

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 37/00

G01N 27/62



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816814.6

[43] 公开日 2005 年 9 月 14 日

[11] 公开号 CN 1668923A

[22] 申请日 2003.6.23 [21] 申请号 03816814.6

[30] 优先权

[32] 2002. 6. 24 [33] JP [31] 183249/2002

[32] 2002. 6. 28 [33] JP [31] 191390/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/007918 2003.6.23

[87] 国际公布 WO2004/001412 日 2003.12.31

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.14

[71] 申请人 佳能株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 川口正浩 冈本尚志 高濑博光

桥本浩行

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 4 页 说明书 25 页 序列表 6 页
附图 4 页

[54] 发明名称 带有标准探针的 DNA 微阵列以及包
含该阵列的试剂盒

[57] 摘要

本发明提供在基板上固定了为了检测检体中所含的具有目的碱基序列的核酸分子使用的带有实质上与该目的核酸分子的碱基序列互补的碱基序列的核酸探针的 DNA 微阵列, 是特征如下的 DNA 微阵列: 含有从用于检定靶核酸的一种以上的内标准用探针、用于检出操作以及探针量检定的一种以上的外标准用探针、用于对通过与上述核酸探针形成同样的手法形成的上述探针的存在量或密度进行检定的探针选择出的一种以上的探针。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. DNA 微阵列，是在基板上固定了为了检测检体中所含的具有目的碱基序列的核酸分子使用的带有实质上与该目的核酸分子的碱基序列互补的碱基序列的核酸探针的 DNA 微阵列中，其特征在于，

含有选自在含有该目的碱基序列的核酸的扩增反应检定用而添加的一种以上的内标准用探针、检出操作以及探针量检定用中添加的一种以上的外标准用探针、通过与形成上述核酸探针同样的手法形成的上述探针的存在量或密度进行检定用探针中的一种以上的探针。

2. DNA 微阵列，是在基板上固定了为了检测检体中所含的具有目的碱基序列的核酸分子使用的带有实质上与该目的核酸分子的碱基序列互补的碱基序列的核酸探针的 DNA 微阵列中，其特征在于，

从为了对上述检体中所含的具有上述目的碱基序列的核酸分子的含有浓度进行定量，含有向含有的一种以上的该目的碱基序列的核酸的扩增反应检定用中添加的内标准用探针、一种以上的检出操作以及探针量检定用中添加的外标准用探针选择出的一种以上的探针。

3. 权利要求 2 所述的 DNA 微阵列，其特征是：固定在基板上的该内标准用探针和/或该外标准用探针按照 4 点以上的量或密度以一系列的组固定在基板上。

4. 权利要求 2 所述的 DNA 微阵列，其特征是：该内标准用探针由相对于与来自内标准核酸的扩增反应产物的不同链长的二种以上的探针构成。

5. 权利要求 2 所述的 DNA 微阵列，其特征是：该外标准用探针由相对于添加的外标准核酸的含有任意核酸碱基数的互补碱基序列的二种以上的探针构成。

6. 权利要求 2 所述的 DNA 微阵列，其特征是：该内标准用探针和外标准用探针是将合成核酸固定在基板上。

7. 权利要求 6 所述的 DNA 微阵列，其特征是：该合成核酸的链长为 15 碱基 ~ 75 碱基长。

8. 引物组, 是在作为利用 DNA 微阵列对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测时, 在对具有该目的碱基序列进行扩增反应时, 与含有该目的碱基序列的核酸同时扩增的内标准核酸的扩增反应用引物组, 其特征是: 来自含有目的碱基序列的核酸的扩增产物的链长与来自该引物组参与的内标准核酸的扩增产物的链长被设计成相同。

9. 目的碱基序列检测用试剂盒, 是在利用 DNA 微阵列对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测时, 作为在对含有该目的碱基序列的核酸进行扩增反应时, 包含与含有目的碱基序列的核酸同时扩增的内标准核酸的扩增反应用引物组的检测用试剂盒, 其特征是: 当来自上述含有目的碱基序列的核酸的扩增产物的链长为二种以上时, 包含二种以上对应于不同链长的权利要求 8 所述的引物组。

10. 权利要求 8 所述的目的碱基序列检测用试剂盒, 其特征是: 多个该引物组包含各 1 种以上的扩增产物链长 200bp 以下用、200~500bp 用、500~2000bp 用、2000bp 以上用的引物。

11. 目的碱基序列检测用试剂盒, 是在作为利用 DNA 微阵列对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测时, 作为含有添加到检体中的外标准核酸的检测用试剂盒, 其特征是: 包含二种以上的用可检测的标记物标记的合成核酸的外标准核酸。

12. 权利要求 9 所述的目的碱基序列检测用试剂盒, 其特征是: 该标记物是荧光物质、放射性物质、发光物质中的任一种。

13. 目的碱基序列检测用试剂盒, 是在利用 DNA 微阵列对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测时, 在含有该目的碱基序列的核酸的扩增反应时作为包含与含有目的碱基序列的核酸同时扩增的内标准核酸的检测用试剂盒, 其特征是: 作为内标准核酸包含二种以上的与检测目的碱基序列没有同源性的来自微生物的核酸或来自病毒的核酸。

14. DNA 微阵列, 是由许多核酸相关物质构成的探针点以矩阵状配置在基板上的 DNA 微阵列, 其特征是: 在上述核酸探针点形成的基板表面的一部分具备通过与上述核酸探针点形成相同手法形成的每一点平均核酸密度已确定的存在量或密度检定用的核酸探针点。

15. 权利要求 14 所述的 DNA 微阵列, 其特征是: 作为上述浓度基准用的核酸探针点具备具有多个阶段的平均核酸密度的每一点核酸密度已决定的多种核酸探针点。

16. 权利要求 14 所述的 DNA 微阵列, 其特征是: 每一点的平均核酸密度已决定的核酸探针点另外通过化学分析决定该每点的平均核酸密度。

17. 权利要求 16 所述的 DNA 微阵列, 其特征是: 作为上述化学分析手段, 使用通过诱导耦合等离子体质量分析法 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry、以下略为 ICP-MS), 决定该每点的平均核酸密度。

