

明 細 書

発明の名称 : 核酸の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、DNAマイクロアレイを用いた核酸の検出方法等に関する。詳しくは、スポットゲルの分子ふるい効果を活用したゲル保持型DNAマイクロアレイを利用したオンチップでのPCR反応による核酸の特異的検出方法等に関する。

背景技術

[0002] DNAマイクロアレイは、固定化されたDNAをプローブとして、検体核酸とハイブリダイゼーション反応を行うツールである。

近年、そのようなDNAマイクロアレイを用いて、検体核酸中の特定の塩基配列の検出を行い、疾患関連遺伝子の探索や臨床診断などの分野における実用化が進みつつある。

DNAマイクロアレイとしては、例えば、2次元表面上にフォトリソグラフィを用いてプローブを逐次的に合成されたDNAマイクロアレイ（特許文献1参照）、予め合成されたプローブが2次元表面上にスポットティングされたDNAマイクロアレイ（特許文献2参照）、樹脂板等の基板に複数の溝又は貫通孔が形成され、それらの溝又は孔の内部にDNAを含むゲルが保持されたDNAマイクロアレイ（特許文献3参照）、平面基盤上にDNA等を含むゲルのスポットが配置されたDNAマイクロアレイ（特許文献4参照）等が知られている。本発明者らの一部も中空繊維の中空部にゲルを保持した中空繊維配列体を作製し、該配列体の繊維軸と交叉する方向で切断することにより得られるDNAマイクロアレイを開発している（特許文献5参照）。

[0003] 従来のDNAマイクロアレイの使用方法では、検体中に存在する標的核酸は通常微量であるため、予めT7増幅法やPCR法等により標的核酸を増幅する必要があった。また、ハイブリダイゼーション反応には一晩かかる場合もある。よって、反応から検出までをより簡略化する必要があると考えられ

ていた。

[0004] 標的核酸を検出するまでの時間を短縮するために、DNAマイクロアレイ上でPCR反応を行う多くの技術が開示されている。例えば、非特許文献1には、所定のアミノシラン試薬を用いて修飾されたガラス基板の表面に、プライマーとなるDNA鎖を共有結合させたDNAマイクロアレイにて固相PCR (Polymerase Chain Reaction) によるDNA増幅を行う技術が開示されている。

[0005] また、非特許文献2には、ガラス基板の代わりにポリ (メチルメタクリレート) を用いて、表面にDNA断片を固定化させたDNAマイクロアレイを用いて所定のDNA鎖とのハイブリッド特性およびPCR様環境下における熱安定性が評価されている。

[0006] さらに具体的なアプリケーションの例としては、非特許文献3～4に示すような迅速な微生物同定手法、一塩基多型の検出手法の開発が試みられている。

[0007] しかしながら、これらの手法には未だいくつかの課題が残されている。特に、基板に核酸を固定化したDNAマイクロアレイ上でのPCR反応の代表的な課題としては、下記1)～3)の点などが挙げられる。

1) 熱サイクル処理時 (PCR反応時) に、固定化されたプライマーが外れてしまう。

2) 基板表面上でPCR反応を行うと核酸の伸長反応効率が低い。

3) PCR反応時に非特異的な検出が起こることがある。

これらの課題に対しては、いくつかの解決策が考えられているが、基板上へ特殊な化学修飾を必要とし通常のヌクレオチドを使用できない (置換ヌクレオチドを用いる) など、実用性が低いものであった (特許文献6～9参照)。

[0008] また、これとは別に、基板表面上に核酸を固定化せず、ゲルパッドを利用したDNAマイクロアレイ技術も開示されている。DNAマイクロアレイ上のゲルパッド内で増幅反応および個別塩基の伸長による検出反応が可能であ

ることが知られている（非特許文献5参照）。

ゲルを使用したDNAマイクロアレイ（特許文献3～5参照）は、2次元表面にプローブが固定されたDNAマイクロアレイに比べて、一区画に固定化できるプローブ量が増加する。よって、ハイブリダイゼーション効率（ハイブリダイゼーションに供した核酸に対してプローブと結合した核酸の割合）が優れたDNAマイクロアレイといえる。

[0009] 上記ゲルを利用したDNAマイクロアレイは、検査の対象となる試料（以下、検体）がゲルの多孔質構造中で十分に拡散し、ゲル中のプローブと反応することにより、高いハイブリダイゼーション効率を達成することができる。しかしながら、これまでに知られているゲルDNAマイクロアレイでは、ゲルの多孔質構造中を検体が十分に拡散できず、ゲル表面しか検査に使用されていない場合もあった。

[0010] ゲルの多孔質構造の有効細孔径を大きくし、検体の拡散を向上させる等の目的で、ゲルを構成するモノマーの種類やモノマー濃度の検討が行われている（特許文献10及び非特許文献6～9参照）。例えば、非特許文献6には、8質量%のアクリルアミドゲルを使用する方法が記載され、非特許文献7及び8には、5質量%のメタクリルアミドゲルを使用することにより最大500塩基長のDNAをハイブリダイゼーションさせることができたことが記載されている。また、特許文献10には、DNAマイクロアレイに使用する好適なゲルとして、N，N－ジメチルアクリルアミドを2～7質量%含むゲルを使用することにより、高いハイブリダイゼーション効率を得られることが記載されている。さらに、N－イソプロピルアクリルアミドのような感温性ゲルを利用する方法も知られている（非特許文献9参照）。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：米国特許第5405783号明細書

特許文献2：米国特許第5601980号明細書

特許文献3：特開2000-60554号公報

特許文献4：米国特許第6682893号明細書

特許文献5：特開2000-270877号公報

特許文献6：特開2006-230335号公報

特許文献7：特開2007-330104号公報

特許文献8：特開2007-222010号公報

特許文献9：特開2009-219358号公報

特許文献10：特許第3654894号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Adessi, Celine et al, “Solid phase DNA amplification: Characterisation of primer attachment and amplification mechanisms”, Nucleic Acids Res., 2000, Vol. 20, No. 20, e87

非特許文献2：Fixe, F. et al., “Functionalization of poly(methyl methacrylate)(PMMA) as a substrate for DNA microarrays”, Nucleic Acids Res., Jan. 2004

非特許文献3：Georg, M. et al., “Microarray-Based Identification of Bacteria in Clinical Samples by Solid-Phase PCR Amplification of 23S Ribosomal DNA Sequences”, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2004, p. 1048-1057

非特許文献4：Martin H. et al., “Detection of Single Base Alterations in Genomic DNA by Solid Phase Polymerase Chain Reaction on Oligonucleotide Microarrays”, Analytical Biochemistry, 299, 24-30, 2001

非特許文献5：Svetlana D. et al., “Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers”, Nucleic Acids Res., 1999, Vol. 27, No. 18, e19

非特許文献6：Gennady Yershov et al., “DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 4913-4918, May 1996

非特許文献7：A. Yu. Rubina et al., “Hydrogel drop microchips with im

mobilized DNA: properties and methods for large-scale production” , Analytical Biochemistry, Vol. 325, pp. 92-106, 2004

非特許文献8 : Dmitry A. Khodakov et al., ” An oligonucleotide microarray for multiplex realtime PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV” , BioTechniques, Vol. 44, No. 2, pp. 241-248, 2008

非特許文献9 : 迫原修治ら, 化学工学会第69年会 I316 : 「DNAチップ構築のための感温性多孔質ゲルの応用」

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] ゲルの多孔質構造の有効細孔径を大きくし検体の拡散を向上させたゲル利用DNAマイクロアレイは、基板上にプローブが固定化されたDNAマイクロアレイと比較して感度が高く、熱的にも安定性が高い（プローブが熱により固定化している部位から解離してしまわない）ものであった。特に、遺伝子発現解析用DNAマイクロアレイとして有用であった。

しかしながら、遺伝子発現解析では、あらかじめ増幅、精製しておいたRNAをDNAマイクロアレイ上のプローブにハイブリダイゼーションさせればよいが、DNAマイクロアレイ上でのPCR反応を実施する場合には、実際にアレイを浸漬した液相、アレイ表面、アレイ内部などにおいて予期せぬ反応が起こることもあり、特異性の面で、基板上にプローブが固定化されたDNAマイクロアレイと同様の問題を生じていた。特に、アレイ上でPCR反応とハイブリダイゼーション反応を同時に行うためには、これまで以上に特異性の高いDNAマイクロアレイを用いる必要があった。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、ゲルの分子ふるい効果とプローブの特異性の両方を利用したDNAマイクロアレイを用いることで、より一層特異性の高い核酸検出を行うことができることを見出した。

すなわち、ゲル利用型DNAマイクロアレイ上で、PCR等の核酸増幅方法による核酸増幅反応とハイブリダイゼーション反応とを同時に行うことに

より、目的の核酸検出の特異性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0015] すなわち、本発明は以下のとおりである。

