

明 細 書

発明の名称：生体分子解析キット及び生体分子解析方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体分子解析キット及び生体分子解析方法に関する。

本願は、2014年1月31日に日本に出願された特願2014-017942号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 生体分子を解析することによって疾患や体質診断を行うことが知られている。たとえば、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) 解析による体質診断、体細胞変異解析による抗がん剤の投与判断、ウイルスのタンパク質やDNAの解析による感染症対策などがある。

[0003] 近時、世界的なヒトゲノム解析により、その約31億個の塩基対の配列が明らかにされ、ヒトの遺伝子の数が約3～4万個であることが明らかとなった。ヒトには、個体間で塩基配列の違いが存在し、特定の集団人口の1%以上の頻度で存在する塩基配列の違いを遺伝子多型と呼んでいる。その中でも、SNPは、種々の疾患と関連性があることが示唆されている。

例えば、ヒトの遺伝子病は、一つの遺伝子中のSNPが病気の原因と考えられている。また、生活習慣病やガンなどは、複数の遺伝子におけるSNPが影響していると考えられている。したがって、SNPの解析は、創薬ターゲットの探索または副作用の予見などの医薬品の開発において、極めて有効であると考えられる。このため、SNPの解析は世界的な巨大プロジェクトとして押し進められている。

[0004] 薬物の効果や副作用の程度に個人差があることの原因の一つとして、個々人の薬物代謝に関わる酵素群の違いが挙げられる。その違いも、SNPなど遺伝子上のわずかな違いによることが最近明らかにされつつある。

近年、あらかじめ患者の遺伝子を解析することによって、最適な薬剤を選

択し患者に投与する方法が考えられている。さらに、単一遺伝子疾患のみならず多因子疾患についても、遺伝子診断の意義が急速に高まりつつある。また、病原細菌やウイルスを標的とした薬物の効果は、同一種であっても、個体毎に異なることがあり、これらは個体毎の遺伝子の微細な違いによることが多い。このような外来因子である病原細菌やウイルスの遺伝子診断も、今後は検査対象が確実に増加することが予想される。

このように、ポストゲノム時代の医療においては、ヒトや病原微生物の遺伝子の微細な違い、とりわけSNPを解析できることは重要であり、今後もその重要性が増すと予想される。

[0005] 従来、塩基配列における微細な違い、とりわけSNPを解析する方法が種々検討されている（非特許文献1～2参照）。実用レベルでの解析を行うためには、低コスト、方法の簡便性、シグナル検出時間の短さ、検出結果の正確さなどの点がいずれも優れていることが要求される。しかしながら、現在までのところ、上記要求をすべて満たす方法は知られていない。

SNPを解析する場合、目的とする遺伝子断片は試料中にわずかしき含まれていないのが一般的である。この場合、目的とする遺伝子を、何らかの方法によって予め増幅させておくことが必要となる。PCR（Polymerase Chain Reaction）法は、迅速かつ再現性の高い遺伝子増幅法として従来からよく知られている。

[0006] 一般的に、目的の遺伝子の一塩基の違いを検出するためには、PCR法などを使った遺伝子増幅の段階と、増幅させた遺伝子の一塩基の違いを調べる段階との二段階の工程を必要とする（非特許文献3参照）。しかしながら、二段階の工程を必要とする方法は、工程が複数あるため、処理が煩雑となる。さらに、PCR法には、温度昇降を行うことが必要であるため、装置が大型化し、耐熱性の反応容器および反応液が蒸発しない工夫が必要となる。

二段階反応を必要としないSNP検出方法として、インベーター法がある。インベーター法はPCRの増幅を必要とせず、等温で反応を進めることができるため、装置が小型化できる。しかし、インベーター法では、遺伝子の

増幅工程を含まないので、シグナル増幅が遅く、検出判定を行うためには数時間の反応時間を要する。インベーター法は、酵素反応を用いた検出方法である。その中でも、酵素を用いたシグナル増幅において、シグナルの濃度が飽和する時間を短縮する方法として、微小空間内で反応させる方法が考えられる。

微小空間においてインベーター反応を行うと、1ウェルに含まれる解析対象の分子が1つ以下になるようにでき、解析対象分子が見かけ上濃縮された状態になるため、シグナルが飽和する時間を短縮することができる。また、1ウェルに入る検出分子を1つ以下にしているため、シグナルが得られたウェルをカウントすることで、検出分子の濃度を正確に調べることが可能である。

たとえば特許文献1では、1 p l以下の容積を有する微小空間内で酵素反応を行うことで遺伝子検査が可能であることが示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：日本国特開2004-309405号公報

非特許文献1：Landegren、Laboratory protocols for mutation detection、Oxford university press、1996年

非特許文献2：Ahmadianら、Biotechniques、第32巻、第1122～1137頁、2002年

非特許文献3：J Biochem Biophys Method、第70巻、第50、2007年、789～795頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] すなわち、SNP解析においてPCRを利用すれば短時間での検出が可能であるが、機器構成が複雑になったり手順が煩雑になる。また、PCRを利

用しない等温反応ではSNP解析完了までに要する時間が長く反応性が低い。そのため、これらの従来の方法は実用的でない。

[0009] 本発明は、上記の問題を鑑みてなされたもので、迅速に、かつ、定量的な生体分子の解析を可能にすることができ、反応性を向上することができる生体分子解析キット及び生体分子解析方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の第一態様に係る生体分子解析キットは、酵素反応を行うための反応容器を有し、前記反応容器は、容器形状部を有する基体部と、前記容器形状部の少なくとも内面に設けられ、前記酵素反応における解析対象となる試料と前記酵素反応のための試薬との少なくとも一方の吸着率が前記基体部の吸着率よりも低い低吸着構造部と、を有し、前記反応容器内において酵素反応が行われたときに、前記酵素反応によるシグナルを検出するように構成されている。

前記低吸着構造部は、前記試料の吸着率が前記基体部よりも低く、前記基体部が前記反応容器内に露出している場合と比較して、前記シグナル検出におけるバックグラウンドが低くてもよい。

前記低吸着構造部は、前記試薬の吸着率が前記基体部よりも低く、前記基体部が前記反応容器内に露出している場合と比較して、前記シグナル検出におけるシグナル強度が高くてもよい。

前記反応容器は、前記容器形状部の内面において前記吸着率を前記基体部より下げるために前記基体部の表面が改質された改質部をさらに有し、前記容器形状部は、直径5マイクロメートル以下の略円形を有する開口部を有する有底円柱形状であってもよい。

前記反応容器は、前記容器形状部の内面において前記吸着率を前記基体部より下げるために前記基体部に積層された低吸着物質層をさらに有し、前記容器形状部は、直径5マイクロメートル以下の略円形を有する開口部を有する有底円柱形状であってもよい。

[0011] 本発明の第二態様に係る生体分子解析キットは、解析対象となる試料を供

給可能な容器形状部及び前記容器形状部が形成された基体部を有し、酵素反応を行うための反応容器と、前記反応容器に供給可能であって前記酵素反応に使用される試薬と、を有し、前記試薬は、前記試料と前記試薬との少なくとも一方の前記基体部への吸着率を低減するための吸着防止剤を含有し、前記反応容器内において前記酵素反応が行われたときに、前記酵素反応によるシグナルを検出するように構成されている。