18. 权利要求 14 所述的 DNA 微阵列, 其特征是: 上述核酸探针由单链核酸构成。

19. 权利要求 14 所述的 DNA 微阵列, 其特征是: 在该基板上配置由单链核酸构成的核酸探针和通过对该核酸探针杂交导入的靶核酸的两方。

20. DNA 微阵列的分析方法, 是在基板上以矩阵状配置了由许多核酸相关物质构成的核酸探针点的 DNA 微阵列的分析方法, 其特征是:

在上述核酸探针点形成的基板表面的一部分设置通过与上述核酸探针点的形成相同的手法形成的每点平均核酸密度已经决定的浓度基准用的核酸探针点,

作为上述浓度基准用核酸探针点, 具备具有多个阶段的平均核酸密度的每点平均核酸密度已经决定的多种核酸探针点,

相对于具有上述多个阶段的平均核酸密度的多种核酸探针点, 使用根据进行 2 次离子质量分析时检出的 2 次离子的信号强度做成的标准曲线,

通过 2 次离子质量分析法决定配置在基板上的未知浓度的核酸探针点核酸浓度。

21. 权利要求 20 所述的方法, 其特征是: 作为上述 2 次离子质量分析使用飞行时间型 2 次离子质量分析法。

22. 权利要求 21 所述的方法, 其特征是: 在上述 2 次离子质量分析检测的 2 次离子强度以 1 次离子的剂量作为选择在 $1 \times 10^{14} / \text{cm}^2$ 以下的一定值时, 是由 1 次离子照射的一定面积放出的来自上述核酸探针的特定的 2 次离子的积分强度 (计数的数)。

23. 权利要求 21 所述的方法, 其特征是: 在上述 2 次离子质量分析中检测的 2 次离子强度, 在将 1 次离子的剂量作为选择在 $1 \times 10^{12} / \text{cm}^2$ 以下的一定值时, 是由 1 次离子照射的一定面积放出的来自上述核酸探针的特定的 2 次离子的积分强度 (计数的数)。

24. 权利要求 21 ~ 23 中任一项所述的方法, 其特征是: 作为在上述 2 次离子质量分析中检测的 2 次离子, 可以利用由从腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶的各碱基脱去一个氢原子的阴离子、或 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、 PO_3^- 构成的来自核酸探针的 2 次离子种类选择的阴离子。

25. 权利要求 21 ~ 24 中任一项所述的方法, 其特征是: 设置根据在上述 2 次离子质量分析中检测的 2 次离子的强度, 对应于 1 次离子的照射位置以二维表示的 2 次离子强度的图像表示检测结果的工序。

26. DNA 微阵列的制造方法, 是由许多核酸相关物质构成的核酸探针以矩阵状配置在基板上的 DNA 微阵列的制造方法, 其特征是: 在 DNA 微阵列中, 在形成上述核酸探针点的基板表面的一部分设置每一点的平均核酸密度已确定的浓度基准用的核酸探针点时, 至少具有

在上述基板上形成矩阵状核酸探针的工序,

在上述核酸探针点形成的基板表面的一部分中, 通过与上述核酸探针点形成相同手法, 形成每一点的平均核酸密度已确定的浓度基准用核酸探针点的工序。

带有标准探针的 DNA 微阵列以及包含该阵列的试剂盒

技术领域

本发明涉及到对检体中含有对具有目的碱基序列的核酸量的定量分析有用的 DNA 微阵列。更具体讲，涉及到使用在固相上固定了带有与检体中含有的具有目的碱基序列的核酸互补的碱基序列的核酸探针的 DNA 微阵列，进行定量分析时，可使定量精度提高的 DNA 微阵列以及利用该 DNA 微阵列进行检出操作中利用的检测用试剂盒。

背景技术

作为基于杂交法的基因 DNA 的检出、测定法的发展，有关在基板上固定多种核酸探针，用于对检体样品中所含有的基因 DNA 同时进行多次检出试验的基因芯片（DNA 芯片、微阵列）的研究近年来进步神速。利用这样的基因芯片（DNA 芯片、微阵列）对检体样品中含有的基因 DNA 进行检出、测定的方法预期可应用在分子生物学研究、遗传疾患、传染病诊断等各个领域。

基因芯片的基本形态是依据杂交法，将用于检出目的基因 DNA 的多种具有与目的基因碱基序列互补的碱基序列的单链核酸片段以阵列状固定在玻璃等基板表面。作为杂交探针被利用的具有与目的基因互补的碱基序列的单链核酸片段一般利用称为寡 DNA 的通过化学合成的 DNA 寡聚物，或利用称为 cDNA 的以来自生物组织基因作为模板通过酶生物合成的互补链 DNA 片段等。关于单链核酸片段向基板表面的固定，如果使用寡 DNA，例如象 US5474796（或、特表平 9-500568 号公报、申请人：ProtoGene Laboratories）所述方法那样，大致有预先将末端固定在基板上，然后在基板上依次合成 DNA 分子本身，做成固定的核酸片段的方法，以及例如象特开平 11-187900 号公报（申请人：佳能株式会社）所述方法那样，通过另一途经合成寡 DNA 后、利用各种结合手段，将核

酸片段固定在基板上的方法。

作为将另外途经制备的核酸片段固定于基板上的手段，有各种各样的方式，例如利用基板带有的电荷和核酸片段的电荷的吸附固定法，以及将聚-L-赖氨酸、氨基硅烷偶联剂等被覆基板表面，利用该被覆膜使固定效率提高的固定法等。

现在，一般使用的DNA微阵列不搭载用于含有目的碱基序列的核酸的定量分析的特别探针等。以往，无论是利用在固相表面的依次合成法制作的DNA微阵列，还是利用裂隙针法制作的DNA微阵列，由于内含起因于该制作方法的偏差，例如利用核酸配列的合成效率的偏差、由裂隙针点头滴到基板的探针液量的偏差，以及固定率的偏差等，在定量精度、再现性中都存在问题。而有人提出了可解决这些DNA微阵列制作时偏差使用喷墨的制作法（特开平11-187900号公报）等。

另一方面，对于供通过DNA微阵列进行基因检查的检体，由于灵敏度的问题，一般都对含有目的碱基序列的核酸实施扩增操作，获得掺入了同时可检测的标记物的扩增产物。该扩增操作的基本技术称为PCR，在美国专利第4683195、第4683202、第4965188等有记载。然而，PCR在其扩增反应过程中含有很多控制困难的要素，例如，即使是对同一样品同时进行扩增时，扩增产物的收率也会出现从数倍至数十倍之间的偏差。为了解决这个扩增产物产率不确定性，进行很多研究，发明了竞争（Competitive）PCR法等。竞争PCR法在P.D. Siebert等人论文（Nature 359；557-558（1992），Bio Techniques 14；244-249（1993））等有详细报道。而作为其它的方法，如向从患者等采取的检体中添加已知量的作为内标准的核酸，在含有目的碱基序列的核酸扩增反应进行的同时内标准核酸也进行扩增，由该内标准核酸的扩增率推定含有目的碱基序列的核酸的扩增率的手法等。

