明　細　書

固定化ＤＮＡライブラリー作製装置、遺伝子増幅装置、温度制御方法及び遺伝子を系統的に比較する方法

技術分野

本発明は、遺伝子工学、蛋白質工学、細胞工学、発生工学、免疫学等の、分子生物学関連分野や生化学関連分野等において、微量の溶液で加熱を伴う各種反応に使用する反応装置に関する。より詳しくは、固定化ＤＮＡライブラリー作製方法、遺伝子増幅方法、遺伝子を系統的に比較する方法及びそれらに用いる装置、さらにはそれに用いる固定化ＤＮＡライブラリーに関する。

背景技術

従来、遺伝子増幅する手段として、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（ＰＣＲ）法が広く用いられている。このＰＣＲ法は、反応溶液をいれたチューブ状のプラスチック反応容器をアルミブロックなどの中に挿入し、反応溶液の水分蒸発を防止するため蓋をし、アルミブロックの温度を、熱変性温度、アニーリング温度、ＤＮＡ合成温度の順に熱サイクルを所定の回数コントロールするというものである。

しかしながら、このような従来のＰＣＲ法に用いられた装置では、熱容量が大きく熱伝導性が悪いプラスチック反応容器が用いられており、しかもアルミブロック自体を温度コントロールするため、昇温や冷却に時間がかかるという問題点があった。

また、反応溶液の温度制御が完全ではないため、目的とするＤＮＡの複製収量が低いという問題点もあった。

本発明は、上記問題点に鑑み、操作が簡単で、昇温や冷却を迅速に行え、反応

の熱サイクルを短時間で行える遺伝子増幅装置及び遺伝子増幅方法を提供することを技術的課題とする。

また、このような装置に用いることが好適なＤＮＡを固定化した基体及び固定化ＤＮＡライブラリー作製方法を提供することも、本発明の技術的課題である。

さらに、上記装置を用いて遺伝子を系統的に比較をする方法を提供することも、本発明の技術的課題である。

発明の概要

本発明の固定化ＤＮＡライブラリー作製装置は、容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されていることを特徴とする。

本発明の遺伝子増幅装置は、容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されていることを特徴とする。

本発明の遺伝子増幅装置は、容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、遺伝子を固定化した基体で形成されていることを特徴とする。

これらの装置は、前記基体が、固体状の基体であることが望ましく、前記容器が分解型であることが望ましく、前記容器がカセット型であることが望ましい。

本発明の遺伝子増幅装置の温度制御方法は、温度測定部６１からの信号をコンピュータ制御部６４に入力し、コンピュータ制御部６４は予め入力されたプログラムチャートと比較し、加熱・冷却手段５１の温度制御部６２と冷却手段５２の温度制御部６３とを駆動させることを特徴とする。

本発明のＤＮＡを固定化した基体は、これらの装置で用いる基体であることを特徴とする。

本発明の基体を冷凍保存する方法は、ＤＮＡを固定化した基体を冷凍保存することを特徴とする。

本発明の遺伝子を系統的に比較する方法は、複数個の固定化ＤＮＡライブラリーを容器内に設置してするものであることを特徴とする。

図面の簡単な説明

図１は、本発明の遺伝子増幅装置を開蓋した状態を示す概略平面図である。図２は、図１のＡ－Ａ断面概略図である。図３は、図１のＢ－Ｂ断面概略図である。図４は、容器の組立概略図である。図５は、本発明の遺伝子増幅装置の断面状態を示す概略断面図である。図６は、本発明の遺伝子増幅装置の温度制御を示す概略図である。図７は、固定化ｃＤＮＡライブラリーの作成及び遺伝子増幅の説明図である。図８は、固定化ｇＤＮＡライブラリーの作成及び遺伝子増幅の説明図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子増幅装置を図面を用いて説明する。

図１は、本発明の遺伝子増幅装置を開蓋した状態を示す概略平面図である。図２は、図１のＡ－Ａ断面概略図である。図３は、図１のＢ－Ｂ断面概略図である。図４は、容器の組立概略図である。図５は、本発明の遺伝子増幅装置の断面状態を示す概略断面図である。

図１～図３において、１０は反応器本体、１１は反応器本体内に形成された凹部である。反応器本体１０は、化学的に安定な、たとえばアクリル樹脂、ポリスチレン樹脂等の高分子材料で形成されることが望ましい。凹部１１は反応器本体内に少なくとも１個設けられており、たとえば、円筒状、三角もしくは四角等の