前記酵素反応が等温反応であってもよい。

解析対象となる前記試料が、DNA、RNA、miRNA、mRNA、タンパク質のいずれか1つを含み、解析対象物質がDNA、RNA、miRNA、mRNA、タンパク質のいずれか1つであってもよい。

解析対象物質が核酸であり、前記酵素反応がインベーター反応であってもよい。

前記試薬は、蛍光、発光、pH、吸光、電位のいずれか1つによりシグナルを発してもよい。

前記吸着防止剤が界面活性剤であってもよい。

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であってもよい。

前記非イオン性界面活性剤がTween 20であってもよい。

前記非イオン性界面活性剤がTriton-100であってもよい。

前記界面活性剤の濃度が0.0005%以上5%以下であってもよい。

[0012] 本発明の第三態様に係る生体分子解析方法は、上記第一態様又は第二態様に係る生体分子解析キットを用いる。

[0013] 本発明の第四態様に係る生体分子解析キットは、流路を通じて試料を供給可能な容器形状部と、前記容器形状部が形成された基体部と、を有する酵素反応を行うための反応容器と、前記反応容器に供給可能であって前記酵素反応に使用される試薬と、を有し、前記試薬は、前記試薬の表面張力を低減するための界面活性剤を含有し、前記反応容器内において酵素反応が行われたときに、前記酵素反応による蛍光若しくは発色シグナルを検出するように構成されている。

[0014] 本発明の第五態様に係る生体分子解析方法は、流路及び複数の容器形状部を有する反応容器において、前記流路に試薬を送液し、前記複数のウェルに前記試薬を充填し、前記流路に油性封止液を送液し、前記複数のウェル内の前記試薬を前記油性封止液により封止することにより前記複数のウェルを複数の独立した核酸検出反応容器を形成すること、を有し、前記試薬、及び前記油性封止液のうちいずれか1つに界面活性剤が含まれる。

本発明の第五態様に係る生体分子解析方法は、前記複数のウェルに前記試薬を充填する前に、前記流路を通じて前記複数の容器形状部に洗浄用のバッファを充填する工程をさらに有していてもよい。

本発明の第六態様に係る生体分子解析方法は、上記第一態様、第二態様、または第四態様に係る生体分子解析キットを用いた生体分子解析方法であって、前記容器形状部に洗浄用のバッファを供給した後に、前記容器形状部に前記試薬を供給する。

発明の効果

[0015] 本発明の上記態様によれば、迅速に、かつ、定量的な生体分子の解析を可能にすることができ、反応性を向上することができる生体分子解析方法及び生体分子解析キットを提供できる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法を適用する生体分子解析キットの断面図である。

[図2]本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法のフローチャートである。

[図3]本発明の第一実施例における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図4]本発明の第一実施例における蛍光強度測定試験の結果を示すグラフである。

[図5]本発明の第一実施例における反応時間測定試験の結果を示す表である。

[図6]本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法を適用する生体分子解析

キットの断面図である。

[図7]本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法を適用する生体分子解析キットの断面図である。

[図8]本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法を適用する生体分子解析キットの断面図である。

[図9]本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法を示すフローチャートである。

[図10]本発明の第二実施例におけるウェルを示す顕微鏡写真である。

[図11A]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が0%、加熱時間10分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11B]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が0.0005%、加熱時間10分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11C]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が0.001%、加熱時間10分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11D]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が0.005%、加熱時間10分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11E]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が0.05%、加熱時間10分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11F]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が0.5%、加熱時間10分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11G]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が5%、加熱時間10分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11H]本発明の第二実施例において、T w e e n 2 0の濃度が0.0005

%、加熱時間 20 分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11I]本発明の第二実施例において、Tween 20 の濃度が 0.001 %、加熱時間 20 分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11J]本発明の第二実施例において、Tween 20 の濃度が 0.005 %、加熱時間 20 分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11K]本発明の第二実施例において、Tween 20 の濃度が 0.05 %、加熱時間 20 分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11L]本発明の第二実施例において、Tween 20 の濃度が 0.5 %、加熱時間 20 分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図11M]本発明の第二実施例において、Tween 20 の濃度が 5 %、加熱時間 20 分の条件における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図12]本発明の第二実施例における蛍光強度測定試験の結果を示すグラフである。

[図13]本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法の作用効果を説明するための図である。

[図14A]本発明の第三実施例におけるサンプル 1 の蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図14B]本発明の第三実施例におけるサンプル 2 の蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図14C]本発明の第三実施例におけるサンプル 3 の蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図14D]本発明の第三実施例におけるサンプル 4 の蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図14E]本発明の第三実施例におけるサンプル5の蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

[図14F]本発明の第三実施例におけるサンプル6の蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。

発明を実施するための形態

[0017] (第一実施形態)

以下、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析キット及び生体分子解析方法を、図1及び図2を参照しながら説明する。

図1は、本実施形態に係る生体分子解析方法を適用可能な生体分子解析キットの断面図である。本実施形態に係る生体分子解析キットでは、解析する生体分子として、DNA、RNA、miRNA、mRNA（以下、RNA類と言うことがある。）、タンパク質のいずれかが選ばれる。

[0018] 図1に示すように、生体分子解析キット100は、反応容器10を構成する軟性平板12及びガラス基板14と、反応容器10を密封可能なカバーガラス13と、を備える。

反応容器10は、一端が開口された有底円柱形状の微小空間11（容器形状部）を有するように成形された基体部2と、基体部2の表面に配された低吸着構造部3と、を有する。

ポリジメチルシロキサン（PDMS（polydimethylsiloxane））製の軟性平板12に対してインプリントにより微小空間11が作製されることによって、反応容器10が形成される。

[0019] 反応容器10を構成する微小空間11は、一端に開口部を有する有底円柱形状の空間である。微小空間11は、例えば、5 μ mの直径L1、及び5 μ mの深さL2を有する。たとえば、微小空間11の容量は約100フェムトリットル（fL）である。反応容器10には、複数の微小空間11のアレイが形成されている。すなわち、微小空間11は、反応容器10において整列配置されている。

たとえば、微小空間11は、軟性平板12において縦横5mmの長方形を

有する表面に対して、その各辺に沿った格子状に配列される。各微小空間 11 の間の隙間の大きさは、各微小空間 11 において独立してシグナル検出ができる分解能に応じて設定される。

微小空間 11 の容積は適宜設定されてよいが、微小空間 11 の容積が小さい方がシグナル検出可能となるまでの反応時間を短縮可能である。一例として、微小空間 11 の容積は、100ピコリットル（p l）またはそれ以下である。

[0020] 具体的には、シグナルを飽和させて十分なシグナルを発生させるのにかかる時間を短縮する目的がある場合には、解析対象の分子が 1 ウェルに 1 つ以下となる液量に基づいて、微小空間 11 の容積が設定される。

[0021] 軟性平板 12 は、たとえばガラス基板 14 上に形成される。ガラス基板 14 の厚さは、軟性平板 12 を材料としてインプリントによって複数の微小空間 11 を形成する過程で十分な強度を有する点を考慮して適宜設定される。

