

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-121096

(P2004-121096A)

(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M 4 B 0 2 9
G O 1 N 37/00	G O 1 N 37/00	1 O 2 4 B 0 6 3
// C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 15/00	F
C 1 2 N 15/09	C 1 2 M 1/00	A

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2002-289848 (P2002-289848)	(71) 出願人	501145295 独立行政法人食品総合研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12
(22) 出願日	平成14年10月2日(2002.10.2)	(71) 出願人	000195568 生物系特定産業技術研究推進機構 埼玉県さいたま市北区日進町1丁目40番地2
		(74) 代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎
		(74) 代理人	100086221 弁理士 矢野 裕也
		(72) 発明者	大谷 敏郎 千葉県我孫子市我孫子144-3-906
		(72) 発明者	杉山 滋 茨城県つくば市高野台2-13-10 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAの伸長固定方法

(57) 【要約】

【課題】DNA上の遺伝子や特定塩基配列の位置を決定するにあたり、大量のDNA溶液を要せず、DNAを基板上の特定位置に直線状に引き伸ばして固定する方法を提供すること。

【解決手段】溶液中のDNAを溶液の流れまたは気液界面の移動により基板上に配向固定する方法において、基板上に高さ1 μm以下10 nm以上の段差を設け、前記段差と交差する方向にDNA溶液を流すか、または気液界面を移動させることにより、DNAの末端を段差面に付着させ、溶液の流れまたは気液界面の表面張力によりDNAを配向、伸長させることを特徴とするDNAの伸長固定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

溶液中の DNA を溶液の流れまたは気液界面の移動により基板上に配向固定する方法において、基板上に高さ $1\ \mu\text{m}$ 以下 $10\ \text{nm}$ 以上の段差を設け、前記段差と交差する方向に DNA 溶液を流すか、または気液界面を移動させることにより、DNA の末端を段差面に付着させ、溶液の流れまたは気液界面の表面張力により DNA を配向、伸長させることを特徴とする DNA の伸長固定方法。

【請求項 2】

段差が、直線、円弧、方形または円形の凹みの形状をなして形成されていることを特徴とする請求項 1 記載の DNA の伸長固定方法。

10

【請求項 3】

溶液の流れまたは気液界面の移動を起こす手段が、重力、遠心力、電気泳動またはポンプによる送液あるいは吸い上げであることを特徴とする請求項 1 記載の DNA の伸長固定方法。

【請求項 4】

基板が、雲母板、ガラス板、シリコン板およびサファイア板のいずれかであることを特徴とする請求項 1 記載の DNA の伸長固定方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

20

本発明は DNA の伸長固定方法に関し、詳しくは DNA を基板上に配向、伸長して固定する方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

DNA 上の遺伝子の位置を決定することは、遺伝子機能の解析や病原遺伝子・有用遺伝子の探索などにおいて非常に重要な意味を持つ。最近、ナノメートルレベルの分解能を持つ原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM) や走査型近接場光プローブ顕微鏡 (Scanning Near-field Optical / Atomic Force Microscope, SNOM / AFM) などを用いて、正確に遺伝子位置を決定することが可能になっている。

30

しかし、これらの方法を適用するためには、対象となる DNA を直線状に引き延ばすことが必要になる。また、AFM や SNOM / AFM は、観察範囲が数十 μm と比較的狭いため、基板上的特定位置に DNA を固定することも必要である。従来、DNA を基板上に伸長固定するためには、基板を DNA 溶液に浸した後、一定速でゆっくりと引き上げ、その時に起きる気液界面の移動により DNA を伸長固定する方法 (Science 277 (1997) p. 1518 - 1523、特表平 9 - 509057 号) が一般的に用いられてきた。

【0003】**【発明が解決しようとする課題】**

しかしながら、従来の方法では DNA は基板の全面に分散して固定されてしまい、固定された DNA の位置を AFM や SNOM / AFM により走査しながら捜す必要があった。さらに、SNOM / AFM では、DNA は基板の片面だけに固定される必要があるが、従来の方法では両面に DNA が固定され、測定時のノイズとなっていた。また、試料作成に要する DNA 溶液の量も数 mL という大量が必要であるという問題点もあった。