- (1) 下記の工程を含む、核酸の検出方法。
 - (a) プローブが固定化されたゲルと、核酸増幅の鑄型となる核酸並びに核酸増幅用プライマーセット、ヌクレオチド単体及びDNA伸長酵素を含む反応溶液とを接触させる工程、
 - (b) 上記ゲル及び反応溶液に、核酸増幅反応を行うための熱サイクル処理を加える工程、
 - (c) 増幅された核酸断片のうち、特定の塩基長の核酸断片を選別する工程、及び
 - (d) 選別された核酸断片を検出する工程。

[0016] 当該検出方法において、プローブが固定化されたゲルは、例えば、ゲル濃度が異なる複数種のゲルを使用することができる。また、当該ゲルは、例えば、基板中のウエル又は貫通孔に保持されたものであってもよく、置換（メタ）アクリルアミド誘導体及び／又はアガロース誘導体を含むものであってもよい。さらに、当該ゲルは、検出対象とする核酸の大きさ（塩基長）にあわせて適切に設定したゲル濃度のものであることが好ましく、例えば、ゲル濃度が2質量%超、5質量%未満であるものが挙げられる。

また当該検出方法においては、例えば、プローブが固定化されたゲルと反応溶液との接触面積（ $S(\mu m^2)$ ）に対する当該ゲルの体積（ $V(\mu m^3)$ ）の比率（すなわち、 V の値を S の値で除した値（ V/S ））を、50以上とすることができ

[0017] (2) ゲル濃度が異なる複数種のゲルが担持され、且つ、当該ゲルはプローブが固定化されたものである、マイクロアレイ。

(3) 下記の工程を含む、請求項7記載のマイクロアレイの製造方法。

(a) 複数本の中空繊維を、中空繊維の各繊維軸が同一方向となるように3次元に配列し、その配列を樹脂で固定することにより、中空繊維束を作製す

る工程、

(b) プローブを含む、モノマー濃度が異なる複数種のゲル前駆体溶液を、中空繊維束の各中空繊維の中空部に導入する工程、

(c) 前記中空部に導入したゲル前駆体溶液を反応（共重合反応）させ、プローブを含むゲル状物（プローブ固定化ゲル）を中空繊維の中空部に保持する工程、及び

(d) 中空繊維束を繊維の長手方向に対して交叉する方向で切断して薄片化する工程。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、ゲルを利用したDNAマイクロアレイ上での核酸増幅反応（PCR等）において、検出目的以外の核酸の非特異検出を効率的に排除し、目的の核酸の検出特異性をより一層向上させることができる（特に擬陽性を低減することができる）核酸の検出方法、及び当該検出方法に用いるマイクロアレイを提供することができる。当該検出方法においては、ゲル濃度（ゲルの多孔質構造）を増幅させる目的の核酸（検出対象の核酸）の大きさ（塩基長）に合わせて適切に設定することにより、ゲルの分子ふるい効果を向上させることができ、より特異性の高い検出方法を提供できる。本発明の検出方法等は、大量の検体を処理する用途に適したものであり、実用性、有用性に優れたものである。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]飽和環状ポリオレフィン製薄型96ウェルプレートに搭載された貫通孔型DNAマイクロアレイを示す図である。

[図2]飽和環状ポリオレフィン製薄型96ウェルプレートを市販のサーマルサイクラー（ライフテック社製、GeneAmp 9700）にセットしたときの状態を示す図である。

[図3]反応ウェル内（反応液内）での検出対象DNAの増幅反応（増幅反応初期）の模式図である。

[図4]貫通孔型アレイスポットゲル内への増幅産物の選択的拡散を示す模式図

である。

[図5]スポットゲル内でのPCR反応の模式図である。

[図6]中空繊維束（中空繊維配列体）の製造用の配列固定治具を示す概略図である。

[図7]DNAマイクロアレイの各スポットのゲル濃度とプローブ搭載位置を示した概略図である。

[図8]サイズが異なる増幅産物の電気泳動図とそれら増幅産物がプローブとハイブリダイズする位置を示した模式図である。

[図9]123bpの増幅産物について分子ふるいの効果を調べた結果を示す図である。

[図10]413bpの増幅産物について分子ふるいの効果を調べた結果を示す図である。

[図11]827bpの増幅産物と1191bpの増幅産物との混合物について分子ふるいの効果を調べた結果を示す図である。

[図12]比較例1で用いた平板状アレイ上のスポットへの増幅産物の非選択的拡散を示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願2011-027588号明細書（2011年2月10日出願）の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

[0021] 本発明は、スポットゲルの特性（分子ふるい効果）とプローブの特異性との相乗効果を活用したDNAマイクロアレイ、及び当該DNAマイクロアレイ上で核酸増幅反応（PCR等）とハイブリダイゼーション反応とを同時に行うことによる核酸の特異的検出方法に関するものである。スポットゲルは

、１種類以上の置換（メタ）アクリルアミド誘導体やアガロース誘導体、架橋剤及び所定のプローブを含むゲル前駆体を共重合して得られるゲルである。

[0022] なお、明細書中、「DNAマイクロアレイ」という場合、DNA（デオキシリボ核酸）のみを固定化したマイクロアレイを指すのではなく、「プローブ」を固定化したマイクロアレイを意味する。また、「マイクロアレイ上での反応」という場合、「マイクロアレイと反応溶液を含む反応系全体での反応」を意味し、ゲルを利用したアレイでのゲル表面やゲル内部のみでの反応は、特に意味しないものとする。

以下に、本発明に用いるDNAマイクロアレイの製造方法の一実施形態を説明する。

[0023]

１．ゲルを利用したDNAマイクロアレイの製造方法 ＜ゲルに固定化するプローブ＞

[0024] 本発明において、「プローブ」とは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ペプチド核酸（PNA）等の核酸類を示し、場合によりタンパク質、脂質等を含む。これらのプローブは、合成市販品又は生細胞等から得ることができる。例えば、生細胞からのDNAの抽出は、Blinらの方法（Nucleic Acids Res. 3, 2303(1976)）等により、また、RNAの抽出は、Favaloroらの方法（Methods. Enzymol. 65, 718(1980)）等により実施することができる。特に本発明においては、DNAマイクロアレイのゲル表面及びゲル内部で核酸の伸長反応が起こるため、「プローブ」はプライマーとしての機能も同時に有するものである。

[0025] また、プローブとして用いる核酸は、鎖状及び環状のいずれの形状のものであってもよく、限定はされないが、例えば、プラスミドDNA又は染色体DNA、RNA（ウイルスの場合等）等が挙げられる。また、制限酵素若しくは化学的に修飾したまたは切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもで

きる。

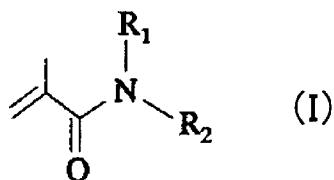
[0026] 後述するように、プローブは、置換（メタ）アクリルアミド誘導体やアガロース誘導体、及び架橋剤との共重合反応により、ゲルの網目構造に固定される。よって、プローブには、共重合反応可能な不飽和官能基が導入されていることが好ましい（以下、修飾プローブという）。不飽和官能基としては、例えば、（メタ）アクリルアミド基、グリシジル基等が挙げられる。不飽和官能基は、プローブ・プライマーの機能を損なわない限り、いずれの部位に導入されていても良い。たとえば、プローブが核酸の場合、不飽和官能基は核酸の末端及び鎖中のいずれに導入されていても良いが、核酸の鎖の末端に導入されていることが好ましい。修飾プローブは、公知の方法により製造でき、例えば、国際公開第02/062817号に記載のごとく製造することができる。

[0027] <DNAマイクロアレイに保持されるゲル>

DNAマイクロアレイを使用する際には反応系全体に核酸増幅反応（PCR等）を行うための熱サイクル処理を加える。そのためゲルは、熱によって、化学的、物理的変化を起こして液相反応液へプローブを溶出しない、融解しない、検出時に検出できないほど形状が変化しないものであれば問題ない。具体的には、PCR反応を実施する際に、反応系全体が94℃前後の温度に達するが、このときゲル自体の融解やゲルに固定されたプローブの溶出がおこらなければ問題ない。

ゲルの作製に用いる単量体（モノマー）は、例えば「置換（メタ）アクリルアミド誘導体」を用いることができる。当該誘導体は、下記一般式（I）で示される化合物をいう。

[0028] [化1]



[0029] [一般式 (I) 中、 R_1 及び R_2 は、互いに独立して、水素原子又は飽和アルキル基を示す。]

一般式 (I) で示される置換 (メタ) アクリルアミド誘導体としては、限定はされないが、例えば、メタクリルアミド (metacrylamide)、N-メチルアクリルアミド (N-methylacrylamide)、N, N-ジメチルアクリルアミド (N, N-dimethylacrylamide)、N-エチルアクリルアミド (N-Ethylacrylamide)、N-シクロプロピルアクリルアミド (N-Cyclopropylacrylamide)、N-イソプロピルアクリルアミド (N-isopropylacrylamide)、N, N-ジエチルアクリルアミド (N, N-Diethylacrylamide)、N-メチル-N-エチルアクリルアミド (N-Methyl-N-Ethylacrylamide)、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド (N-Methyl-N-Isopropylacrylamide)、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミド (N-Methyl-N-n-propylacrylamide) 等が挙げられる。

