



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103842821 B

(45) 授权公告日 2016.03.23

(21) 申请号 201280049085.1
 (22) 申请日 2012.10.04
 (30) 优先权数据
 2011-221024 2011.10.05 JP
 2011-236138 2011.10.27 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2014.04.04
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2012/075807 2012.10.04
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02013/051651 JA 2013.04.11
 (73) 专利权人 株式会社日立高新技术
 地址 日本东京都
 (72) 发明人 斋藤俊郎 滨崎孝伸 高桥智
 前岛宗郎 今井恭子 今井一成
 田尾龙治
 (74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
 代理人 钟晶 於毓桢

(51) Int. Cl.
 G01N 33/553(2006.01)
 C12M 1/00(2006.01)
 C12Q 1/68(2006.01)
 G01N 21/64(2006.01)
 G01N 33/543(2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 101988922 A, 2011.03.23,
 David M Rissin, et al.. Single-molecule
 enzyme-linked immunosorbent
 assay detects serum proteins at
 subfemtomolar concentrations. 《nature
 biotechnology》. 2010, 第 28 卷 (第 6 期), 第
 595-600 页.
 David M Rissin, et al.. Single-molecule
 enzyme-linked immunosorbent
 assay detects serum proteins at
 subfemtomolar concentrations. 《nature
 biotechnology》. 2010, 第 28 卷 (第 6 期), 第
 595-600 页.
 审查员 贾静

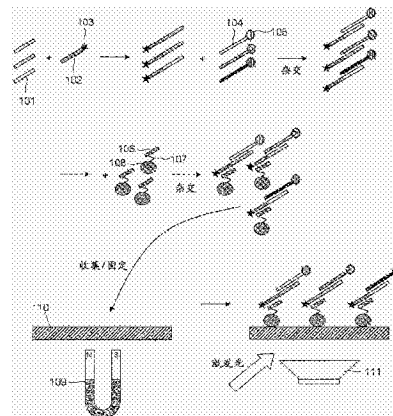
权利要求书2页 说明书23页 附图10页

(54) 发明名称
 生物分子分析及生物分子分析装置

对浓度进行评价。

(57) 摘要

本发明的目的在于,提供一种生物分子分析方法及单元,其在生物分子分析方法中利用生物分子数计数实现宽动态范围和快速分析。本发明涉及生物分子分析方法,其特征在于,包含:将分析对象生物分子 101 固定在磁性微粒 108 表面的工序、使带标记的探针分子 104 与分析对象生物分子 101 反应的工序、将前述微粒 108 收集并固定在支撑基体 110 上的工序、和对前述支撑基体 110 上的标记进行测定的工序。本发明通过使用带有一分子的磁性微粒来实现生物分子数的计数,并且通过在使固定有生物分子的微粒分散的状态下进行杂交、抗原抗体间的反应,实现了快速反应。进而,能够以一分子水平对目的生物分子的种类进行判别和对存在量进行定量,特别是能够对绝



1. 一种生物分子分析方法,其特征在于,包含:
将分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的工序、
使带荧光标记的探针分子与分析对象生物分子反应的工序、
将所述磁性微粒收集并固定在支撑基体上的工序、和
对所述支撑基体上的标记进行测定的工序,
所述磁性微粒的直径为 $1\ \mu\text{m}$ 以下,
所述支撑基体的收集并固定所述磁性微粒的面平滑,
将分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的工序通过将每一个所述磁性微粒固定一分子所述分析对象生物分子来进行,
对所述支撑基体上的标记进行测定的工序通过利用一分子生物分子所附的一分子荧光色素的荧光观察,计数亮点来进行。
2. 根据权利要求 1 所述的生物分子分析方法,其特征在于,所述磁性微粒表面预先固定有捕捉用分子,介由所述捕捉用分子将分析对象生物分子固定在所述磁性微粒表面。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物分子分析方法,其特征在于,所述磁性微粒预先固定有一分子捕捉用分子,介由所述捕捉用分子将分析对象生物分子固定在所述磁性微粒表面。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物分子分析方法,其特征在于,通过使用磁力将所述磁性微粒收集并固定在支撑基体上。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物分子分析方法,其特征在于,进行将分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的工序后,进行使带荧光标记的探针分子与所述分析对象生物分子反应的工序。
6. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物分子分析方法,其特征在于,进行使带荧光标记的探针分子与分析对象生物分子反应的工序后,进行将所述分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的工序。
7. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物分子分析方法,其特征在于,所述生物分子为核酸。
8. 根据权利要求 7 所述的生物分子分析方法,其特征在于,所述探针分子为能够与欲测定的生物分子杂交的核酸。
9. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物分子分析方法,其特征在于,所述生物分子为蛋白质。
10. 根据权利要求 9 所述的生物分子分析方法,其特征在于,所述探针分子为对于欲测定的生物分子的抗体。
11. 根据权利要求 1 或 2 所述的生物分子分析方法,由标记的测定结果,从而对分析对象生物分子的绝对浓度进行评价。
12. 一种生物分子分析装置,其特征在于,具备:
将分析对象生物分子固定在磁性微粒上的单元、
使带荧光标记的探针分子和分析对象生物分子反应的单元、
在所述反应后将所述磁性微粒收集并固定在支撑基体上的单元、和
对标记进行测定的单元,
所述磁性微粒的直径为 $1\ \mu\text{m}$ 以下,

所述支撑基体的收集并固定所述磁性微粒的面平滑，

将分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的单元是将每一个所述磁性微粒固定一分子所述分析对象生物分子的单元，

对标记进行测定的单元是利用一分子生物分子所附的一分子荧光色素的荧光观察，计数亮点的单元。

13. 根据权利要求 12 所述的生物分子分析装置，其特征在于，对标记进行测定的单元包含光照射单元及发光检测单元。

生物分子分析方法及生物分子分析装置

技术领域

[0001] 本发明涉及生物分子分析方法及生物分子分析装置。

背景技术

[0002] 近年来,作为生物分子的分析方法,开发出了对试样中所包含的生物分子的种类和量简便地进行解析的方法。例如,在 DNA 微阵列中,预先将多种具有能够识别已知基因序列的序列的合成 DNA 固定在支撑基体上的规定位置,将实施了荧光体标记的核酸试样或核酸试样的逆转录产物、扩增产物在前述支撑基体上进行杂交,然后利用荧光扫描仪获得荧光图像,从而可以由荧光强度解析何种基因以怎样的量进行了表达(非专利文献 1)。此外,通过夹心法(sandwich assay)检测特定的生物分子的方法(酶联免疫吸附法:ELISA)已经实用化,所述夹心法为:预先将与检测对象生物分子特异性结合的抗体固定在支撑基体上,使分析对象试样在其上流过从而进行规定的特异性结合反应,进而使实施了荧光标记的抗体在其上流过,并进行荧光检测。

[0003] 在任意情况下,均是预先将特异性捕捉检测对象生物分子的探针分子固定在支撑基体上,使分析对象试样在其上流过,进行规定的特异性结合反应,通过荧光测定等进行定量。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献 1:Science Vol. 270, pp. 467-470, 1995 年

[0007] 非专利文献 2:Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 103, pp. 3687-3692, 2006 年

[0008] 非专利文献 3:Nature Biotechnology Vol. 28, pp. 595-599, 2010 年

发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] DNA 微阵列、ELISA(酶联免疫吸附法)所代表的现有解析方法中,使带荧光标记(或酶标记)的生物分子在固定有数千~数万分子的探针分子的反应位点进行特异性结合反应后,由荧光强度的测定对结合在该反应位点的生物分子数进行相对比较,动态范围在 2~3 位,比报道(非专利文献 2)的实际的生物分子存在量的动态范围(~4 位)低。

[0011] 此外,报道了单一分子 ELISA 法,该方法中,将多种抗体固定在微粒上,使稀释后的样品中的抗原与每一微粒上仅 1 分子的该抗体结合,将微粒收集、固定在支撑体上后,在支撑体上对标记进行测定从而对生物分子(抗原)进行分析(非专利文献 3)。但是已知:由于微粒上固定有多种抗体,存在结合 2 分子以上抗原的可能性,一旦发生结合,则难以在检测工序中对其进行判别,即使支撑体上的孔中存在微粒无法进入的位置,在检测工序中也无法对其进行判别。

[0012] 进而,前述特异性结合反应中,进行特异性结合的探针分子由于被固定在支撑基体上,因此无法移动,反应时间非常长。例如,在前述 DNA 微阵列的情况下杂交需要 10 小时

以上,存在在需要快速进行解析的、例如临床检查等中无法应用的课题。

[0013] 进而,上述方法虽然能够进行试样间的表达比较解析,但基本上并非出于对提取的生物分子的绝对数进行测定的目的。因此,存在如下问题:表达虽微量但对细胞整体有较大影响的生物分子,由于表达量多的其它生物分子的存在而被遗漏。

[0014] 本发明的目的在于,提供一种生物分子分析方法及单元,其在生物分子分析方法中利用生物分子数的计数实现宽动态范围和快速分析。

[0015] 进而,本发明的目的在于,提供一种简便的生物分子绝对数的直接分析方法,其在生物分子、特别是核酸分子的分析方法中,对提取自检体的生物分子进行捕捉且不使用 PCR 等扩增反应,可以实现一次能够解析的生物分子的种类达千种以上的包罗性和动态范围为 4 位以上、能够以一分子水平进行生物分子种类的判别和定量。特别是提供一种对于分析对象生物分子为 1 万种以下的非翻译 RNA、microRNA 的分析极其有效的分析方法。

[0016] 用于解决课题的手段

[0017] 本发明涉及对包含生物分子的试样中的生物分子的种类和存在量进行分析的方法。具体而言,本发明人发现,将分析对象生物分子固定在磁性微粒上,于磁性微粒分散在溶液中的状态下,与和生物分子特异性结合的探针分子进行反应,反应后利用磁力将前述微粒收集、固定在支撑基体上,然后利用荧光测定等进行检测、评价,从而可以实现生物分子数的计数及快速反应,直至完成本发明。

[0018] 即,本发明包含以下方案。

[0019] [1] 一种生物分子分析方法,其特征在于,包含:

[0020] 将分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的工序、

[0021] 使带标记的探针分子与分析对象生物分子反应的工序、

[0022] 将前述微粒收集并固定在支撑基体上的工序、和

[0023] 对前述支撑基体上的标记进行测定的工序。

[0024] [2] 根据 [1] 所述的生物分子分析方法,其特征在于,前述磁性微粒表面预先固定有捕捉用分子,介由前述捕捉用分子将分析对象生物分子固定在前述磁性微粒表面。

[0025] [3] 根据 [1] 或 [2] 所述的生物分子分析方法,其特征在于,前述磁性微粒预先固定有一分子捕捉用分子,介由前述捕捉用分子将分析对象生物分子固定在前述磁性微粒表面。

[0026] [4] 根据 [1] ~ [3] 中任一项所述的生物分子分析方法,其特征在于,每 1 个前述磁性微粒固定有一分子前述分析对象生物分子。

[0027] [5] 根据 [1] ~ [4] 中任一项所述的生物分子分析方法,其特征在于,通过使用磁力将前述磁性微粒收集并固定在支撑基体上。

[0028] [6] 根据 [1] ~ [5] 中任一项所述的生物分子分析方法,其特征在于,进行将分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的工序后,进行使带标记的探针分子与前述分析对象生物分子反应的工序。

[0029] [7] 根据 [1] ~ [5] 中任一项所述的生物分子分析方法,其特征在于,进行使带标记的探针分子与分析对象生物分子反应的工序后,进行将前述分析对象生物分子固定在磁性微粒表面的工序。

[0030] [8] 根据 [1] ~ [7] 中任一项所述的方法,其特征在于,前述标记为荧光标记。

[0031] [9] 根据 [8] 所述的生物分子分析方法,其特征在於,前述荧光标记为利用配合比例按照欲测定的生物分子的种类而不同的多种荧光体,对前述探针分子进行标记。

[0032] [10] 根据 [8] 所述的生物分子分析方法,其特征在於,前述荧光标记为利用按照欲测定的生物分子的种类而发出不同颜色的荧光的荧光体,对前述探针分子进行标记。

[0033] [11] 根据 [8] ~ [10] 中任一项所述的生物分子分析方法,其特征在於,对标记进行测定的工序包含荧光测定。

[0034] [12] 根据 [1] ~ [11] 中任一项所述的方法,其特征在於,进而包含对分析对象生物分子附加共通的标记的工序,使利用与前述共通的标记不同的标记进行标记的探针分子和前述分析对象生物分子反应,通过算出前述共通的标记和前述不同的标记的比值,对相对于前述分析对象生物分子的总量的发生反应的生物分子量进行评价。

[0035] [13] 根据 [1] ~ [12] 中任一项所述的生物分子分析方法,其特征在於,前述生物分子为核酸。

[0036] [14] 根据 [13] 所述的生物分子分析方法,其特征在於,前述探针分子为能够与欲测定的生物分子杂交的核酸。

[0037] [15] 根据 [1] ~ [12] 中任一项所述的生物分子分析方法,其特征在於,前述生物分子为蛋白质。

[0038] [16] 根据 [15] 所述的生物分子分析方法,其特征在於,前述探针分子为对于欲测定的生物分子的抗体。

[0039] [17] 一种生物分子分析装置,其特征在於,具备:

[0040] 将分析对象生物分子固定在磁性微粒上的单元、

[0041] 使带标记的探针分子和分析对象生物分子反应的单元、

[0042] 在前述反应工序后将前述磁性微粒收集并固定在支撑基体上的单元、和

[0043] 对标记进行测定的单元。

[0044] [18] 根据 [17] 所述的生物分子分析装置,其特征在於,对标记进行测定的单元包含光照射单元及发光检测单元。

[0045] [19] 一种生物分子的分析方法,其特征在於,准备分析对象生物分子,使带标记的探针分子与前述生物分子反应,对结合有前述生物分子的探针分子的标记进行检测,从而对目的生物分子的绝对浓度进行评价。

[0046] [20] 根据 [19] 所述的方法,其特征在於,进而包含将分析对象生物分子各一分子固定在空间上分离的位置的工序。

[0047] [21] 根据 [19] 或 [20] 所述的方法,其特征在於,进而包含:对分析对象生物分子的浓度进行调整的工序、对其进行搅拌的工序、和将其各一分子固定在空间上分离的位置的工序。

[0048] [22] 根据 [19] ~ [21] 中任一项所述的方法,分析对象生物分子各一分子在支撑基板上被固定在空间上分离的位置。

[0049] [22-2] 根据 [19] ~ [21] 中任一项所述的方法,其特征在於,分析对象生物分子实质全部、优选全部被固定。

[0050] [23] 根据 [19] ~ [22] 中任一项所述的方法,生物分子为核酸分子,探针分子为具有与目的生物分子互补的序列的核酸分子。

[0051] [23-2] 根据 [19] ~ [22] 中任一项所述的方法,生物分子为蛋白质,探针分子为对于目的生物分子的抗体。

[0052] [24] 一种核酸分子的分析方法,其特征在于,生物分子为核酸分子,通过将分析对象核酸分子各一分子固定在空间上分离的位置的工序、使具有已知碱基序列且标记的探针核酸分子与前述分析对象核酸分子杂交的工序、和在前述杂交工序后对前述标记进行检测,从而对目的核酸分子的绝对浓度进行评价。

[0053] [25] 根据 [24] 所述的方法,其特征在于,进而包含:对分析对象核酸分子的浓度进行调整的工序、对其进行搅拌的工序、和将其各一分子固定在空间上分离的位置的工序。

