

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G01N 33/53		G01N 33/53	M 2G052
C12M 1/00		C12M 1/00	A 4B024
C12N 15/09		G01N 33/566	4B029
G01N 33/566		37/00	102
37/00	102	C12N 15/00	F

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 225410(P 2001 - 225410)

(22)出願日 平成13年7月26日(2001.7.26)

(71)出願人 501203344

独立行政法人 農業技術研究機構
茨城県つくば市観音台3 - 1 - 1

(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

(72)発明者 乙部 和紀

茨城県つくば市春日1丁目1番地102号棟3
06号室

(74)代理人 100107870

弁理士 野村 健一 (外1名)

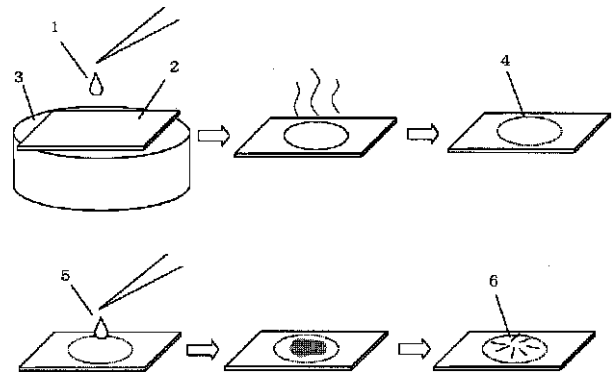
最終頁に続く

(54)【発明の名称】DNA計測用基板の作製方法

(57)【要約】

【課題】 表面の平坦性、DNA吸着性、DNA伸張性が高いDNA計測用基板を提供する。

【解決手段】 基板の上に溶媒に可溶なポリマー又は共役結合を有するポリマーの被膜を形成させる工程、該被膜上にDNA溶液を滴下する工程、及び滴下したDNA溶液を該被膜上に拡げる工程を含むDNA計測用基板の作製方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板上に溶媒に可溶性ポリマーの被膜を形成させる工程、該被膜上に DNA 溶液を滴下する工程、及び滴下した DNA 溶液を該被膜上に拡げる工程を含む DNA 計測用基板の作製方法。

【請求項 2】 基板上に 共役結合を有するポリマーの被膜を形成させる工程、該被膜上に DNA 溶液を滴下する工程、及び滴下した DNA 溶液を該被膜上に拡げる工程を含む DNA 計測用基板の作製方法。

【請求項 3】 共役結合を有するポリマーが、ポリフェナザシリン、ポリビニルカルバゾール、又は、ポリエチレンジオキシチオフェンとポリスチレンスルホン酸の混合物である請求項 2 記載の DNA 計測用基板の作製方法。

【請求項 4】 請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載された方法によって作製された DNA 計測用基板。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、DNA 計測用基板の作製方法に関するものである。この方法によって作製された DNA 計測用基板は、表面の平坦性、DNA 吸着性、DNA 伸張性が高いため、この基板を用いることにより鮮明かつ大量の DNA 像を得ることができる。

【0002】

【従来の技術】DNA チップ法においては、様々な標的遺伝子断片を有する DNA をその種類ごとに基板上に吸着させておき、検査対象物の抽出液を基板上に展開することにより、標的遺伝子 DNA または対応する RNA の有無を検出することができる。また、上記方法では結合状態の DNA について 0.5 μm 程度の分解能を有する蛍光顕微鏡により検出している。一方、微細な探針先端と観察対象物との力学的、電磁気学的、もしくは化学的相互作用を利用して 1nm 以下の分解能を実現した走査型プローブ顕微鏡を用いることにより、標的遺伝子 DNA の結合部位を高分解能で検出することができる。この顕微鏡を利用するために、DNA 観察用の平坦な面を有する基板としてマイカの劈開面を利用している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】標的遺伝子 DNA の結合などの変化を高感度で計測するためには、基板に配置する DNA が重ならないように伸張・整列させることが重要である。DNA を基板上に伸張・整列させる方法としては、例えば、特表平 9-509057 号公報記載の方法が知られている。しかし、この方法では DNA の一端のみを固定する方法を採用しているため、DNA が無秩序に絡み合い、重なり合った DNA 像しか観察できない。