[0030] ゲルの組成は、特に限定はされないが、例えば、上記の置換 (メタ) アクリルアミド誘導体に加えて、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ) アクリル酸、アリルデキストリン等の単量体も用いることができ、さらには、置換 (メタ) アクリルアミド誘導体の 1 種類または 2 種類以上とメチレンビス (メタ) アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ (メタ) アクリレート等の多官能性単量体を共重合したゲルも用いることができる。その他、例えば、アガロース、アルギン酸、デキストラン、ポリビニルアルコール及びポリエチレングリコール、並びにこれらの誘導体等を含んだゲル、またはこれらを架橋剤により架橋したゲルを用いることができる。

[0031] 架橋剤とは、エチレン性不飽和結合を 2 個以上有する多官能性単量体であ

る。例えば、N, N' -メチレンビスアクリルアミド、N, N' -ジアリル(1, 2-ヒドロキシエチレン)-ビスアクリルアミド、N, N' -シスタミン-ビスアクリルアミド、N-アクリロイルトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、ポリエチレングリコールジメタクリレート等である。好ましくはN, N' -メチレンビスアクリルアミドが用いられる。

[0032] 次に、共重合反応について説明する。

共重合反応の際に使用する修飾プローブは、ゲルの作製に用いる単量体の合計モル数に対して1/10以下のモル数で使用することが好ましいが、前述の熱サイクル処理時の耐性の条件をクリアできる範囲であれば特に制限はされない。

[0033] 共重合反応に使用する架橋剤の量は、ゲルの作製に用いる単量体(置換(メタ)アクリルアミド誘導体等)の合計に対し、モル比(単量体:架橋剤)で8:2~500:1の範囲であることが好ましい。当該モル比が8:2より大きくなるとゲルネットワークが不均一化し、白濁が生じやすく、モル比が500:1以下になるとゲルとしての構造が保てなくなってしまうおそれがある。

[0034] 重合開始剤は、重合反応の際にプローブの分解が顕著に生じないものであればよく、限定はされないが、好ましい重合開始剤は、2, 2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライド、APS(過硫酸アンモニウム)、KPS(過硫酸カリウム)等である。また重合開始剤としてAPSまたはKPSを用いた場合、重合促進剤としてTEMED(テトラメチレンジアミン)を使用することも可能である。

[0035] 重合反応の際の反応温度は、限定はされないが、アゾ系の重合開始剤を用いた場合には40℃以上が好ましい。またAPS、KPSを単独で用いた場合には50℃以上が好ましい。APS、KPSにTEMEDを使用した場合には室温~30℃の範囲が好ましい。

[0036] <ゲル濃度の設定>

上記共重合反応により形成されるゲル中のポリマー濃度(ゲル濃度)は、

ゲルの組成や、検出しようとする核酸のサイズ（塩基長）に対応して適宜調整及び設定することができる。本発明においては、同一アレイ上に複数のゲルの区画（スポット）を設けることもでき、その場合は、同一アレイ上にゲル濃度が異なる複数種のスポットゲルを搭載することができる。

具体的なゲル濃度は、特に限定はされないが、2質量%超かつ5質量%未満であることが好ましく、より好ましくは2.5～4.5質量%、さらに好ましくは2.5～4質量%、特に好ましくは2.8～3.8質量%である。ゲル濃度が当該範囲内である場合は、50塩基以上かつ3000塩基未満の塩基長の核酸を特異的に検出する場合に好ましく、より好ましくは50～2000塩基、さらに好ましくは100～2000塩基、さらにより好ましくは100～1500塩基、特に好ましくは100～1200塩基、最も好ましくは100～1000塩基である。また、上記ゲル濃度の範囲は、ゲルを構成する単量体に、例えばN，N-ジメチルアクリルアミドを含む場合に、特に好適である。

[0037] ＜プローブ固定化ゲルを搭載した基材の作製＞

本発明の核酸検出方法に用いる、プローブ固定化ゲルは、鋳型核酸等を含む反応溶液と接触させて核酸増幅反応（PCR等）を行うことができれば、どのような形態でもよく、限定はされないが、基本的には、何らかの基材に搭載されている形態であることが好ましい。

例えば、ゲルを管状体の中空部に充填することによりゲル保持管状体を作製することもできる。その管状体は、例えば特開平3-47097号公報に記載のごとく、遺伝子変異の検出等のツールとして使用できる。管状体の中空部へのゲルの保持は、キャピラリーゲル電気泳動に使用されるキャピラリーカラムを作製する要領で実施可能である。

[0038] また、ゲル濃度が異なる複数種のゲル（プローブ固定化ゲル）が担持されたマイクロアレイを作製することもできる。例えば、平面基板上に、重合前又は重合開始直後のプローブを含むモノマー溶液（モノマー濃度が異なる複数種のゲル前駆体溶液）を、予め定めた区画にスポットティングすることにより

、DNAマイクロアレイを製造することができる（特表平6-507486号公報、米国特許第5,770,721号明細書参照）。上記基板において、各区画が溝（ウェルを含む）又は貫通孔により形成されている場合は、それら溝又は貫通孔に、重合前又は重合開始直後のプローブを含むモノマー溶液を添加し、区画内で重合反応を実施することにより、上記基板中の溝又は貫通孔にプローブ固定化ゲルが保持された（搭載された）DNAマイクロアレイを作製することができる（特開2000-60554号公報参照）。

[0039] さらには、プローブ固定化ゲルを保持した管状体を複数本、集束し、該集束物を管状体の長手方向に対して交叉する方向で切断して薄片化することを繰り返すことにより、DNAマイクロアレイを作製することができる（国際公開第00/53736号参照）。他方、先に複数の管状体を集束させた後、その集束物の各中空部にゲルを保持してから、上記切断及び薄片化をしても良い。その場合、下記（１）～（４）の工程を順次行うことによりDNAマイクロアレイが製造できる。

- [0040] （１）複数本の管状体をそれらの長手方向が一致するように集束する工程。
- （２）集束物の各管状体の中空部に、ゲル作製に用いる単量体、架橋剤及びプローブを含む溶液を充填する工程。
- （３）中空部内で共重合反応する工程。
- （４）集束物の長手方向と交叉する方向で切断する工程。

[0041] 管状体としては、ガラス管、ステンレス管、中空繊維等が例示できる。特に、加工性、取り扱いの容易さを考慮すると中空繊維を使用することが好ましい。ここで、管状体として中空繊維を用いる場合のマイクロアレイの製造方法としては、具体的には、下記（a）～（d）の工程を順次行う方法が例示できる。

（a）複数本の中空繊維を、中空繊維の各繊維軸が同一方向となるように３次元に配列し、その配列を樹脂で固定することにより、中空繊維束を作製する工程、

（b）プローブを含む、モノマー濃度が異なる複数種のゲル前駆体溶液を、

中空繊維束の各中空繊維の中空部に導入する工程、

(c) 前記中空部に導入したゲル前駆体溶液を反応（共重合反応）させ、プローブを含むゲル状物（プローブ固定化ゲル）を中空繊維の中空部に保持する工程、及び

(d) 中空繊維束を繊維の長手方向に対して交叉する方向で切断して薄片化する工程。

以上のようにして、多数の中空繊維を配列させた中空部に、プローブ（プローブ核酸等）が固定化されたゲルを保持したDNAマイクロアレイを作製することができる。

[0042] <DNAマイクロアレイの使用方法>

引き続き、前述したDNAマイクロアレイの使用方法について以下に説明する。

DNAマイクロアレイの作製後は、以下の(a)～(d)の手順に従って核酸の検出を行うことができる。

(a) 前述したプローブ固定化ゲルと、検体（核酸増幅の鋳型となる核酸）並びに核酸増幅用プライマーセット、ヌクレオチド単体及びDNA伸長酵素を含む反応溶液とを接触させる工程。当該工程において、プローブ固定化ゲルは、DNAマイクロアレイ等の基材に保持された状態であってもよいし、当該基材等に保持されていない状態であってもよい。

(b) 上記ゲル及び反応溶液に、核酸増幅反応（PCR等）を行うための所定の熱サイクル処理を加える工程。当該工程において、上記ゲルがDNAマイクロアレイ等の基材に保持された状態におけるゲルである場合は、熱サイクル処理を加える対象は、通常、反応溶液と接触させたDNAマイクロアレイ等の全体（ひいては反応系全体）となる。

(c) 増幅された核酸断片のうち、特定の塩基長の核酸断片を選別する工程。当該工程でいう特定の塩基長の核酸断片の選別は、ゲル濃度に依存したプローブ固定化ゲルの分子ふるい効果による核酸断片の選別を意味する。よって、当該選別は、核酸増幅反応後に、プローブ固定化ゲルの特性によりなさ