发明内容

如上所述，使用DNA微阵列，在对含有目的碱基序列的核酸进行定量分析时，存在着影响其定量的各种各样的不稳定因素。

首先在 DNA 微阵列制作时,存在着来自固定于基板上探针量的偏差的精度、再现性的低可靠性。另外,存在着起因于 PCR 法中的含有目的碱基序列的核酸扩增效率的不确定性,检体所含的具有目的碱基序列核酸的扩增率中存在着偏差。以往,这些不同因素的偏差利用另外的各种方法对他们分别进行检定后,供使用 DNA 微阵列的定量分析,对分析结果根据各个检定结果进行修正后,得到实际的定量。

这些多种类的检定操作都是非常繁杂的,另外由于需要长时间操作,所以在处理多个检体时,检定操作成为阻碍其工作效率的要因。

本发明正是要解决上述课题,本发明的目的在于提供使这些检定操作显著简化,对检体中含有目的碱基序列的核酸进行定量,测定时可以获得其修正数据的 DNA 微阵列,以及此时利用的检定用试剂盒。

本发明人为了解决上述课题,进行了锐意研究,发现了在制作 DNA 微阵列时,作为探针的固定法,通过采用利用喷墨将另外途经制作的核酸探针涂布、固定在基板上的制作法(特开平 11-187900 号公报),除了含有目的碱基序列的核酸的检出用核酸探针之外,在同一 DNA 微阵列上还并用内标准用探针和/或外标准用探针,通过同样手法固定的 DNA 微阵列,可以使这些检定操作显著简化。根据这些见解,本发明人在使用上述的 DNA 微阵列的检测操作中也考察了用于使这些检定操作精度更高、运用简便的试剂盒,从而完成本发明。

即,本发明的 DNA 微阵列是在基板上固定了用于检测检体中所含的具有目的碱基序列的核酸分子的带有与该目的核酸分子的碱基序列互补的碱基序列的核酸探针的 DNA 微阵列中,其特征在于

含有选自用于对上述检体中所含的上述含有目的碱基序列的核酸分子的含有浓度进行定量的含有该目的碱基序列的核酸的扩增反应检定用中添加的一种以上的内标准用探针、检出操作以及探针量检定用中添加的一种以上的外标准用探针、用于对通过与形成上述核酸探针同样的手法形成的上述探针的存在量或密度进行检定的一种以上的探针中的一种以上的探针。此时固定在基板上的该内标准用探针和/或该外标准用探针最好是以 4 点以上的量或密度的一系列群固定在基板上。

另外，固定于 DNA 微阵列上的该内标准用探针优选由与来自内标准核酸扩增反应产物的不同链长相对应的二种以上的探针构成。另外，该外标准用探针对于添加的外标准核酸，优选由含有任意核酸碱基数的非互补碱基序列的二种以上探针构成。

另外，该内标准用探针和外标准用探针如果是在基板上固定了合成核酸的探针更好。此时该合成核酸的链长最好是 15 碱基 ~ 75 碱基长。

另外，本发明的 DNA 微阵列，当具备内标准用探针时，在对含有目的碱基序列的核酸进行扩增反应时内标准核酸与含有该目的碱基序列的核酸同时扩增，对扩增反应的扩增效率进行测定，但本发明也提供该内标准核酸的扩增反应用引物组的发明。即本发明涉及的引物组，是在作为进行含有目的碱基序列核酸的扩增反应时，与含有该目的碱基序列的核酸同时进行扩增的内标准核酸的扩增反应用引物组，其特征在于，将来自含有目的碱基序列的核酸的扩增产物的链长与来自该引物组参与的内标准核酸的扩增产物的链长设计成相同。

另外，本发明也一并提供检测用试剂盒，该试剂盒是含有上述内标准核酸的扩增反应用引物组，适合利用本发明的 DNA 微阵列对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测用途的检测用试剂盒。即本发明的目的碱基序列检测用试剂盒是在作为利用 DNA 微阵列在对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测时，在对具有该目的碱基序列的核酸进行扩增反应时，包含与含有该目的碱基序列的核酸同时扩增的内标准核酸扩增反应用引物组的检测用试剂盒，其特征在于，当来自上述含有目的碱基序列的核酸的扩增产物的链长为二种以上时，包含二种以上对应于这不同链长的权利要求 7 所述的引物组。此时，可以做成例如特征如下的目的碱基序列检测用试剂盒：该多个引物组包含各 1 种以上扩增产物链长 200bp 以下用、200 ~ 500bp 用、500 ~ 2000bp 用、2000bp 以上用的引物。

另外，在本发明的目的碱基序列检测用试剂盒中，是在作为利用 DNA 微阵列在对含有目的碱基序列的核酸进行定量检出时，在对该含有目的碱基序列的核酸进行扩增反应时，包含与具有该目的碱基序列的核酸同时扩增的内标准核酸的检测用试剂盒，优选是特征如下的试剂盒：作为

内标准核酸包含二种以上与检测目的碱基序列没有同源性的来自微生物的核酸或来自病毒的核酸。

另外，本发明的 DNA 微阵列当备有外标准用探针时，本发明也一并提供检测用试剂盒，该试剂盒是含有上述外标准核酸，适合利用本发明的 DNA 微阵列对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测用途的检测用试剂盒。即本发明的这个目的碱基序列检测用试剂盒，是在利用 DNA 微阵列对含有目的碱基序列的核酸进行定量检测时，含有添加到检体的外标准核酸的检测用试剂盒，其特征在于，包含二种以上作为用可检测标记物标记的合成核酸的外标准核酸。而此时该标记物可以是荧光物质、放射性物质、发光物质中的任一个。

另外，在本发明的 DNA 阵列中，核酸探针由单链核酸构成，具体来说，由单链核酸构成的核酸探针可以由 DNA、RNA、PNA（肽核酸）、cDNA（互补 DNA）、cRNA（互补 RNA）中的任一个构成。另外，DNA 微阵列也可以做成由作为核酸探针的单链核酸和通过对该核酸探针杂交而导入的靶核酸两方构成的形态的 DNA 微阵列。

附图说明

图 1 表示本发明实施方式的一例，是表示内标准用探针、外标准用探针、外标准核酸、以及内标准核酸的扩增用引物组、该扩增产物的图。

图 2 表示本发明的 DNA 微阵列的一实施方式模式，是表示 DNA 微阵列中具备的内标准用探针的配置图。

图 3 是表示在利用本发明的 DNA 微阵列的定量分析中，用于利用 DNA 微阵列中具备的外标准用探针算出探针固定化率的标准曲线的做成例子的图。

图 4 是表示在利用本发明的 DNA 微阵列的定量分析中，用于利用 DNA 微阵列中备有的内标准用探针算出 PCR 扩增倍率时的标准曲线以及因扩增产物的核酸链长不同造成的检测灵敏度不同的图。