[0054] [26] 根据 [24] 或 [25] 所述的方法,分析对象核酸分子各一分子在支撑基板上被固定在空间上分离的位置。

[0055] [27] 根据 [19] ~ [26] 中任一项所述的方法,其特征在于,包含将分析对象生物分子固定在微粒上使得每 1 个微粒上固定前述生物分子各一分子的工序。

[0056] [27-2] 根据 [27] 所述的方法,其特征在于,前述微粒预先固定有捕捉分子一分子,介由前述捕捉分子将分析对象生物分子固定在前述微粒上。

[0057] [28] 根据 [19] ~ [27] 中任一项所述的方法,其中,标记为荧光标记。

[0058] [29] 根据 [19] ~ [28] 中任一项所述的方法,其特征在于,前述标记为包含按照目的生物分子的种类而配合比例不同的多种荧光体的微粒。

[0059] [29-2] 根据 [19] ~ [28] 中任一项所述的方法,其特征在于,前述标记为按照目的生物分子的种类而发出不同颜色的荧光的荧光体。

[0060] [29-3] 根据 [28] 或 [29] 所述的方法,其特征在于,标记的检测为荧光的检测。

[0061] [30] 根据 [19] ~ [29] 中任一项所述的方法,其特征在于,对于目的生物分子以外的生物分子的探针分子,使用同一标记,按照前述目的生物分子对标记数进行计数并算出每个目的生物分子的标记数相对于总标记数的比值,从而对前述每个目的生物分子的绝对浓度进行评价。

[0062] [31] 根据 [19] ~ [30] 中任一项所述的方法,其特征在于,进而包含对分析对象生物分子附加共通的标记的工序,使利用与前述共通的标记不同的标记进行标记的探针分子和前述分析对象生物分子反应,通过算出前述共通的标记的数量和前述不同的标记的数量的比值,对前述每一目的生物分子的种类的绝对浓度进行评价。

[0063] [32] 根据 [27] ~ [31] 中任一项所述的方法,其特征在于,固定有分析对象生物分子各一分子的微粒为磁性微粒,前述标记为包含按照目的生物分子的种类而配合比例不同的多种荧光体的微粒,在前述分析对象生物分子和前述探针分子反应后将未结合的探针分子和前述磁性微粒分离,然后对前述磁性微粒上的结合有生物分子的探针分子的标记进行检测。

[0064] [33] 一种生物分子的分析装置,其特征在于,具备:

[0065] 将分析对象生物分子各一分子固定在空间上分离的位置的单元、

[0066] 使带标记的探针分子与前述生物分子反应的单元、和

[0067] 对结合有前述生物分子的探针分子的标记进行检测的单元;

[0068] 由检测到的标记的数目对目的生物分子的绝对浓度进行评价。

[0069] [34] 根据 [33] 所述的装置,其特征在于,

[0070] 前述固定单元具备：

[0071] 对分析对象生物分子的浓度进行调整的单元、和

[0072] 对分析对象生物分子进行搅拌的单元。

[0073] [34-2] 根据 [33] 或 [34] 所述的装置，其特征在于，对标记进行检测的单元包含光照射单元及发光检测单元。

[0074] 发明的效果

[0075] 根据本发明，对于生物分子的存在量，能够以一分子的分辨率对分子数进行计数，因此能够获得非常大的动态范围。进而，在使固定有生物分子的微粒分散的状态下与探针分子在溶液中反应，因此能够使探针分子和生物分子的结合反应快速进行。因此，根据本发明的分析方法及分析装置，能够使生物分子分析在高动态范围内快速进行。

[0076] 进而，根据本发明，通过试样浓度调整和搅拌等工序，能够不损失所提取的试样，以非常高的概率在空间上分离的位置配置各一分子生物分子，以一分子的灵敏度及分辨率、具有高包罗性和定量性且简便、快速地进行生物分子的分析。进而，与目前的方法相比灵敏度非常高、且不会带来扩增偏差，因此能够在非常接近实际的状态下对细胞内的分析对象生物分子的存在数量进行评价。

[0077] 此外，对于由多种生物分子构成的生物分子试样，可以使分析对象生物分子在支撑基体上的有规律的位置，在每一个固定位置各固定前述生物分子一分子，使已知与目的生物分子结合的探针分子与前述固定于支撑基体上的生物分子反应，对前述探针分子进行检测。因此，能够兼顾包罗性和定量性地、以一分子的灵敏度和分辨率简便且迅速地对分析对象生物分子的种类和存在量进行分析。

[0078] 对于上述以外的课题、方案及效果，通过以下实施方式的说明而明确。

附图说明

[0079] 图 1 为用于说明本实施例的分析方法的一例的图。

[0080] 图 2 为用于说明本实施例的分析方法的一例的图。

[0081] 图 3 为用于说明本实施例的分析方法的一例的图。

[0082] 图 4 为用于说明本实施例的分析方法中使用的器件的构成的一例的图。

[0083] 图 5 为用于说明本实施例的分析方法中使用的器件的制造方法的一例的图。

[0084] 图 6 为用于说明本实施例的固定有一分子的微粒的制作方法的一例的图。

[0085] 图 7 为用于说明本实施例的分析方法的一例的图。

[0086] 图 8 为用于说明制作固定有一分子的捕捉分子的微粒的方法及器件的一例的图。

[0087] 图 9 为用于说明本实施例的分析方法的一例的图。

[0088] 图 10 为用于说明本实施例的生物分子分析装置的一例的图。

具体实施方式

[0089] 本发明涉及使分析对象生物分子和与欲测定的生物分子特异性结合的探针分子反应、对生物分子进行分析的方法，其特征在于，通过将分析对象生物分子固定在磁性微粒上，从而简便且快速地将磁性微粒收集并固定在支撑基体上，并对上述反应进行检测。其特征还在于，通过将分析对象生物分子在每 1 个微粒上固定一分子，从而以高精度且高动态

范围进行生物分子的分析。进而,通过将分析对象生物分子各一分子固定在空间上分离的位置,从而以高包罗性和动态范围对目的生物分子的绝对浓度进行评价。

[0090] 关于分析对象生物分子,只要是欲对其种类、表达量或存在量、是否存在等进行分析的源自生物体的分子,就没有特别限定。例如,包括核酸(信使 RNA (mRNA)、非编码 RNA (ncRNA)、micro RNA、DNA、适体等)及其片段、蛋白质(肽、多肽、抗体等)及其片段、糖等。予以说明,生物分子中还包含含有自然界中不存在的序列、构成要素的聚合物,例如 poly(A)、poly(T)、poly(G)、poly(C) 等序列或具有任意序列的人工合成的生物分子也包括在内。此外,生物分子中还包含利用本领域公知的核酸扩增技术(例如聚合酶链反应)制备的核酸、克隆到载体中的核酸。

[0091] 此外,分析对象生物分子的来源也没有特别限定,可以设为源自脊椎动物(例如哺乳类、鸟类、爬行类、鱼类、两栖类等)、无脊椎动物(例如昆虫、线虫、甲壳类等)、原生生物、植物、真菌、细菌、病毒等任意生物的细胞样品、组织样品、液体样品等任意样品的样品。具体而言,可以列举由单个细胞构成的样品、包含多个细胞的样品、组织切片样品等。或者,也可以是源自 DNA 文库、抗体文库、肽文库等人工供给源的生物分子。

[0092] 由样品制备分析对象生物分子的方法在本技术领域是公知的。例如,可以使用蛋白酶 K 这类蛋白水解酶、硫氰酸胍以及盐酸胍这类离液盐、Tween 及 SDS 这类表面活性剂、或者市售的细胞溶解用试剂溶解细胞,使其中所包含的核酸、即 DNA 及 RNA 溶出。使用 RNA (mRNA 等) 作为分析对象生物分子时,利用脱氧核糖核酸酶(DNase)将通过上述细胞溶解而溶出的核酸中的 DNA 分解,获得仅含有 RNA 作为核酸的试样。

[0093] 可以对分析对象生物分子附加共通的标记,此时,通过后述的标记测定工序中对该共通的标记进行测定,可以对分析对象生物分子的数目或量进行测定。共通的标记设为不同于后述的探针分子所附加的标记的标记,从而在标记测定工序能够识别。作为该共通的标记,可以使用本技术领域公知的任意标记,可以列举出例如荧光标记(Cy3、Cy5、异硫氰酸荧光素(FITC)、四甲基罗丹明异硫氰酸盐(TRITC)等)、发光性半导体标记(硒化锌(Zn-Se)等)、化学发光标记(荧光素等)、酶标记(过氧化物酶、 β 一半乳糖苷酶、碱性磷酸酶等)、放射性标记(氚、 I^{125} 等)。考虑到后述的标记测定工序中的测定容易性,标记优选为荧光标记。

[0094] 对分析对象生物分子附加标记的方法也没有特别限定,可以采用本技术领域公知的方法。例如,既可以直接使标记结合在生物分子上,也可以介由适当的接头(例如实施例 1 中的捕捉用标签)使生物分子和标记结合,或者还可以介由第一抗体使作为第二抗体或第三抗体的生物分子与标记结合。

[0095] 探针分子只要是能够特异性地与分析对象生物分子结合的物质,就没有特别限定,根据分析对象生物分子的种类及欲测定的生物分子而不同。分析对象生物分子为核酸时,可以使用与欲测定的生物分子进行杂交的核酸、例如具有与生物分子序列互补的序列的核酸作为探针分子。与生物分子(核酸)进行杂交的探针分子的设计及制备方法在本领域中是公知的,可以在 10 ~ 60 个碱基左右的长度内考虑熔解温度(T_m)及 GC 含量等而设计适当的分子。此外,用于设计这样的分子的程序也是已知的。

[0096] 此外,在分析对象生物分子为蛋白质时,可以使用对于欲测定的蛋白质的抗体(包括完整抗体、抗体片段、结构域抗体等)、适体核酸等作为探针分子。在分析对象生物分子为

抗体(例如血清中抗体)时,可以使用欲测定的抗体所结合的抗原(肽、糖等)、与该抗体结合的抗体等作为探针分子。在分析对象生物分子为糖或糖蛋白时,可以使用凝集素等作为探针分子。任意情况下,本领域技术人员均可以基于欲测定的生物分子而设计、制备适当的探针分子。

[0097] 探针分子可以是 1 种,也可以是多种。根据欲测定的生物分子的种类而准备探针分子。

[0098] 探针分子可以利用适当的标记进行标记。标记的种类及标记附加方法可以与上述同样地适当选择。予以说明,在为了对多种生物分子进行测定而使用与其对应的多种探针分子时,优选使用不同的标记按照能够识别该多种标记的方式进行标记。例如,可以使用配合比例按照生物分子的种类而不同的多种荧光体,或者使用按照生物分子的种类而发出不同颜色的荧光的荧光体,按照能识别探针分子的方式进行标记。

[0099] 分析对象生物分子和标记的探针分子的反应根据其种类而不同,可以按照本技术领域公知的方法进行。例如,在分析对象生物分子为核酸时,可以进行与探针分子(核酸)的杂交反应。杂交反应通过使固定在磁性微粒或未固定的分析对象生物分子(核酸)和探针分子(核酸)在固相体系或液相体系中在严格条件下进行孵育而实施。严格条件在本技术领域是公知的,本领域技术人员可以适当选择。此外,优选在杂交反应后进行洗涤除去残留试剂、未结合分子。

[0100] 在分析对象生物分子为蛋白质或抗体时,可以与和该蛋白质或抗体特异性结合的抗体或蛋白质进行基于抗原-抗体反应的反应。这样的反应在本技术领域是公知的,例如,可以通过使固定在磁性微粒的或未固定的分析对象生物分子和探针分子在固相体系或液相体系中接触从而使其反应。在分析对象生物分子为蛋白质、使用与蛋白质特异性结合的适体核酸作为探针分子时,也可以同样地使两者在固相体系或液相体系中接触,从而使两者结合。优选在反应后进行洗涤除去残留试剂、未结合分子。

[0101] 予以说明,分析对象生物分子固定在磁性微粒的表面。向微粒上的固定既可以在使带标记的探针分子与分析对象生物分子反应的工序进行之前进行(例如实施例 2),也可以在该工序之后进行(例如实施例 1)。

[0102] 进而,分析对象生物分子各一分子优选固定在空间上分离的位置。特别是,优选分析对象生物分子实质全部、例如 90%以上、优选 95%以上、更优选 99%以上、最优选 100%被固定。例如,可以将分析对象生物分子固定在微粒上。向微粒上的固定可以在使带标记的探针分子与分析对象生物分子反应的工序进行之前进行(例如实施例 3),也可以在该工序之后进行(例如实施例 7 及 9)。

[0103] 关于磁性微粒,只要是磁化的或能够磁化的磁性微粒,就没有特别限定。市场上有本技术领域能够使用的磁性微粒出售。磁性微粒例如利用磁铁矿等氧化铁(超常磁性体)制作的微粒、涂覆超常磁性体层而制作的微粒,其直径为 100 微米(μm)以下、优选 50 微米以下、更优选 10 微米以下、例如 1.0 微米~10.0 微米。磁性微粒优选考虑其在溶液中的分散性、分析对象生物分子的种类、反应的种类等而确定其材质及尺寸。通过使用磁性微粒,可以自动地、有效地或快速地进行后述的向支撑基体上的收集及固定。

[0104] 分析对象生物分子向磁性微粒上的固定可以通过本技术领域公知的任意方法进行。例如,可以利用共价键、离子键、物理吸附、互补性结合、生物学结合(例如,生物素和抗

生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的结合、抗原和抗体的结合等)将生物分子固定在磁性微粒的表面。此外,还可以介由其它分子(例如,实施例1及3中的捕捉用标签、捕捉用分子等)将生物分子固定在磁性微粒上。予以说明,本说明书中,方便起见将使分析对象生物分子和与磁性微粒结合的其它分子分别称为“捕捉用标签”及“捕捉用分子”,但可以两者均存在,也可以仅存在一者,还可以两者均不存在。具体而言,例如,磁性微粒表面预先固定有捕捉用分子,介由该捕捉用分子将分析对象生物分子(或结合有捕捉用标签的分析对象生物分子)固定在磁性微粒表面。该其它分子、即捕捉用标签或捕捉用分子没有特别限定,例如可以设为核酸分子(RNA分子等)、蛋白质分子(抗体等),可以通过本技术领域公知的方法(使用连接酶的连接反应反应、利用官能团的偶联反应、介由结合分子的结合、使用了生物素与抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的结合的反应等)与分析对象生物分子或磁性微粒分别结合。

[0105] 介由共价键的生物分子向磁性微粒上的固定,例如,可以通过在分析对象生物分子或捕捉用标签中导入官能团且在磁性微粒表面或捕捉用分子中导入与该官能团具有反应性的官能团并使两者反应,从而实施。例如,在生物分子或捕捉用标签中导入氨基,在磁性微粒或捕捉用分子中导入活性酯基、环氧基、醛基、碳二亚胺基、异硫氰酸酯基或异氰酸酯基,从而可以形成共价键。此外,还可以在分析对象生物分子或捕捉用标签中导入巯基,在磁性微粒或捕捉用分子中导入活性酯基、马来酰亚胺基或二巯基。作为将官能团导入磁性微粒的表面的方法之一,可以列举利用具有期望官能团的硅烷偶联剂(γ -氨基丙基三乙氧基硅烷等)处理磁性微粒的方法。作为将成为结合部位的官能团导入磁性微粒的其它方法,可以列举等离子体处理。此外,作为通过物理吸附将生物分子或捕捉用标签固定于磁性微粒的方法,可以列举利用生物分子或捕捉用标签的电荷使其静电结合于通过聚阳离子(聚赖氨酸、聚烯丙基胺、聚乙烯亚胺等)进行了表面处理的磁性微粒上的方法等。