れる工程である。

(d) 選別された核酸断片を検出する工程。

以下、上記核酸検出の方法について詳細に説明する。

[0043] <核酸増幅の鋳型となる核酸（検体）>

反応溶液に含まれる核酸増幅の鋳型となる核酸は、具体的には検体として使用するものである。

まず、核酸が含有した液体を用意する。この溶液は熱サイクル処理時に反応が阻害されなければ、精製されていてもいなくとも構わない。精製する場合は生物試料等を採取し核酸を抽出する。生体成分から核酸を抽出する方法としては、例えばフェノール抽出、エタノール沈殿の他、任意の抽出方法を使用し得る。mRNAを抽出する場合には、オリゴdTカラムにかけてもよい。必要があれば更にDNAもしくはRNAに分離精製する。より具体的には、例えばある特定の生物のゲノムDNA、または転写産物（mRNA）もしくはこれを逆転写したcDNA、1種類以上の生物のゲノムDNA混合物、転写産物（mRNA）の混合物等を含む。さらにこれらに対し酵素処理を行ったものや化学物質の作用を行ったものも含む。

[0044] これらの核酸を鋳型にして、核酸増幅反応により、ある領域の核酸断片を増幅させる、または、ある特定の生物にしか含まれない核酸断片を増幅させる、もしくは特定の遺伝子の発現量（mRNA）を定量する等を行うことができる。核酸の増幅方法としてはPCR法、LAMP法、ICAN法、TRC法、NASBA法、PALSAR法など様々な方法があり、なかでもPCR法が好ましいが、核酸の検出上特に問題が生じなければいずれの方法も核酸増幅反応に用いることができる。

[0045] <核酸増幅用プライマーセット>

通常、検出しようとする核酸配列（核酸断片）はあらかじめ決定しておく。すなわち、この時点で検出しようとする核酸の鎖長と領域を決定しておき、その鎖長の核酸が通過できるゲルの組成・濃度もあらかじめ決めておく。核酸増幅用のプライマーセットは液相の反応液に混合しておくこともDNAマ

マイクロアレイのスポットにプローブとともに固定しておくこともできる。プローブ（プライマーとしても機能する）となるオリゴヌクレオチドの塩基配列が、増幅させる配列（プライマーセットで挟まれる領域）の内部に含まれるようにプライマーセットを決定する。プライマーは通常、20～50ヌクレオチド程度の長さで設定し、増幅させる遺伝子領域1つに対して通常フォワードプライマーとリバースプライマーの2種（1組）、もしくはそれ以上（1組以上）のプライマーを必要とする。

[0046] 本発明を実施するためには、この1組以上のプライマーを混在させておき、その増幅産物とハイブリダイゼーションする特異的な塩基配列を有する1種類以上のプローブが、固定化されていることが必要である。

ここで、1組のプライマーに対して複数の遺伝子領域を増幅させることができるような配列を選択するとより反応系が簡単になる。具体的には、例えば、複数の生物の16S rRNAの配列を比較し、共通した領域にプライマー（1組）を設計し、生物種ごとにそのプライマーで挟まれる内部に個々の生物種を検出するためのプローブを設計する場合等が挙げられる。

さらに、後の検出が容易になるように、使用するプライマーセットはあらかじめその末端を蛍光物質（cy3、cy5等）やビオチンなどであらかじめ標識しておくといよい。標識方法は特に限定されず、増幅反応において著しく反応が阻害されるなどの現象がみられなければ、どのような方法でもよい。

[0047] <ヌクレオチド単体>

ヌクレオチド単体は、通常増幅反応で用いるデオキシヌクレオチド三リン酸等が挙げられる。これもプライマーセットと同様、後の検出が容易になるような誘導体を用いることも可能であるが、増幅反応を阻害しないものを使用することが好ましい。

[0048] <DNA伸長酵素、その他>

DNA伸長酵素は、通常のPCR法に用いられるものと同様に、耐熱性細菌に由来するDNAポリメラーゼであるTaq DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ等を使用できる。

使用可能な具体的な酵素やキットとしては、Hot StarTaq DNA Polymerase (QIAGEN社製)、PrimeStarMax DNAポリメラーゼ (タカラバイオ社)、Speed STAR HS DNAポリメラーゼ (タカラバイオ社)、KOD-Plus-Neo (東洋紡社)、KAPA2G FastHotStartPCRキット (日本ジェネティックス (株) 社) 等が挙げられる。

[0049] <熱サイクル処理>

検体 (検体核酸) を含む反応溶液を、DNAマイクロアレイ等に保持されたプローブ固定化ゲルに接触させた後、PCR等の核酸増幅反応を行うための所定の熱サイクル処理を、当該DNAマイクロアレイ等を含む反応系全体に加える。ここで、プローブ固定化ゲルに反応溶液を接触させることは、反応溶液にプローブ固定化ゲル (すなわち当該ゲルが保持されたDNAマイクロアレイ等) を浸漬することでもよいし、プローブ固定化ゲル (あるいは当該ゲルが保持されたDNAマイクロアレイ等) に反応溶液を供給することでもよく、限定はされない。

ここで、本発明においては、個々の区画のプローブ固定化ゲルにおける、当該ゲルと反応溶液との接触表面積 (反応溶液に接触する当該ゲルの表面積) ($S(\mu\text{m}^2)$) は、当該ゲルの体積 ($V(\mu\text{m}^3)$) に対して大きすぎないことが好ましく、大きすぎる場合はゲルの分子ふるい効果 (ゲル自身が核酸分子のサイズを選別する効果) が十分に発揮されないおそれがある。例えば、前掲の非特許文献6 (Gennady Yershov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 4913-4918, May 1996) や非特許文献7 (A. Yu. Rubina et al., Analytical Biochemistry, Vol. 325, pp. 92-106, 2004) に記載の技術においては、ゲルの形状をより扁平にして拡散効率を高くする (反応溶液に対する接触面積を極力増加させ、ゲルの網目構造を大きくする) ことがなされているが、これによりハイブリダイゼーションに要する時間は短縮できるものの、ハイブリダイズする核酸分子がゲル中で短時間で飽和に達してしまうため、ゲルの分子ふるい効果は殆ど発揮されない。これに対し、本発明は、ゲルと反応溶液との接触表面積 ($S(\mu\text{m}^2)$) に対する当該ゲルの体積 ($V(\mu\text{m}^3)$)

)) の比率 (すなわち、Vの値をSの値で除した値 (V/S)) が、限定はされないが、例えば50以上であり、好ましくは75以上、より好ましくは100以上、さらに好ましくは125以上である。V/Sの値が当該範囲内となるように、プローブ固定化ゲルの形状を設計する、特に基板への保持形態 (搭載形態) を設計することにより、ゲルの分子ふるい効果を十分に発揮させることができ、ひいては目的の塩基長の核酸の検出特異性をより高めることができる。

なお、DNAマイクロアレイ等と反応溶液の両方を入れる容器としては、一度に多数のサンプルを処理できること、DNAマイクロアレイ等が入る程度の大きさのウェルをもつこと等を考えると、例えば96ウェルプレート形状のものでその寸法はSBS基準に準拠したものが好ましい。96ウェルプレートの各ウェルは、角型、丸型のどちらでもよい。

[0050] また、ウェルプレートの底面は熱伝導性を維持するため、ヒートシンクと接する下面の高低差が限りなく0に近く、厚みは薄いものが好ましい。また、耐熱性としては103℃以上で変形が起こらなければ特に問題は無い。このような条件を満たすウェルプレートの底部の厚みは、限定はされないが、0.05mm~0.5mmのものが好ましく、より好ましくは0.1mm~0.4mm、更に好ましくは0.15mm~0.35mmである。当該厚みが上限値を超えると熱伝導性が悪くなる恐れがあり、下限値未満では底部にウェルプレートにゆがみを生じる恐れがある。

[0051] ウェルプレートは、反応後に光学的な手法による検出を行うことを考慮すると、底面は透明性が高いほうが好ましい。他方、上面は封止のために蓋又はシールを用いることが好ましい。蓋又はシールの材質は反応系に悪影響を及ぼさないものであれば良い。また、適用する反応に際して与えられる温度で変形や不純物溶出等を生じない程度の耐熱性および耐薬品性等を有するものであればよい。上面から光学的測定器で測定する場合は、例えば、リアルタイムPCR用に販売されている粘着シール等を用いることができる。

[0052] ウェルプレートの材質としては熱可塑性樹脂が好ましく、蛍光発生量の少な

いものを用いることができる。蛍光発生量の少ない樹脂を用いることにより検出時のバックグラウンドを低下させることができるため、検出感度をさらに向上させることができる。蛍光発生量の少ない熱可塑性樹脂としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン等の直鎖状ポリオレフィン；環状ポリオレフィン；含フッ素樹脂；等を用いることができる。これらの中でも、飽和環状ポリオレフィンは、耐熱性、耐薬品性、低蛍光性、透明性および成形性に特に優れるため、ウェルプレートの材質として好ましく用いられる。市販の96ウェルプレートとしては、例えば、Aurora Biotechnologies社の96-IQプレート等を用いることができる。