【0004】また、微細な探針先端と観察対象物との力学的、電磁気学的、もしくは化学的相互作用を利用して 1nm 以下の分解能を実現する走査型プローブ顕微鏡を用いて、標的遺伝子 DNA の結合部位を高分解能で検出す

るためには、凹凸が 1nm 以下の高度の平坦さを有する基板の作製が必要であるが、マイカの劈開面の利用以外に手段が存在しない。

【0005】さらに、高度に平坦な表面を、ポリマーで被覆することにより実現するためにはポリマー溶液の流動性が重要であり、ポリマーが可溶性であることが必要である。

【0006】この発明は、前述したような当該技術の有していた課題を解決して、かつ従来技術の欠点を克服した新規な DNA 計測用基板の作製方法を提供しようとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、DNA 計測用基板の表面を、溶媒に可溶性で 共役結合を有するポリマーで覆うことにより、凹凸のある基板表面を高度に平坦な表面に作り変えることができ、また、計測しようとする DNA の吸着性と伸張性を向上できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、本発明は、基板上に溶媒に可溶性ポリマーの被膜を形成させる工程、該被膜上に DNA 溶液を滴下する工程、及び滴下した DNA 溶液を該被膜上に拡げる工程を含む DNA 計測用基板の作製方法である。

【0009】また、本発明は、基板上に 共役結合を有するポリマーの被膜を形成させる工程、該被膜上に DNA 溶液を滴下する工程、及び滴下した DNA 溶液を該被膜上に拡げる工程を含む DNA 計測用基板の作製方法である。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】本発明は、少なくとも以下の (1) ~ (3) の工程を含む DNA 計測用基板の作製方法である。

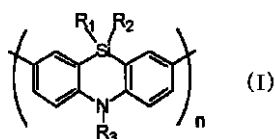
【0012】工程 (1) では、基板上に、溶媒に可溶性ポリマー又は 共役結合を有するポリマーの被膜を形成させる。溶媒に可溶性ポリマーの場合、溶媒に溶かすことによりポリマーに流動性を付与することができるので、基板上に高度に平坦な表面を作り出すことができる。溶媒に可溶性ポリマーとしては、例えば、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネートなどを挙げることができる。共役結合を有する化合物とそれらポリマーは、DNA に対し特異的な相互作用が報告されており、このようなポリマーで基板を被覆することにより、DNA の固定が期待できる。共役結合を有するポリマーとしては、例えば、ポリアニリン、ポリピロール、ポリチオフェンなどを挙げることができるが、これらポリマーは溶媒に不溶である。ポリフェナザシリン (式 (I)) 及びポリビニルカルバゾール (式 (II)) は、一般的な有機溶媒 (クロロホルム、テトラヒドロフラン、1, 2-ジクロロエタン) に可溶性で、なおかつ 共有結合を有

する。従って、これらのポリマーを用いることにより、基板表面の平坦性、DNA吸着性、及びDNA伸張性を高めることができる。ポリエチレンジオキシチオフェン(式(III))やポリスチレンスルホン酸(式(IV))は水溶性の共役ポリマーであり、これらのポリマーの混合物を用いることで有害な有機溶媒を用いることなくガラス上へのコートが可能であり、DNAの固定と伸張を行うこともできる。

【0013】なお、本発明において使用するポリフェナザシリン、ポリビニルカルバゾール、ポリエチレンジオキシチオフェン、ポリスチレンスルホン酸は、それぞれ以下の式で表される。