[0106] 关于磁性微粒,优选每一个微粒上固定有分析对象生物分子一分子。例如,使1分子捕捉用分子结合在磁性微粒上,介由该捕捉用分子将分析对象生物分子固定在磁性微粒上,从而可以进行一分子的固定。予以说明,为了避免吸附其它物质(核酸、蛋白质等),磁性微粒优选进行表面涂覆。

[0107] 磁性微粒优选分散于适当的溶液中。即,本发明的方法还可以包含将磁性微粒分散在溶液中的工序。可以使用的溶液只要不妨碍生物分子向磁性微粒上的固定、生物分子和探针分子的反应等,就可以使用任意的溶液。例如,可以使用水、盐类缓冲液(生理盐水等)、Tris缓冲液、醇(甲醇、乙醇等)、酮(丙酮等)、醚(二乙醚、四氢呋喃等),根据需要还可以添加分散剂。

[0108] 收集并固定磁性微粒的支撑基体只要是利用本技术领域通常用作载体或支撑体的材料制作的支撑基体,就没有特别限定,可以是例如片、膜滤器(membrane)、凝胶薄膜、毛细管板、膜等。考虑到其后进行的标记测定工序,支撑基体优选为平面状。作为其材料,可以列举例如金、银、铜、铝、钨、钼、铬、铂、钛、镍等金属;不锈钢、耐盐酸镍基合金、因科镍合金(Inconel)、蒙乃尔合金、硬铝合金等合金;硅;玻璃、石英玻璃、熔融石英、合成石英、氧化铝、蓝宝石、陶瓷、镁橄榄石及感光性玻璃等玻璃材料;聚酯树脂、聚苯乙烯、聚乙烯树脂、聚丙烯树脂、ABS树脂(丙烯腈丁二烯苯乙烯树脂)、尼龙、丙烯酸系树脂、氟树脂、聚碳酸酯树脂、聚氨酯树脂、甲基戊烯树脂、酚树脂、三聚氰胺树脂、环氧树脂及氯乙烯树脂等塑料;

琼脂糖、葡聚糖、纤维素、聚乙烯醇、硝酸纤维素、壳多糖、脱乙酰壳多糖。

[0109] 磁性微粒向支撑基体上的收集及固定可以利用磁力、例如磁铁进行。为了后述的标记测定工序,优选磁性微粒以单层形式收集并固定在支撑基体上。

[0110] 生物分子或微粒向支撑基体上的固定可以如上述那样与生物分子向微粒上的固定同样地进行。此外,微粒还能介由粘接垫固定在支撑基体上。具体而言,在支撑基板上的微粒的固定位置形成粘接垫,使该微粒和该粘接垫结合,从而将微粒固定在支撑基体上。

[0111] 粘接垫只要是材质不同于支撑基体,就没有特别限定,例如可以使用金、钛、镍、铝等金属及金属氧化物等材质。将粘接垫配置在支撑基体上的方法也没有特别限定,例如,可以利用:利用半导体领域中利用的薄膜工艺、具体而言为蒸镀及溅射进行粘接垫的形成、或利用蒸镀及溅射后的干式蚀刻或湿式蚀刻进行粘接垫的形成。生物分子或微粒向粘接垫上的固定也可以如上述那样与生物分子向微粒上的固定同样地进行。

[0112] 分析对象生物分子优选各一分子被固定在空间上分离的位置。因此,粘接垫优选有规律性地形成在支撑基体上。特别是,按照微粒(即生物分子)被固定在空间上分离的位置的方式来确定粘接垫间的距离、位置。每1个粘接垫上固定的微粒(即生物分子)的数目优选为1个。为了进行这样的固定而对分析对象生物分子或微粒的浓度进行调整,使得生物分子的分子数少于支撑基体上的固定位置、粘接垫的数目。此外,对含有分析对象生物分子或微粒的溶液进行搅拌,使其接触支撑基体,从而提高碰撞频率,可以提高固定率。

[0113] 然后,在支撑基体上进行标记的测定,标记的测定可以根据标记的种类使用本技术领域公知的方法及仪器进行。例如,荧光标记、发光性半导体标记及化学发光标记可以使用适当的激光器进行激发,使用计数光学系统、荧光显微镜、酶标仪等对放出的光进行测定。此外,在使用酶标记时,可以加入在酶作用下分解、显色的底物,通过光学手段对底物的分解量进行测定,从而对标记进行测定。在使用放射性标记时,通过闪烁计数器对放射性标记发射的射线剂量进行测定。在本发明的方法中,优选利用荧光并对获得的亮点进行计数,从而对生物分子进行定量分析。例如,对分析对象生物分子上所附加的共通的标记以及探针分子上所附加的不同的标记进行测定,算出两者的比值,从而可以对相对于分析对象生物分子的总量的发生反应的生物分子量进行评价。

[0114] 如上所述,可以对分析对象生物分子中的目的生物分子的存在有无和/或量进行分析。分析结束后,由分析对象生物分子中除去探针分子,从而还可以将磁性微粒上固定的分析对象生物分子用于与其它探针分子的反应,通过除去磁性微粒上固定的分析对象生物分子,还可以将磁性微粒用于与其它生物分子的分析反应。这样的分子的除去根据分子的固定及结合中使用的反应及手段而不同,例如,可以通过热变性(高温处理)而进行。

[0115] 此外,本发明还涉及用于实施上述本发明的生物分子分析方法的装置。本发明的生物分子分析装置包含例如以下的单元:

[0116] 将分析对象生物分子固定在磁性微粒上的单元、

[0117] 使带标记的探针分子和分析对象生物分子反应的单元、

[0118] 在前述反应工序后将前述磁性微粒收集并固定在支撑基体上的单元、和

[0119] 对标记进行测定的单元。

[0120] 固定在磁性微粒上的单元包含:例如,供给分析对象生物分子的单元、供给磁性微粒的单元、将分析对象生物分子和磁性微粒混合的反应室等。

[0121] 与分析对象生物分子反应的单元包含：例如，固定有生物分子或捕捉分子的材料（也称为“生物分子分析用器件”）、供给探针分子的单元、将分析对象生物分子和探针分子混合的反应室、温度调节单元等。

[0122] 收集并固定在支撑基体上的单元包含：例如，磁铁单元、洗涤单元等。

[0123] 标记测定单元例如在对荧光标记、发光性半导体标记或化学发光标记进行测定时包含：光照射单元、发光检测单元等。光照射单元及发光检测单元可以根据所使用标记的种类、激发和发光波长等进行选择和设计。

[0124] 进而，本发明的生物分子分析装置还可以具备：供给洗涤液的单元、排出洗涤液的单元、记录分析结果的单元、将分析结果与数据库进行比较的单元等。

[0125] 实施例

[0126] 以下参照附图对本发明的上述以及其它新颖特征和效果进行说明。这里，为了完整理解本发明而对特定的实施方式进行了详细说明，但本发明不受这里所记载的内容的限制。

[0127] 实施例 1

[0128] 以分析对象生物分子为核酸的情况为例，使用图 1 对本实施例的分析方法进行说明。使分析对象核酸片段 101 与标记有荧光色素 103 的捕捉用标签 102 结合。结合还可以使用连接反应、在预先对分析对象核酸片段 101 和捕捉用标签 102 中导入氨基、琥珀酰亚胺基等官能团的情况下官能团彼此的偶联反应。特别是，在分析对象核酸片段 101 为 micro RNA 时，将捕捉用标签 102 设为碱基长度为 10 ~ 20 个碱基左右的 RNA 分子，使用 T4RNA 连接酶将两者结合的方法是有效的。使分析对象核酸片段 101 与标记有荧光色素 103 的捕捉用标签 102 结合后，与被荧光体 105 标记的核酸分子（探针分子）104 进行杂交。核酸分子 104 为用于识别各个核酸片段的分子，因此必须具有代表各个基因的序列的碱基序列。在进行序列设计时，必须将核酸双链的稳定性指标即熔解温度在各个标记的核酸分子中限定在一定范围内。该范围优选为窄，优先控制在规定温度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 左右。此外，标记的核酸分子彼此的碱基序列的同源性优选为低，优选将同源性控制为 70% 以下、更优选 60% 以下。然后，使用实施例 6 中记载的方法，预先制作介由结合分子 107 使仅一分子的捕捉用分子 106 固定在磁性微粒 108 上的产物，加入该产物进行杂交，从而可以制作下述微粒：在磁性微粒 108 上，形成有一分子对的分析对象核酸片段 101 和标记有荧光体 105 的核酸分子 104 的杂合体 (hybrid)。荧光体 105 可以使用 Cy3、Cy5 等通常的荧光色素分子、包含 Zn-Se 等的半导体微粒、以及 Genisphere 公司销售的在树枝状聚合物上带有数百分子荧光色素的制品。

[0129] 然后，使用磁铁 109 将该形成有杂合体的磁性微粒 108 收集并固定在支撑基体 110 上。

[0130] 最后利用检测器 111 测定荧光色素 103 和荧光体 105 的荧光，算出荧光色素 103 和各荧光体 105 的每个种类的亮点数。荧光色素 103 的亮点数对应于分析对象核酸片段 101 的总数，各荧光体 105 的每个种类的亮点数相当于各种核酸片段数。因此，通过算出两者的比值可以算出各核酸片段数相对于分析对象总核酸片段数的比例。算出该比值在进行试样间的核酸片段的表达比较解析时特别有用。例如，当对在健康人和特定疾病患者间表达量不同的标志基因进行探索时，需要找出两试样间表达量相等的基因并利用该表达量进行标准化，但实际上找出两试样间表达量相等的基因是非常困难的。特别是在定量 PCR 中，指出

这是困难的(Nature Methods2010, Vol. 7, pp687-692)。与此相对,本实施例的方法由于能简便地对各个生物分子算出相对于总体的比例,因此健康人和患者的比较也可以直接通过相对于试样中的全部生物分子数的比例来进行比较。这一点对于临床检体中核酸分子的比较分析特别有用。

[0131] 当需识别的生物分子的种类多时,作为标记的荧光体 105,可以使用引入了荧光体的荧光珠子。例如,通过将 2 种荧光体的含量设为各 10 种水平并改变 2 种荧光体的含量水平进行混合,能够制作 100 种荧光珠子,如果将荧光体的数量设为 3 种,则能够容易地制作 1000 种可识别的珠子套装。例如, Luminex 公司销售一种通过以 2 波长的激光进行激发可以识别的 100 种荧光珠子的荧光珠子套装。通过对这些荧光珠子的表面进行化学修饰并使其与核酸分子结合,可以制作带荧光体标记的核酸分子 104。杂交后,适当洗涤非特异吸附物,然后进行荧光检测,从而进行分析对象核酸片段 101 的分析。当作为荧光体标记仅带有一分子 Cy3、Cy5 等通常的荧光色素分子的带荧光体标记的核酸分子(探针分子) 104 时,从支撑基体 110 上的固定有分析对象核酸片段 101 的位置,观察到一分子荧光。此时,由于荧光微弱,因此需要电子倍增 CCD (EM-CCD)等高灵敏度的荧光检测仪。当使用荧光珠子作为荧光体时,发出比一分子荧光更强的荧光,因此用通常的 CCD 也能够充分检测。

[0132] 当使固定有一分子的磁性微粒 108 (10^8 个)和核酸分子 104 (1.7nM)在 10ul 溶液体积中一边搅拌一边反应时,在反应时间为约 3 小时左右反应效率达到饱和值。该时间与 A molecular Cloning Manual DNA Microarrays2002, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp228-239 中记载的 DNA 微阵列通常的杂交所需时间(14 ~ 16 小时)相比非常短,表明结合反应快速地进行。因此,根据本发明,可以说能够使生物分子和作为探针分子的核酸分子的结合反应快速进行,能够快速地进行生物分子分析。

[0133] 在上述实施例中示出了将分析对象生物分子试样各一分子固定在微粒上的例子,但固定各一分子是由于计数上更容易,但固定各一分子并非必须条件,只要能够计数,则即使固定各二个或三个也能够对分析对象生物分子试样的种类和存在量进行分析,即能够实现本发明的目的。

[0134] 实施例 2

[0135] 以分析对象生物分子为蛋白质的情况为例,使用图 2 对本实施例的分析方法进行说明。

[0136] 介由结合分子 203 将与分析对象蛋白质 204 特异性结合的抗体 202 固定在磁性微粒 201 表面。磁性微粒 201 没有特别限制,由于需要在溶液中与蛋白质试样进行反应,因此优选分散性高。直径为 100 微米以下、更优选为 10 微米以下。通过使带有抗体的微粒与蛋白质试样在溶液中反应,从而使分析对象蛋白质 204 被捕捉到磁性微粒 201 上。然后,与实施有荧光色素标记的抗体(探针分子) 205 反应,可以对被捕捉到磁性微粒 201 的分析对象蛋白质 204 进行荧光标记。然后,可以使用磁铁 207 将磁性微粒 201 简便地收集并固定在支撑基体 206 表面。然后,对收集到支撑基体 206 的表面的分析对象蛋白质 204 照射光,从而用检测器 208 检测荧光亮点。荧光亮点数由于与分析对象蛋白质 204 的浓度有相关性,因此通过求出亮点数可以获得分析对象蛋白质 204 浓度的相关信息。特别是,可以使用实施例 6 中记载的方法预先制作使仅一分子的固定抗体 202 固定在磁性微粒 201 上的产物,通过使用该产物求出分析对象蛋白质 204 的绝对浓度。