[0053] 本検出方法で行う熱サイクル処理の温度制御の方法について説明する。当該温度制御は、例えば、任意の温度に調節された熱板（ヒートブロック）にウェルプレートの底面を接触させることにより、反応溶液の温度を制御することが可能である。別の態様としては、複数の熱板（ヒートブロック）を各々所定の温度状態に予め制御しておき、その上をウェルプレートが順次移動していくという方法により、格段に速く反応溶液の温度調整を行うことも可能となる。また、熱板（ヒートブロック）はウェルプレートの下方のみでなく上方からも接触させることで、より短時間で反応溶液の温度調節・温度制御をすることができる。

[0054] 本検出方法の熱サイクル処理に用いる温度制御装置は、市販のサーマルサイクラーを用いることもできるが、ウェルプレートをそのままセットできるものが好ましい。例えば、GeneAmp 9600やGeneAmp 9700（ライフテック社）、T Professionalシリーズ（バイオメトラ社）などを用いることができるが、熱伝導性、蓋の形状について問題が生じなければどのような型式のものであってもよい。また、DNAマイクロアレイや反応液を入れるウェルプレートがサーマルサイクラーに入らない深さ（厚み）である場合には、上面部分を削り、深さを浅くして厚みを薄くしたウェルプレートを用いることもできる。

[0055] <増幅産物の検出方法>

増幅産物（増幅され且つゲルの分子ふるい効果により選別された核酸断片）の検出方法としては、例えば、蛍光物質や発光物質を標識基質として使用し、発色測定や蛍光強度測定による方法、あるいは目視による方法を用いることができる。具体的には、フルオロイメージングアナライザーやCCDカメラ等を用いて増幅産物の有無及び定量を行うことができる。また、望ましくは、近年多用されつつあるPCR反応随時定量装置（Real Time PCR装置）等を用いて、スポットごとに蛍光量を経時的にモニタリングすることで、より信頼性の高い核酸の定量ができる。さらに、酵素反応を利用する又は利用しない発色試薬等を用いてゲル上で発色を行うこともできる。このような場合は、目視でDNAマイクロアレイ上の検出スポットの位置を判定することや、光学スキャナーでスキャンすることが可能である。

[0056] 本発明におけるDNAマイクロアレイの使用方法の一実施形態を、図1及び図2に示す。図1左上は、7mm角のDNAマイクロアレイ、図1右は、角型96ウェルプレートに7mm角のDNAマイクロアレイが96枚収納されている図である。また図2は、これをサーマルサイクラーに収納した図である。サーマルサイクラーで熱サイクル処理を行った後、ウェルプレートを取り出して、その上面または下面からCCDカメラで即座に検出することが可能である。

[0057] 引き続き、本発明の核酸の検出方法の原理について説明する。ゲル利用DNAマイクロアレイをウェルプレートのウェルに入れ、その後、ウェル内に反応溶液を加えて、反応溶液にDNAマイクロアレイを接触または浸漬させ、その後、熱サイクル処理を行うことによりPCR等の核酸増幅反応を実施することができる。

当該反応は、DNAマイクロアレイ及び反応液全体を、あらかじめ最適化された各温度で、「変性→アニーリング→複製」の3段階、または「変性→アニーリング・複製」の2段階の熱サイクル処理による反応を繰り返すことにより行う。

[0058] 図3に示したように、熱サイクル処理の初期段階では、主に液相（反応溶液

中)において核酸増幅反応(PCR)が起こる。これと同時に、一部の増幅産物(標的となる核酸断片)が、スポットゲルに固定化されたプローブDNAとハイブリダイズする。この際、ゲノムDNAのような大きなサイズの核酸や、非特異的に増幅した核酸のうちゲル内部に拡散できないような大きなサイズのものは排除されており、次の段階に進むことができない(図4)。また、スポットのゲル濃度は、前述の通り、検出目的の核酸のサイズ(塩基長)に対応して、すなわちゲルの内部に拡散させるべき核酸の大きさを考慮して設定されている。

続いて、反応溶液中に含まれているDNAポリメラーゼにより標的DNAを鋳型としてプローブDNAの伸長反応が起こる。当該伸長反応により、液相中のプライマーDNAがハイブリダイゼーションできる領域ができる(図5右上及び右下)。

[0059] その後、加熱することにより2本鎖DNAが解離すると同時に、伸長したプローブ(プライマー)末端に液相中からのプライマーがアニールし、逆側の鎖の増幅反応が進行する。逆側の鎖は、プローブ配列の3'末端部分までしか鋳型がないため中途半端な長さで合成が終了するが、その後の加熱により一部液相中へ拡散し、核酸増幅反応(PCR)の鋳型、プライマーとしての役割も果たすことができる(図5下)。

このようなステップを繰り返し行うことで、DNA増幅及びゲルに固定化したプローブDNAの伸長、増幅産物(増幅核酸断片)のハイブリダイゼーション、液相中での核酸増幅反応(PCR)が同時に進行する。

はじめに液相中に入れておくプライマーの末端を蛍光物質等で標識しておけば、検出時にこの標識の有無を検出する、または定量することにより標的DNAの検出、定量を行うことができる。

[0060] 特に本発明においては、図4に示したように核酸増幅反応(PCR)時に予期せぬ増幅産物が生じて、ゲルの分子ふるい効果によって目的のサイズ以上の核酸がゲル内部に拡散しにくくハイブリダイゼーションしにくいいため、バックグラウンドの低減及び特異性の向上が図られている。本発明のDNA

マイクロアレイは核酸の有無を判定する場合において、明確な検出結果が得られやすいという特長を有する。

以上においては、一実施形態として特にPCR法を例に挙げて説明したが、SNP検出用の反応系でより適した核酸増幅方法であれば、PCR法に限らず適用することも可能である。

[0061] 本発明の核酸の検出方法は、例えば一塩基遺伝子多型（SNP）の解析、マイクロサテライト解析、染色体異常解析（CGH：Comparative Genomic Hybridization）、機能未知（nc）RNA探索などの遺伝子解析用基本ツールへの適用；これらツールを使用した臓器・疾患別遺伝子発現解析チップ、変異原性試験キット（環境ホルモン）、遺伝子組換え食品検査キット、ミトコンドリア遺伝子配列解析キット、親子鑑定・犯罪捜査のための解析キット、先天性疾患解析キット、染色体・遺伝子異常解析キット、遺伝子診断（着床前・出生前）キット、薬物反応関連遺伝子多型解析キット、脂質代謝関連遺伝子多型解析キット、耳鼻科・眼科領域遺伝子多型解析キットなどの用途別カスタムチップへの適用；ガン予後予測チップ、医薬品開発（臨床・創薬）用チップ、健康食品開発用チップなどの診断・臨床用カスタムチップへの適用；微生物限度試験や食品飲料水中の微生物検査などの薬品・食品製造工程、及びう蝕・歯周病関連菌の検出、日和見感染菌の検出などの歯科領域の臨床検査、および食品工場・厨房施設環境検査、飲料・公衆浴場、井戸水などの水質検査における環境検査、および感染症・食中毒の予防、会社従業員の衛生管理などの保健衛生、および耐性菌を含む一般細菌同定、肝炎ウイルス、ヘリコバクターピロリ、肝炎クラミジア菌、エイズウイルス、SARSウイルス、ウエストナイルウイルス、ノロウイルス（生カキ由来の食中毒）、インフルエンザウイルス、真菌・カビなどの臨床検査などの微生物同定検査キットへの適用などが挙げられる。

以下に、実施例を挙げて本発明具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

[0062] 1. ゲル保持DNAマイクロアレイの作製（複数のゲル濃度が異なるスポットを有するDNAマイクロアレイの作製）

DNAマイクロアレイを以下のようにして製造した。

1-1. プローブの調製

まず、プローブとなる配列番号1記載のオリゴヌクレオチドを調製した。この際、オリゴヌクレオチドの5'末端にアミノヘキシル基が導入されたオリゴヌクレオチドを調製した。次いで、そのオリゴヌクレオチドに、無水メタクリル酸を反応させ、さらにHPLCで精製、分取することにより、下記の配列番号1で示される塩基配列を有する5'末端ビニル化オリゴヌクレオチド（プローブ（プライマーとしても機能する））を取得した。

[0063] 5' -AGGAKGTTGGCTTAGAAGCAGCCA-3' （配列番号1）

（省略記号Kは、グアニン(G)又はチミン塩(T)を表す。）

[0064] このオリゴヌクレオチドはセレウス菌の23SリボソーマルDNA配列（23SリボソーマルRNAをコードするゲノムDNA配列）の一部分とハイブリダイズすることができる。

