(HRAS及びアクチン遺伝子のため); 及び40 30秒の冷却ステップが続いた。SYBR Greenシグナルを有する増幅生成物を、LightCycler 2.0上で実施した。

#### 【0076】

マイクロチップ内のヒト全血及び尿サンプル由来のDNAのSPE内のDMA試薬の効率を検証するため、マイクロ流体チップ内のDMAテクニックを、2つの異なるDNA抽

10

20

30

40

50

出方法（マイクロチップ上の溶液相及びカオトロピック試薬（エタノール）内のQ I A m p DNAミニキット）と比較した（図4A）。まず、マイクロ流体チップ内のDNA抽出のため、2  $\mu$  Lの全血（8  $\mu$  L PBSを有する）又は10  $\mu$  Lの尿（pH調整なし）のいずれかを使用した。抽出DNAを得るため、5ステップからなるプロセスが続いた：

- （1）細胞サイズに基づき細胞を濾過及び分離するステップ、
- （2）細胞を溶解するステップ、
- （3）DNAと、カオトロピック試薬又はDMAのいずれかと結合するステップ、
- （4）DNAを洗浄及び精製するステップ、及び
- （5）DNAを、蒸留水又は溶出緩衝液のいずれかで溶出するステップ。

抽出DNAの溶出後、3種の異なるテクニックにより抽出されたDNAの純度を、260 nm（DNA）及び280 nm（タンパク質）におけるサンプルの光学密度の比率を決定することにより測定した。血液及び尿両方におけるDMAテクニック由来のDNAの質は、エタノールベースの方法から得られたものと比べて、サンプルについて統計的に顕著な誘導された純度であった（ $p < 0.001$ ）。事実、尿媒体は比較的正常であり、血液と比べてタンパク質をほとんど含まないので、他の方法について血液サンプルから抽出されたDNAの品質に対するDMAベースのSPEの有効性は、尿サンプル由来のものよりも明白であることが期待された。予想とは反対に、提案されたテクニックにより高度に生成されたDNAが、全血及び尿サンプル両方から得られた。これは、カオトロピック方法と比べて、他の分子（例えば細胞破片、タンパク質、その他）を取り除くための洗浄ステップの際、DMAが、液体サンプルから抽出されたDNA分子と緊密に結合しているから

次に、RT-PCRを使用する抽出DNAで、増幅テストを実施した。HRAS及びアクチン遺伝子を、遺伝子ターゲットとして使用し、3種の異なるテクニックを使用することにより抽出された全DNAサンプルにおいて増幅した。DMAベースのテクニックで抽出されたDNAの量及び質は、そのほかの方法で得られたものよりも大きかったことが示された。リアルタイム（RT）-PCRのため、合計DNAサンプルグループから抽出されたDNA 2  $\mu$  Lを、いずれの定量化なしに、前分析システムのための実際の状況を真似るために使用した。当該システムにおいて、デバイスから抽出されたDNAは、臨床現場において遺伝子分析のいずれの定量化なしに、ターゲットプレートとして直接使用されることが期待される。従って、Q I A m p DNAミニキットを使用するSYBR蛍光信号（全血又は尿200  $\mu$  Lから抽出されたDNA）は、他より速いCt（サイクル閾値）値において飽和されているようである。DMAベースのテクニックを使用することにより、遺伝子分析のためのDNAバイオマーカー（HRAS、アクチン）は良い品質及び量で増幅されたことが観察された。従って、本研究において提案されたDMAテクニックは、マイクロチップシステムにおけるヒト体液の小体積由来の高品質を有する固相DNA抽出のために有用であり得る。

#### 【0077】

マイクロ流体デバイスの設計及び製造

マイクロチップ環境においてDMAベースの方法を試験するため、ケイ素系DNA抽出マイクロ流体デバイスを使用した。DNA抽出マイクロ流体デバイスの構造及び制帽は知られている。ケイ素マイクロ流体チップは、3つの成分を有する：