[0137] 实施例 3

[0138] 使用图 3 说明本实施例的器件构成和分析方法。

[0139] 本实施例的器件构成如下。在支撑基体 301 之上形成有粘接垫 302。作为支撑基体 301, 可以使用石英等玻璃基板、硅片等。作为粘接垫 302, 为不同于支撑基体 301 的材质即可, 可以使用金属或金属的氧化物。粘接垫 302 的制作方法将在实施例 5 中详细描述。粘接垫 302 优选有规律性地形成于支撑基体 301 上, 细节在实施例 5 中描述。在粘接垫 302 之上固定有微粒 303。每个粘接垫上固定的微粒数为 1 个。在微粒 303 上, 仅一分子的捕捉分子 304 介由结合分子 305 而固定。根据分析对象核酸片段 306 的种类, 捕捉用标签分子 307、捕捉分子 304、结合分子 305 可以使用各种各样的组合分子组。例如, 当分析对象核酸片段 306 为 RNA 的逆转录产物时, 捕捉用标签分子 307 可以使用逆转录反应时的引物 DNA, 作为捕捉分子 304, 可以使用具有捕捉用标签分子 307 的互补序列的核酸分子。或者还可以以末端具有生物素的核酸分子作为捕捉用标签分子 307, 使用末端具有抗生物素蛋白的分子作为捕捉分子 304。结合分子 305 可以使用碳原子数 10 左右以下的烷烃分子, 可以使用通过化学键与捕捉分子 304 结合、相反侧的末端带有生物素的分子。此时, 在微粒 303 的表面修饰有抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白等是理想的。关于捕捉用标签分子 307 和捕捉分子 304 的反应, 当两者为具有互补序列的核酸分子时, 优选为杂交。此外, 也优选使用通过连接反应使两者以化学键连接的方法。作为结果, 分析对象核酸片段 306 按照规律的配置以每一分子孤立的状态被固定在支撑基体 301 上。为了求出分析对象核酸片段 306 的绝对数量, 可以使粘接垫 302 及微粒 303 的数量多于核酸片段 306 的数量。核酸片段 306 的总分子数可以由核酸片段 306 的总重量进行推测。总重量由波长 260nm 的吸光度求出。按照这里算出的分子数比粘接垫 302 的数量少的方式对试样浓度进行稀释。可以通过以下的方法来实现使更多的分析对象核酸片段 306 被固定。例如, 在粘接垫 302 表面覆盖烷烃分子作为结合分子, 通过分子间力使其结合由聚苯乙烯等聚合物构成的微粒 303。由此, 微粒 303 接近粘接垫 302 并迅速发生结合, 一旦粘接则不再脱落。进而, 通过提高微粒 303 碰撞粘接垫 302 的频率来提高固定率。为了提高碰撞频率, 对含有微粒 303 的溶液进行搅拌是理想的。具体而言, 为在流通含有微粒 303 的溶液的流路中配置槽或突起物将流动由层流变为湍流的方法。此时, 来自配置有粘接垫 302 的支撑基体 301 的液体浓度以稀薄为好, 可以提高碰撞频率。该流路结构将在实施例 9 中详细记载。为了确认全部微粒 303 均结合在了粘接垫 302 上, 可以将反应后的溶液干燥固定在基板上, 然后通过连接反应使捕捉用标签分子 307 结合并对其进行检测, 从而进行确认。

[0140] 然后, 鉴定所固定的分析对象核酸片段 306 的种类, 求出其存在数。使带荧光体标记的核酸分子(探针分子)308 与固定有分析对象核酸片段 306 的支撑基体 301 反应。带荧光体标记的核酸分子(探针分子)308 中包含与分析对象核酸片段 306 互补的核酸序列。荧光体标记可以使用 Cy3 和 Cy5 等通常的荧光色素分子、包含 Zn - Se 等的半导体微粒。当需识别的评价目的核酸片段的数量多时, 可以使用引入了荧光体的荧光珠子作为荧光体标记。例如, 通过将 2 种荧光体的含量设为各 10 种水平并改变 2 种荧光体的含量水平进行混合, 能够制作 100 种荧光珠子, 如果将荧光体的数量设为 3 种, 则能够容易地制作 1000 种可识别的荧光珠子的珠子套装。例如, Luminex 公司销售一种通过以 2 波长的激光进行激发可以识别的 100 种荧光珠子的荧光珠子套装。通过对这些荧光珠子的表面进行化学修饰并

使其与核酸分子结合,可以制作带荧光体标记的核酸分子(探针分子)308。

[0141] 杂交后,适当洗涤非特异吸附物,然后进行荧光检测,从而进行分析对象核酸片段306的分析。当为荧光体标记仅带有一分子Cy3、Cy5等通常的荧光色素分子的带荧光体标记的核酸分子(探针分子)308时,从支撑基体301上的固定有分析对象核酸片段306的位置,观察到一分子荧光。此时,由于荧光微弱,因此需要EM-CCD等高灵敏度的荧光检测仪。当使用荧光珠子作为荧光体时,发出比一分子荧光强的荧光,因此用通常的CCD也能够充分检测。由于粘接垫302是高度规律性地、例如以格子状形成于支撑基体301上,因此荧光图像中也是在有规律性的位置观测到荧光的亮点。因此,即使带荧光体标记的核酸分子(探针分子)308非特异性地附着在支撑基体301上,也能够根据荧光图像的亮点位置容易地识别、除去。这一点在微量试样的解析、微弱荧光的观察中实际上是非常有用的特征。在荧光体或荧光珠子的识别中,可以通过使用衍射光栅将发光光谱分光并照射在CCD的感光面上并对按波长方向分开的各像素的强度进行研究,来识别荧光体或荧光珠子的种类。或者,还可以使用反射特性具有较大波长依赖性的分色镜,使用反射光和透过光的比率来识别荧光体或荧光珠子的种类。在进行各亮点的识别后,对其进行合计,从而可以最终获得分析对象核酸片段306的种类和亮点数、即存在量(绝对浓度)的信息。例如,在以1 μ m间距制作粘接垫302时,每一毫米见方中存在106个粘接垫,因此可以对最大总分子数106中存在多少分子的规定种类的目的核酸片段进行研究。

[0142] 以下,作为具体分析对象,以microRNA为例对细节进行说明。

[0143] 分析对象为microRNA时,可以从已知的microRNA碱基序列数据库(例如<http://www.microrna.org/>)中获取各microRNA分子的序列数据。基于该数据可以设计逆转录用引物。引物的碱基长度优选为10~15个碱基左右,5'端附加10个碱基的DNA作为捕捉用标签分子307。例如,以人microRNA为对象设计、合成1000种引物。制作将合成的1000种引物各以等量混合的引物混合物(cocktail),以总RNA为对象,混合了逆转录用引物混合物、逆转录酶后,在37~40℃的环境下进行逆转录反应,合成cDNA,从而获得分析对象核酸片段306和捕捉用标签分子307的结合产物。或者,也可以使用RNA作为分析对象核酸片段306,使用10个碱基左右的RNA作为捕捉用标签分子307,用T4RNA连接酶使两者结合,从而使捕捉用标签分子307结合在分析对象核酸片段306上。微粒303预先固定有一分子的针对捕捉用标签分子307的10个碱基核酸的互补链DNA作为捕捉分子304。关于一分子的捕捉分子304对微粒303的固定,细节记载在实施例8中。通过常规手段使cDNA(结合了分析对象核酸片段306和捕捉用标签分子307的分子)在支撑基体上进行杂交,从而将分析对象核酸片段306固定在支撑基体上。

[0144] 与上述同样地从已知的microRNA碱基序列数据库获取各microRNA分子的序列数据,按照与该序列相同的碱基序列合成1000种在5'端修饰有生物素的合成寡核苷酸。

[0145] 作为荧光珠子中使用的荧光体,可以使用例如Cy5、Cy5.5、Cy3,激发光可以以532nm、633nm这2种进行应对。制作各色素的浓度比不同的溶液,在由苯乙烯单体合成聚苯乙烯珠子的阶段进行混合,从而可以制作规定色素混合比的聚苯乙烯珠子。为了在聚苯乙烯表面实施抗生物素蛋白等的修饰,通过使用丙烯酸/甲基丙烯酸和苯乙烯的共聚反应在珠子表面导入羧基,以碳二亚胺为交联剂与抗生物素蛋白的氨基反应,从而可以容易地进行修饰。

[0146] 通过使修饰有抗生物素蛋白的荧光珠子和在 5' 端修饰有生物素的合成寡核苷酸反应,可以合成带荧光体标记的核酸分子(探针分子) 308。

[0147] 然后,使用常规方法使带荧光体标记的核酸分子(探针分子) 308 与固定有分析对象核酸片段 306 的支撑基体 301 进行杂交。

[0148] 用包含十二烷基硫酸钠的洗涤液洗涤后,获取荧光图像,识别各粘接垫 302 的荧光亮点相当于何种荧光珠子并对亮点进行计数,从而可以解析各种 microRNA 的存在量。

[0149] 能够检测的核酸品种的数量取决于可以识别的荧光珠子的数量。当假设 microRNA 的种类存在大约 1000 种时,制作 1000 种荧光珠子即可,如前所述,通过将荧光体的含量各设为 10 种水平并改变 3 种荧光体的含量水平进行混合,从而能够容易地制作 1000 种可以识别的荧光珠子的珠子套装,可以一次对所有 microRNA 种类全部进行检测。此外,在欲仅研究特定 microRNA 的表达量时,制作与特定 microRNA 品种对应的带荧光体标记的核酸分子(探针分子)308 并仅准备相应数目的荧光珠子。对于特定 microRNA 品种以外的 microRNA 品种,使用它们以外的同一荧光珠子,从而作为荧光珠子的种类,即使不准备 1000 种,也能够作为亮点的计数值知晓全部 microRNA 的存在量,此外,还可以求出特定 microRNA 相对于全部 microRNA 的存在比。

[0150] 或者,预先对捕捉用标签分子 307 赋予具有发光波长或发光强度不同于带荧光体标记的核酸分子 308 的共通的荧光色素标记,将标记在捕捉用标签分子 307 上的荧光色素产生的荧光亮点数判断为相当于全部核酸试样分子数、将各种标记在带荧光体标记的核酸分子(探针分子) 308 上的荧光体的荧光亮点数判断为相当于各种核酸试样分子数,将两者的亮点数的比值判断为各种核酸试样分子的存在比率,这在欲仅研究特定核酸分子的表达量时也是极其有效的。

[0151] 进而,本发明的方法不仅能够应用于核酸试样,通过优化捕捉分子 304,也能够应用于蛋白质等核酸试样以外的生物分子的解析。对于由多种生物分子种类构成的生物分子试样,可以将分析对象生物分子 306 在支撑基体 301 上的有规律的位置通过捕捉分子 304 使用适当的抗体等,在每一个固定位置各固定所述生物分子 306 一分子,使已知结合于特定生物分子的探针分子 308 与所述固定于支撑基体 301 上的生物分子 306 反应,对所述探针分子 308 进行检测,从而与核酸试样的情形同样地进行分析。因此,能够对分析对象生物分子的种类和绝对数进行评价,能够以一分子的灵敏度和分辨率简便且迅速地对生物分子进行分析。

[0152] 实施例 4

[0153] 使用图 4 说明本实施例的器件的构成。在支撑基体 401 之上有规律地、例如如图 4 所示那样以格子状形成有粘接垫 402。粘接垫 402 和微粒 403 介由线状分子 405 通过化学键或化学性相互作用而被连接。线状分子 405 的末端的官能团 406 和粘接垫 402 优选通过化学性相互作用结合。此时,优选官能团 406 与支撑基体 401 的相互作用弱、与粘接垫 402 的相互作用强。从这样的观点出发,作为支撑基体 401,可以使用石英玻璃、蓝宝石、硅基板等。此外,粘接垫 402 可以由选自金、钛、镍、铝的材料构成。官能团 406 必须考虑支撑基体 401 和粘接垫 402 的组合而进行选择,可以使用例如巯基、氨基、羧基、磷酸基、醛基等。线状分子 405 发挥连接微粒 403 和粘接垫 402 的作用,对于长度没有大的限定,在低分子的情况下,优选碳原子数 3 至 20 左右的直链状分子。线状分子 405 的末端的官能团 407 具有与微

粒 403 的粘接性。此外,使用高分子作为线状分子 405 时,可以使用具有多个侧链且同时具有带有官能团 406 的侧链和带有官能团 407 的侧链的分子。作为微粒 403,可以使用金属微粒、半导体微粒。例如,作为金的微粒,可以利用市售的直径 5nm ~ 100nm 的微粒。此外,作为半导体微粒,可以利用市售的直径为 10nm ~ 20nm 左右的 CdSe 等化合物半导体。可以用作官能团 407 的官能团根据微粒的种类的不同而不同,例如,在使用金微粒时,优选为巯基、氨基等。使用半导体微粒时,市售有用链霉抗生物素蛋白修饰了表面的微粒,可以使用生物素作为官能团 407。进而,作为微粒 403,还可以使用由聚苯乙烯等高分子材料形成的微粒。在为高分子材料的情况下,可以使微粒的粒径一致,粒径的大小也可以从数十 nm 至数 μm 的宽范围进行选择。此外,通过以高分子材料所具有的官能团为基础进行表面修饰,可以使得用于固定于微粒表面的捕捉分子 404 的固定反应的官能团的导入量均匀,从这一点来看是优选的。特别是仅将一分子捕捉分子 404 固定于微粒表面时,固定率的再现性非常高,故而优选。

[0154] 捕捉分子 404 可以使用 DNA、RNA 核酸分子的一条链。预先对核酸分子的末端与官能团 407 同样地进行修饰并与微粒 403 反应。优选在一个微粒 403 上固定的捕捉分子 404 为一分子,从而在粘接垫 402 之上仅固定一分子捕捉分子 404。

[0155] 在利用简便的荧光检测来识别探针时,考虑到衍射极限,优选探针之间距离 $1\mu\text{m}$ 左右。因此,微粒 403 的尺寸优选为 $1\mu\text{m}$ 以下。

[0156] 作为在支撑基体 401 上形成粘接垫 402 的方法,可以利用在半导体中已经实用化的薄膜工艺。例如,可以通过透过掩模进行蒸镀、溅射、或在通过蒸镀、溅射形成薄膜后利用干式蚀刻或湿式蚀刻而制造。使用薄膜工艺可以容易地实现有规律地配置。衬垫间的间隔可以任意设定,在进行光检测作为检测手段时,考虑到光检测的衍射极限,优选为 $1\mu\text{m}$ 以上。

[0157] 在支撑基体 401 上形成粘接垫 402 后,供给连接微粒 403 和粘接垫 402 的线状分子 405,将线状分子 405 固定在粘接垫 402 上。此时,出于防止在支撑基体 401 上的非特异性吸附的目的,在供给线状分子 405 之前使与支撑基体 401 的粘接力强的材料在支撑基体 401 上进行反应的方法是有效的。例如,可以使用硅烷偶联剂等。然后,将固定有捕捉分子 404 的微粒 403 供给于支撑基体 401 上,将微粒 403 固定在粘接垫 402 上,从而制成生物分子分析用器件。

[0158] 将微粒 403 固定在粘接垫 402 上时,具有在一个粘接垫 402 上固定多个微粒 403 的可能性。如果固定了多个,则不同种类的生物分子的信息会相互重叠,导致无法进行正确的分析。因此,一个粘接垫 402 上必须固定 1 个微粒 403。为此,发明人等反复进行各种条件下的固定实验,进行了深入研究,结果发现,当满足粘接垫 402 的直径 d 比微粒 403 的直径 D 小的条件时,能够在在一个粘接垫 402 上固定 1 个微粒 403 (例如 W02010/087121 号)。说明如果固定了与粘接垫 402 相比大小为同等或更大的微粒 403,则未反应的线状分子会被所固定的微粒遮挡,从而无法与其它微粒反应。进而,继续进行了深入研究,结果表明:当微粒 403 的表面具有电荷时,微粒间静电斥力发挥作用,因而,即使在粘接垫 402 的直径 d 比微粒 403 的直径 D 大时,也能实现每个粘接垫上的固定微粒数为 1 个。因此阐明了:当微粒 403 的表面电荷少、静电斥力弱时,优选粘接垫 402 的直径 d 比微粒 403 的直径 D 小,当微粒 403 的表面电荷多、静电斥力大时,粘接垫 402 的直径 d 可以不必比微粒 403 的直径 D 小。