[0065] 1-2. 中空繊維束薄片シート（DNAマイクロアレイ）の製造

図6に示す配列固定器具を利用して、中空繊維束を製造した。なお、図6中のx、y、zは直交の3次元軸であり、x軸は繊維の長手方向と一致する。

[0066] 図6を参照して、直径0.32mmの孔11が、孔の中心間距離を0.42mmとして、縦12列横各9列で合計108個設けられた厚さ0.1mmの多孔板21、2枚を準備した。これらの多孔板を重ね合わせて、そのすべての孔に、ポリカーボネート中空繊維31（三菱エンジニアリングプラスチック社製、カーボンブラック1質量%添加）を1本ずつ、通過させた。

[0067] X軸方向に各繊維に0.1Nの張力をかけた状態で2枚の多孔板の位置を移動させて、中空繊維の一方の端部から20mmの位置と100mmの位置の2ヶ所に固定した。即ち、2枚の多孔板の間隔を80mmとした。

次いで、多孔板間の空間の周囲3面を、板状物41で囲った。このようにして上部のみが開口状態にある容器を得た。

[0068] 次に、この容器の上部から容器内に樹脂原料を流し込んだ。樹脂としては、ポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業（株）製、ニッポラン4276、コロネート4403）の総重量に対し、2.5質量%のカーボンブラックを添加したものを使用した。25℃で1週間静置して樹脂を硬化させた。次いで、多孔板と板状物を取り除き、中空繊維束を得た。

[0069] ゲル前駆体重合性溶液として、下記表1に示す質量%、濃度で混合した溶液を調製した。核酸プローブとしては、前述の配列番号1で示されるオリゴヌクレオチド1種類を用い、ゲル前駆体重合性溶液は5種類調製した。プローブを搭載しない箇所については核酸プローブの代わりに水を使用した。各スポットとゲル濃度、プローブ配置図を図7に示した。図7中、薄い色から濃い色で色分けしている区域はゲル濃度の違いを示す。また「P」で示した箇所には核酸プローブが固定化され、「B」で示した箇所はゲルのみで核酸プローブを含んでいない。

[0070] [表1]

ゲル濃度(質量%)	10.00%	5.00%	3.80%	2.80%	2.00%
N, N-ジメチルアクリルアミド(モノマー) 質量%	9.00%	4.50%	3.42%	2.52%	1.80%
N, N-メチレンビスアクリルアミド(架橋剤) 質量%	1.00%	0.50%	0.38%	0.28%	0.20%
2, 2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライド(VA-044: 開始剤) 質量%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
ミQ水 質量%	89.99%	94.99%	96.19%	97.19%	97.99%
モノマー/架橋剤(モル比)	14/1	14/1	14/1	14/1	14/1
核酸プローブ(終濃度)	5pmol/μl	5pmol/μl	5pmol/μl	5pmol/μl	5pmol/μl

[0071] 次に、核酸プローブを含むゲル前駆体重合性溶液をデシケーター内に設置した。デシケーター内を減圧状態にしたのち、中空繊維束の繊維束が固定されていない一方の端部をこの溶液中に浸漬した。デシケーター内に窒素ガスを封入し、中空繊維の中空部に核酸プローブを含むゲル前駆体重合性溶液を導入した。次いで、容器内を50℃とし、3時間かけて重合反応を行った。

このようにして核酸プローブがゲル状物を介して中空繊維の中空部に保持された中空繊維束を得た。

[0072] 次に、得られた中空繊維束を、ミクロトームを用いて繊維の長手方向と直

交する方向で適当な枚数だけスライスし、厚さ0.25mmの薄片シート（DNAマイクロアレイ）を300枚得た（図1左上参照）。

個々の区画のプロープ固定化ゲルにおける、ゲルと反応溶液との接触表面積（ $S(\mu\text{m}^2)$ ）に対する当該ゲルの体積（ $V(\mu\text{m}^3)$ ）の比率（すなわち、 V の値を S の値で除した値（ V/S ））は、本実施例では図1左下に示したように、125であった。

[0073]

2. ゲルの分子ふるい効果を利用した特異性向上の確認

2-1. 鎖長サイズが異なるテンプレートDNAの作製

住商ファーマインターナショナル株式会社のATCC分譲サービスを利用して、セレウス菌のゲノムDNAを購入し（受託番号：ATCC 14579）、PCR反応のテンプレートに用いた。

マイクロアレイに搭載させたプロープ配列（すなわち、5'-AGGAKGTTGGCTT AGAAGCAGCCA-3'（配列番号1））と、セレウス菌の23SリボソーマルDNA配列（23SリボソーマルRNAをコードするゲノムDNA配列）由来の塩基配列とを内部に含む、4種の塩基長の核酸断片が得られるように、上記テンプレートに対する4組のプライマーを設計した。

以下に、設計した4組のプライマーセット（フォワード(F)プライマー及びリバーズ(R)プライマー）を示した。

[0074] 「123bpのPCR産物を得るためのプライマー」

・Fプライマー(i)

PrimerFP123bp_cereus : 5'-GTATTAAGTGGAAAAGGATGTGGAGTTGC-3'（配列番号2）

・Rプライマー(i)

PrimerRP123bp_cereus : 5'-CCGGTACATTTTCGGCGCAGAGTC-3'（配列番号3）

[0075] 「413bpのPCR産物を得るためのプライマー」

・Fプライマー(ii)

PrimerFP413bp_cereus: 5' -AACTCCGAATGCCAATGACTTATCCTTAG-3' (配列番号4)

・Rプライマー(ii)

PrimerRP413bp_cereus : 5' -AGCCTTCCTCAGGAAACCTTAGGCA-3' (配列番号5)

[0076] 「827bpのPCR産物を得るためのプライマー」

・Fプライマー(iii)

PrimerFP827bp_cereus: 5' -AACTCCGAATGCCAATGACTTATCCTTAG-3' (配列番号6)

・Rプライマー(iii)

PrimerRP827bp_cereus: 5' -TTCCTGCGGCTTCCGTTAAGAAAGCA-3' (配列番号7)

[0077] 「1191bpのPCR産物を得るためのプライマー」

・Fプライマー(iv)

PrimerFP1191bp_cereus: 5' -AACTCCGAATGCCAATGACTTATCCTTAG-3' (配列番号8)

・Rプライマー(iv)

PrimerRP1191bp_cereus: 5' -CCGCCTATCCTGTACAACTGTACCAA-3' (配列番号9)

[0078] セレウス菌の23SリボソーマルDNA配列(23SリボソーマルRNAをコードするゲノムDNA配列)は、米国生物工学情報センター、NCBI; National Center for Biotechnology Informationにより提供されるGenBankデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)においてAccession No.: AJ310099.1として登録)を利用した。以下に、セレウス菌の23SリボソーマルDNA配列(23SリボソーマルRNAをコードするゲノムDNA配列; 配列番号10)の塩基配列を示す。当該塩基配列中、二重下線を付けた塩基配列はプローブ(配列番号1)とハイブリダイゼーション可能な配列である(二本鎖であるため逆鎖(相補鎖)がハイブリダイゼーションする)。

[0079] 「Bacillus cereus AJ310099.1 23S rRNA gene」 (配列番号 1 O) :