- （1）細胞分離のためのプレ濾過部分；
- （2）細胞溶解のための2ステージスパイラルミキサーからなるマイクロミキサー；及び
- （3）SiO<sub>2</sub>表面積の最大化のため（60 mm<sup>2</sup>を超えると推定される）、DMAベースの方法のための曲がりくねった形状のマイクロチャネル。

マイクロ流体チップは、硬質マスキング層として2  $\mu$  m厚さの熱SiO<sub>2</sub>が積層されたケイ素基板の正面側に、反応性イオンエッチング（RIE）プロセスを使用して製造された。流体相互接続を形成するため、水酸化カリウム（KOH）によるウェットエッチプロセスを、熱SiO<sub>2</sub>層の上、低圧化学蒸着（LPCVD）により堆積された窒化ケイ素（Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>）のコンポジットマスキング層が積層されたケイ素基板の裏側に適用した。マイクロチャネル表面上の残存するSiO<sub>2</sub>薄膜層と共に、開いたチャネルをキャップする



ため、Pyrex（登録商標）ガラス基板とのアノード結合プロセスを実施した。各製造マイクロ流体デバイスの全体サイズは、16 mm × 12 mm × 1.2 mmである。

【0078】

小さいサンプル体積を有する人体液（全血又は尿）からのDNA抽出のためのマイクロ流体デバイスプロセスフローは、以前に報告されたプロトコルから改変された以下のステップを包含する。24乃至35個のマイクロ流体チップは、ポリカーボネートハウジング内に梱包する。ハウジングは、外部シリンジポンプからケイ素マイクロチップの底部まで流体相互接続のためのドリル穴を有するリングを包含する。全サンプル及び試薬は、以下の順番でマイクロチップへ順次送達される。

入口I：分離 - サイズによって細胞を分離するため、サンプルをマイクロフィルタ内へ注入する；

入口II：分泌 溶解緩衝液として使用されるべきプロテイナーゼKを有するAL緩衝液を、マイクロミキサー内に注入する；

入口III：洗浄及び溶出 - サンプルを精製するため、洗浄緩衝液（EtOHもしくはDMAのいずれか及びPBS）を注入する；及び

出口IV：ケイ素固体表面から核酸を溶出する。

カオトロピック方法（エタノール）を使用する場合、8 µLのPBS緩衝液を有する全血（2 µL）又は尿（10 µL）のいずれかが、入口I内へ、流速1.67 µL分<sup>-1</sup>で10分間、シリンジポンプ（KDS Scientific, MA）で注入された。次いで、溶解緩衝液が入口II内へ、流速3 µL分<sup>-1</sup>で10分間、シリンジポンプによるPBS緩衝液と共に3 µL分<sup>-1</sup>で10分間までの入口I流速における増加と共に、注入された。溶解反応の際、エタノールを流速10 µL分<sup>-1</sup>で10分間、入口IIIに添加した。次いで、エタノールのみを12.5 µL分<sup>-1</sup>で5分間、チップ全体を洗浄するため、順次使用した。最後に、抽出DNAを、12.5 µL分<sup>-1</sup>で10分間、純水で溶出した。

【0079】

提案されたDMA方法を使用する場合、マイクロチャネル（入口III）部分をまず、APTESで2時間シリンジポンプを用いて被覆し、表面をエタノールで20分間洗浄した。次いで、反応に備えて、表面を窒素ガスで乾燥した。8 µLのPBS緩衝液を有する全血（2 µL）又は尿（10 µL）のいずれかが、入口I内へ、流速1.67 µL分<sup>-1</sup>で10分間、シリンジポンプで注入された。次いで、溶解緩衝液が入口II内へ、流速3 µL分<sup>-1</sup>で10分間注入され、入口I流速は、シリンジポンプによるPBS緩衝液と共に3 µL分<sup>-1</sup>で10分間まで増加させられた。溶解反応の際、DMA溶液（25 mg mL<sup>-1</sup>）を流速10 µL分<sup>-1</sup>で10分間、入口IIIに添加した。次いで、非特異的結合分子及びPCR阻害剤を取り除くため、PBS緩衝液を、12.5 µL分<sup>-1</sup>で10分間、順次チップの中を通過させた。最後に、抽出DNAを、12.5 µL分<sup>-1</sup>で10分間、溶出緩衝液で溶出した。加えて、200 µL no全血又は尿を、QIAmp DNAミニキット（Hilden, ドイツ）を使用する参照材料としてゲノムDNA抽出のために使用した。全抽出DNAを次いで、RT-PCRによる遺伝子分析のために使用した。