[0159] 实施例 5

[0160] 使用图 5 说明本实施例的分析用器件的制造方法。在平滑的支撑基体 501 上利用旋转涂布法涂覆电子束用正型抗蚀剂 502。作为平滑的支撑基体 501, 可以使用玻璃基板、蓝宝石基板、硅片等。在制成器件时需要从与排列有微粒 506 的面相反侧的背面照射激发光时, 只要使用光透过性优异的石英基板、蓝宝石基板即可。作为电子束用正型抗蚀剂 502, 可以列举例如聚甲基丙烯酸甲酯、ZEP-520A (日本瑞翁公司制)。利用支撑基体 501 上的标记的位置进行位置对齐后进行电子束直接曝光, 在抗蚀剂中形成通孔。例如, 形成直径 15nm 的通孔。虽然取决于平行处理所能够分析的生物分子的分子数, 但考虑到制造上的简便性、成品率的高低以及平行处理所能够分析的生物分子的分子数, 通孔以 1 μm 左右的间距形成是适宜的。通孔形成区域也取决于平行处理所能够分析的生物分子的分子数, 但也大幅依赖于检测装置侧的位置精度、位置分辨率。例如, 以 1 μm 间距构成反应位点(粘接垫)时, 若将通孔形成区域设为 1mm \times 1mm 则可以形成 100 万个反应位点。形成通孔后, 通过溅射使构成粘接垫 503 的材料如金、钛、镍、铝成膜。在使用玻璃基板、蓝宝石基板作为平滑的支撑基体 501、使用金、铝、镍作为粘接垫 503 的材料时, 就强化支撑基体材料和粘接垫材料间的粘接而言, 优选引入钛、铬的薄膜。然后使线状分子 504 与粘接垫 503 反应。当粘接垫 503 为金、钛、铝、镍时, 作为线状分子 504 末端的官能团 505, 优选各自使用巯基、磷酸基、噻唑基。线状分子 504 的相反侧的官能团 506 可以使用例如生物素。在使线状分子 504 与粘接垫 503 反应后, 将抗蚀剂剥离。将抗蚀剂剥离后, 对于形成了粘接垫 503 以外的支撑基体 501 表面实施防止非特异吸附的处理。为了实现防止对带荧光色素的核苷酸(探针分子)的吸附, 用具有带负电荷的官能团的防止非特异吸附用分子 507 进行涂覆。例如, 通过旋转涂布在表面涂布环氧硅烷并加热处理后, 用弱酸性溶液 (pH5 ~ pH6 左右) 进行处理, 从而使环氧基开环、在表面导入 OH 基, 从而可以带来防止非特异吸附的效果。

[0161] 优选预先用抗生物素蛋白 509 修饰微粒 508 表面。在使用金或铂微粒时, 与氨基硫醇反应后与生物素-琥珀酰亚胺(Pierce 公司制 NHS-Biotin)反应, 最后与链霉抗生物素蛋白反应, 从而可以容易地进行抗生物素蛋白修饰。在使用金或铂以外的金属微粒时, 通过在氧气气氛中进行加热处理对表面进行氧化处理后, 与氨基硅烷反应, 然后与生物素-琥珀酰亚胺(Pierce 公司制 NHS-Biotin)反应, 最后与链霉抗生物素蛋白反应。由此, 可以容易地对金属微粒表面进行抗生物素蛋白修饰。使用半导体微粒作为微粒 508 时, 可以使用市售的微粒。例如, 可以使用直径为 15 ~ 20nm 的制品名为“Qdot (R) 链霉抗生物素蛋白标记”(Invitrogen 公司制)的产品。此外, 还可以使用聚苯乙烯珠子作为微粒 508。例如, 可以使用直径为 40nm 的制品名为“FluoSpheres NeutrAvidin Label”(Invitrogen 公司制)的制品。使用寡核苷酸作为捕捉分子 510 时, 通过用生物素修饰末端而合成, 可以容易地固定在微粒 508 上。通过将固定有捕捉分子 510 的微粒 508 固定到粘接垫 503 上, 可以制造本实施例的分析用器件。

[0162] 实施例 6

[0163] 本实施例中, 使用图 6 说明仅固定有一分子捕捉用分子(分析对象生物分子为核酸时, 优选为核酸; 分析对象生物分子为蛋白质时, 优选为抗体)的微粒的制造方法的一例、特别是在每个微粒上固定一分子捕捉用分子的方法。预先使用于固定捕捉用分子 604 的结合位点 602 结合在微粒 601 的表面。例如, 可以使用链霉抗生物素蛋白作为结合位点, 可以

使用市售的链霉抗生物素蛋白包被微粒(Invitrogen 公司制)作为微粒。捕捉用分子 604 预先修饰有结合位点 603。结合位点 603 选择容易与微粒 601 表面的结合位点 602 结合的位点。例如,使用所述的链霉抗生物素蛋白作为结合位点 602 时,使用生物素作为结合位点 603。然后,使微粒 601 和捕捉用分子 604 反应,从而使捕捉用分子 604 结合在微粒 601 上。为了在每个微粒 601 上固定一分子捕捉用分子 604,优选使单位体积中的捕捉用分子 604 的分子数比微粒 601 的个数少。这是由于,当捕捉用分子 604 与微粒 601 相比过量时,每个微粒 601 的捕捉用分子数多于一分子的可能性高。发明人等研究的结果是,如果使微粒 601 的数量比捕捉用分子 604 的数量多 10 倍而进行反应,则大约 90% 的微粒 601 上未固定捕捉用分子 604,约 9% 的微粒 601 上固定了一分子捕捉用分子 604。该结果与假设为泊松分布时的预测结果的一致性良好。因此,若仅收集捕捉到了捕捉用分子 604 的微粒 601,则收集的微粒 601 中,90% 以上为仅固定了一分子捕捉用分子 604 的微粒 601。

[0164] 在捕捉用分子 604 为核酸时,准备具有与捕捉用分子 604 的末端序列互补的序列且末端修饰有结合位点 606 的寡核苷酸 605,将与结合位点 606 结合的结合位点 608 预先涂覆在回收用微粒 607 的表面。使用这样制作的回收用微粒 607 可以使固定有捕捉用分子 604 的微粒 601 结合在回收用微粒 607 上。作为捕集方法,例如,在水溶液 609 中使捕捉用分子 604 结合在由聚丙烯等比重较轻的聚合物形成的回收用微粒 607 上,使得仅固定有捕捉用分子 604 的微粒 601 漂浮,未固定捕捉用分子 604 的微粒 601 沉到容器下方,从而仅分离并收集固定有捕捉用分子 604 的微粒 601。为了从回收用微粒 607 分离微粒 601,例如,可以使用使捕捉用分子 604 和寡核苷酸 605 的双链分离的变性处理(高温处理)。分离后,通过使用磁铁 610 可以将固定有捕捉用分子 604 的微粒 601 分离。

[0165] 在捕捉用分子 604 为抗体时,通过准备具有与捕捉用分子 604 特异性结合的适体序列的寡核苷酸 605,可以与上述捕捉用分子 604 为核酸时同样地,使用回收用微粒 607 以 90% 以上的高比例分离、收集固定有捕捉用分子 604 的微粒 601。为了从回收用微粒 607 分离微粒 601,例如,可以使用使捕捉用分子 604 和适体寡核苷酸 605 分离的加热处理。

[0166] 实施例 7

[0167] 使用图 7 说明本实施例的器件的构成和分析方法。使标记有荧光色素 703 的捕捉用标签分子 702 结合于分析对象核酸片段 701。结合可以使用连接反应、在预先在分析对象核酸片段 701 和捕捉用标签分子 702 中导入氨基、琥珀酰亚胺基等官能团的情况下官能团彼此的偶联反应。尤其是当分析对象核酸片段 701 为 microRNA 时,使捕捉用标签分子 702 为 10 ~ 20 个碱基长度左右的 RNA 分子、使用 T4RNA 连接酶将两者结合的方法是有效的。在使标记有荧光色素 703 的捕捉用标签分子 702 与分析对象核酸片段 701 结合后,与标记有荧光体 705 的核酸分子(探针分子)704 进行杂交。核酸分子(探针分子)704 是用于识别各评价目的核酸片段的分子,需要具有代表各基因序列的碱基序列。在进行序列设计时,需要通过各带标记的核酸分子(探针分子)将作为核酸双链稳定性的指标的熔解温度限定在一定范围内。该范围越窄越优选,优选控制在规定温度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 左右。此外,优选带标记的核酸分子(探针分子)彼此的碱基序列的同源性低,优选将同源性控制在 70% 以下,更优选控制在 60% 以下。然后,使用实施例 6 中记载的方法,预先制作介由结合分子 707 将仅一分子捕捉用分子 706 固定在微粒 708 上的微粒,添加该微粒进行杂交,从而可以制作下述微粒:在微粒 708 上,形成有一分子对的分析对象核酸片段 701 和标记有荧光体 705 的核酸分子(探针分

子) 704 的杂合体。荧光体 705 可以如实施例 3 所述使用引入有荧光体的荧光珠子。

[0168] 然后,将该形成有杂合体的微粒 708 固定在支撑基体 710 的预先形成的粘接垫 709 上。固定反应条件可以使用实施例 3 中记载的条件。

[0169] 最后,利用检测器 711 对荧光色素 703 和荧光体 705 的荧光进行检测,算出荧光色素 703 和每种荧光体 705 的亮点数。荧光色素 703 的亮点数对应于分析对象核酸片段 701 的总数,每种荧光体 705 的亮点数相当于各种分析对象核酸片段数。通过如此对所有作为分析对象的核酸片段的亮点数进行计数,可以求出试样中所包含的生物分子的绝对分子数。此外,通过算出两者的绝对数比值,可以算出各核酸片段数相对于分析对象总核酸片段数的比例。算出该比例在进行试样间的表达比较解析时尤其有用。例如,当对在健康人和特定疾病患者间表达量不同的标志基因进行探索时,需要找出两试样间表达量相等的基因并利用该表达量进行标准化,但实际上找出试样间表达量相等的基因是非常困难的。特别是在定量 PCR 法中,指出这是困难的(Nature Methods 2010, Vol. 7, pp687-692)。而本实施例的方法由于能简便地对各目的生物分子算出相对于试样总体的比例,因此健康人和患者的比较也可以直接通过相对于试样中的全部生物分子数的比例来进行比较。这一点对于临床检体中核酸分子的比较解析特别有用。

[0170] 实施例 8

[0171] 实施例 8 中,使用图 8 对显著提高固定有仅一分子捕捉分子的微粒 803 的固定率的方法和器件的构成进行说明。该方法之一为如下的方法:将含有固定有仅一分子捕捉分子的微粒 803 的溶液滴加在配置有粘接垫 802 的支撑基体 801 上,为避免干燥而盖上盖子放置片刻从而使其反应的方法。此时,微粒 803 由于布朗运动而概率性地接近粘接垫 802。例如,粘接垫 802 表面覆盖有烷烃分子作为结合分子,与由聚苯乙烯等聚合物构成的微粒 803 产生分子间力,从而微粒 803 接近粘接垫 802 并迅速发生结合,一旦粘接则不再脱落。进而,为了促进主动性碰撞,可以通过用搅拌子对溶液进行搅拌、实施热或微波使溶液产生对流等提高微粒 803 碰撞粘接垫 802 的频率。进而,作为积极提高微粒 803 的碰撞频率的有效方法,存在在流路中对包含微粒 803 的溶液进行搅拌的方法。使用图 8 对该方法进行说明。首先,如图 8 的 A 所示,在支撑基体 801 上配置流路,流路的盖子使用图 8 的 B 所示的带有槽的凹凸板 804。作为流路形成材料,优选为用硅烷偶联剂等实施了防止非特异性吸附处理的石英、PDMS (聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane)) 等。通常,使溶液在微细流路中沿着一定方向流动时,溶液以层流形式通过流路。因此,仅接近支撑基体 801 的层中的微粒 803 被固定在粘接垫 802 上,远离支撑基体 801 的层中的微粒 803 无法接近支撑基体 801。例如,静置或层流中通过分子间力使微粒 803 吸附在粘接垫 802 时,势能与距离的 6 次方成反比,因此在支撑基体 801 的附近,最多仅存在于数十微米附近的微粒 803 能够获得碰撞机会。微粒 803 与粘接垫的碰撞频率与微粒 803 的浓度成比例,因此支撑基体 801 的表层的微粒 803 在一定时间后几乎都被固定在粘接垫 802 上。因此,液层间的微粒 803 的移动仅仅是扩散,在表层附近和其以外的液层间产生浓度差,微粒 803 相对于粘接垫 802 的实质浓度显著降低。

[0172] 这里,将如图 8 的 B 所示的凹凸板 804 沿着流体的前进方向配置。图 8 的例子中,示出按照与支撑基体 801 相面对的方式配置的构成。沿着一定方向前进的流体在通过该凹凸板 804 的过程中产生以 X 方向为轴的涡流或湍流,流体还沿着 Z 轴方向移动。流动方式

取决于凹凸板 804 的形状。这种现象的一例在 Science2002, Vol. 295, pp647-650 中有所说明。

[0173] 通过利用以上方法产生上下方向的流动,溶液内所包含的微粒 803 与粘接垫 802 的碰撞频率显著提高。同时,与将溶液在支撑基体 801 上静置而反应的方法相比,可以显著缩短时间。通常,1 微米微粒的扩散速度为 0.1 ~ 1 微米每秒,与此相对,配置如图 8 的 B 所示的凹凸板 804 并使溶液以流速 200 微米每秒流动时,在 Z 轴方向产生约 10 微米每秒的流动。因此,与静置相比,理论上反应速度提高约 10 ~ 100 倍。此外,将反应室用隔膜泵等连接、将流路的出入口用管连接,从而流体的前进方向可以不仅仅为单方向而是以一定的周期改变方向,即使微量的液量也能反复进行搅拌。此时,来自于配置有粘接垫 802 的支撑基体 801 的液体浓度以稀薄为好,可以进一步提高碰撞频率。使 10^5 分子的生物分子(即微粒)与 10^6 的粘接垫在长度为 10 毫米、宽度为 5 毫米、高度为 1 毫米的反应室内反应时,当使溶液以流速 200 微米每秒往返 15 次时,计算可知约 50% 的生物分子被固定在粘接垫上。进而,为了固定约 95% 的生物分子(即微粒),需要往返约 100 次,所需时间为约 80 分钟左右。实际上,产生 10 次左右同等程度的流动时,反应效率比静置条件增加约 30% 左右。搅拌不仅可以用来提高微粒 803 的固定率,而且还可以用于提高分析对象生物分子和捕捉分子的杂交效率、检测用的带荧光体标记的核酸分子(探针分子)和分析对象生物分子的杂交效率的目的。

[0174] 实施例 9

[0175] 使用图 9 说明本实施例的分析方法。使标记有荧光色素 903 的捕捉用标签分子 902 与分析对象核酸片段 901 结合。结合可以使用连接反应、在预先在分析对象核酸片段 901 和捕捉用标签分子 902 中导入氨基、琥珀酰亚胺基等官能团的情况下官能团彼此的偶联反应。尤其是当分析对象核酸片段 901 为 microRNA 时,使捕捉用标签分子 902 为 10 ~ 20 个碱基长度左右的 RNA 分子、使用 T4RNA 连接酶将两者结合的方法是有效的。使标记有荧光色素 903 的捕捉用标签分子 902 与分析对象核酸片段 901 结合后,与标记有荧光体 905 的核酸分子(探针分子)904 进行杂交。核酸分子(探针分子)904 是用于识别各评价目的核酸片段的分子,需要具有代表各基因序列的碱基序列。在进行序列设计时,需要通过各带标记的核酸分子(探针分子)将作为核酸双链稳定性的指标的熔解温度限定在一定范围内。该范围越窄越优选,优选控制在规定温度 $\pm 3^\circ\text{C}$ 左右。此外,优选带标记的核酸分子(探针分子)彼此的碱基序列的同源性低,优选将同源性控制在 70% 以下,更优选控制在 60% 以下。然后,使用实施例 6 中记载的方法,预先制作介由结合分子 907 将仅一分子捕捉分子 906 固定在微粒 908 上的微粒,添加该微粒进行杂交,从而可以制作下述微粒:在微粒 908 上,形成有一分子对的分析对象核酸片段 901 和标记有荧光体 905 的核酸分子 904 的杂合体。荧光体 905 可以如实施例 1 所述,使用引入有荧光体的荧光珠子。