40

そこで、本発明は、大量の DNA 溶液を要せず、DNA を基板上的特定位置に直線状に引き伸ばして固定する方法を提供することを目的とする。

【0004】**【課題を解決するための手段】**

請求項 1 記載の本発明は、溶液中の DNA を溶液の流れまたは気液界面の移動により基板

50

上に配向固定する方法において、基板上に高さ $1\ \mu\text{m}$ 以下 $10\ \text{nm}$ 以上の段差を設け、前記段差と交差する方向に DNA 溶液を流すか、または気液界面を移動させることにより、DNA の末端を段差面に付着させ、溶液の流れまたは気液界面の表面張力により DNA を配向、伸長させることを特徴とする DNA の伸長固定方法である。

請求項 2 記載の本発明は、段差が、直線、円弧、方形または円形の凹みの形状をなして形成されていることを特徴とする請求項 1 記載の DNA の伸長固定方法である。

請求項 3 記載の本発明は、溶液の流れまたは気液界面の移動を起こす手段が、重力、遠心力、電気泳動またはポンプによる送液あるいは吸い上げであることを特徴とする請求項 1 記載の DNA の伸長固定方法である。

請求項 4 記載の本発明は、基板が、雲母板、ガラス板、シリコン板およびサファイア板のいずれかであることを特徴とする請求項 1 記載の DNA の伸長固定方法である。 10

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明は、DNA を基板上に配向、伸長して固定する方法である。本発明の対象とされる DNA に制限はなく、あらゆる生物のゲノムまたはプラスミド、ファージ（ウイルス）、人工染色体などのベクターに由来するものでよく、長さも限定されない。

DNA を懸濁する溶液としては、例えば TE 緩衝液（ $10\ \text{mM}$ トリス、 $1\ \text{mM}$ EDTA、 pH 7 ~ 8）、トリス緩衝液、蒸留水などが用いられ、これらの中では TE 緩衝液が好ましい。

【0006】

次に、基板に関しては、特に限定されないが、雲母板、ガラス板、シリコン板、サファイア板などが好適である。 20

基板には、段差が設けてあり、その高さは $1\ \mu\text{m}$ 以下 $10\ \text{nm}$ 以上、好ましくは $0.5\ \mu\text{m}$ 以下 $50\ \text{nm}$ 以上である。段差の形状については任意であるが、例えば直線、円弧、方形または円形の凹みが好適であり、そのサイズは $10\ \mu\text{m}$ から $1\ \text{mm}$ の範囲が適当である。

【0007】

DNA を含む溶液の流れまたは気液界面の移動を起こす手段としては、例えば重力、遠心力、電気泳動、ポンプ（電動等の自動または手動）などによる送液や吸い上げが挙げられる。いずれの方法でも DNA を伸長することは可能であるが、遠心力またはポンプによる方法が望ましい。 30

【0008】

以下に、本発明を図面に基づいて詳しく説明する。

図 1 は、本発明による DNA 伸長固定の原理を示した模式図である。図に示されるように、DNA は溶液中ではランダムコイル状（1）に丸まっている。DNA は溶液の流れに従って移動し、基板上に設けた段差（2）を通過するときある確率で末端部分が段差（2）に付着する。

末端が段差に付着したランダムコイル状 DNA（3）は、水流の力により引き伸ばされて直線状（4）になり、DNA 分子自身が持つ極性や電荷のため基板面に付着し、（5）のように基板面に固定される。 40

【0009】

図 2 は、実際に本原理に基づいて基板上に伸長固定した DNA の蛍光顕微鏡写真である。基板上に段差を作成するには、基板の材質を考慮して適切な手段を採用すればよく、例えば雲母板の場合は雲母を劈開することによって段差を形成することができる。1 例を示すと、雲母を劈開して高さ $400\ \text{nm}$ 程度の段差を作成することができた。

【0010】

次に、雲母板に段差を形成した基板を用いて DNA を該基板上に配向、伸長して固定する方法について説明する。

雲母板を MgCl_2 処理することにより雲母板上に正電荷を有する Mg^+ イオンを吸着させて、DNA の付着を容易にした後、その中心に $5\ \mu\text{L}$ の蛍光色素（YOYO-1） 50