[0022] 本実施形態において、低吸着構造部 3 は、たとえば以下の構成を有する。
（構成例 1）

低吸着構造部 3 は、基体部 2 の表面のうち反応容器 10 の微小空間 11 の内面に位置する領域が疎水性を有する。たとえば、低吸着構造部 3 は、基体部 2 の表面が疎水性となるように改質することで形成される改質部 4 を有する。

（構成例 2）

低吸着構造部 3 は、基体部 2 の表面のうち反応容器 10 の内面に位置する領域に低吸着物質層 4 A を有する。低吸着物質層 4 A は、本実施形態の生体分子解析キット 100 を用いた解析の対象となる試料あるいはその解析試薬の吸着率が低い材料から形成される。たとえば、低吸着物質層 4 A は、疎水性の被膜である。

また、低吸着物質層 4 A の他の例として、蛍光物質が透過不能な分子構造を有する高分子被膜を挙げることができる。この高分子被膜は、上記の P D M S と比較して密な分子構造を有することが好ましく、蛍光物質の透過を抑

制することによってシグナル強度の低下を防止する効果を奏する。なお、P D M S 以外に対しても、基体部 2 の材料となる物質の分子構造に基づいて、試薬の透過を防止可能な分子構造を有する高分子被膜が選択されてもよい。これらの高分子被膜はシグナル強度の低下を抑制する。

なお、低吸着構造部 3 における高分子被膜は、蛍光物質の透過を抑制する被膜に限られず、酵素反応に関わる物質の透過を抑制する被膜が、使用される試薬に応じて適宜選択されてよい。

[0023] 次に、本実施形態に係る生体分子解析キット 1 0 0 に好適に適用可能な試薬の組成について説明する。

本実施形態では、各試薬に吸着防止剤が含まれていることで、生体分子解析キット 1 0 0 の反応容器 1 0 の内面に対して試薬の構成成分が吸着されるのを防止することができる。

吸着防止剤の組成は、たとえば、界面活性剤、リン酸脂質、その他の高分子化合物のうちの少なくとも 1 種を含んだ組成であり、任意の材料を混合して用いても良い。例を挙げると、界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤が挙げられる。非イオン性界面活性剤としては、T w e e n や g l y c e r o l 、 T r i t o n - X 1 0 0 等が挙げられる。また、高分子化合物としては、P o l y e t h y l e n e g l y c o l (P E G) , D N A , 蛋白質が挙げられる。

また、2 種以上の材料が混合された吸着防止剤として、例えば、リン酸脂質と P E G とを混合した吸着防止剤が挙げられる。

界面活性剤として非イオン性界面活性剤を用いる場合、試薬に含まれる非イオン性界面活性剤の濃度は 5 % 以下であることが好ましい。T w e e n 2 0 を用いる場合、試薬に含まれる T w e e n 2 0 の濃度は 0 . 0 0 0 5 % 以上 5 % 以下の範囲であることが好ましく、0 . 0 0 1 % 以上 0 . 5 % 以下の範囲であることが特に好ましい。T w e e n 2 0 の濃度が 0 . 0 0 0 5 % 以上であると、複数の微小空間 1 1 における反応を独立して検出することができ、微小空間 1 1 の蛍光を正しく計測できる。T w e e n 2 0 の濃度が 5 %

以下であると、十分な酵素反応が得られる。

[0024] これらの吸着防止剤は、反応容器 10 における微小空間 11 の内面に吸着される物質でも構わない。吸着防止剤が含まれた試薬が反応容器 10 内に供給されることにより、吸着防止剤が反応容器 10 の内面に吸着される。その結果、反応容器 10 の内面は、吸着防止剤が含まれていない場合と比較して、酵素反応に用いられる酵素、解析対象となる核酸やタンパク質、及びシグナル検出に利用される標識物質等が吸着されにくい状態となる。

また、微小空間 11 にオイルを入れる場合、オイルに上記の吸着防止剤を入れて用いても良い。

[0025] 酵素反応に用いられる酵素、解析対象となる核酸やタンパク質、及びシグナル検出に利用される標識物質等のうちの少なくとも 1 つが最初に反応容器 10 の内部に供給される前から、シグナル検出が終了するまでの間に反応容器 10 の内部に接する試薬の少なくともいずれか 1 つに吸着防止剤が含まれていることが好ましい。たとえば、吸着防止剤は、試薬を所定濃度に希釈するための緩衝液等の溶媒に混合されていてもよい。

酵素反応に用いられる酵素、解析対象となる核酸やタンパク質、及びシグナル検出に利用される標識物質等のうちの少なくとも 1 つが最初に反応容器 10 の内部に供給される前から、シグナル検出が終了するまでの間に反応容器 10 の内部に接する試薬のすべてに吸着剤が含まれていても良い。

[0026] なお、吸着防止剤は、酵素反応やシグナル増幅反応を阻害しない物質であることが好ましい。

[0027] 次に、本実施形態に係る生体分子解析キット 100 を用いた生体分子解析方法について説明する。図 2 は、本実施形態に係る生体分子解析方法を示すフローチャートである。

[0028] まず、反応容器 10 の微小空間 11 に、解析対象となる物質（本実施形態ではたとえば DNA）を含んだ試薬が滴下される（図 2 に示すステップ S101）。具体的には、本実施形態において滴下される試薬は、インベーター反応試薬（1 μ M アレルプローブ、0.4 μ M インベーターオリゴ、1

μM FAM標識アーム、 20mM MOPS pH7.5、 15mM NaCl、 6.25mM MgCl_2 、 $50\text{U}/\mu\text{L}$ クリベース) 及びDNAを含んでいる。

[0029] 反応容器10の微小空間11に滴下される試薬の液量は、微小空間11の数に応じて適宜設定されてよい。また、反応容器10の微小空間11に滴下される試薬の液量及びその濃度は、1つの微小空間11に1つのDNAが入るように調整される。たとえば、本実施形態では、反応容器10の微小空間11に滴下される試薬の液量は、全体で $0.5\mu\text{L}$ であり、 $0.5\mu\text{L}$ の液体が複数の微小空間11に配分される。

[0030] 続いて、反応容器10の微小空間11がカバーガラス13によって覆われる(図2に示すステップS102)。これにより、各微小空間11は、インベーター反応試薬及びDNAが封入された独立した反応室となる。

[0031] そして、インベーター反応試薬及びDNAが微小空間11に封入された反応容器10が、例えば、 62°C のオープンにてインキュベートされる(図2に示すステップS103)。このインキュベートによって、インベーター反応において等温で行われるシグナル増幅が好適に進行する。

[0032] 続いて、インベーター反応試薬及びDNAが各微小空間11に封入された反応容器10が、あらかじめ定められた時間の後に取り出され、蛍光を有するウェル数およびその蛍光量が計測される(図2に示すステップS104)。

[0033] なお、本実施形態において、蛍光の検出以外に、可視光の発光、発色、pHの変化、電位変化などをシグナルとして検出する検出系を適用してもよい。また、タンパク質を解析するために本実施形態の構成を適用することも可能である。