[0176] 然后,使该形成有杂合体的微粒 908 在流路 909 中流动并照射激发光,从而利用检测器 910 对荧光色素 903 的荧光和荧光体 905 的荧光强度进行检测。通过将流路 909 的直径设定为微粒 908 的直径的 2 倍以下,可以逐个识别微粒 908 并对荧光进行测定而不同时对多个荧光色素 903 的荧光进行测定,故而优选。对荧光色素 903 的荧光亮点数进行计数,获得相当于总核酸片段数的值。另一方面,仅在同时测定到荧光色素 903 的荧光和荧光体 905 的荧光时,对特定的荧光体的亮点进行计数,获得相当于各种核酸片段数的值。通过对

全部荧光体的亮点进行计数,从而获得核酸片段数的绝对数。通过算出两者的绝对数的比值,可以算出各核酸片段数相对于试样中的总核酸片段数的比例。本实施例的方法中,由于各基因的表达量是以表达量相对于全部基因的表达量的比值形式获得的,因此不同试样间、例如健康人和患者试样的比较也可以直接进行比较。这一点对于临床检体中核酸分子的比较解析特别有用。

[0177] 作为微粒 908,可以使用由聚苯乙烯等高分子形成的微粒,此外,还可以使用在含高分子中含有磁性金属粉体的磁性微粒。尤其在使用磁性微粒时,在使反应后的微粒 908 在流路 909 中流动之前,可以容易地将反应液中残存的未固定在微粒 908 上的未反应的标记有荧光色素 903 的捕捉用标签分子 902、标记有荧光体 905 的核酸分子(探针分子) 904 去除,存在仅在同时测定到荧光色素 903 的荧光和荧光体 905 的荧光时对特定的荧光体的亮点进行计数时测定变得容易的显著优点,故而优选。

[0178] 实施例 10

[0179] 本实施例中,以生物分子为核酸的情况为例,参照图 10 说明生物分子分析方法中使用的生物分子分析装置的优选构成的一个例子。

[0180] 本实施例的核酸分析装置具备:对核酸分析用器件基板供给核酸试样溶液、带荧光标记的分子溶液和洗涤液的单元,用于在反应室中进行杂交的温度调节单元,对核酸分析用器件基板照射光的单元,以及对带荧光标记的分子的荧光体的荧光进行测定的发光检测单元。更具体而言,将核酸分析用器件基板 1001 置于温度调节板 1003 上,在其上贴合设有流路 1004 的流路部件 1002,从而形成反应室。流路部件 1002 可以使用例如 PDMS (聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane))。

[0181] 送液单元 1005 连接在注入口 1014 上,保存在送液单元 1005 中的核酸试样溶液、带荧光标记的分子溶液和洗涤液依次被供给至核酸分析用器件基板 1001 上的反应室。在核酸试样溶液和带荧光标记的分子溶液被供给至反应室后,在流路 1004 中,溶液被保持在核酸分析用器件基板 1001 上的反应室中,利用温度调节板 1003,在 30℃至 80℃的温度范围进行杂交。杂交后,由磁性单元 1016 将反应室内的磁性微粒收集并固定到核酸分析用器件基板 1001 上,由送液单元 1005 将洗涤液供给反应室,洗涤未反应物。

[0182] 洗涤后进行荧光检测。激发光源可以根据所使用的荧光体的种类适当选择。例如,在使用 Cy5、Cy5.5、Cy3 作为荧光珠子中使用的荧光体时,激发光可以以 532nm (YAG 激光)、633nm (He-Ne 激光) 2 种来应对。利用分色镜 1015 将从 YAG 激光源(波长 532nm、输出功率 20mW)1007 和 He-Ne 激光源(波长 633nm、输出功率 20mW)1013 发射的激光调整为使所述 2 激光同轴后,通过透镜 1008,利用分色镜 1009 引导至物镜 1006,照射在核酸分析用器件基板 1001 上。带荧光标记的分子发出的荧光与激发光沿着同轴的光路逆向前进,利用物镜 1006 聚光后通过分色镜 1009,通过成像透镜 1011 在 2 维 CCD 相机 1012 的感光面上成像。激发光的散射光通过滤光器 1010 而被滤除。

[0183] 如上所述,通过由送液单元、温度调节板、激发光源和荧光检测单元组成核酸分析装置,可以自动进行基于杂交的核酸分析,可以实现对现有技术的通量(through-put)的大幅改善。

[0184] 予以说明,生物分子为蛋白质时也能够利用装置构成相同的分析装置进行分析。

[0185] 附图标记说明

- [0186] 101 分析对象核酸片段
- [0187] 102 捕捉用标签
- [0188] 103 荧光色素
- [0189] 104 核酸分子(探针分子)
- [0190] 105 荧光体
- [0191] 106 捕捉用分子
- [0192] 107 结合分子
- [0193] 108 磁性微粒
- [0194] 109 磁铁
- [0195] 110 支撑基体
- [0196] 111 检测器
- [0197] 201 磁性微粒
- [0198] 202 抗体
- [0199] 203 结合分子
- [0200] 204 分析对象蛋白质
- [0201] 205 实施了荧光标记的抗体(探针分子)
- [0202] 206 支撑基体
- [0203] 207 磁铁
- [0204] 208 检测器
- [0205] 301 支撑基体
- [0206] 302 粘接垫
- [0207] 303 微粒
- [0208] 304 捕捉分子
- [0209] 305 结合分子
- [0210] 306 分析对象核酸片段(生物分子)
- [0211] 307 捕捉用标签分子
- [0212] 308 带有荧光体标记的核酸分子(探针分子)
- [0213] 401 支撑基体
- [0214] 402 粘接垫
- [0215] 403 微粒
- [0216] 404 捕捉分子
- [0217] 405 线状分子
- [0218] 406 官能团
- [0219] 407 官能团
- [0220] 501 平滑的支撑基体
- [0221] 502 电子束用正型抗蚀剂
- [0222] 503 粘接垫
- [0223] 504 线状分子
- [0224] 505、506 线状分子末端的官能团

- [0225] 507 防止非特异吸附用分子
- [0226] 508 微粒
- [0227] 509 抗生物素蛋白
- [0228] 510 捕捉分子
- [0229] 601 微粒
- [0230] 602 结合位点
- [0231] 603 结合位点
- [0232] 604 捕捉用分子
- [0233] 605 寡核苷酸
- [0234] 606 结合位点
- [0235] 607 回收用微粒
- [0236] 608 结合位点
- [0237] 609 水溶液
- [0238] 610 磁铁
- [0239] 701 分析对象核酸片段
- [0240] 702 捕捉用标签分子
- [0241] 703 荧光色素
- [0242] 704 核酸分子(探针分子)
- [0243] 705 荧光体
- [0244] 706 捕捉分子
- [0245] 707 结合分子
- [0246] 708 微粒
- [0247] 709 粘接垫
- [0248] 710 支撑基体
- [0249] 711 检测器
- [0250] 801 支撑基体
- [0251] 802 粘接垫
- [0252] 803 微粒
- [0253] 804 凹凸板
- [0254] 901 分析对象核酸片段
- [0255] 902 捕捉用标签分子
- [0256] 903 荧光色素
- [0257] 904 核酸分子(探针分子)
- [0258] 905 荧光体
- [0259] 906 捕捉分子
- [0260] 907 结合分子
- [0261] 908 微粒
- [0262] 909 流路
- [0263] 910 检测器

-
- [0264] 1001 核酸分析用器件基板
 - [0265] 1002 流路部材
 - [0266] 1003 温度调节板
 - [0267] 1004 流路
 - [0268] 1005 送液单元
 - [0269] 1006 物镜
 - [0270] 1007 YAG 激光光源
 - [0271] 1008 透镜
 - [0272] 1009 分色镜
 - [0273] 1010 滤光器
 - [0274] 1011 成像透镜
 - [0275] 1012 2 维 CCD 相机
 - [0276] 1013 He-Ne 激光光源
 - [0277] 1014 注入口
 - [0278] 1015 分色镜
 - [0279] 1016 磁性单元