で染色した ファージ DNA 溶液 (濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$) を滴下し、 5000rpm で回転させた。DNA 溶液は回転にともなう遠心力により中心から外縁部へと押し流され、その時起きる水流により、図 1 の原理に基づき DNA が段差部に伸長固定された。

図 3 では、AFM により個別の DNA を観察した結果を立体で表示した。図 2 では、DNA 1 本を確認することはできないが、図 3 では、AFM によって雲母基板上の段差部に本発明の方法により伸長固定された 1 本 1 本の DNA の形状像が確認された。また、段差部分に対し、DNA が一方向に配向して直線状に固定されていることがわかる。

【0011】

このように伸長固定された DNA 上の遺伝子を蛍光色素ないしは微小金粒子などにより標識すれば、AFM や SNOM / AFM により、その位置をナノメートルレベルで逐次決定して行くことが可能になる。

10

【0012】

【発明の効果】

本発明によれば、DNA を基板上の片面の特定位置に直線状に引き伸ばして固定することができるので、AFM や SNOM / AFM による遺伝子位置の詳細な決定を行うことが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】(a) ~ (e) は本発明の原理を示す模式図である。

【符号の説明】

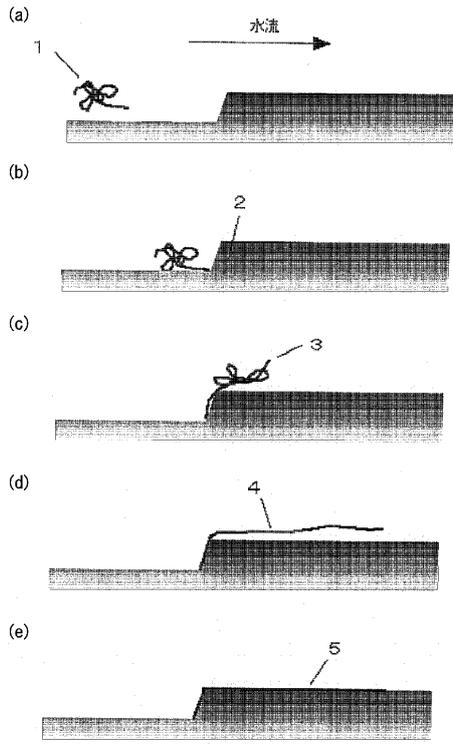
- 1 溶液中のランダムコイル状 DNA
- 2 基板上に作成した段差
- 3 末端が段差に付着したランダムコイル状 DNA
- 4 水流により直線状に伸ばされた DNA
- 5 基板面に直線状に固定された DNA

20

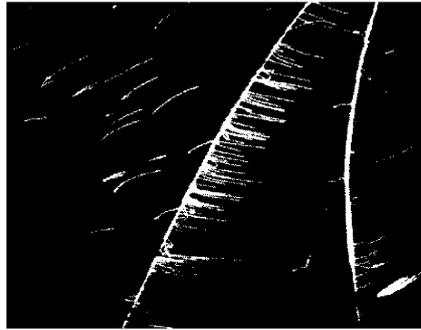
【図 2】本発明により実際に伸長固定された DNA を示す蛍光像である。

【図 3】基板の段差部に伸長固定された DNA の AFM 観察像である。

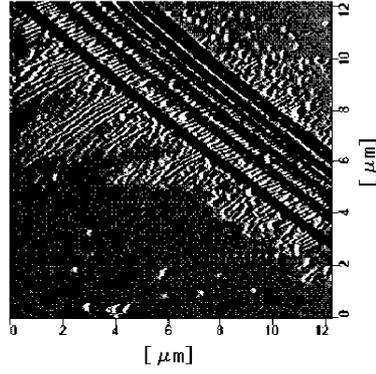
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 吉野 智之

茨城県つくば市東新井 1 0 - 3 シティハイツ B 2 0 1

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 HA12

4B029 AA07 AA23 CC08 FA15

4B063 QA01 QA11 QA20 QQ43 QQ91 QR32 QR55 QR62 QR82 QS03

QS25 QS34 QS39 QX02 QX10