图 5 表示本发明的生物芯片的构成的一个例子的平面配置和断面形状（AA 中的断面）模式图。

图 6 是表示对于生物芯片,测定的 2 次离子强度和 DNA 形成密度(每一探针点的 DNA 分子数)的关系图。

具体实施方式

本发明的第一个方式是在 DNA 微阵列上搭载内标准用探针。

所谓内标准用探针从广义上讲是用于对为了辅助含有目的碱基序列的核酸的定量利用的内标准核酸进行检出的探针。指的是作为具有与检体中存在量已判明的内标准核酸(基因)互补的碱基序列,可与内标准核酸(基因)结合的核酸探针,通过测定内标准核酸的存在量和含有目的碱基序列核酸存在量的相对比,可以对含有目的碱基序列的核酸进行定量的探针。例如,在生物体细胞中,形成细胞骨架的基因(看家基因)的转录产物由于其表达量变动很小,而表达量也比较多,所以常常作为内标准核酸使用。具体来说,可例举如 GAPDH 或 β -肌动蛋白的 mRNA、核糖体 RNA 等。

另外,所谓狭义的内标准核酸指的是在利用以 PCR 为代表的核酸扩增反应,进行核酸量的扩增或为了在含有目的碱基序列的核酸中添加可检测的标记物进行扩增反应时向检体中添加已知量的具有已知碱基序列的核酸。在检体中添加的狭义内标准核酸选择在进行含有目的碱基序列的核酸的扩增反应或标记反应时,以与含有目的碱基序列的核酸同样效率进行扩增或标记的核酸。扩增反应或标记反应后,通过对添加的内标准核酸量进行定量,可以算出扩增倍率或标记付加率,另外,作为相对于内标准核酸存在量的相对比可以求出含有目的碱基序列的核酸的存在量。

本发明的第二个方式,是在 DNA 微阵列上搭载针对外标准核酸的探针(外标准用探针)。

所谓外标准核酸主要是指是以修正 DNA 微阵列制作工序和/或检测、测定工序中的偏差等目的添加到检体中的含有已知碱基序列的核酸。具体来说,可以使用向合成 DNA、质粒 DNA 等纯度高的核酸中导入了可检测、定量的标记物后的核酸。而附加在这样的外标准核酸的标记是事先

对其标记效率等进行了检定的标记。该外标准核酸只要是与 DNA 微阵列的种类（对象基因）无关的，具有与检测目的的碱基序列没有同源性的碱基序列，在整个 DNA 微阵列可以使用都相同的序列。外标准用探针是具有与上述外标准核酸互补的碱基序列，可有选择结合的核酸探针。

外标准核酸、外标准用探针通过同时使用数种类的组，可以进行 DNA 微阵列具有的性能、即定量性的检定。具体来说，例如，准备搭载了 3 种以上、最好是 5 种以上的外标准用探针的 DNA 微阵列，将与此对应的标记过的外标准核酸各个种类的每一种改变浓度（已知量）后添加到含有目的碱基序列的核酸检测操作中。通过画出这些外标准核酸的检出量的曲线，可以做成标准曲线。另外，使用一种外标准核酸和外标准用探针组时，也可以对固定在 DNA 微阵列的探针量进行检定。即使用一种类的组，也可以对 DNA 微阵列间（基板间）探针固定效率的偏差进行修正。该方法首先是将外标准用探针以 3 阶段以上、最好是 5 阶段以上浓度固定于 DNA 微阵列上。通过使充足量的已标记过的外标准核酸反应，对与微阵列结合的外标准核酸的量进行测定，可以测定实际固定在 DNA 微阵列上的探针分子数比。

本发明的第三个方式是为了更有效、而且更简便利用上述的第一以及第二方式的 DNA 微阵列的检出、定量法使用的检测用试剂盒。

在利用具备内标准用探针的 DNA 微阵列的检测试剂盒中，包含内标准核酸的扩增用引物组。另外，在利用具备外标准用探针的 DNA 微阵列的检测试剂盒中包含用可检测和定量的标记物标记的、而且其标记率已检定的外标准核酸。这些核酸无论哪一个都要对应于内标准用探针、外标准用探针，作为至少一种，根据需要也可以是数种~十几种为一组，整合在检定用试剂盒中。

内标准核酸的扩增用引物组由于各种必要的条件不同，其内容可变化。首先在以内标准核酸为模板的扩增反应中，为了生成含有与内标准用探针互补的碱基序列的扩增产物，必须设定引物组的碱基序列（对应位置）。另外，同时也必须留意在对核酸进行扩增时，以含有目的碱基序列的核酸作为模板，不要生成不优选的扩增产物。还有，作为内标准，

为了使定量性的精度提高,在含有目的碱基序列的核酸的扩增反应中生成的扩增产物的核酸链长和使用本试剂盒含有的扩增用引物对内标准核酸进行扩增时得到的扩增产物的核酸链长要避免差异过大。具体来说,将来自内标准核酸的扩增产物的核酸链长设定数阶段,优选选择使得来自内标准核酸的扩增产物的链长某一个与来自含有目的碱基序列的核酸的扩增产物的链长相同。例如,制备得到的扩增产物链长可为200bp以下、200~500bp、500~2000bp、2000bp以上4种的四种引物组,优选选择与来自含有目的碱基序列的核酸的扩增产物的链长相适合的引物组。不用说,将该扩增产物链长的设定范围进一步细分,制备多个引物组也没有任何问题。

用作内标准核酸的核酸最好使用可以获得的含有已知碱基序列、而且纯度高的核酸,例如,在分子生物、医疗领域中一般市售的核酸,例如可以利用质粒载体、噬菌体DNA、微生物基因组等。特别是由于质粒载体、噬菌体DNA等纯度高、可以比较简单地获得单一种类的样品,因此更适用。

另外,用可检出、定量的标记物标记的、其标记率已检定的外标准核酸也适合利用可以获得的含有已知碱基序列、而且纯度高的核酸,例如,合成DNA、质粒载体等更适用。合成DNA由于标记效率稳定,而且每分子量的标记率高,因此特别优选。

此外,在本发明的DNA微阵列中内标准用探针和外标准用探针双方都具备的方式更好。此时检定用试剂盒最好做成具备内标准核酸的扩增用引物组和外标准核酸双方的试剂盒。

还有,外标准探针、内标准探针在分别进行处理时可以使用相同的探针(的序列)。但在同时使用时,由于竞争需要使用不同的序列(不同种类)的探针。浓度标准探针可与外标准探针兼用。

[使用在核酸探针存在量或密度检定用添加的、通过与上述核酸探针相同手法形成的浓度标准用探针的分析方法]

本发明还提供DNA阵列本身的分析方法。以下用具体的实施方式进行说明。

在以往的利用 TOF - SIMS 法的定量分析中, 存在以下的问题。即、其测定条件、具体来说存在着 1 次离子的照射条件 (加速能、入射角、离子种类、照射量)、2 次离子的检出条件 (能幅)、以及样品为绝缘体时, 存在着由于因带电修正被脉冲照射的电子线引起的脱离, 以及带电中和的程度等不同, 被检测的 2 次离子强度也不同的问题。