(第二実施形態)

[0034] 以下、本発明の第二実施形態に係る生体分子解析キット及び生体分子解析方法を、図6を参照しながら説明する。本実施形態に係る生体分子解析キット100Aは、核酸定量用アレイデバイス20と試薬と油性封止液とを含む

。

図6は本実施形態に係る核酸定量用アレイデバイス20の断面図である。本実施形態に係る生体分子解析キットでは、解析する生体分子として、DNA、RNA、miRNA、mRNA（以下、RNA類と言うことがある。）及びタンパク質のいずれかが選ばれる。

[0035] 図6に示すように、核酸定量用アレイデバイス20は、反応容器30と、カバー部27と、注入口部（不図示）と、排出口部（不図示）と、を備える。反応容器30は、基体部23と流路31とを有する。基体部23には、複数のウェル（容器形状部）26と、基板24と、微小孔アレイ層25と、が形成される。

微小孔アレイは、基板24に直接形成されていてもよいし、微小孔アレイが形成された部材が基板24に、接着、溶着等の手段で固定して設けられてもよい。

[0036] 基板24は、実質的に透明な材料からなる板状部材である。基板24の材質は、たとえば樹脂やガラスである。具体的には、基板24は、ポリスチレンやポリプロピレンから形成されていてもよい。基板24は、核酸定量用アレイデバイス20を搬送する装置や作業者の手作業による取扱い時に破損しない程度の剛性を持ったものであればよい。

[0037] 微小孔アレイ層25は、複数の貫通孔25aが並べて形成された層である。微小孔アレイ層25の層厚は3 μ mで、微小孔アレイ層25とカバー部27との間には100 μ mの間隔が空けられている。貫通孔25aは、一端に開口部を有する有底円柱形状の空間である。貫通孔25aは、直径が5 μ m、中心線方向の長さが3 μ mの円柱形状である）。たとえば、貫通孔25aの容積は約60フェムトリットル（f l）である。

各貫通孔25aの容積は適宜設定されてよいが、貫通孔25aの容積が小さい方がシグナル検出可能となるまでの反応時間を短縮可能である。

一例としては、各貫通孔25aの容積は、100ピコリットルまたはそれ以下である。

なお、本実施形態において、蛍光の検出以外に、可視光の発光、発色、pHの変化、電位変化などをシグナルとして検出する検出系を適用してもよい。また、タンパク質を解析するために本実施形態の構成を適用することも可能である。

[0038] 各貫通孔25a同士の中心線間の距離（ピッチ）は、各貫通孔25aの直径よりも大きければよい。

各貫通孔25aの間隔（隙間）の大きさは、各貫通孔25aにおいて独立してシグナル検出ができる分解能に応じて設定される。

各貫通孔25aは微小孔アレイ層25に対して三角格子状をなして配列されている。

なお、各貫通孔25aの配列のされ方は特に限定されない。微小孔アレイ層25に形成された貫通孔25aと、基板24の表面24aとによって、基板24を底面部26aとする有底筒状の微小なウェル26（容器形状部）が基体部23には形成されている。

[0039] 具体的には、シグナルを飽和させて十分なシグナルを発生させるのにかかる時間を短縮する目的がある場合には、解析対象の分子が1ウェルに1つ以下となる液量に基づいて、ウェル26の容積が設定される。

[0040] 微小孔アレイ層25の材質は、樹脂やガラス等であってよい。微小孔アレイ層25の材質は、基板24の材質と同じでもよいし基板24の材質と異なってもよい。また、微小孔アレイ層25は基板24と同じ材料で一体化されていてもよい。また、微小孔アレイ層25は基板24と同じ材料で一体成型されていてもよい。樹脂からなる微小孔アレイ層25の材質の例としては、シクロオレフィンポリマーや、シリコン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ酢酸ビニル、フッ素樹脂、アモルファスフッ素樹脂などが挙げられる。なお、微小孔アレイ層25の例として示されたこれらの材質はあくまでも例であり、微小孔アレイ層25の材質はこれらには限られない。

[0041] また、微小孔アレイ層25は着色されていてもよい。微小孔アレイ層25

が着色されていると、ウェル 26 内で蛍光、発光、吸光度等の光の測定をする場合に、測定対象となるウェル 26 に近接する他のウェル 26 からの光の影響が軽減される。

微小孔アレイ層 25 は、基板 24 上に積層された疎水性膜のベタパターンに対してエッチング、エンボス形成、あるいは切削等の加工が施されることによって貫通孔 25 a が形成される。また、微小孔アレイ層 25 が基板 24 と一体成型される場合は、基板 24 にエッチング、エンボス形成、あるいは切削等の加工が施されることによって、微小孔アレイ層 25 の貫通孔 25 a に相当する部分が形成される。これによって、疎水部及び親水部を有するパターンを基板に形成することができる。

[0042] カバー部 27 は、基体部 23 との間に隙間を有して複数のウェル 26 の開口部分を覆うように基体部 23 に重ねられている。基体部 23 とカバー部 27 との間は、各種の液体が流れる流路 31 となる。本実施形態では、基体部 23 とカバー部 27 との間を、注入口部から排出口部へ向かって各種の液体が流れる。

[0043] 次に、本実施形態に係る生体分子解析キット 100 A に好適に適用可能な試薬の組成について説明する。

図 7 及び図 8 に示すように、検出反応試薬 21 は、基体部 23 とカバー部 27 との間に注入口部から送液可能な溶液である。検出反応試薬 21 は、解析対象物質に対する酵素反応などの生化学的反応を行うための試薬である。

解析対象物質に対する生化学的反応は、たとえば、DNA（核酸）が解析対象物質の場合、核酸が存在する条件下でシグナル増幅が起こるような反応である。検出反応試薬 21 は、たとえば核酸を検出可能な方法に応じて選択される。たとえば、インベーター（登録商標）法や、LAMP法（商標登録）、TaqMan（登録商標）法または、蛍光プローブ法やその他の方法に使用される試薬が本実施形態の検出反応試薬 21 に含まれる。

本実施形態では、解析対象物質が核酸のときに、従来のようなPCR法での核酸の増幅工程を行わずに検出可能であるが、必要に応じてPCR法等を

使って解析対象核酸を増幅したものをサンプルとして用いても良い。

また、解析対象物質が核酸以外でも、本実施形態に適用できるように、必要な前処理を適宜行ってから本実施形態を適用することができる。

[0044] 本実施形態では、各試薬の少なくとも1つに吸着防止剤が含まれていることで、生体分子解析キット100Aのウェル26の内面に対して試薬の構成成分が吸着されるのを防止することができる。各試薬全てに吸着防止剤が含まれていても良い。

試薬の例としては、バッファー、検出反応試薬、サンプル（解析対象物：DNA、RNA類、タンパク質等）溶液、封止液、試薬やサンプルの希釈用溶媒が挙げられる。

吸着防止剤の組成は、たとえば、界面活性剤、リン酸脂質、その他の高分子化合物のうちの少なくとも1種を含んだ組成であり、任意の材料を混合して用いても良い。例を挙げると、界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤が挙げられる。非イオン性界面活性剤としては、Tweenやglycerol、Triton-X100等が挙げられる。また、高分子化合物としては、Polyethyleneglycol（PEG）や、DNA、蛋白質が挙げられる。