CACGGTGGATGCCTTGACACTAGGAGTCGATGAAGGACGGGACTAACGCCGATATGCTTCGGGGAGCTG
TAAGTAAGCTTTGATCCGAAGATTTCCGAATGGGGAAACCCACTATACGTAATGGTATGGTATCCTTAC
CTGAATACATAGGGTATGGAAGACAGACCCAGGGAACTGAAACATCTAAGTACCTGGAGGAAGAGAAAG
CAAATGCGATTTCTGAGTAGCGGCGAGCGAAACGGAATCTAGCCCAAACCAAGAGGCTTGCCTCTTGG
GGTTGTAGGACATTCTATACGGAGTTACAAAGGAACGAGGTAGACGAAGCGACCTGGAAAGGTCCGTCTG
TAGAGGGTAACAACCCCGTAGTCGAAACTTCGTTCTCTCTTGAATGTATCCTGAGTACGGCGGAACACG
TGAAATTCCGTCTGGAATCTGGGAGGACCATCTCCCAAGGCTAAATACTCCCTAGTGATCGATAGTGAAC
CAGTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAGCACCCCGGAAGGGGAGTGAAAGAGATCCTGAAACCGTGTGCCT
ACAAATAGTCAGAGCCCGTTAATGGGTGATGGCGTGCCTTTTGTAGAATGAACCGGCGAGTTACGATCC
CGTGCAAGGTTAAGTTGAAGAGACGGAGCCGCAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGTTTAGTACGTGG
TCGTAGACCCGAAACCAGGTGATCTACCCATGTCCAGGGTGAAGTTCAGGTAACTGAATGGAGGCCC
GAACCCACGCACGTTGAAAAGTGCGGGGATGAGGTGTGGGTAGCGGAGAAAATCCAATCGAACCTGGAG
ATAGCTGGTTCTCCCGAAATAGCTTTAGGGCTAGCCTTAAGTGTAAGAGTCTTGGAGGTAGAGCACTG
ATTGAACTAGGGGTCTCATCGGATTACCGAATTCAGTCAAACTCCGAATGCCAATGACTTATCCTTAG
GAGTCAGACTGCGAGTGATAAGATCCGTAGTCAAGAGGGAAACAGCCAGATCGCCAGCTAAGGTCCCA
AAGTGTGTATTAAGTGGAAGGATGTGGAGTTGCTTAGACAACTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA
CCATTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTGACTCTGCGCCGAAAATGTACCGGGGCTAAATA
CACCACCGAAGCTGCGAATTGATACCAATGGTATCAGTGGTAGGGGAGCGTTCTAAGTGCAGTGAAGTC
AGACCGGAAGGACTGGTGGAGCGCTTAGAAGTGAGAATGCCGGTATGAGTAGCGAAAGACGGGTGAGAA
TCCCGTCCACCGAATGCCTAAGGTTTCCTGAGGAAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCAGGACCTAAGC
CGAGGCCGACAGGCGTAGGCGATGGACAACAGGTTGATATTCCTGTACCACCTCTTTATCGTTTGAGCA
ATGGAGGGACGCAGAAGGATAGAAGAAGCGTGCGATTGGTTGTGCACGTCCAAGCAGTTAGGCTGATAA
GTAGGCAAATCCGCTTATCGTGAAGGCTGAGCTGTGATGGGGAAGCTCCTTATGGAGCGAAGTCTTTGA
TTCCCGCTGCCAAGAAAAGCTTCTAGCGAGATAAAAGGTGCCTGTACCGCAAACCGACACAGGTAGGC
GAGGAGAGAATCCTAAGGTGTGCGAGAGAACTCTGGTTAAGGAACTCGGCAAAATGACCCCGTAACTTC
GGGAGAAGGGGTGCTTTCTTAACGGAAAGCCGCAGTGAATAGGCCCAAGCGACTGTTTAGCAAAAACAC
AGGTCTCTGCGAAGCCGTAAGGCGAAGTATAGGGGCTGACACCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAAGGAGA

GGGGTTAGCGTAAGCGAAGCTCTGAACTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACATAACGGTCCTAA
 GGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCCGCACGAAAGGTGTAACGATTTGGGCACTGTCTCA
 ACCAGAGACTCGGTGAAATTATAGTACCTGTGAAGATGCAGGTTACCCGCGACAGGACGGAAAGACCCC
 GTGGAGCTTTACTGTAGCCTGATATTGAATTTTGGTACAGTTTGTACAGGATAGGCGGGAGCCATTGAA
 ACCGGAGCGCTAGCTTCGGTGGAGGCGCTGGTGGGATACCGCCCTGACTGTATTGAAATTCTAACCTAC
 GGGTCTTATCGACCCGGGAGACAGTGTGAGGTGGGCAGTTTGAAGTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAGTGTA
 ACGGAGGCGCCCAAAGGTTCCCTCAGAATGGTTGGAAATCATTGCTAGAGTGCAAAGGCATAAGGGAGC
 TTGACTGCGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGGCTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGA
 AGGGCCATCGCTCAACGGATAAAAGCTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTCCACATC
 GACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTGCGCTCATCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCAAGGGTTGG
 GCTGTTGCGCCATTAAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTGAGAACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCCG
 TCGTGGGCGTAGGAAATTTGAGAGGAGCTGTCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACGCACCGCTGGT
 GTACCAGTTGTTCTGCCAAGGGCATAGCTGGGTAGCTATGTGCGGAAGGGATAAGTGCTGAAAGCATCT
 AAGCATGAAG

[0080] <PCR反応>

セレウス菌ゲノムDNA 50 ng/μLをテンプレートとし、前記4組のプライマーセットをそれぞれ用いてPCR反応を行った。PCR反応にはAmpDirectキット（島津製作所）を用いた。

[0081] <PCR反応液組成>

セレウス菌ゲノムDNA溶液 (50ng/μL)	1 μL
Fプライマー(i)~(iv) (20 μM)	0.5 μL
Rプライマー(i)~(iv) (20 μM)	0.5 μL
2×AmpDirect buffer	50 μL
BioTaq (AmpDirectキット付属)	1 μL
MilliQ水	47 μL
合計	100 μL

[0082] PCR反応にはGeneAmp 9600サーマルサイクラーを用いた。温度条件を以下に

示した。

[0083] <PCR 反応温度条件>

95°C 10分間

(94°C 30秒、64°C 1分、72°C 30秒) ×35サイクル

72°C 1分間

4°C 反応終了後維持

[0084] 反応後にキアゲン社のMinElute PCR purification kitを用いて精製し、14 μL で溶出した。その後、アジレント社のバイオアナライザーを用いて電気泳動を実施したところ目的の大きさのPCR産物を確認することができた。図8に電気泳動結果と各産物の内部のプローブ配列に対応する位置の模式図を示した。図8中、レーンLはサイズマーカーであり、レーン1～4は、それぞれ順に、123bp、413bp、827bp及び1191bpのPCR産物である。

得られたPCR産物の吸光度を測定して濃度を計算し、すべて5fmol/ μL に濃度を調整した。

[0085] 2-2. ゲルを保持したDNAマイクロアレイでのPCR反応

中空繊維を利用したゲル保持DNAマイクロアレイ（図1左も参照）を、切削加工により8mmの厚みにしたAurora Biotechnologies社の96-IQプレートのウェルの1つに入れ、さらに、以下の組成のPCR反応液100 μL を加えた。

[0086] <PCR 反応液組成>

123bp PCR産物溶液 (5fmol/ μL)	1 μL
5' 末端cy5標識Fプライマー(i) (20 μM)	0.5 μL
5' 末端cy5標識Rプライマー(i) (20 μM)	0.5 μL
2×AmpDirect buffer	50 μL
BioTaq (AmpDirectキット付属)	1 μL
MilliQ水	47 μL

合計 100 μ L

[0087] 反応液を加えたのち、リアルタイムPCR用の粘着シール（ABI PRISM Optical Adhesive Covers、アプライドバイオシステムズ社 #4311971）で上部をシールし、反応液が漏れないようにした。

引き続き、サーマルサイクラーGeneAmp 9700（0.2 mLブロック）に96ウェルプレートセットした。セットする際は、当該ウェルプレートの底面と同じ大きさ（11.5 × 7.5 cm）の0.8 mm厚アルミ板を置き、その上に当該ウェルプレートを置いた。さらに、Microseal 'P+' シーリングパッド（バイオ・ラッド社製）をのせ、位置がずれないようにゆっくりと蓋をスライドさせてレバーを下げ、上から押された状態が維持されるようにした。

[0088] サーマルサイクラーのプログラムは、以下のとおりの温度設定で設定し、反応系全体が熱サイクル処理されるようにした。合計40サイクルの熱サイクルプログラムを実施した。

[0089] <熱サイクル処理>

94°C 7分間

(92°C 30秒、60°C 1分、72°C 1分) × 20サイクル

(92°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒) × 20サイクル

4°C 反応終了後維持

[0090] PCR反応終了後、装置からウェルプレートを取り出し、PCR反応液全量をピペッティングにより除き、キアゲン社のMinElute PCR purification kitを用いて精製し14 μ Lで溶出した。濃度を測定したところ156 nmol/ μ Lであった。

DNAマイクロアレイは、TN buffer 200 μ Lで2回ピペッティングによりすすいだ後、粘着シールをして50°C、20分間放置した。その後、TN buffer 200 μ L全量をピペッティングにより除き、TN buffer 200 μ Lで2回

ピペティングによりすすいだ後、全量を除き、TN buffer 100 μ Lを加えて検出操作へ進んだ。

検出操作は、冷却CCDカメラ方式のDNAマイクロアレイ自動検出装置を用いた。DNAマイクロアレイをウェル上部から露光時間1秒間で撮像し、各スポットにおけるcy5の蛍光シグナルを検出した。その検出結果を図9に示した。

[0091] スポットの蛍光強度をスポット内の蛍光強度の中央値として定量化したところ、ゲル濃度依存的な蛍光強度を示した。図9のグラフ中、右端のB-Medはブランクスポットの蛍光強度である。ブランクスポットの蛍光強度+ブランクスポットの標準偏差の2倍をカットオフ値として、検出できているかどうか判定した。その結果123bpではかろうじてすべてのゲル濃度のスポットで検出できていると判断された。しかしながら2質量%ゲルではスポットからの脱落、ゲルの形状不良により、蛍光強度に大きなバラツキが観察された。

[0092] この結果より、ゲルの分子ふるい効果を利用して、検出しようとする核酸の大きさに対応したゲル濃度に設定したスポットを配置することにより、ゲル濃度依存的に蛍光強度が低下しておりサイズによる選択が観察された。