特别是样品为绝缘体时, 标准样品和被测定样品在照射 1 次离子时的带电状况不一定要相同。因此, 为了达到高定量性, 每改变一次样品, 都需要严格使测定条件最适化, 最适化不充分时, 就会丧失测定结果的精度。另外, 标准曲线的做成需要与作为测定对象的浓度的水准数相同数目的标准样品, 所以带来繁琐的操作。

另外, 按照 P. Lazzeri 等报道的那样旋涂法制作核酸芯片的标准样品时, 如果在很大面积平均, 虽然可做到浓度再现性好的涂布形成, 但在 TOF - SIMS 法的点大小的测定领域、具体来说, 在每一个从数 $10 \mu\text{m}^2$ 到数 $100 \mu\text{m}^2$ 的微小区域, 不能说涂布面内的均一性充分, 对测定结果的可靠性带来很大的问题。本发明为了解决上述课题, 提供通过可达到高定量性的飞行时间型 2 次离子质量分析 (TOF - SIMS) 法对在基板上以矩阵状配置许多核酸相关物质 (探针) 的所谓核酸芯片探针进行分析的核酸芯片的分析方法, 以及利用该分析方法简便决定存在于配置在核酸芯片上的核酸探针点的核酸量、即形成密度 (每一探针点的核酸量) 的可能的方式的 DNA 微阵列。

本发明人为了解决上述课题进行锐意研究, 发现除了配置在核酸芯片上的形成密度未知的核酸探针点之外, 如果与上述核酸探针点形成同样的手法在基板表面的一部分设置每一点的平均核酸密度已判明的浓度基准用核酸探针点, 对于该浓度基准用核酸探针点进行 2 次离子质量分析检出的 2 次离子信号强度作为基准, 可以通过 2 次离子质量分析法决定配置在基板上的未知浓度的核酸探针点的核酸浓度, 还有, 该定量性表现出很好的再现性。

另外, 在本实施方式的 DNA 微阵列中, 由单链核酸构成的核酸探针和通过对该核酸探针杂交导入的靶核酸两方也可以存在于该基板上。

还有,本实施方式作为在基板上以矩阵状配置了由许多核酸相关物质构成的核酸探针的DNA微阵列的制造方法,其特征是在DNA微阵列,在上述核酸探针点形成的基板表面的一部分设置每一点的平均核酸密度已确定的浓度基准用的核酸探针点,至少包括在上述基板上形成矩阵状核酸探针的工序,和在上述核酸探针点形成的基板表面的一部分中,通过与上述核酸探针点形成相同手法,形成每一点的平均核酸密度已确定的浓度基准用核酸探针点的工序。本实施方式的DNA微阵列,其特征是在DNA微阵列基板上的一部分形成已经形成的探针点的核酸浓度已知的区域,由在该区域通过TOF-SIMS法检测的2次离子强度做成标准曲线,使用该标准曲线,由在DNA微阵列基板上的其它区域检测的2次离子强度决定固定在该探针点的核酸探针的核酸量(形成密度)。

即、在本实施方式的DNA微阵列中,在许多核酸相关物质以矩阵状配置在基板上的所谓DNA微阵列形成的基板上的一部分设置每一点核酸浓度已知的核酸探针点,通过TOF-SIMS法进行定量测定时,用作浓度基准。另外,作为每一点的核酸浓度已知的核酸探针点,在DNA微阵列基板上通过形成阶段式改变了核酸浓度的核酸探针点,此时可以做成标准曲线,可以进行具有更高定量性的测定。对于一般在浓度基准中利用的每一点核酸浓度已知的核酸探针点,使用用通过另外途经在同一制作条件制作的核酸探针点,预先通过化学分析每一点含有的核酸浓度已决定的核酸探针点。

本发明中的DNA微阵列一般来说使用外形尺寸为1cm×1cm、1英寸×1英寸(25.4mm×25.4mm)、或玻片尺寸(例如、26mm×76mm)的基板制作,探针点矩阵被做成配置在内部的平面形态。本发明就象已叙述的那样,采用利用TOF-SIMS法分析的手段,利用设置在同一基板内的上述浓度基准,可以高精度地对固定于DNA微列表面的各矩阵点的核酸探针的浓度进行检定。

在本实施方式的DNA微阵列中,配置在基板上的核酸探针就象下面所述的那样,最好是通过共价键固定于基板上。为了在共价键的固定中利用,例如在基板表面处理过程中,对该基板表面用结合了氨基的硅烷

偶联剂(N-β-(氨基乙基)-γ-氨基丙基三甲氧硅烷)和交联剂N-马来酰亚胺己酰氧琥珀酰亚胺(EMCS)处理,做成形成被膜的形态也是有效的。

在决定每点含有的核酸浓度时利用的化学分析中,通过对形成许多核酸浓度分别被阶段式改变的核酸探针的多个DNA微阵列,例如进行酸处理,将核酸探针从基板分离,对该溶液中含有的核酸探针量、该核酸中的磷的量利用微量分析手段进行分析,通过另外方法进行定量。核酸中磷量的定量中利用的微量分析手段没有特别限定,最好是高灵敏度、而且高精度的手段,例如ICP-MS法等。ICP-MS法中的磷检测限度为10ppb程度,为了进行定量,至少需要该值的2~3倍、即20~30ppb程度。另外作为样品量(溶液量)最低限度需要1ml。

而另一方面,利用下面的喷墨法形成核酸探针时,即使在1英寸×3英寸面积上形成例如200行×300列程度的矩阵大小的核酸探针也并不那么困难。另外,喷墨法中的1次吐出量表现出高再现性,可以高准确度地推定其平均值(p1级)。另外,在上述浓度基准用点的制作利用的吐出溶液中的探针DNA浓度(μM级)不用说要预先设定。

除了这些值以外,使用吐出量中的探针DNA的固定量(减去经水洗等没有固定的部分的量、数10%的水平),为了获得上述ICP-MS分析所必需的样品量应当从基板上洗脱的核酸探针点总数可以进行一定程度推定。具体来说,在上述标准条件下制作核酸芯片时,每一类的浓度(μM级),在平均200行×300列程度的矩阵大小·点的吐出量(p1级)的DNA微阵列,需要使用数10枚。

另外,关于附设在DNA微阵列上的浓度基准用点,每一浓度的核酸浓度已知的探针点数虽然没有特别限定,但形成多个最好。

本实施方式使用根据在阶段式改变核酸浓度的浓度基准用核酸探针点多个间进行检测的2次离子信号强度做成的标准曲线,可以决定未知浓度的核酸探针点的核酸浓度。此时,通过本发明的分析方法,使用在飞行时间型2次离子质量分析中检测的2次离子强度在达到更高定量性方面是有效的。