【0014】

【化1】

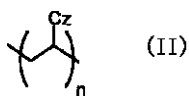


一般式(1)において、R₁、R₂及びR₃は、それぞれ独立に、水素原子、置換されていてもよいアルキル基、アール基、アルコキシ基またはアリーロキシ基である。

【0015】上記のR₁ - R₃におけるアルキル基としては、メチル、エチル、n-またはiso-プロピル、n-、iso-またはtert-ブチル、n-、iso-またはneo-ペンチル、n-ヘキシル、シクロヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル等の直鎖、分岐、環状の炭素数1~20、好ましくは1~10のアルキル基が挙げられる。また、アルコキシ基としては、メトキシ、エトキシ、n-またはiso-プロポキシ、n-、iso-またはtert-ブトキシ、n-、iso-またはneo-ペントキシ、n-ヘキソキシ、シクロヘキソキシ、n-ヘプトキシ、n-オクトキシ等の直鎖、分岐、環状の炭素数1~20、好ましくは1~10のアルコキシ基が挙げられる。また、アリール基としては、フェニル基、o-、m-、p-トリル基、1-および2-ナフチル基、アントリル基等の炭素数6~20、好ましくは6~14のアリール基が挙げられる。アリーロキシ基としては、フェノキシ基、o-、m-、p-トリロキシ基、1-および2-ナフトキシ基、アントロキシ基等の炭素数6~20、好ましくは6~14のアリーロキシ基が挙げられる。

【0016】

【化2】

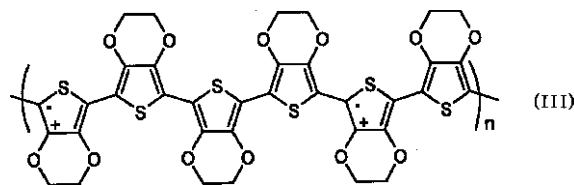


一般式(II)において、Czはカルバゾイル基を示す。

【0017】上記のCzにおけるカルバゾイル基は、1-カルバゾイル、2-カルバゾイル、3-カルバゾイル、4-カルバゾイル、9-カルバゾイル基があげられる。また、カルバゾイル基は置換されていてもよい。

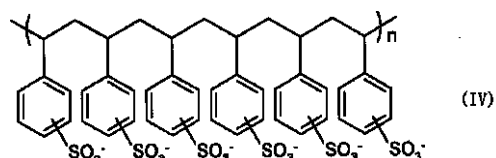
【0018】

【化3】



【0019】

10 【化4】



20 ポリマーの被膜の形成は、どのような方法で行ってもよく、例えば、回転可能な台上に置いた基板の上に、ポリマー溶液(溶媒として1,2-ジクロロエタン、濃度2g/l)を50μl滴下し、基板を回転させ、それによって生じる遠心力によりポリマーを基板上に拡張させ、その後、溶媒を乾燥させることにより、被膜を形成させることができる。

【0020】工程(2)では、被膜上にDNA水溶液を滴下する。

【0021】DNA溶液中のDNA濃度は特に限定されないが、 $5.2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ぐらいが適当である。滴下するDNAの量も特に限定されないが、5μlぐらいが適当である。

30 【0022】工程(3)では、滴下したDNA溶液を該被膜上に拡げる。DNA溶液を被膜上に拡げる方法は特に限定されず、人為的手段によって拡げてよいし、また、DNA溶液の自然な流動により拡げてよい。被膜上に拡がった溶液中に含まれるDNAは、気液界面移動法(特表平9-509057号公報)の原理により被膜表面上に伸張された状態で固定される。

40 【0023】以上の方法によって作製されるDNA計測用基板は、DNA計測のための種々の用途に用いられるが、その表面の平坦性から、特に走査型プローブ顕微鏡を用いてDNAの結合部位を検出する場合に用いるのが好ましい。

【0024】以下に本発明の方法の一態様を図1を用いて説明する。

【0025】図1において、1はポリマー溶液、2は被覆対象基板、3は基板回転台、4はポリマー被覆部、5はDNA溶液、6は伸張したDNAをそれぞれ表す。

50 【0026】最初に清浄な状態のカバーガラス2を高速回転可能な回転台3上に固定し、回転台を回転させた状態で被覆剤であるポリマー溶液1を滴下することにより、遠心力でポリマー溶液はガラス上に薄く展開される。溶媒を乾燥させることによりポリマー被覆部4が形