【0080】

「comprising」は包含することを意味するが、ただし何かが用語「comprising」の後に続いてもそれに限定されない。従って用語「comprising」は、列挙された要素が必要とされるか、必須であること、但し、他の要素は任意であって、あってもなくてもよいことを意味する。

【0081】

「consisting of」は包含することを意味し、何かが語句「consisting of」の後に続いたら、それに限定される。従って、語句「consisting of」は、列挙された要素が必要とされか、必須であること、且つその他の要素はあってはいけないことを意味する。

【0082】

本書に詳しく記載された本発明は、本書で具体的に開示されなかった、いずれの単数もしくは複数の要素、単数もしくは複数の限定が存在しない場合に、好適に実施されてよい

10

20

30

40

50

。従って、例えば用語「comprising」, 「including」, 「containing」等は、拡大されて、限定なしに読まれるものとする。加えて、本書で使用された用語及び表現は、限定のためではなく説明の用語として使用された。このような用語及び表現の使用において、表示且つ記載された特徴事項のいずれの等価物又はその部分を排除する意図は存在しないが、特許請求された発明の範囲内において様々な改変が可能であることが認識される。従って、好ましい実施形態及び任意の特徴事項により本発明は具体的にかいじされたが、本書に開示され、具体化された発明の改変及びバリエーションが、当業者により行われてよい。そのような改変及びバリエーションは、本発明の範囲内と見なされる。

【0083】

所与の数値（例えば温度、時間）に関連した「約（about）」は、具体的な値の10%以内の数値を包含することを意味する。

【0084】

本書において、発明は広く且つ一般的に記載された。一般的な開示に該当する狭い種類及び下位概念的なグループはまた、発明の一部を形成する。これは、削られた材料が本書に具体的に書かれているか否かに関わらず、属からいずれの発明を取り除くという条件付きでもしくはネガティブな限定つきで発明の一般的記載を包含する。

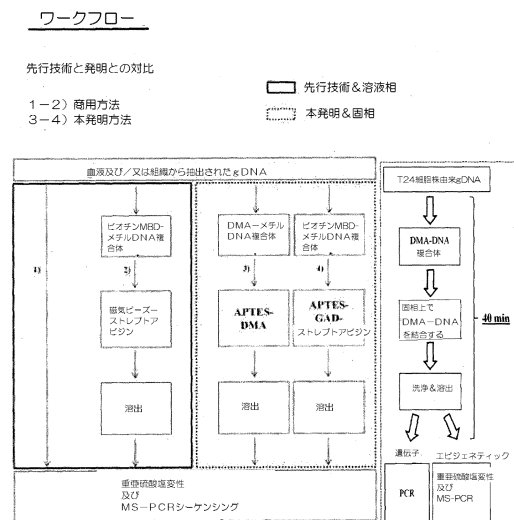
【0085】

その他の実施形態は、添付の特許請求の範囲及び非限定的実施例内にある。加えて、発明の特徴事項もしくは態様がマーカッシュ形式で記載される場合、当業者ならば、マーカッシュグループのいずれの個々のメンバーもしくはメンバーのサブグループに関して発明はまたそれにより記載されていると認識する。