多角柱状などのものが好ましい。

容器１２は、熱伝導性のよい基体４１、たとえばダイヤモンド基体、窒化アルミ、炭化珪素などのセラッミクス基体や、アルミニウム、ステンレススチール等の金属基体から構成されていることが好ましい。

あるいは、一部にダイヤモンドが形成されたダイヤモンドライク・カーボン、炭素、炭素化合物なども好ましい。また、ポリカーボネートやフッ素樹脂等のプラスチック基体等も好ましい。さらに上記基体を組み合わせたもので形成されていることも好ましい。

容器１２は底付きのものであればよく、凹部１１に埋設・取外しが容易に行えることが好ましい。

また、容器１２は、基体４１を底や側壁を分解型にしておくことも好ましく、たとえば四角柱状の容器であれば、底１枚、側壁４枚の基体に分解できる。たとえば図４の（ａ）に示すように、一辺が５～１０ｍｍ程度で厚みが０．１ｍｍ程度の基体４１を、たとえば（ｂ）に示すように、合成樹脂製の基体ホルダー４２内の底４３と側壁４４とに組み立てて容器１２とすることができる（（ｃ）参照）。

この場合、容器１２は、底、側壁の少なくとも１枚は上記基体上に遺伝子を固定化したもので形成されているものを用いることが好ましい。

さらに、これらの容器をいくつか連結して（カセット型）、複数の容器を複数の凹部１１にワンタッチで埋設・取外しできるようにして、操作の効率化を図ることもできる。このカセット型の具体的態様については後述の固定化ＤＮＡライブラリーの部分で詳述する。

図５は、本発明の遺伝子増幅装置の断面状態を示す概略断面図である。図５において、（ａ）は、反応器本体１０の上部に蓋部５０を設置する態様を示した概略説明図である。（ｂ）は、図５の（ａ）に示すＣ－Ｃ断面概略図である。図５において、５０は蓋部、５１は加熱・冷却手段、５２は冷却手段を示す。蓋部５

０は、化学的に安定な、たとえばアクリル樹脂、ポリスチレン樹脂等の高分子材料で形成されることが望ましい。

加熱・冷却手段５１は、容器１２と接触して容器１２を加熱・冷却する手段であり、ペルチェ素子、電熱ヒータ、赤外線ランプ等を用いるのが好ましい。この加熱・冷却手段５１を、容器１２と直接的に接触させて設置することによって容器１２の温度を直接的に制御できるので、従来の増幅装置よりも温度制御精度がよい。冷却手段５２は、冷却水や冷風を流通させるパイプや冷却ファンを設置したユニットであり、容器１２を急速に冷却するための手段である。

図６は、本発明の遺伝子増幅装置の温度制御を示す概略図である。図６において、容器１２の温度制御は、温度測定部６１からの情報に基づき加熱・冷却手段５１の温度制御部６２と冷却手段５２の温度制御部６３とによって行われる。すなわち容器１２の底もしくは側壁に直接的に接して設けられた温度測定部６１からの信号をコンピュータ制御部６４に入力し、コンピュータ制御部６４は予め入力されてあるプログラムチャート（昇温速度、保持温度、保持時間、降温速度等）と比較し、加熱・冷却手段５１の温度制御部６２と冷却手段５２の温度制御部６３を駆動させる。

実施例

本発明の実施例を図７及び図８を用いてさらに詳細に説明する。

容器１２として５mm四方（厚さ０．１mm）のダイヤモンドチップ４１をダイヤモンド基体として用いた。このダイヤモンドチップ４１を、底に１枚と側壁に４枚使用して、図４に示すように、合成樹脂製の基体ホルダー４２の側壁に組み立てて容器１２とした。この側壁に使用したダイヤモンドチップ４１にはすでに有機カルボン酸で化学修飾済みのものを用いた。その後蓋部５０を、反応器本体１０上部に設置した。

（固定化ＤＮＡライブラリーの作製）

次に、固定化ＤＮＡライブラリーの作製例を図７，図８を用いて説明する。ま

ず、有機カルボン酸で化学修飾した４枚のダイヤモンドチップ４１を用いて構成した容器１２内の溶液と接触するダイヤモンドチップ４１表面に、ｍＲＮＡ（messenger RNA:メッセンジャーＲＮＡ）の場合はオリゴ－ｄＴ$_{16-20}$を、一方ｇＤＮＡ（genomic DNA:染色体ＤＮＡ）の場合は目的の制限酵素部位を持ったオリゴヌクレオチドを、まず化学的なエステル結合反応によって固定化した（図７、図８参照）。これらの固定化反応のためには、オリゴ－ｄＴ$_{16-20}$では３’末端側及びオリゴヌクレオチドでは５’末端側がアミノ基を有するアデニン（Ａ）かシトシン（Ｃ）であることが要求される。なお、図７、図８において、”ＡＤＣ－Ｒ－”で示す記号は、有機カルボン酸を化学修飾したダイヤモンドチップを表す。