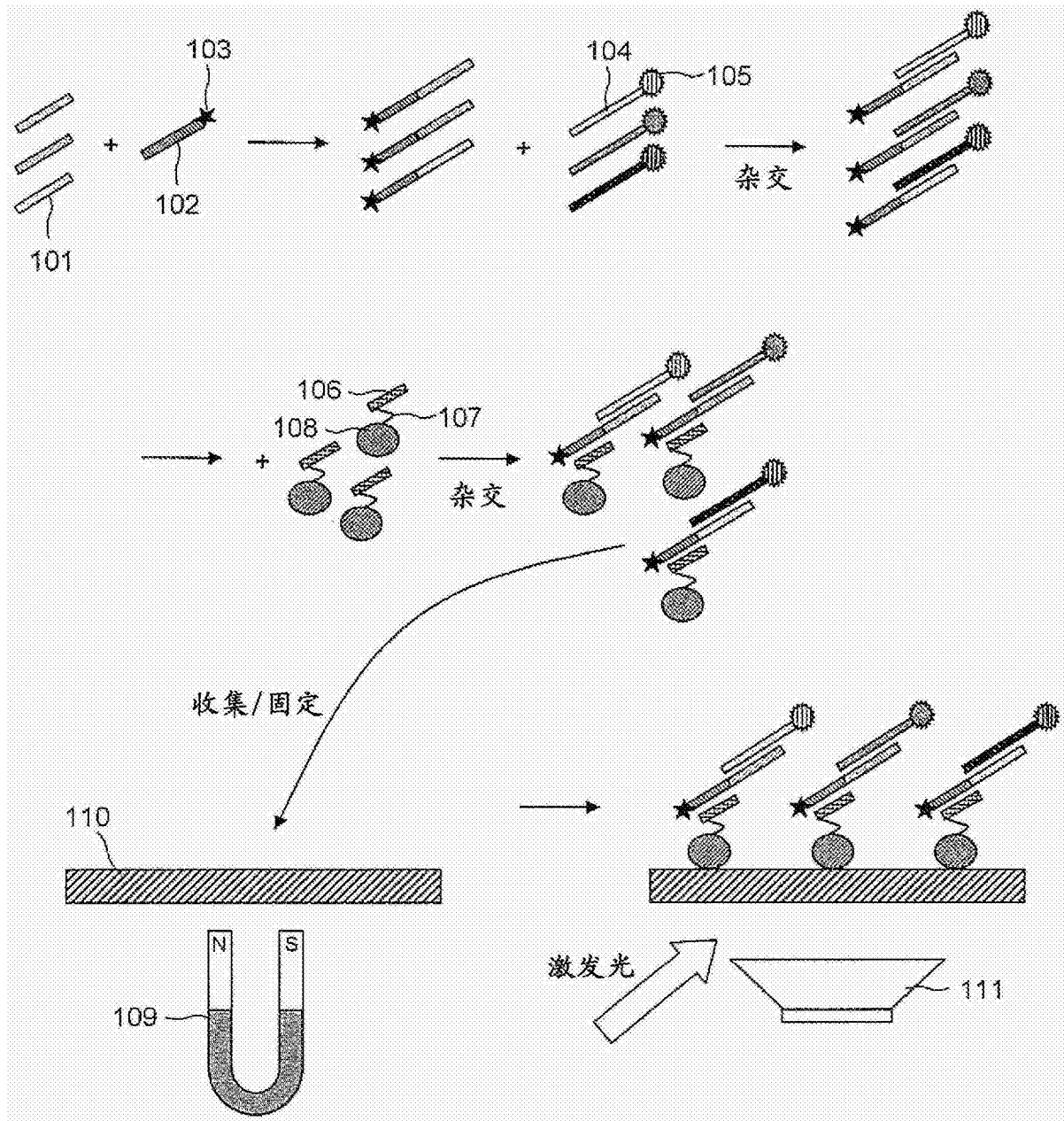


图 1

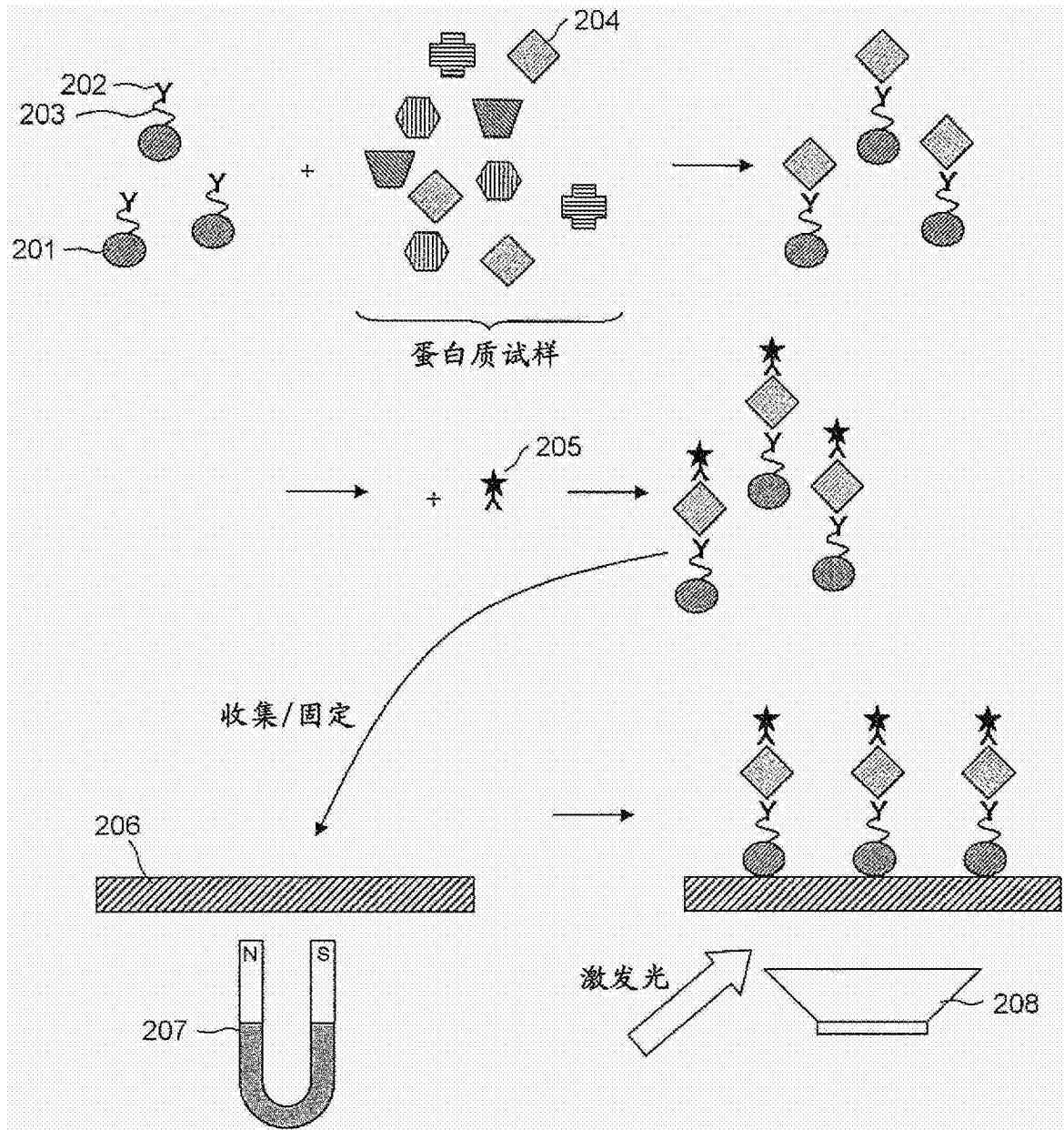


图 2

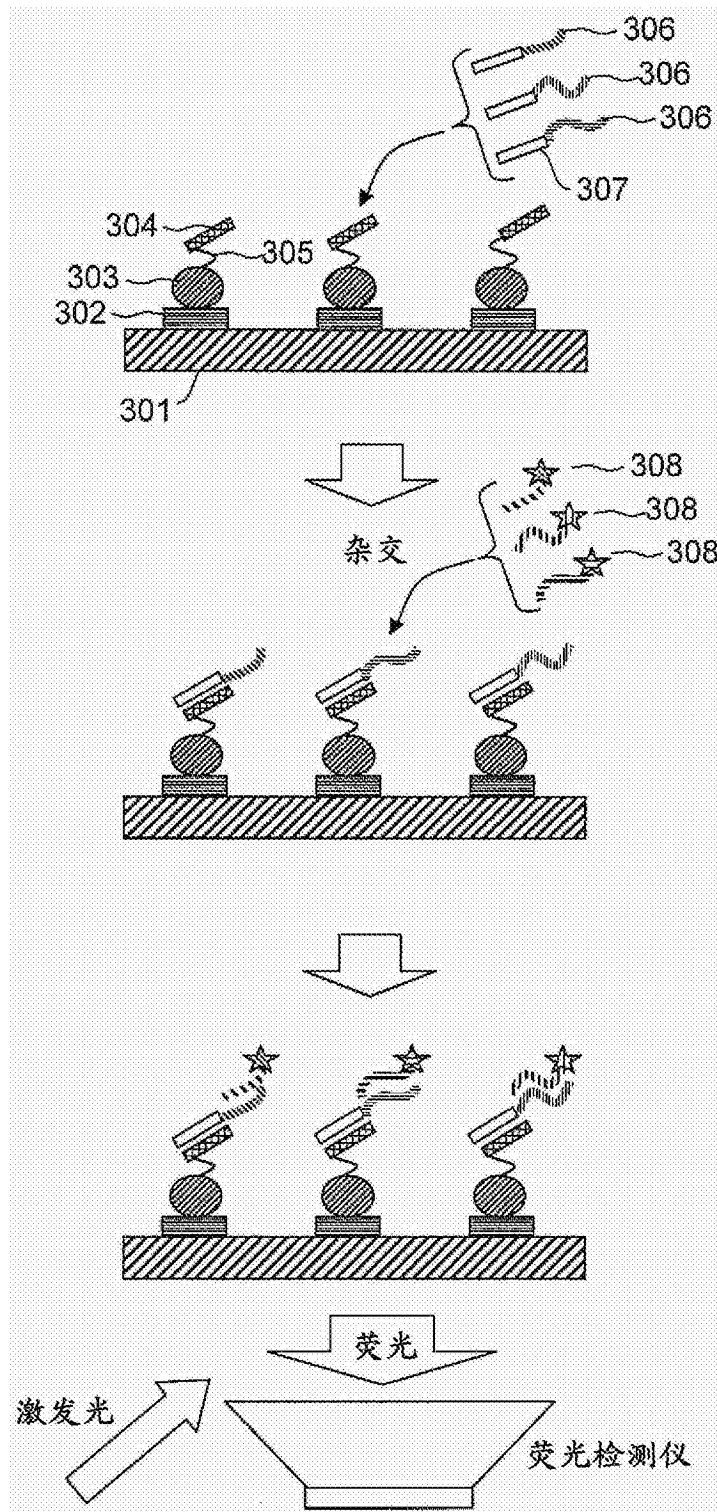


图 3

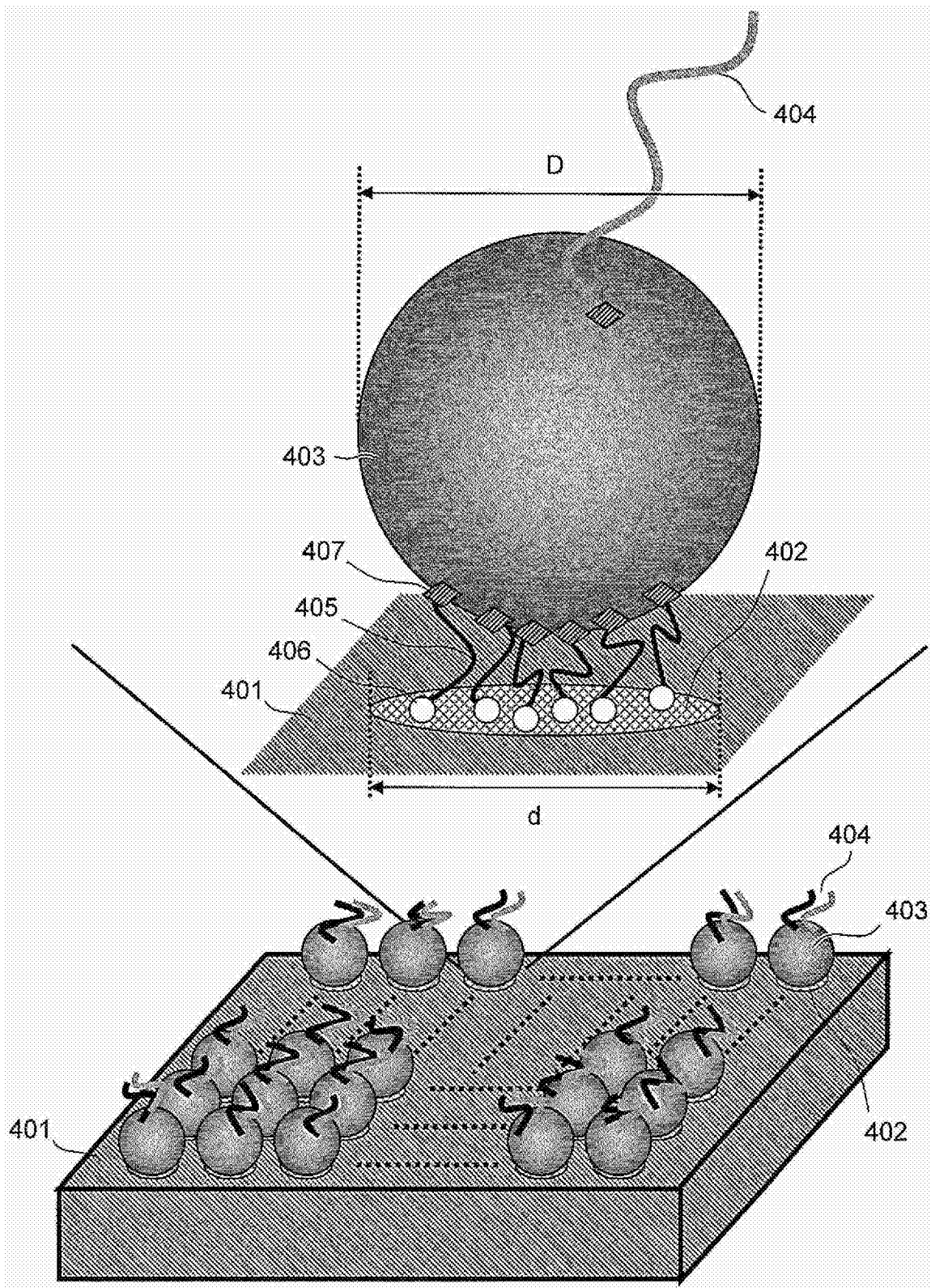


图 4

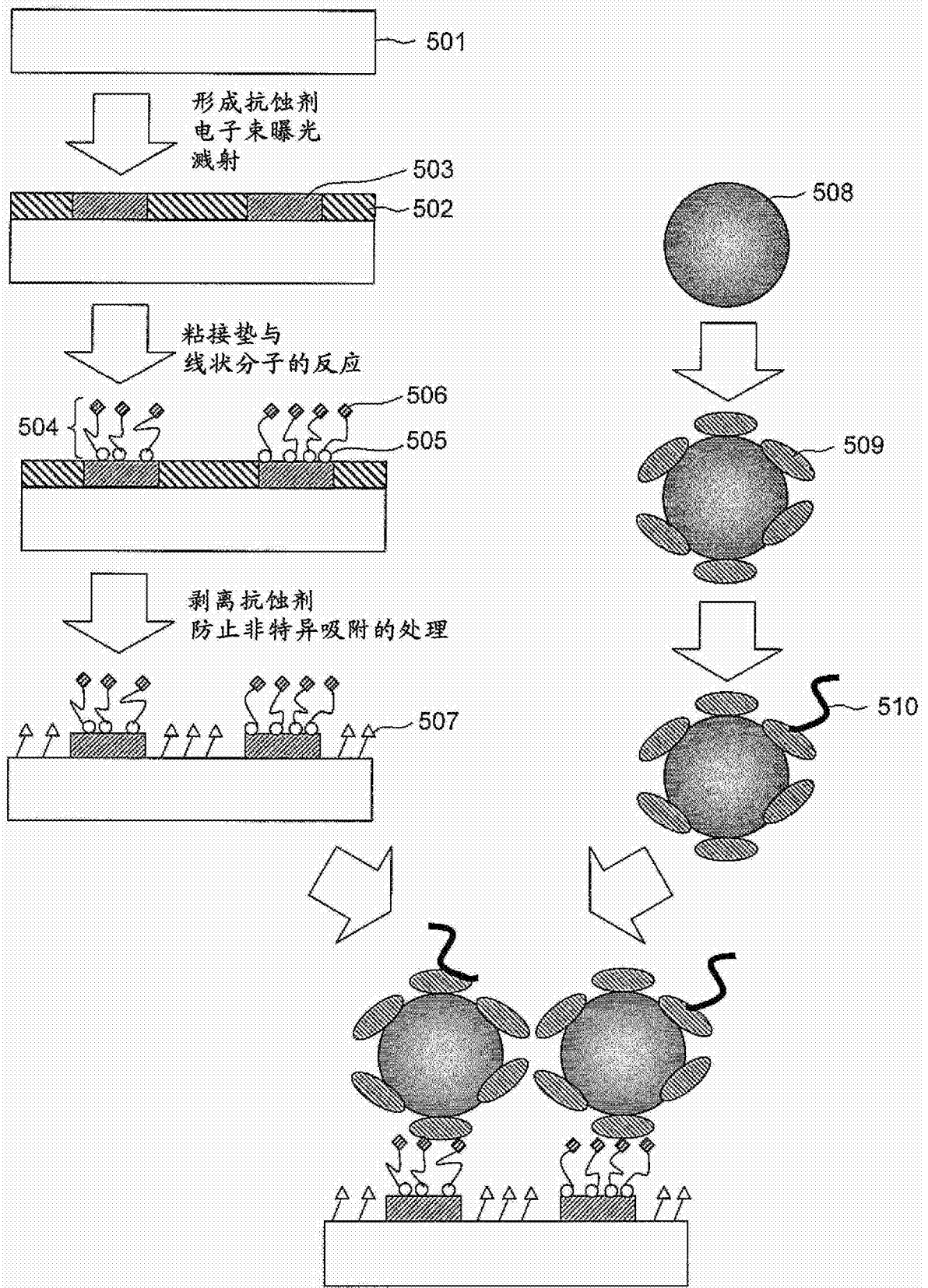


图 5