而上述所谓 2 次离子强度不是计数率,最好是在一定条件下,一定时间计数的积分强度。正确作法是将 1 次离子剂量作为所谓的 static 条件的 $1 \times 10^{12} / \text{cm}^2$ 以下的一定值,作为由一定面积放出的下面 2 次离子的计数值(计数的数)。而 1 次离子的剂量至少需要 $1 \times 10^{14} / \text{cm}^2$ 以下。

在利用 TOF-SIMS 法的测定中,作为利用的 1 次离子可以使用 Cs^+ 离子、 Ga^+ 离子或 Ar^+ 离子。作为 2 次离子种类,如来自探针核酸、以及通过杂交导入的靶核酸为单链核酸、更具体讲为 DNA、RNA、cDNA(互补 DNA)、cRNA(互补 RNA)时构成核酸的骨架的磷酸的 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、 PO_3^- 等。另外,由碱基类脱去质子后的产物,即碱基类为腺嘌呤时 $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_5^-$ (134a. m. u.)、为鸟嘌呤时 $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_5\text{O}^-$ (150a. m. u.)、为胞嘧啶时 $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_3\text{O}^-$ (110a. m. u.)、为胸腺嘧啶时 $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_2^-$ (125a. m. u) 也可作为 2 次离子种类检测。另外,对于核酸探针为 RNA 探针时,除了取代胸腺嘧啶,对来自尿嘧啶的 $\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_2^-$ (111a. m. u) 进行检测以外,可以对与 DNA 探针同样的 2 次离子进行检测。以作为构成 DNA 微阵列的基板,例如使用玻璃等绝缘物基板时,与 1 次离子照射合并,并用的电子线照射需要考虑到 1 次离子脉冲幅度、频率以及样品的电容率、以及玻璃基板的厚度后,决定合适的照射条件。

在本发明的 DNA 微阵列分析方法中,其特征是将起因于核酸的 2 次离子强度相应于 1 次离子照射的扫描,作为二维图像,进行定量表示。

实施例

以下举出实施例,对本发明进行更具体说明。这里给出的实施例虽然是本发明最好实施方式的例子,但本发明并不限于这样的实施例所示的方式。

(实施例 1) 作为内标准用核酸的制备

作为内标准用核酸选择含有已知碱基序列的质粒 DNA: pUC118 (3, 162bp、宝酒造株式会社制)。为了做成 PCR 的模板,按照常规方法,用限制酶 EcoR I 切断上述质粒 pUC118,做成直链 DNA。然后经琼脂糖凝胶电泳确认切断状况后,对限制酶切断反应液通过酚处理、乙醇沉

淀,回收目的直链 DNA。将回收的直链 DNA 按照终浓度为 $10\text{ng} / \mu\text{l}$ ($2.4\text{pmol} / \text{ml}$) 溶解于 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl ($\text{pH}7.5$), 1mM EDTA) 中,作为内标准用核酸溶液。

(实施例 2) 内标准用核酸的扩增用引物的制备

根据实施例 1 制备的直链状 DNA: pUC118 EcoR I Digest 的碱基序列信息,作为 PCR 用引物选择如下面表 1 所示的正向引物 5 种:P1 ~ P5、反向引物 4 种: RP1 ~ RP4。

名称		序列	链长	位置	GC (%)
正向引物	P1	gagacaataaccctgata	18	1083-1100	38.9
	P2	ccttaacgtgagtttctg	18	2101-2118	44.4
	P3	gcttggagcgaacgacct	18	2507-2524	61.1
	P4	gagtcgacctgcaggcat	18	32-49	61.1
	P5	ggttgactcaagacgatag	20	2432-2451	50.0
反向引物	RP1	taagttgggtaacgccag	18	116-99	50.0
	RP2	agggcgctggcaagtgtgta	18	368-351	61.2
	RP3	cgtttcggtgatgacggt	18	926-909	55.6
	RP4	gcggtaatacggttatccac	20	2858-2839	50.0

(P1-PR4: 序列编号 10 - 18)

表 1 中所示位置表示以限制酶 EcoR I 的切断部位的最前头作为位置 1 进行编号时,该引物碱基序列的位置。表 1 中反向引物, RP1 ~ RP4 表示互补链上碱基序列的位置。

表 1 所示的碱基序列的各引物合成后,通过高效液相层析 (HPLC) 进行纯化,分别按照终浓度为 $10\text{pmol} / \mu\text{l}$ 溶解于 TE 缓冲液,作为引物溶液。

图 1 示出了以实施例 1 制备的内标准用核酸: pUC118 EcoR I Digest 作为模板,使用表 1 所示引物,进行 PCR 扩增反应得到的扩增产物的链长,以及被利用的正向引物和反向引物的组合。而在反向引物中,通过

另一种途经准备在 5'末端进行了荧光标记(罗丹明)的引物,进行与上记未标记引物同样处理后作为荧光标记引物溶液。

(实施例 3) 内标准用探针的制备

根据实施例 1 制备的直链状质粒 DNA: pUC118 EcoR I Digest 的碱基序列信息, 设定以下内标准用探针。

表 2

名称	序列	链长	位置	GC (%)	
探针	B-SH	actggccgctcgttttaca	18	61-78	50.0
	D-SH	gtgagctatgagaaagcgcc	20	2549-2568	55.0
	F-SH	ggtatctttatagtcctgtc	20	2663-2682	40.0
	H-SH	ggccttttgctcacatgttc	20	2795-2814	50.0

(B-H: 序列编号 1-4)

表 2 中所示位置表示以限制酶 EcoR I 的切断部位的最前头作为位置 1 进行编号时, 该探针碱基序列的位置。

表 2 所示碱基序列的 4 种内标准用探针合成后, 作为用于固定在 DNA 微阵列上的官能团, 按照常规方法分别向各核酸的 5'末端导入巯基。官能团导入后进行纯化、冷冻干燥。冷冻干燥的内标准用探针于冷库中在 -30℃ 下保存。

图 1 表示内标准用探针 4 种进行杂交的靶碱基序列的位置。另外, 对于各 PCR 扩增产物也一并示出了靶碱基序列的位置。

(实施例 4) 外标准核酸的制备

由实施例 1 准备的直链状质粒: pUC118 EcoR I Digest 的序列信息设定以下的外标准核酸。

表 3

名称	序列	链长	位置	GC (%)	
靶	A-Rho	tgtaaacgacggccagt	18	78-61	50.0
	C-Rho	ggcgctttctcatagctcac	20	2568-2549	55.0
	E-Rho	gacaggactataaagatacc	20	2682-2663	40.0
	G-Rho	gaacatgtgagcaaaaggcc	20	2814-2795	50.0