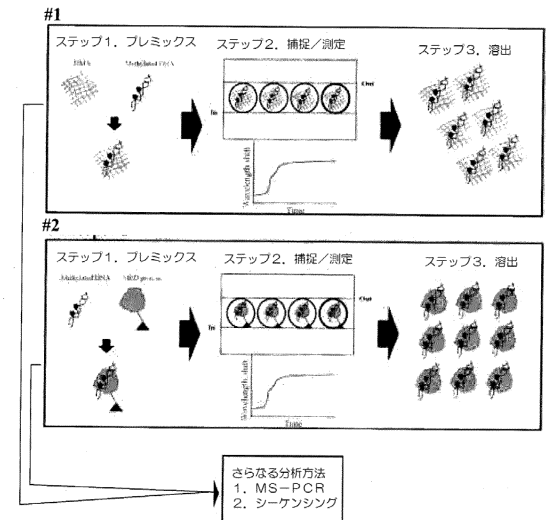
10

20

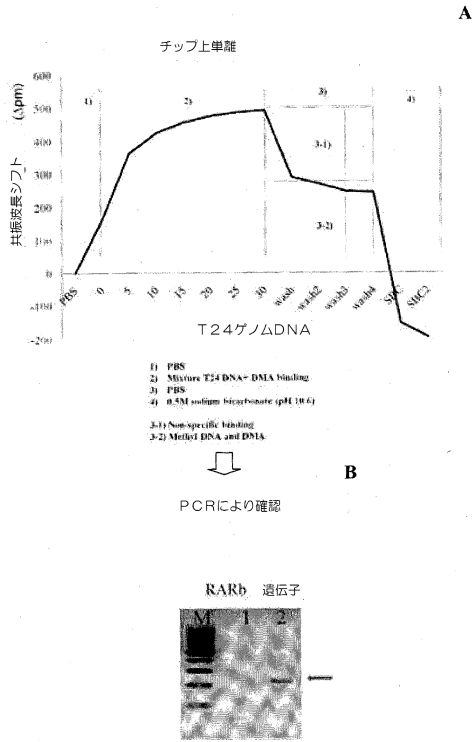
【図1】



【図2】

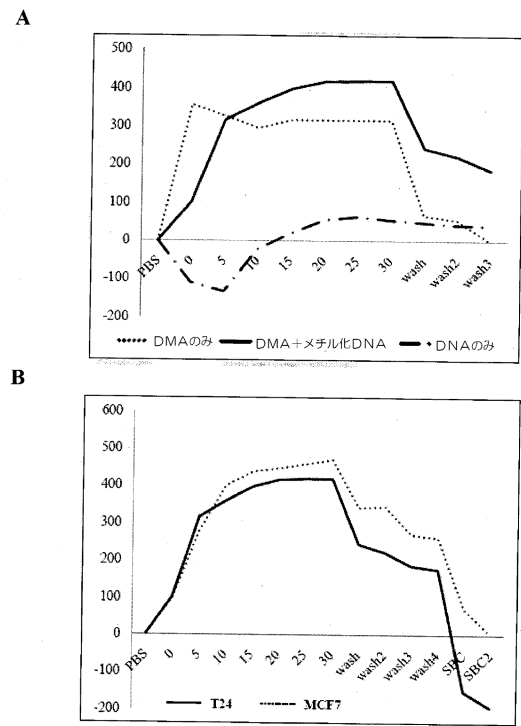


【 図 3 】



A

【 図 4 】



A

B

## フロントページの続き

(72)発明者 シン, ヨン

シンガポール, シンガポール 117685, シンガポール・サイエンス・パーク 2, サイエンス・パーク・ロード 11, シー/オウ インダストリー・ディヴェロプメント, インスティテュート・オブ・マイクロエレクトロニクス

(72)発明者 パーク, マイ キョウン

シンガポール, シンガポール 117685, シンガポール・サイエンス・パーク 2, サイエンス・パーク・ロード 11, シー/オウ インダストリー・ディヴェロプメント, インスティテュート・オブ・マイクロエレクトロニクス

審査官 上村 直子

(56)参考文献 特表2011-519280(JP, A)

特開2009-213480(JP, A)

特表2008-515447(JP, A)

APPLICATIONS OF THE OPTO-FLUIDIC RING RESONATOR FOR DNA METHYLATION ANALYSIS AND MICRO FLUIDIC LASER DEVELOPMENT, 2010年, p.xvi, 59-78, A Thesis presented to the Faculty of the Graduate School University of Missouri, <<https://mospace.umsystem.edu/xmlui/handle/10355/10248>><https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/10248/research.pdf?sequence=3>>

Methods in Molecular Biology, 2009年, Vol.503, p.139-165, Author manuscript; available in PMC 2009 Sep 28, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2753609/>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)