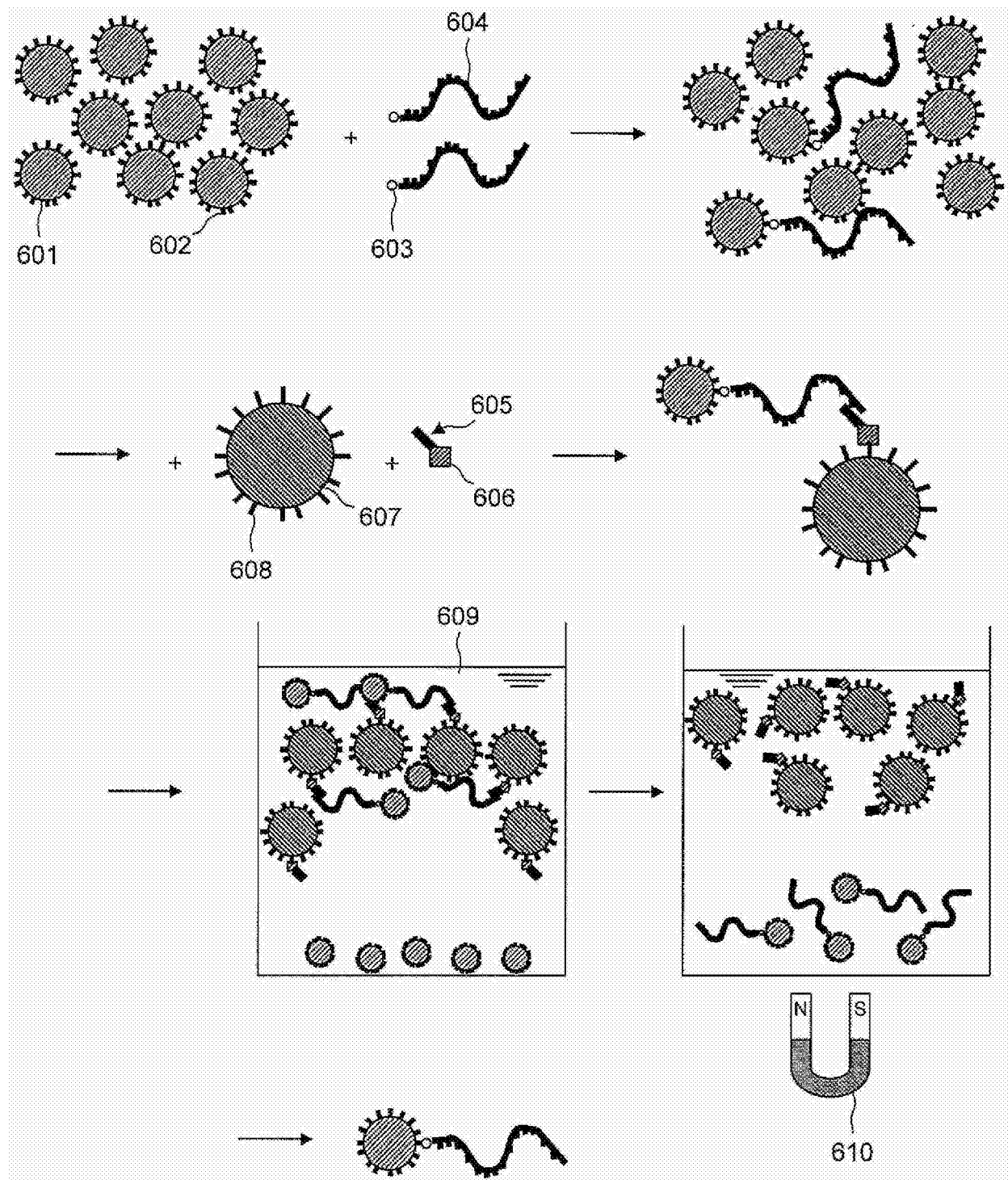


图 6

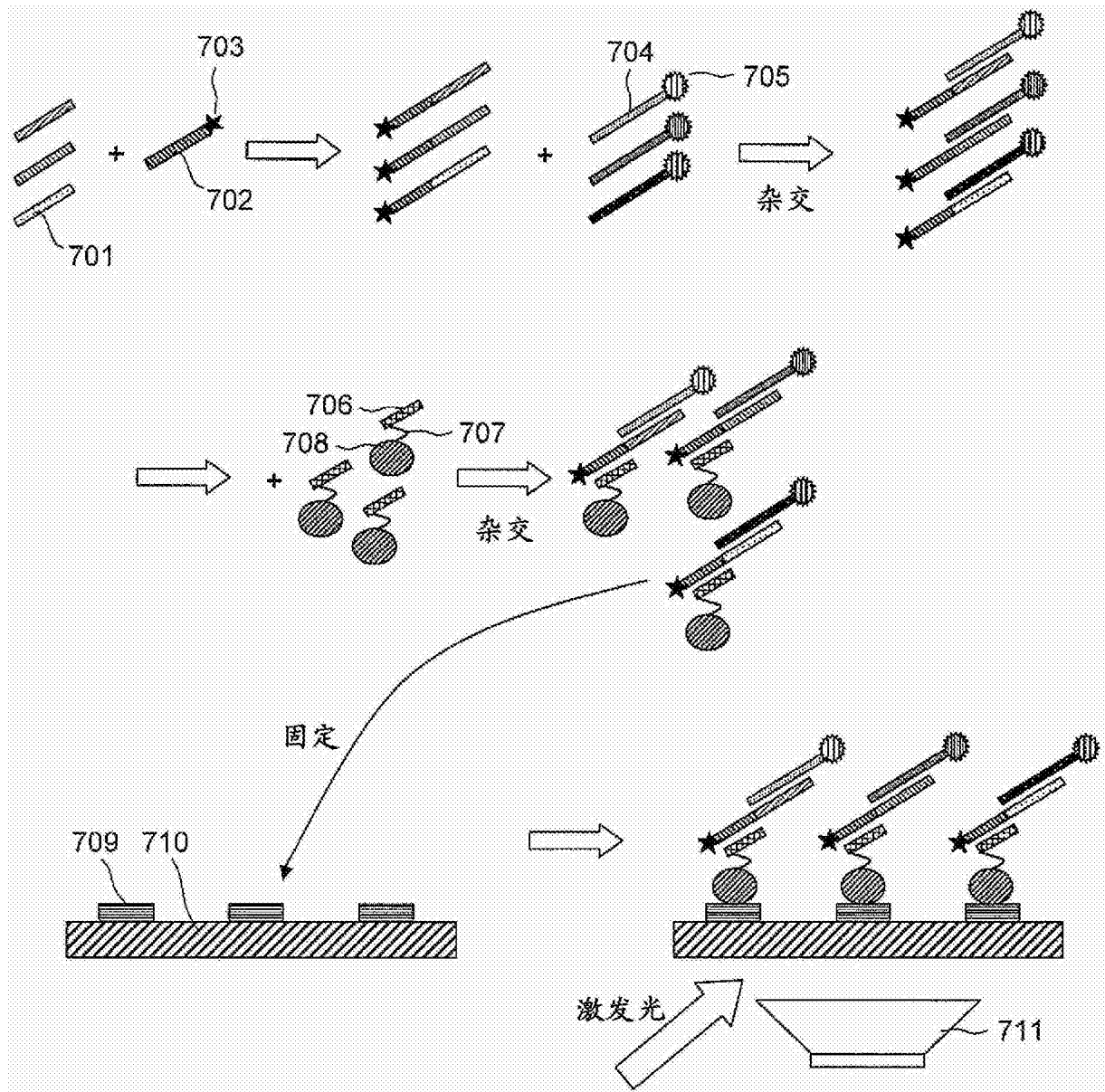


图 7

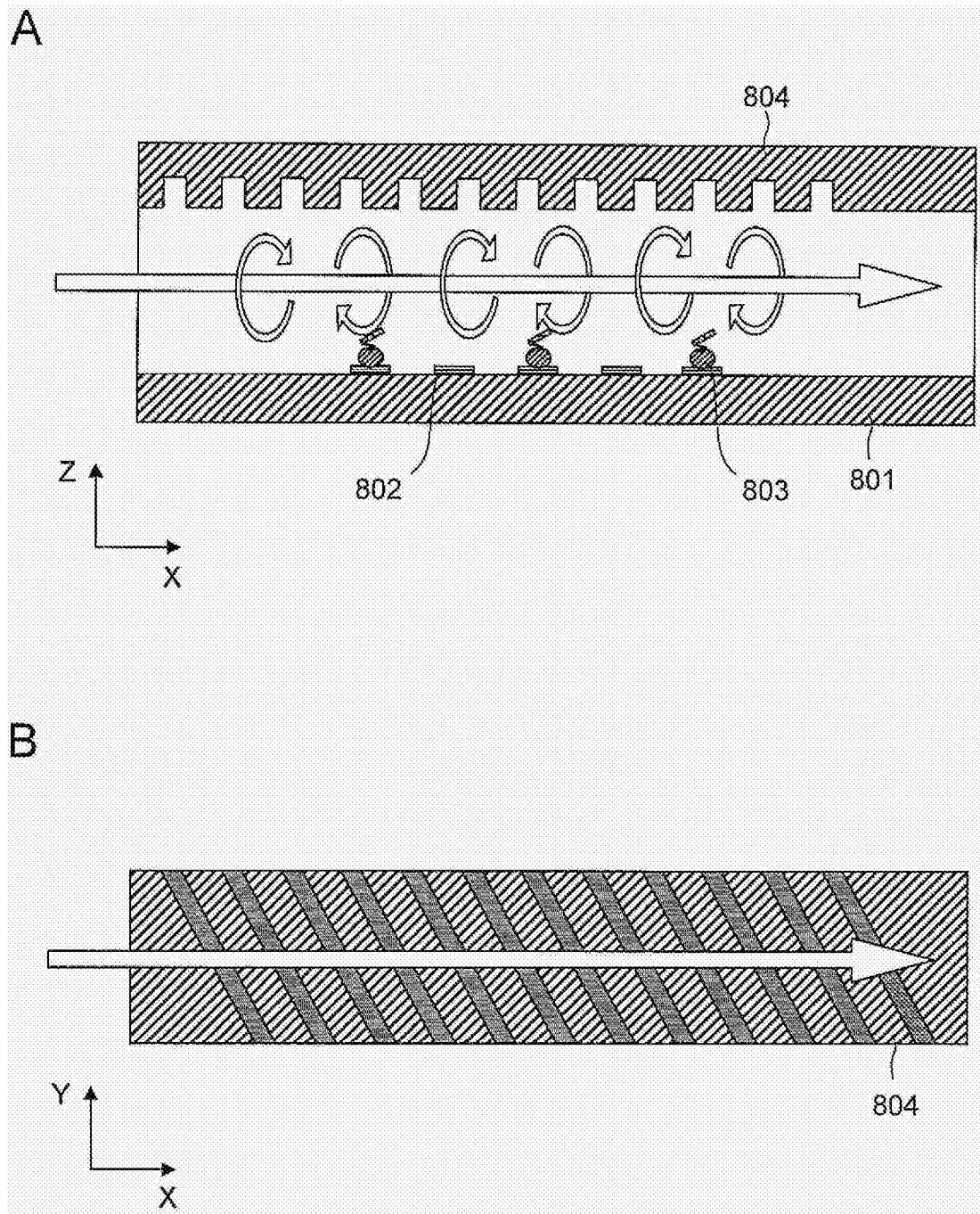


图 8

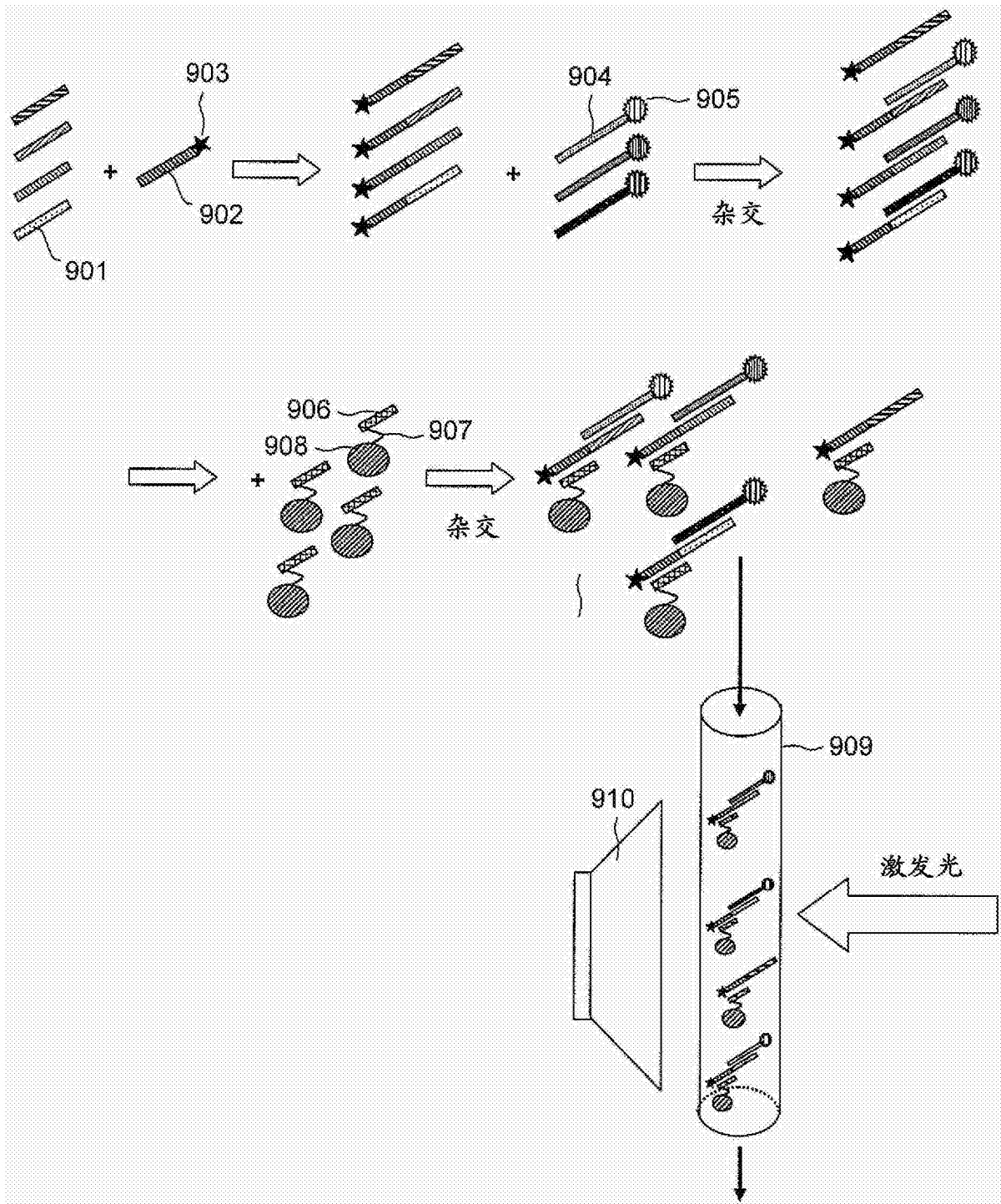


图 9

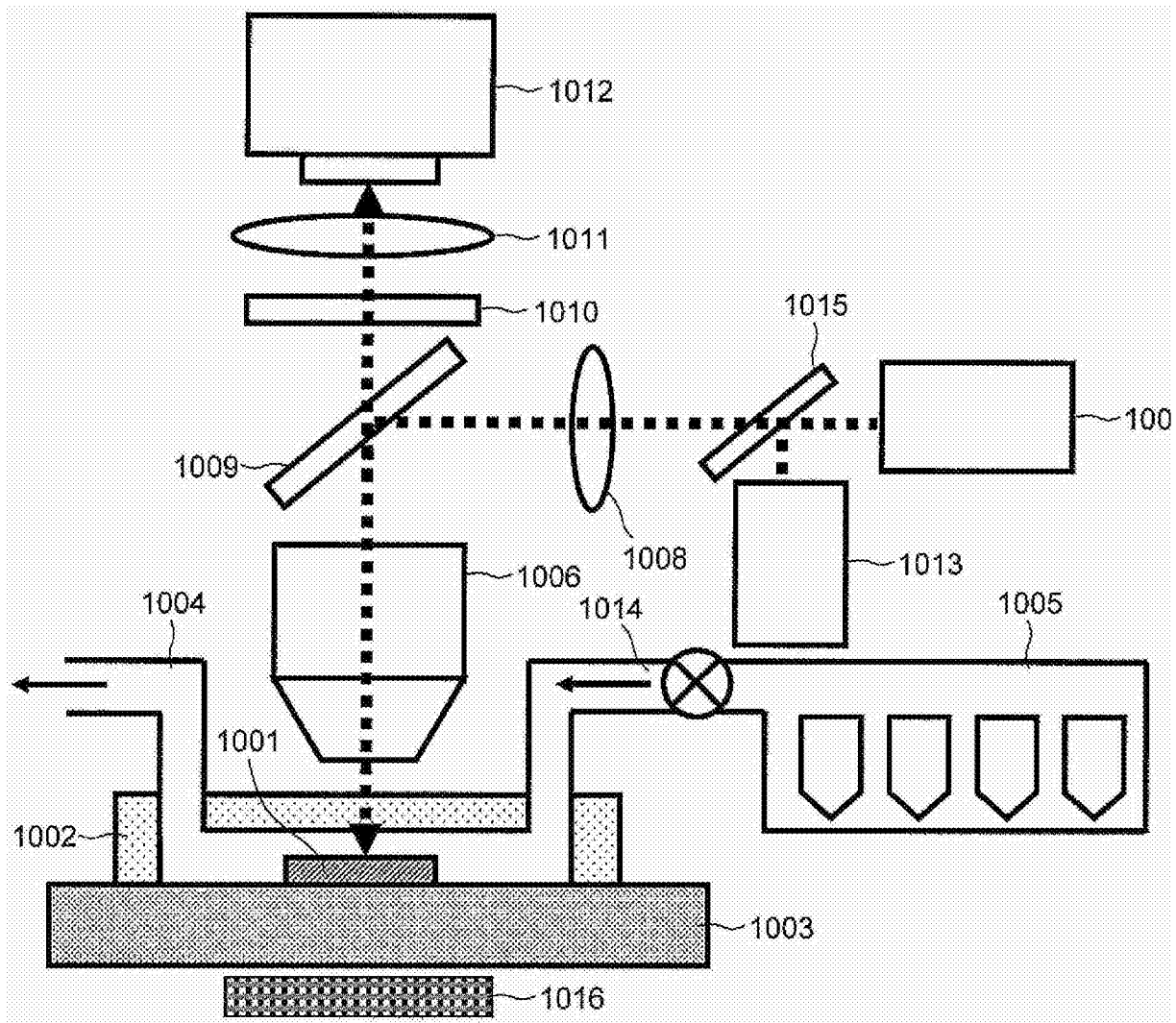


图 10