また、2種以上の材料が混合された吸着防止剤として、例えば、リン酸脂質とPEGとを混合した吸着防止剤が挙げられる。

界面活性剤として非イオン性界面活性剤を用いる場合、試薬に含まれる非イオン性界面活性剤の濃度は5%以下であることが好ましい。Tween20を用いる場合、試薬に含まれるTween20の濃度は0.0005%以上5%以下の範囲であることが好ましく、0.001%以上0.5%以下の範囲であることが特に好ましい。Tween20の濃度が0.0005%以上であると、複数のウェル26における反応を独立して検出することができウェル26の蛍光を正しく計測できる。Tween20の濃度が5%以下であると、十分な酵素反応が得られる。

界面活性剤は非イオン性に限られない。界面活性剤として、イオン性界面

活性剤（陰イオン、陽イオン、両性イオン）が用いられても良い。イオン性界面活性剤同士の混合物や、イオン性界面活性剤と非イオン性界面活性剤との混合物を用いても良い。

また、界面活性剤と高分子化合物との混合物を、吸着防止剤として使用することも可能である。

[0045] 次に、本実施形態に係る生体分子解析キット１００Ａに好適に適用可能な油性封止液２２の組成について説明する。

本実施形態では、生体分子解析キット１００Ａのウェル２６の内面に対して試薬の構成成分が吸着されるのを防止する目的で、油性封止液２２に吸着防止剤が含まれていてもよい。

油性封止液２２（図８参照）は、基体部２３とカバー部２７との間に注入口部から送液可能な溶液である。油性封止液２２は、解析対象物質を含む試料と混合しない材料から選ぶことができる。油性封止液２２としてはミネラルオイルやフッ素系液体のＦＣ４０等を用いることができる。

また、本実施形態では、生体分子解析キット１００Ａのウェル２６の内面に対して試薬の構成成分が吸着されるのを防止する目的で、試薬を送液する前にウェル洗浄用のバッファーを送液してもよい。バッファーには吸着防止剤が含まれていてもよい。

[0046] これらの吸着防止剤は、反応容器３０におけるウェル２６の内面に吸着される物質でも構わない。吸着防止剤が含まれた試薬が反応容器３０内に供給されることにより、吸着防止剤が反応容器３０の内面に吸着される。その結果、反応容器３０の内面は、吸着防止剤が含まれていない場合と比較して、酵素反応に用いられる酵素、解析対象となる核酸やタンパク質、及びシグナル検出に利用される標識物質等が吸着されにくい状態となる。

[0047] 洗浄用のバッファーに含まれる吸着防止剤は非イオン性界面活性剤であってもよい。非イオン性界面活性剤としては、Tweenやglycerol、Triton-X100等が挙げられる。また、洗浄用のバッファーが試薬の一部を構成していてもよい。

[0048] 酵素反応に用いられる酵素、解析対象となる核酸やタンパク質、及びシグナル検出に利用される標識物質等のうちの少なくとも1つが最初に反応容器30の内部に供給される前から、シグナル検出が終了するまでの間に反応容器30の内部に接する試薬の少なくとも1つに吸着防止剤が含まれていることが好ましい。たとえば、吸着防止剤は、試薬を所定濃度に希釈するための緩衝液等の溶媒に混合されていてもよい。

また、酵素反応に用いられる酵素、解析対象となる核酸やタンパク質、及びシグナル検出に利用される標識物質等のうちの少なくとも1つが最初に反応容器10の内部に供給される前から、シグナル検出が終了するまでの間に反応容器10の内部に接する試薬のすべてに吸着剤が含まれていても良い。

[0049] なお、吸着防止剤は、酵素反応やシグナル増幅反応を阻害しない物質であることが好ましい。

[0050] 次に、本実施形態に係る生体分子解析キット100Aを用いた生体分子解析方法について説明する。図9は、本実施形態に係る生体分子解析方法を示すフローチャートである。

[0051] まず、不図示の注入口部及び排出口部が開放され、吸着防止剤を含む洗浄用のバッファー33が注入口部を通じて基体部23とカバー部27との間の隙間へと、たとえば分注ピペット等によって送液される（図9に示すステップS201）。バッファー33は、複数のウェル26の全てを覆うように、基体部23とカバー部27との間の隙間内で広がる（図6参照）。これによって、基体部23の表面のうち貫通孔25aの内面に位置する領域及び隣り合うウェルの間に位置する領域34に低吸着物質層35を有する低吸着構造部32が形成される。

バッファー33を送液するのではなく、反応容器30中にバッファー33が予め満たされていてもよい。この場合、注入口部、排出口部をフィルムなどで封止してバッファー33を反応容器30中に封止しておいてもよい。

[0052] 次に、解析対象となる物質（本実施形態ではたとえばDNA）を含んだ試薬が注入口部を通じて基体部23とカバー部27との間の隙間へと、たとえ

ば分注ピペット等によって送液される（図9に示すステップS202）。具体的には、本実施形態において充填される試薬は、インベーター反応試薬（検出反応試薬21）（ $1\mu\text{M}$ アレルプローブ、 $1\mu\text{M}$ インベーターオリゴ、 $1\mu\text{M}$ FAM標識アーム、 10mM MOPS pH7.5、 6.25mM MgCl_2 、 $50\text{U}/\mu\text{L}$ クリベース、Tween 20）及び解析対象物質であるDNAを含んでいる。試薬は、複数のウェル26の全てを覆うように、基体部23とカバー部27との間の隙間内で広がる（図7参照）。また、試薬が基体部23とカバー部27との間の隙間に送液されることにより、バッファー33は排出口部から排出される。なお、このとき、試薬がバッファー33と異なる色であると、試薬が基体部23とカバー部27との間のどの部分に送液されたかを容易に把握できる。

[0053] 図6に示すように、基体部23とカバー部27とによって形成される流路31には、基板24と微小孔アレイ層25とによって形成された複数のウェル26が配置されている。複数のウェル26内に満たされたバッファー33は、試薬を流し入れることで順次ウェル内でバッファー33から試薬に置き換わっていく。

しかしバッファー33がウェル26の内面に保持された状態で維持されるウェル26も存在する。この場合、試薬は複数のウェル26内に満たされたバッファー33と置き換わることなく、バッファー33に試薬が重層された状態となる。しかしながら、バッファー33と試薬とは互いに容易に混合されるので、バッファー33に試薬が重層された状態となった後、試薬中の溶質はバッファー33へと拡散する。このため、バッファーと試薬が置き換わったウェルと、バッファー33と試薬とが重層されたウェルでの反応は実質的に同じである。

[0054] ウェル26に充填される液量は、貫通孔25aの数に応じて適宜設定されてよい。また、ウェル26に滴下される液量及びその濃度は、1つのウェル26に1つのDNAが入るように調整される。たとえば、本実施形態では、ウェル26に充填される液量は、反応容器全体で $0.5\mu\text{L}$ であり、 0.5