成され、DNA 溶液 5 を該被覆部に 5 μl 滴下し、自然な流動で展開させた後に DNA 溶液を除去し、伸張・固定された DNA 6 を得ることができる。

【0027】以上の操作により、十分に伸張した状態の DNA が基板上に多数吸着したガラス基板を得ることができる。

【0028】

【実施例】10mgのポリフェナザシリン（一般式(I)、R₁およびR₂ = n-オクチル、R₃ = メチル）そしてポリビニルカルバゾール（一般式(II)、Cz=9-カルバゾイル）を、5mlの1,2-ジクロエタンに溶解させ、それぞれ濃度2g/lのポリフェナザシリン溶液とポリビニルカルバゾール溶液を調製した。各々の溶液50 μlをカバーガラス表面に滴下し、展開・乾燥させ、カバーガラスの表面の被覆を行なった。

【0029】蛍光色素ラベルした フェージDNA 溶液（濃度 5.2×10^{-4} μg/μl）5 μlを、カバーガラス上のポリフェナザシリンまたはポリビニルカルバゾールで被覆した部分に滴下し、自然な流動で展開させ、溶液中のフェージDNAを固定させた。また、比較のため、ポリフェナザシリンやポリビニルカルバゾールで被覆していないカバーガラスにも、フェージDNA溶液を滴下し、DNAの固定を行った。蛍光観察を行った結果、図2のように被覆されていないカバーガラス上では凝集した状態にあるDNAが多数存在し、伸張・固定が十分でないのに対して、ポリフェナザシリン又はポリビニルカルバゾールにより被覆されたガラス表面においては、図3ならびに図4のように直線性の高い状態で伸張したDNAが多数得られることが確認された。

【0030】また、微細な探針先端と観察対象物との力学的相互作用を利用して観察する走査型プローブ顕微鏡（オリンパス光学製、NVB100）を用いて、ポリマーコートしたガラス基板表面の凹凸を比較した結果、図5のように被覆のないガラス上では約25nmの凹凸が存在して

いるのに対して、図6のようにポリビニルカルバゾールで被覆したガラス上では基板表面にあった凹凸がポリマーに覆われて平坦になっていることが確認された。

【0031】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のDNA計測用基板の作製方法によれば、溶媒に可溶性ポリマーで基板表面を覆うことにより、凹凸のある基板表面を高度に平坦な表面を作り変えることができ、また、共役結合を有するポリマーで基板表面を覆うことにより、基板表面におけるDNAの吸着性や伸張性を高めて、効率よく計測対象のDNAを伸張・整列させることができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】基板のポリマー被覆並びに該被覆部のへのDNA伸張固定に関する方法の流れ図。

【図2】ポリマー被覆のないガラス基板に固定したDNAの蛍光顕微鏡写真。

【図3】ポリビニルカルバゾールで被覆したガラス基板に固定したDNAの蛍光顕微鏡写真。

【図4】ポリフェナザシリンで被覆したガラス基板に固定したDNAの蛍光顕微鏡写真。

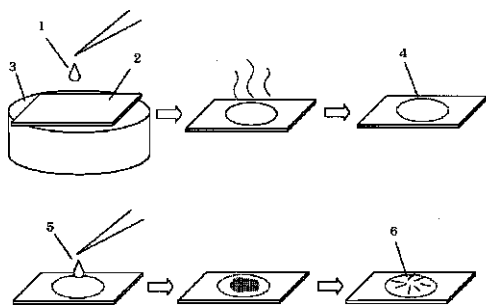
【図5】ポリマーで被覆していないガラス基板表面の走査型プローブ顕微鏡による凹凸計測結果を示す図。