プローブでの核酸の選別、ゲル濃度依存的な核酸サイズの選別という二重の作用により、平板状のアレイと比較し、更に特異的な検出が可能なDNAマイクロアレイを提供できることが分かった。

実施例 2

[0093] 実施例1の2-2. 項（ゲルを保持したDNAマイクロアレイでのPCR反応）において、PCR反応液組成を以下の組成に変更する以外は、実施例1と同様の操作を実施した。

[0094] <PCR反応液組成>

413bp PCR産物溶液 (5fmol/ μ L)	1 μ L
5' 末端cy5標識Fプライマー(ii) (20 μ M)	0.5 μ L

5' 末端cy5標識Rプライマー(ii) (20 μ M)	0.5 μ L
2×AmpDirect buffer	50 μ L
BioTaq (AmpDirectキット付属)	1 μ L
MilliQ水	47 μ L
合計	100 μ L

[0095] 実施例 1 と同様に、PCR 反応終了後、装置からウェルプレートを取り出し、PCR 反応液全量をピペティングにより除き、キアゲン社のMinElute PCR purification kitを用いて精製し14 μ Lで溶出した。濃度を測定したところ401 nmol/ μ Lであった。

実施例 1 と同様に、各スポットにおけるcy5の蛍光シグナルを検出し、その検出結果を図10に示した。

スポットの蛍光強度をスポット内の蛍光強度の中央値として定量化したところ、ゲル濃度依存的な蛍光強度を示した。実施例 1 と同様、ブランクスポットの蛍光強度+ブランクスポットの標準偏差の2倍をカットオフ値として、検出できているかどうか判定した。その結果、413 bpでは10質量%ゲル濃度のスポットでは検出できないと判断されたが、2.8質量%及び3.8質量%のゲルスポットで良好に検出できることが示された。また、2質量%ゲルではスポットからの脱落、ゲルの形状不良により、蛍光強度に大きなバラツキが観察された。

[0096] この結果より、ゲルの分子ふるい効果を利用して、検出しようとする核酸の大きさに対応したゲル濃度に設定したスポットを配置することにより、ゲル濃度依存的に蛍光強度が低下しておりサイズによる選択が観察された。

プローブでの核酸の選別、ゲル濃度依存的な核酸サイズの選別という二重の作用により、平板状のアレイと比較し、更に特異的な検出が可能なDNAマイクロアレイを提供できることが分かった。

実施例 3

[0097] 実施例1の2-2. 項（ゲルを保持したDNAマイクロアレイでのPCR反応）において、PCR反応液組成を以下の組成に変更する以外は、実施例1と同様の操作を実施した。

[0098] <PCR反応液組成>

827bp PCR産物溶液 (5fmol/ μ L)	1 μ L
1191bp PCR産物溶液 (5fmol/ μ L)	1 μ L
5' 末端cy5標識Fプライマー(iii) (20 μ M)	0.5 μ L
5' 末端cy5標識Rプライマー(iii) (20 μ M)	0.5 μ L
5' 末端cy5標識Fプライマー(iv) (20 μ M)	0.5 μ L
5' 末端cy5標識Rプライマー(iv) (20 μ M)	0.5 μ L
2×AmpDirect buffer	50 μ L
BioTaq (AmpDirectキット付属)	1 μ L
MilliQ水	47 μ L
合計	100 μ L

[0099] 実施例1と同様に、PCR反応終了後、装置からウェルプレートを取り出し、PCR反応液全量をピペティングにより除き、キアゲン社のMinElute PCR purification kitを用いて精製し14 μ Lで溶出した。濃度を測定したところ827bpの産物が147.7 nmol/ μ L、1191bpの産物が70.6 nmol/ μ L（電気泳動のバンドから換算した）であった。

実施例1と同様に、各スポットにおけるcy5の蛍光シグナルを検出し、その検出結果を図11に示した。

[0100] スポットの蛍光強度をスポット内の蛍光強度の中央値として定量化したところ、ゲル濃度依存的な蛍光強度を示した。実施例1と同様、ブランクスポットの蛍光強度+ブランクスポットの標準偏差の2倍をカットオフ値として、検出できているかどうか判定した。その結果、827bp及び1191bpの混合物では、3.8質量%～10質量%ゲル濃度のスポットでは検出できないと判断されたが、2.8質量%ゲルでは良好に検出できることが示された。

2質量%ゲルでは実施例1及び2と同様、スポットからの脱落が観察された。また、蛍光強度にバラツキが観察された。

[0101] この結果より、ゲルの分子ふるい効果を利用して、検出しようとする核酸の大きさに対応したゲル濃度に設定したスポットを配置することにより、ゲル濃度依存的に蛍光強度が低下しておりサイズによる選択が観察された。

プローブでの核酸の選別、ゲル濃度依存的な核酸サイズの選別という二重の作用により、平板状のアレイと比較し、更に特異的な検出が可能なDNAマイクロアレイを提供できることが分かった。

[0102] [比較例1]

市販のハイドロゲルコーティングスライド (CodeLink (登録商標) Activated Microarray Slides (Surmodics, Inc. #DN01-0025)) を7mm角に切断し、この上にオリゴDNAをスポットして平板状のDNAアレイを作製した (図12)。アレイの作製方法は特開2006-174788号公報の実施例1の方法に従って作製した。

[0103] 作製したアレイは、実施例1と同様に角型96ウェルプレートのウェル内に入れ、PCR反応液100 μ Lに浸漬してPCR反応を実施した。

実施例1及び2と同様の方法により、個別のサイズごと (123、413、827、1191bp) にPCR反応実験を実施し、各スポットにおけるcy5の蛍光シグナルを検出した。その検出結果 (スポット内の蛍光強度の中央値) を下記表2に示した。

[0104] [表2]

テンプレートに用いた PCR 産物のサイズ	蛍光強度の中央値
123bp	12304
413bp	11245
827bp	11025
1191bp	12031

[0105] 基板表面上にプローブ (プライマーとしても機能する) を固定したアレイにおいては、分子ふるい効果がないため、どのサイズのテンプレートを用い

ても同程度のシグナル強度が検出された。すなわち、仮にゲノムDNAやサイズの大きな非特異的増幅産物が生成・混入している場合、これらの非特異的なハイブリダイゼーションの影響を受けやすい状態にあると考えられた。

産業上の利用可能性

[0106] 本発明の核酸の検出方法、及び当該検出方法に用いるDNAマイクロアレイ等は、例えば、大量の検体を処理する用途に適したものであり、実用性及び有用性に優れたものである。

符号の説明

- [0107] 1 1 孔
2 1 多孔板
3 1 中空繊維
4 1 板状物

受託番号

[0108] 受託番号：ATCC 14579

配列表フリーテキスト

- [0109] 配列番号1：合成DNA
配列番号2：合成DNA
配列番号3：合成DNA
配列番号5：合成DNA
配列番号6：合成DNA
配列番号8：合成DNA
配列番号9：合成DNA

請求の範囲

- [請求項1] 下記の工程を含む、核酸の検出方法。
- (a) プローブが固定化されたゲルと、核酸増幅の鋳型となる核酸並びに核酸増幅用プライマーセット、ヌクレオチド単体及びDNA伸長酵素を含む反応溶液とを接触させる工程、
- (b) 上記ゲル及び反応溶液に、核酸増幅反応を行うための熱サイクル処理を加える工程、
- (c) 増幅された核酸断片のうち、特定の塩基長の核酸断片を選別する工程、及び
- (d) 選別された核酸断片を検出する工程。
- [請求項2] プローブが固定化されたゲルとして、ゲル濃度が異なる複数種のゲルを使用する、請求項1記載の方法。
- [請求項3] プローブが固定化されたゲルと反応溶液との接触表面積 ($S(\mu\text{m}^2)$) に対する当該ゲルの体積 ($V(\mu\text{m}^3)$) の比率 (V/S) が50以上である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] プローブが固定化されたゲルが、基板中のウェル又は貫通孔に保持されたものである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] プローブが固定化されたゲルが、置換(メタ)アクリルアミド誘導体及び／又はアガロース誘導体を含むものである、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] プローブが固定化されたゲルのゲル濃度が、2質量%超、5質量%未満である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] ゲル濃度が異なる複数種のゲルが担持され、且つ、当該ゲルはプローブが固定化されたものである、マイクロアレイ。
- [請求項8] 下記の工程を含む、請求項7記載のマイクロアレイの製造方法。
- (a) 複数本の中空繊維を、中空繊維の各繊維軸が同一方向となるように3次元に配列し、その配列を樹脂で固定することにより、中空繊維束を作製する工程、

- (b) プローブを含む、モノマー濃度が異なる複数種のゲル前駆体溶液を、中空繊維束の各中空繊維の中空部に導入する工程、
- (c) 前記中空部に導入したゲル前駆体溶液を反応させ、プローブを含むゲル状物を中空繊維の中空部に保持する工程、及び
- (d) 中空繊維束を繊維の長手方向に交叉する方向で切断して薄片化する工程。