μ L の液体が複数のウェル 26 に配分される。

[0055] 次に、図 8 に示すように、基体部 23 とカバー部 27 とによって形成される流路 31 内に、注入口部から油性封止液 22 を送液する。油性封止液 22 は、試薬がバッファーに拡散した状態で複数のウェル 26 内の液体を封止することにより、複数のウェル 26 を複数の独立した反応室（核酸検出反応容器）36 とする。すなわち、本実施形態では、油性封止剤 22 が各ウェル 26 を覆うことによって、第一実施形態に開示された微小空間と同様に、各ウェル 26 が独立した状態となる。また、油性封止液 22 は、基体部 23 とカバー部 27 との間隙間内で複数のウェル 26 の外部にある液体を排出口部から押し出す（図 9 に示すステップ S203）。

[0056] そして、インベーター反応試薬及び DNA が各ウェル 26 に充填されたアレイデバイス 20 が、例えば、62℃のオープンにてインキュベートされる（図 9 に示すステップ S204）。このインキュベートによって、インベーター反応において等温で行われるシグナル増幅が好適に進行する。

[0057] 続いて、インベーター反応試薬及び DNA が各ウェル 26 に充填されたアレイデバイス 20 が、あらかじめ定められた時間の後に取り出され、蛍光を有するウェル数およびその蛍光量が計測される（図 9 に示すステップ S205）。

[0058] つまり、本実施形態に係る生体分子解析キット 100A を用いた生体分子解析方法は、流路及び複数の容器形状部を有する反応容器において、流路に試薬を送液し、複数のウェルに試薬を充填する工程（試薬送液工程）と、試薬送液工程の後に、油性封止液を流路に送液し、複数のウェル内の試薬を油性封止液により封止することにより複数のウェルを複数の独立した核酸検出反応容器とする工程（封止工程）と、を有する。

[0059] なお、本実施形態において、蛍光の検出以外に、可視光の発光、発色、pH の変化、電位変化などをシグナルとして検出する検出系を適用してもよい。また、タンパク質を解析するために本実施形態の構成を適用することも可能である。

[0060] なお、本実施形態において、各試薬に吸着防止剤が含まれていることで、生体分子解析キット100Aの反応容器30の内面に対して試薬の構成成分が吸着されるのを防止することができる。吸着防止剤は、全ての試薬に含まれていてもよいし、試薬の一部に含まれていてもよい。

また、このような吸着防止剤に代えて、試薬の構成成分の表面張力を低下させる物質を試薬が含まんでいてもよい。例えば界面活性剤は試薬の表面張力を低下させる。そのため、各ウェルへ試薬を充填するためにも、試薬に界面活性剤を含むことは有効である。

実施例

[0061] (第一実施例)

次に、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法の作用効果を確認するために行った実施例について説明する。図3は、本実施例における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。図4は、本実施例における蛍光強度測定試験の結果を示すグラフである。なお、図4における横軸は反応時間を示し、図4における縦軸は蛍光強度を示している。図5は、本実施例における反応時間測定試験の結果を示す表である。なお、図5において、「良」は定量性が良好であることを示し、「劣」は定量性において本実施例に劣ることを示す。

[0062] <蛍光を発するウェル数の計測試験>

まず、反応容器10の微小空間11内に、インベーター反応試薬とともに、3種類の人工合成DNAを封入した。ここで、それぞれの人工合成DNAの濃度は、1ウェルに1分子が入る30 pMと、1ウェルに1666分子が入る50 nMと、1ウェルに1分子も入らない0Mと、に設定した。

[0063] そして、反応容器10を、62℃のオープンにてそれぞれインキュベートし、0分(0 min)、10分(10 min)、15分(15 min)後の状態を確認した。

図3に示すように、DNA濃度が30 pM以上であれば、0Mである場合のバックグラウンドに対してほぼすべての微小空間11において蛍光量に差

が生じ、DNAが存在していることがわかる。

[0064] <蛍光強度の計測試験>

次に、上述の設定の人工合成DNAが封入された反応容器10を、62℃のオープンにてインキュベートし、0分、10分、15分後の状態を確認するため、DNA濃度ごとに5ウェルの画像を選び、各画像における21ピクセルの蛍光量の平均値を求めた。ここでは、反応後のウェルは、蛍光顕微鏡（ツァイス社、AX10）、対物レンズ（E C P l a n - N e o f l u a r 40× o i l N A 1.3）、光源（L E J 社、F l u o A r c 001.26 A U s a b l e w i t h H B O 10）、センサー（浜松ホトニクス社、E M - C C D C 9100）、フィルター（オリンパス社、U - M N I B A 2）、及び解析ソフト（浜松ホトニクス社、A Q U A C O S M O S 2.6：露光時間 64.3ms、EMゲイン 180、オフセット 0、ビニング ×1）を用いて計測された。

[0065] 図4に示すように、1つの微小空間11に1分子が収容される濃度である30pMにおいて、0Mの場合と比較して区別可能な強度の蛍光が検出された。

[0066] <反応時間測定試験>

続いて、従来の解析方法と本発明の解析方法とにおける反応時間の比較をした。反応時間の測定試験には、本発明との比較対象として、1ナノリットル（n l）×多ウェルの試薬量でデジタルPCR反応を行う方法（比較例1）、20マイクロリットル（μ l）の試薬量でPCR反応を行う方法（比較例2）、20μ lの試薬量でPCR+インベーター反応を行う方法（比較例3）、20μ lの試薬量でインベーター反応を行う方法（比較例4）、及び100フェムトリットル（f l）×多ウェルの試薬量でデジタルELISA反応を行う方法（比較例5）を採用した。

[0067] 図5に示すように、反応時間の測定試験により明らかなように、1n l×多ウェルの試薬量でデジタルPCR反応を行った比較例1では、60分の反応時間を必要とし、温調が変温であり、定量性は良好であった。20μ lの

試薬量でPCR反応を行った比較例2では、60分の反応時間を必要とし、温調が変温であり、定量性は良好ではなかった。20 μ lの試薬量でPCR + インベーター反応を行った比較例3では、60分の反応時間を必要とし、温調が変温であり、定量性は良好ではなかった。

[0068] 20 μ lの試薬量でインベーター反応を行った比較例4では、120分の反応時間を必要とし、温調が等温であるものの、定量性は良好ではなかった。100 f l $\times$ 多ウェルの試薬量でデジタルELISA反応を行った比較例5では、15分の反応時間を必要とし、温調が等温であり、定量性は良好であった。

[0069] これらに対し、100 f l $\times$ 多ウェルの試薬量でデジタルインベーター反応を行った本実施例では、10分の反応時間だけであり、温調が等温であり、定量性は良好であった。これによって、本実施例が、100 f l $\times$ 多ウェルの試薬量でデジタルインベーター反応を行ったからであることが判明する。

[0070] (第二実施例)

次に、本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法の作用効果を確認するために行った実施例について説明する。図10は、本実施例におけるウェルを示す蛍光画像図である。図11Aから図11Mは、本実施例における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。図12は、本実施例における蛍光強度測定試験の結果を示すグラフである。なお、図12における横軸はTween 20の濃度を示し、図12における縦軸は蛍光強度を示している。