次に、ｃＤＮＡ（complementary DNA）ライブラリーでの場合は、組織・細胞から抽出した全ＲＮＡ溶液を加えて０～４℃の低温でｍＲＮＡを固定化オリゴ－ｄＴ$_{16-20}$にハイブリダイズさせた後に、３７～６０℃の範囲内での適当な一定温度で逆転写酵素（Reverse Transcriptase：RT）によってｃＤＮＡ合成を行った。このときのｃＤＮＡは、固定化オリゴ－ｄＴ$_{16-20}$の５’へ向けての延長反応させ固定化したものを用いた。

合成された固定化ｃＤＮＡとｍＲＮＡとのハイブリダイズ状態にある溶液を９０℃に昇温させてｍＲＮＡを脱ハイブリダイズした後、反応溶液をＴｒｉｓ－ＥＤＴＡ(ＴＥ)緩衝液に交換し、再度０～４℃の低温にしてエタノール洗浄し、一本鎖ＤＮＡの状態の精製された固定化ｃＤＮＡライブラリーを作製した（図７参照）。

ｇＤＮＡライブラリーでの場合は、まず、目的の制限酵素部位を持った固定側オリゴヌクレオチド（図８参照）を上記のオリゴ－ｄＴ$_{16-20}$の場合と同様にダイヤモンドチップ４１の表面に固定化した。次に、その化学的な固定化のための反応溶液を０～４℃の低温でハイブリ側オリゴヌクレオチドと目的の制限酵素を含む反応溶液に交換した。そして、オリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション後、３７℃にまで昇温して半固定化されたオリゴヌクレオチドの制限酵素切

断を行った。

制限酵素切断後に、再度反応容器を０～４℃の低温にして、目的の制限酵素で断片化したｇＤＮＡとライゲーション酵素（Ligase）を含む反応溶液に交換し、再び温度を３７℃にまで上昇させてライゲーション反応を行い、一本鎖ＤＮＡの状態のｇＤＮＡライブラリーを作製した（図８参照）。

なお、ダイヤモンドチップ４１の表面上に上記作製された固定化ｃＤＮＡライブラリー或いは上記作製された固定化ｇＤＮＡライブラリーを、

①多検体での同種の組織・細胞の遺伝子変異の比較、

②同一検体での各組織・細胞の遺伝子発現変動の比較、

③同一検体での治療・手術等に伴う余後経過に対応する遺伝子発現変動の比較、

等を目的として、それぞれを別の容器内に設置することができる。

たとえば①の場合は、同種の組織・細胞の遺伝子変異の比較をするために、多検体（固定化ＤＮＡライブラリーを有した複数のダイヤモンドチップ）を、別の容器中に設置し、これらの複数の容器を連結した１カセットとする。そしてこれらのカセットを反応器本体に埋設する。さらにこれらのカセットを２カセット以上を系統的に作れば、効率的に多検体の比較を行うことができる。

本発明では、これらの複数の容器を連結した１カセットあるいは複数のカセッカセットを集合体にして、これらのそれぞれの容器内に固定化ＤＮＡライブラリーを設置したものを、カセット型固定化ＤＮＡライブラリーとする。本発明ではこれらのカセット型固定化ＤＮＡライブラリーを用いて、前記①～②の比較を系統的に行うことによって、遺伝子の変動を効率的に調査できる。

そして、このカセット型固定化ＤＮＡライブラリーは、ＰＣＲ過程に供しなかった場合でも供した場合でも、その容器をＴＥ緩衝液及び７０～７５％のエタノール水溶液で十分に洗浄後、１００％エタノールに浸潤して冷凍保存すれば、比較データ等の要求に応じて半永久的に利用可能である。