【図6】ポリビニルカルバゾールで被覆したガラス基板表面の走査型プローブ顕微鏡による凹凸計測結果を示す図。

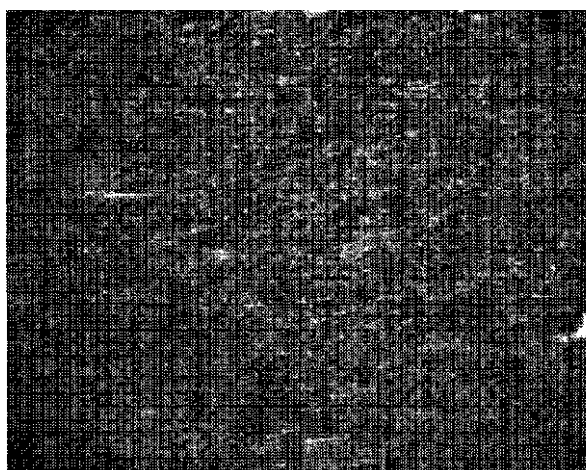
【符号の説明】

- 1 ポリマー溶液
- 2 被覆対象基板
- 3 基板回転台
- 4 ポリマー被覆部
- 5 DNA 溶液
- 6 伸張したDNA

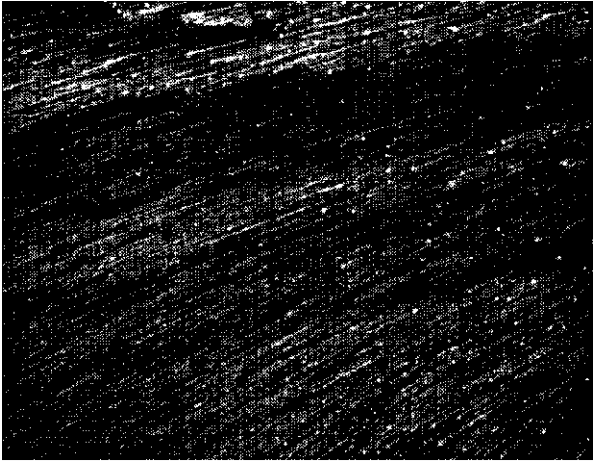
【図1】



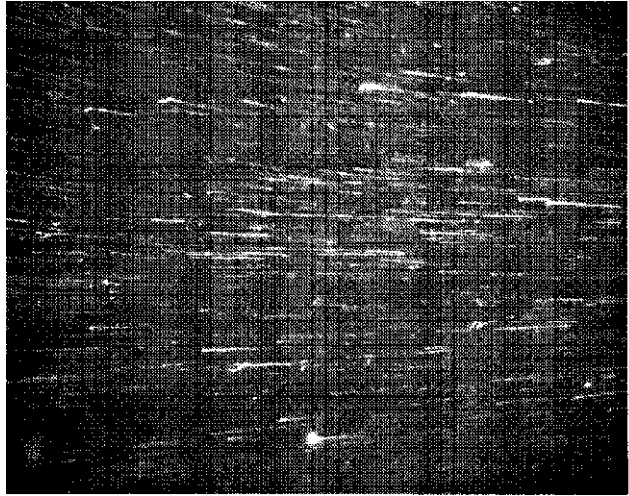
【図2】



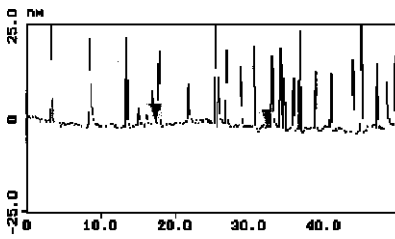
【図 3】



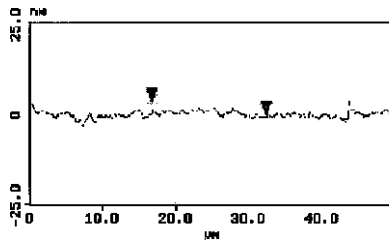
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷ // G 0 1 N 1/28	識別記号	F I G 0 1 N 1/28	テームコード(参考) N
(72)発明者 中尾 秀信 茨城県つくば市二の宮 2 - 7 - 2 サンティ 二の宮104		F ターム(参考)	2G052 AB20 AD26 AD46 CA04 CA18 DA08 FA05 GA31 JA07 JA16 4B024 AA11 CA04 CA09 HA08 HA11 HA12
(72)発明者 大谷 敏郎 茨城県つくば市吾妻 2 - 1 - 2 - 705 - 202			4B029 AA07 AA21 AA27 BB20 CC07
(72)発明者 林 英樹 愛知県名古屋市昭和区川原通 4 - 10 - 612			FA15 GA08 GB09