(A-G: 序列编号 5-8)

表 3 中所示位置是表示以限制酶 EcoR I 的切断部位的最前头作为位置 1 进行编号时, 该外标准核酸的碱基序列位置。该 4 种外标准核酸具有与表 2 所示 4 种内标准用探针互补的碱基序列。

表 3 所示碱基序列的外标准核酸 4 种分别作为检测、定量用标记, 合成后按照常规方法在各核酸的 5' 末端导入荧光色素(罗丹明)。荧光标记导入后进行纯化, 将其溶解于 TE 缓冲液(终浓度为 5 μ M), 作为外标准核酸溶液。该外标准核酸溶液加入到实施遮光处理的容器上, 于冷库中在 -30 $^{\circ}$ C 下保存。

图 1 对于 4 种外标准核酸也示出了具有与他互补的碱基序列的上记 4 种内标准用探针进行杂交的靶碱基序列的位置, 以及其碱基序列位置。

(实施例 5) DNA 微阵列的制作

[1] 玻璃基板的清洗

将合成石英玻璃基板(尺寸: 25mm \times 75mm \times 1mm、饭山特殊玻璃公司制)放入到耐热性、耐碱性的槽中, 浸入到制备到所定浓度的超音清洗用的清洗液中。于清洗液中浸泡过夜后, 进行 20 分钟超声清洗。然后, 将基板从清洗液中取出, 用纯水轻轻洗刷后, 于超纯水中进行 20 分超声清洗。然后将基板于加热到 80 $^{\circ}$ C 的 1N 氢氧化钠水溶液中浸泡 10 分钟。再进行纯水清洗和超纯水清洗, 准备 DNA 芯片用的清洗好的石英玻璃基板。

[2] 表面处理

将硅烷偶联剂; KBM-603(信越硅公司生产)按照终浓度 1wt% 溶解于纯水中, 于室温搅拌 2 小时。然后将清洗好的玻璃基板浸入到硅烷偶联剂水溶液, 于室温放置 20 分钟。取出玻璃基板, 用纯水轻轻清洗基板表面后, 向基板两面吹氮气, 使其干燥。然后将干燥的基板于加热到 120 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 1 小时, 完成表面的偶联剂处理。随着该氨基硅烷偶联剂处理的完成, 在基板表面导入了氨基。

另外, 准备按照终浓度 0.3mg/ml 将同仁化学研究所公司生产的 N-马来酰亚胺己酰氧琥珀酰亚胺(N-(6-Maleimidocaproyloxy)

succinimido、以下、略为 EMCS) 溶解于二甲基亚砷与乙醇的 1: 1 (体积比) 混合溶剂中的 EMCS 溶液。烘烤结束后, 将玻璃基板放冷, 然后于室温在制备的 EMCS 溶液中浸泡 2 小时。通过这样处理, 经硅烷偶联剂处理导入表面的氨基与 EMCS 的琥珀酰亚胺基反应, 将来自 EMCS 的马来酰亚胺基导入基板表面。将从 EMCS 溶液取出的玻璃基板用先前提到的二甲基亚砷和乙醇的混合溶剂清洗。再用乙醇清洗后, 将实施了表面处理的玻璃基板在氮气氛围下干燥。

[3] 探针 DNA

利用实施例 3 制备的 4 种内标准用探针, 按照下述表 4 所示组成表, 配制溶解于纯水, 具有各种浓度的溶液、混合溶液。各内标准用探针溶液在制备后按照一定量分成小份, 进行冷冻干燥, 除去水分。

表 4

No.	内容		浓度
1	B - SH	1 种	1.50D/ml
2	D - SH		
3	F - SH		
4	H - SH		
5	B - SH	1 种	0.750D/ml
6	D - SH		
7	F - SH		
8	H - SH		
9	B - SH	1 种	0.50D/ml
10	D - SH		
11	F - SH		
12	H - SH		
13	B - SH	1 种	各 0.3750D/ml
14	D - SH		
15	F - SH		
16	H - SH		
17	B + D	2 种混合	各 0.750D/ml
18	B + F		
19	B + H		
20	D + F		
21	D + H		
22	F + H		
23	B + D + F	3 种混合	各 0.50D/ml
24	B + D + H		
25	B + F + H		
26	D + F + H		
27	B + D + F + H	4 种混合	各 0.3750D/ml

[4]通过BJ打印机吐出DNA、制备含有与基板结合的甘油7.5wt%、硫二甘醇7.5wt%、尿素7.5wt%、Acetylenol EH(川研フアインケミカル公司制)1.0wt%的水溶液。然后将如表4所示的预先制备为小份的27种探针溶液冷冻干燥物加到所定量的上述混合溶剂,溶解至规定浓度。将得到的DNA探针溶液填充到泡沫喷墨打印机(商品名:BJF-850佳能公司制)用墨盒,装到印字头上。

另外,这里使用的泡沫喷墨打印机是可改造成为能进行平板印刷的打印机。另外该泡沫喷墨打印机根据所定的文件作成方法,通过输入印字图样,向对应的图样吐出点,在约120微米孔距,可以点印约5微微升的DNA溶液。

然后,使用该改造泡沫喷墨打印机,对于1枚表面处理后玻璃基板,按照图2所示配列顺序,分别点印27种探针溶液。确认进行了目的点印字后,于加湿盒内静置30分钟,使玻璃基板表面的马来酰亚胺基和DNA探针5'末端的巯基反应。

[5]清洗

反应30分钟后,通过含有100mM的NaCl的10mM磷酸缓冲液(pH7.0)将残留在表面的DNA溶液冲洗掉,得到在玻璃基板表面固定了点印成矩阵状的单链DNA基因芯片(DNA探针·阵列基板)。

(实施例6)通过外标准核酸对基板进行检定

制备8枚实施例5制作的DNA微阵列。对于这8枚DNA微阵列,浸入到以下所示组成的封闭液,于室温放置3小时,实施封闭处理。

表5

封闭溶液组成

成分	含有浓度
牛血清白蛋白(Sigma公司生产)	2%(w/v)
NaCl	100mM
磷酸缓冲液pH7.0	10mM

另外,制作8种含有下面表6所示组成的外标准核酸的杂交溶液。

而杂交溶液的基本溶剂是 100mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) (以下、称为基本缓冲液)，将表 6 所示的外标准核酸单独或混合物溶解于该基本缓冲液中，无论是单独，还是混合，合计的终浓度为 30nM。

表 6

No.	外标准核酸	含有浓度
1	A	30nM each
2	G	30nM each
3	A+G	15nM each
4	C+G	15nM each
5	E+G	15nM each
6	A+C+G	10nM each
7	C+E+G	10nM each
8	A+C+E+G	7.5nM each