[0071] <核酸定量用アレイデバイスの作製>

0.5 mm厚のガラス製の基板にCYTOP（登録商標）（旭硝子製）をスピコートした後、180℃で1時間ベークした。形成されたCYTOPの厚みは3 μ mだった。CYTOPを基板にスピコートによってコートした後、ポジティブフォトリソストをコートし、フォトマスクを用いてパターンを形成した。その後、O₂プラズマによってCYTOPをドライエッチング

した。表面に残ったフォトリソを除去するためにアセトンとエタノールにより表面を洗浄、リンスした。

図10に示すようにCYTOPによって形成されたウェル（微小空間）の直径は $5\mu\text{m}$ であり、インベーター反応によるシグナル検出が数分で可能な体積を有する。1つの基体部には100ブロックのウェルアレイが設けられた。また、各々のブロックは10,000個のウェルを有した。そのため、合計100万個のウェルが形成された。図6に示すように、送液ポート（注入口部：不図示）を有するガラス製の板と基体部とを、 $50\mu\text{m}$ の厚みを有し流路形状に加工された両面テープを用いて接着した。

[0072] <試料と検出反応試薬との混合液の送液>

界面活性剤であるTween 20の濃度による液滴の形成しやすさを確かめた。

まず、界面活性剤を含む洗浄バッファを送液ポートを通じて核酸定量用アレイデバイスに送液した。その後、インベーター反応試薬（検出反応試薬 21 : $1\mu\text{M}$ アレルプローブ、 $1\mu\text{M}$ インベーターオリゴ、 $1\mu\text{M}$ FAM標識アーム、 10mM MOPS pH7.5、 6.25mM MgCl_2 、 $50\text{U}/\mu\text{L}$ クリベース、Tween 20) $22\mu\text{l}$ 及び解析対象物質であるDNAを送液ポートを通じて核酸定量用アレイデバイスに送液した。

その後、フッ素系液体であるFC40（油性封止液22）を送液ポートを通じて $80\mu\text{l}$ 送液することで各ウェル内に試薬を分割して封入した。これを63のホットプレート上で加熱し、インベーター反応を実施した。

次に、蛍光顕微鏡（オリンパス製）を使用し、 63°C 10分、20分経過時の各ウェルの蛍光を検出した。露光時間は、明視野 : 100msec 、N1BA : 2000msec 、mCherry : 2000msec とした。

10分加熱後の各ウェルを顕微鏡で観察した結果を図11Aから図11Gに示す。20分加熱後の各ウェルを顕微鏡で観察した結果を図11Hから図11Mに示す。

[0073] Tween 20の濃度が0%のときは、隣り合うウェルの間に位置する領域でも蛍光が検出されたため正しくデジタル計測ができなかった。この理由として、隣り合うウェルの反応溶液の液滴同士が結合しているため、隣り合うウェルの間に位置する領域で試料が反応したと考えられる。その他に、隣り合うウェルの反応溶液の液滴同士は結合していないが、隣り合うウェルの間に位置する基体部の表面に残存した試料が反応したと考えられる。一方、Tween 20が0.0005%以上含まれていれば、反応溶液の液滴が個々に分離していることが確かめられた。

[0074] また、20分加熱後のウェルにおいて、Tween 20が0.001%以上含まれていれば、反応溶液の液滴が個々に分離していることが確かめられた。つまり、長時間加熱した場合、Tween 20が0.001%以上含まれていれば、短時間加熱した場合よりも再現性が高くなると考えられる。

図12はTween 20の濃度に応じた蛍光強度の値を示すグラフである。Tween 20の濃度が高くなるにつれ、蛍光強度が弱くなった。すなわち、Tween 20の濃度が増えることで反応を阻害している挙動が確認された。そのため、Tween 20の最適な濃度は5%程度までと推察される。また、コストの観点から、Tween 20の濃度は0.5%以下がより好ましいと考えられる。

また、同様の試薬10 μ lを96ウェルプレートに分注し、10 μ lの体積での反応性をライトサイクラーLC480（ロシュ製）を用いて検出した。ライトサイクラーの温調条件は、63℃一定とした。ライトサイクラーで同様の組成で反応を確かめた結果、Tween 20の濃度によらずインバーダー反応の蛍光シグナル増加は一定であった。このことから界面活性剤は酵素の反応性を高めるためではなく液滴の安定性に寄与していることが分かった。

界面活性剤は、試薬に含まれる検出対象物質がCYTOPやガラスなどに吸着するのを防ぐことができる濃度を添加すればよい。Triton-X100などのほかの界面活性剤の場合には最適な濃度が異なってもよいが

、T w e e n 2 0 の例を考慮できる。

[0075] (第三実施例)

次に、本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法の作用効果を確認するために行ったさらなる実施例について説明する。図 1 3 は、本発明の第二実施形態に係る生体分子解析方法の作用効果を説明するための図である。図 1 4 A から図 1 4 F は本実施例における蛍光量測定試験の結果を示す蛍光画像図である。図 1 3 において、反応性の欄の「良」とは、反応性が良好であったことを示す。図 1 3 において、液滴の欄の「○」とは、は隣り合う 2 つのウェルの間に蛍光が観察されなかったことを示す。図 1 3 において、液滴の欄の「△」とは、は隣り合う 2 つのウェルの間に蛍光が観察されたが、濃度測定には影響がない程度であったことを示す。図 1 3 において、液滴の欄の「×」とは、隣り合う 2 つのウェルの間に蛍光が観察されたことにより、隣り合う 2 つのウェルの間の領域を用いたときは正しくデジタル計測ができない場合があったことを示す。

[0076] 本実施例では第二実施例で用いられたインベダー反応試薬及び DNA を用いて、図 1 3 に示すように、洗浄の有無、洗浄用バッファーへの界面活性剤の添加の有無、及び反応試薬への界面活性剤の添加の有無について条件を変えて反応を行い、得られた蛍光画像から液滴の状態及び反応性を確認した。界面活性剤として、0.05%のT w e e n 2 0 を洗浄用バッファー又は反応試薬に添加した。その他の条件については第二実施例と同様である。

[0077] サンプル 1 及びサンプル 2 に対しては洗浄用のバッファーに界面活性剤を添加して洗浄を行った。サンプル 3 及びサンプル 4 に対しては洗浄用のバッファーに界面活性剤を添加せずに洗浄を行った。サンプル 5 及び 6 に対しては洗浄を行わなかった。さらに、サンプル 1、3、及び 5 の反応試薬には界面活性剤を添加した。一方、サンプル 2、4、及び 6 の反応試薬には界面活性剤を添加しなかった。いずれのサンプルにおいても反応性は良好であった。さらに、サンプル 2 が示すように、反応試薬に界面活性剤が含まれていない場合でも、洗浄用のバッファーに界面活性剤が含まれていれば、液滴が良

好に形成され、反応性も良好であることがわかった。

[0078] 以上説明したように、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００、及び第二実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００Ａによれば、微小空間１１又はウェル２６内で酵素反応を行うことで、迅速に、かつ、定量的な生体分子の解析を行うことができる。