（固定化ＤＮＡライブラリーを用いての遺伝子増幅）

上記の固定化ｃＤＮＡライブラリー又はｇＤＮＡライブラリーで作製したカセット型固定化ＤＮＡライブラリーで容器１２の側壁を構成した。この容器１２内面をＴＥ緩衝液で十分に洗浄後、増幅目的のＤＮＡに対するプライマーをセットし、４種のヌクレオチド及びＤＮＡポリメラーゼを含むＰＣＲ反応溶液を加えた。その後、容器１２を、二本鎖のＤＮＡを一本鎖ＤＮＡに分離させる熱変性温度（９５℃で約１．５分間）、一本鎖ＤＮＡとＤＮＡプライマとを結合させるアニーリング温度（４５℃で約１分間）、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼによりＤＮＡ鎖の伸長反応を行わせるＤＮＡ増幅温度（７４℃で約２分間）にそれぞれ順に温度制御し、これらの温度変化を３０サイクル繰り返しＰＣＲを行った（図７，図８参照）。

なお、多検体の遺伝子診断を一度に短時間で可能にするためには、このカセット型固定化ＤＮＡライブラリー作製・遺伝子増幅装置を必要な数だけ並列的に配置できる形のシステムを提供することで解決できる。この場合は、例えば、５０試料の処理では、５組の本発明の遺伝子増幅装置を並列的に配置した形にすることが好ましい。

産業上の利用可能性

本発明の装置を用いれば、反応容器内の反応溶液を昇温や冷却を迅速に行うことができるので、非常に短時間でＤＮＡの増幅を行うことができる。また、自動化遺伝子診断装置にも適用可能である。すなわち、自動化遺伝子診断装置の開発において技術的に最も重要な２点は、半永久的に利用可能なカセット型固定化ライブラリーの作製及び遺伝子増幅の効率・特異性の優れた遺伝子増幅装置の開発である。

前記の両方の問題点は、ライブラリー作製からＰＣＲまでの一連の操作を温度制御が、同一基体でもってできるという最高の利点から、現状では最も簡便、小型で高性能な形の自動化カセット型固定化ＤＮＡライブラリー作製及び遺伝子増

幅装置を提供することができる。

すなわち、本発明の装置を用いれば、ＤＮＡ固定化反応の直接的な温度制御に加えて、ＤＮＡライブラリーを固定化したダイヤモンドチップをそのまま利用しての遺伝子増幅に関する直接的な温度制御も可能である。

さらに本発明の装置は、高熱伝導性のダイヤモンドなどの基体を用いてのＰＣＲ反応溶液の直接的な温度制御を行うことができるので、ＰＣＲの温度制御効率を格段に進歩させて所要時間を大幅に短縮することができるのみならず、目的ＤＮＡの特異的増幅といったＰＣＲ効率も上昇させることができる。

また、本発明の基体に高熱伝導性の基体を用いれば、高熱伝導性の他に、化学試薬に対して安定である点、耐熱性に優れている点、放射線照射によるダメージが少ない点等のダイヤモンドの特性を利用することにより、作製された固定化ＤＮＡライブラリーは非常に安定なものとなり、一度カセット型固定化ＤＮＡライブラリーを作製すれば、何度の繰返し利用も可能な半永久的なＤＮＡライブラリーを提供することができる。

なお、ダイヤモンド基体の高熱伝導性を利用して、化学修飾していないダイヤモンド基体等のチップを本発明の増幅装置内にセットして、従来行われているＰＣＲ法を行うこともできる。

請　求　の　範　囲

１、　容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、

この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されている固定化ＤＮＡライブラリー作製装置。

２、　容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、

この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、化学修飾された基体で形成されている遺伝子増幅装置。

３、　容器を挿入する凹部が形成された反応器本体と、

この反応器本体の上部に取付けられ、加熱・冷却手段、冷却手段を設けた蓋部とが設けられた装置であって、前記容器は、遺伝子を固定化した基体で形成されている遺伝子増幅装置。

４、　前記基体が、固体状の基体である請求項１～３のいずれかに記載の装置。

５、　前記容器が分解型である請求項１～４のいずれかに記載の装置。

６、　前記容器がカセット型である請求項１～５のいずれかに記載の装置。

７、　請求項１～６のいずれかに記載の装置において、

温度測定部６１からの信号をコンピュータ制御部６４に入力し、コンピュータ制御部６４は予め入力されたプログラムチャートと比較し、加熱・冷却手段５１の温度制御部６２と冷却手段５２の温度制御部６３とを駆動させる遺伝子増幅装置の温度制御方法。

８、　請求項１～６記載のいずれかの装置で用いるＤＮＡを固定化した基体。

９，　ＤＮＡを固定化した基体を冷凍保存する方法。

１０、　複数個の固定化ＤＮＡライブラリーを容器内に設置し、遺伝子を系統的に比較する方法。