[0079] また、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００、及び第二実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００Ａによれば、酵素反応としてインベーター法を用いることにより、ＰＣＲ増幅を必要とせずに、等温反応が可能のために、機器構成および解析手順を単純化できる。

[0080] また、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００、及び第二実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００Ａによれば、解析対象１分子が収容される大きさの微小空間１１内又はウェル２６内で反応をさせるため、シグナルが飽和するまでにかかる時間を短縮できる。

[0081] また、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００、及び第二実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００Ａによれば、従来に比して反応時間が短くＳＮ比が高い。

[0082] また、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００、及び第二実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００Ａによれば、酵素反応が、等温反応であるために、変温反応と比べて、安定した酵素反応を得ることができ、再現性が高い。

[0083] また、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００、及び第二実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット１００Ａによれば、酵素反応が、インベーター反応であるために、ＰＣＲを要する手順と比較してシグナルの検出判定を行うための時間を短縮することができる。

[0084] また、本発明の第一実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット 100、及び第二実施形態に係る生体分子解析方法及び生体分子解析キット 100Aによれば、微小空間 11 又はウェル 26 が、100ピコリットル以下であるために、解析のために消費される試薬の量を削減できる。

[0085] なお、上記実施形態では、低吸着構造部と吸着防止剤とが併用される例が開示されている。しかしながら、低吸着構造部と吸着防止剤との少なくともいずれかが採用されていれば、低吸着構造部と吸着防止剤とのいずれも採用されていない場合と比較して迅速に、かつ、定量的に解析をすることができる。

符号の説明

[0086] 100, 100A 生体分子解析キット
2, 23 基体部
3, 32 低吸着構造部
4 改質部
4A, 35 低吸着物質層
10, 30 反応容器
11 微小空間（容器形状部）
12 軟性平板
13 カバーガラス
14 ガラス基板
22 油性封止液
24 基板
26 ウェル（容器形状部）
31 流路
33 バッファー

請求の範囲

- [請求項1] 酵素反応を行うための反応容器を有し、
前記反応容器は、
容器形状部を有する基体部と、
前記容器形状部の少なくとも内面に設けられ、前記酵素反応における解析対象となる試料と前記酵素反応のための試薬との少なくとも一方の吸着率が前記基体部の吸着率よりも低い低吸着構造部と、
を有し、
前記反応容器内において酵素反応が行われたときに、前記酵素反応によるシグナルを検出するように構成されている生体分子解析キット。
- [請求項2] 前記低吸着構造部は、前記試料の吸着率が前記基体部よりも低く、前記基体部が前記反応容器内に露出している場合と比較して、前記シグナル検出におけるバックグラウンドが低い請求項1に記載の生体分子解析キット。
- [請求項3] 前記低吸着構造部は、前記試薬の吸着率が前記基体部よりも低く、前記基体部が前記反応容器内に露出している場合と比較して、前記シグナル検出におけるシグナル強度が高い請求項1または請求項2に記載の生体分子解析キット。
- [請求項4] 前記反応容器は、前記容器形状部の内面において前記吸着率を前記基体部より下げるために前記基体部の表面が改質された改質部をさらに有し、
前記容器形状部は、直径5マイクロメートル以下の略円形を有する開口部を有する有底円柱形状である請求項1から請求項3のいずれか一項に記載の生体分子解析キット。
- [請求項5] 前記反応容器は、前記容器形状部の内面において前記吸着率を前記基体部より下げるために前記基体部に積層された低吸着物質層をさらに有し、

前記容器形状部は、直径 5 マイクロメートル以下の略円形を有する開口部を有する有底円柱形状である請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の生体分子解析キット。

[請求項6] 解析対象となる試料を供給可能な容器形状部及び前記容器形状部が形成された基体部を有し、酵素反応を行うための反応容器と、

前記反応容器に供給可能であって前記酵素反応に使用される試薬と、

を有し、

前記試薬は、前記試料と前記試薬との少なくとも一方の前記基体部への吸着率を低減するための吸着防止剤を含有し、

前記反応容器内において前記酵素反応が行われたときに、前記酵素反応によるシグナルを検出するように構成されている生体分子解析キット。

[請求項7] 前記酵素反応が等温反応である請求項 1 から請求項 6 のいずれか一項に記載の生体分子解析キット。

[請求項8] 解析対象となる前記試料が、DNA、RNA、miRNA、mRNA、タンパク質のいずれか 1 つを含み、解析対象物質がDNA、RNA、miRNA、mRNA、タンパク質のいずれか 1 つである請求項 1 から請求項 7 のいずれか一項に記載の生体分子解析キット。

[請求項9] 解析対象物質が核酸であり、前記酵素反応がインベーター反応である請求項 8 に記載の生体分子解析キット。

[請求項10] 前記試薬は、蛍光、発光、pH、吸光、電位のいずれか 1 つによりシグナルを発する請求項 1 から請求項 9 のいずれか一項に記載の生体分子解析キット。

[請求項11] 請求項 1 から請求項 10 のいずれか一項に記載の生体分子解析キットを用いた生体分子解析方法。

[請求項12] 流路を通じて試料を供給可能な容器形状部と、前記容器形状部が形成された基体部と、を有する酵素反応を行うための反応容器と、

前記反応容器に供給可能であって前記酵素反応に使用される試薬と、

を有し、

前記試薬は、前記試薬の表面張力を低減するための界面活性剤を含有し、

前記反応容器内において酵素反応が行われたときに、前記酵素反応による蛍光若しくは発色シグナルを検出するように構成されている生体分子解析キット。

[請求項13] 前記吸着防止剤が界面活性剤である請求項6に記載の生体分子解析キット。

[請求項14] 前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項13に記載の生体分子解析キット。

[請求項15] 前記非イオン性界面活性剤がT w e e n 2 0である請求項14に記載の生体分子解析キット。

[請求項16] 前記非イオン性界面活性剤がT r i t o n - 1 0 0である請求項14に記載の生体分子解析キット。

[請求項17] 前記界面活性剤の濃度が0. 0 0 0 5 %以上5 %以下である請求項13に記載の生体分子解析キット。

[請求項18] 流路及び複数の容器形状部を有する反応容器において、前記流路に試薬を送液し、前記複数のウェルに前記試薬を充填し、

前記流路に油性封止液を送液し、前記複数のウェル内の前記試薬を前記油性封止液により封止することにより前記複数のウェルを複数の独立した核酸検出反応容器を形成すること、を有し、

前記試薬、及び前記油性封止液のうちいずれか1つに界面活性剤が含まれる生体分子解析方法。

[請求項19] 前記複数のウェルに前記試薬を充填する前に、前記流路を通じて前記複数のウェルに洗浄用のバッファを充填する工程をさらに有する請求項18に記載の生体分子解析方法。

〔請求項20〕 請求項 1 から 1 0 のいずれか一項または請求項 1 2 から 1 7 のいずれか一項に記載された生体分子解析キットを用いた生体分子解析方法であって、

前記容器形状部に洗浄用のバッファーを供給した後に、前記容器形状部に前記試薬を供給する生体分子解析方法。