记入表 6 中外标准核酸栏的省略号是表 3 所示的外标准核酸名称第一个文字，表示含有该外标准核酸。

封闭处理结束后，用基本缓冲液淋洗 DNA 微阵列。将封闭处理后的 DNA 微阵列各 1 枚浸入到准备的 8 种杂交溶液中，用乙烯薄膜密封。于 45℃ 进行 3 小时杂交反应。

反应结束后，将 DNA 微阵列从乙烯薄膜中取出，进行以下清洗。

2 × SSC + 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 55℃ 5 分钟 × 3 次 0.1 × SSC. 室温 1 分钟 × 1 次，其中，2 × SSC 的组成为 NaCl 17.5g / 1、柠檬酸三钠 2 水合物 8.8g / 1，用氢氧化钠溶液调整到 pH7.0。

清洗结束后，用气流除去液体，进行干燥。干燥后用 DNA 阵列扫描仪 (GenePix 4000 B、Axon 公司制)，测定各个点的荧光量。测定数据用 DNA 阵列扫描附带的解析软件 (GenePix Pro 3.0) 进行解析。

(实施例 7) 固定探针的密度检定

由测定的荧光量求各探针的密度比。如表 7 所示。

表 7

No.	内容		浓度	密度比 (%)
1	B - SH	一种	1.50D/ml	185
2	D - SH			189
3	F - SH			187
4	H - SH			189
5	B - SH	一种	0.750D/ml	100
6	D - SH			100
7	F - SH			98
8	H - SH			101
9	B - SH	一种	0.50D/ml each	67
10	D - SH			66
11	F - SH			66
12	H - SH			68
13	B - SH	一种	0.3750D/ml each	51
14	D - SH			49
15	F - SH			51
16	H - SH			50

密度比是以 Ink No. 5 的 DNA 探针固定密度作为 100% 时, 作为对他的相对比求出的。另外各外标准核酸的标记率表示通过另一方法测定, 用其标记率进行修正的密度比。

表 7 中 Ink No. 1~4 的密度比(荧光量)不到理论值的 200% 的是由于探针核酸的固定量达到了基板容许量(饱和量)。

另外, 表 4 中所示的 Ink No. 17~27 混合探针的各探针密度比分别表示依据对应的各探针浓度的单独探针密度比的值。

(实施例 8) 使用外标准核酸的标准曲线的做成
由实施例 7 结果, 检定各探针固定量, 使用该修正数据做成标准曲线。

具体来说,使用实施例5制作的DNA微阵列,与实施例6同样进行杂交实验。但外标准核酸的添加量为如下所述的混合量。外标准核酸的混合比为

A-Rho: 66.7% (20nM)

C-Rho: 25.0% (7.5nM)

E-Rho: 6.7% (2.0nM)

G-Rho: 1.7% (0.5nM)

按照与实施例6同样步骤进行测定和解析。

使用测定结果和实施例7求出的探针密度的修正值,做成标准曲线。

图3表示做成的标准曲线。

(实施例9)使用PCR产物做成标准曲线

使用实施例1制备的内标准用核酸、以及实施例2制备的内标准用引物,做成PCR扩增产物的标准曲线。

首先使用表8的内标准用引物的组合,按照常规方法进行PCR扩增反应。PCR反应液组成如下所示。另外,在本实施例使用的反向引物中,使用了在实施例3中准备的5'末端进行了荧光标记的引物。

PCR反应液

PCR 预混合反应液 (2×)	25 μl
pUC118 EcoR I Digest	1 μl
混合引物 (表8)	6 μl
纯水	18 μl / 总计 50 μl
温度循环 (92℃: 10秒 62℃: 15秒 72℃: 30秒 24循环)	

表8

No.	正向引物	反向引物	引物浓度	扩增产物链长
1	P-4	PR-2*	50nmol/ml each	337bp
2		PR-3*		895bp
3	P-1	PR-4*		1776bp
4	P-2			758bp

*表示带有荧光标记

反应后进行凝胶过滤，对 PCR 扩增产物进行纯化。用 TE 缓冲液调整容量后，测定 240nm 的吸光度和荧光量，对核酸量和荧光标记量进行定量，求出标记率。

使用求出标记率的内标准扩增产物，与实施例 8 同样进行杂交反应，测定起因于与探针结合的内标准扩增产物的荧光量。

使用内标准扩增产物标记率和实施例 7 求出的探针密度的修正值，由测定结果做成标准曲线。图 4 表示做成的标准曲线。

研究图 4 所示的标准曲线，可以看出，标准曲线斜率存在的差异与扩增产物分子量（链长）有关。即，为了更准确地对含有目的碱基序列的核酸进行定量，判断需要具有目的碱基序列核酸的扩增产物和采用可给出具有同等链长的内标准扩增产物的引物组合。

以下实施例表示使用通过与核酸探针形成相同手法形成的在上述探针的存在量或密度检定用添加的浓度标准用探针的例子。

（实施例 10）

图 5 是表示在基板上结合许多点状探针的探针阵列的平面配置和断面构造的模式图。501 为在任意条件下制作的探针群，502 为核酸浓度已知的探针群。在断面图中，503 为基板、504 为由有机物质构成的表面处理层、500 为核酸探针。以下就图 5 例举的构成的探针阵列，对于应用众所周知的方法（特开平 11-187900 号公报记载的方法 9）进行制作的工序进行说明。

〔1〕玻璃基板的清洗和〔2〕表面处理与实施例 5 同样进行。

〔3〕探针 DNA 的合成

委托 DNA 合成业者（ベックス），合成序列编号 9 的单链核酸（dT 的 40 聚体）。另外，对于序列编号 1 的单链 DNA 的 5' 末端在合成时使用巯基修饰剂（グレンリサーチ），导入巯基（SH）。DNA 合成后，通过常规方法进行脱保护、DNA 的回收，另外，在纯化中使用 HPLC。从合成到纯化为止的一系列工序都委托合成业者。

序列编号：9

5' - HS - (CH₂)₆ - O - PO₂ - O - TTTTTTTTTT TTTTT

TTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 3'

〔4〕通过热喷墨打印机吐出 DNA、和与基板的结合

将〔3〕所述的序列编号 1 的单链 DNA 按照终浓度 $8\mu\text{M}$ 溶解于含有甘油 7.5wt%、尿素 7.5wt%、硫二甘醇 7.5wt%、乙炔醇（商品名：Acetylenol EH；川研フラインケミカル公司制）1wt% 的溶液。

另外，将使用作为热喷墨法一种的泡沫喷墨法的泡沫喷墨打印机 B J F - 850（佳能）用的打印机头 BC - 50（佳能）改造成可以吐出数 $100\mu\text{l}$ 溶液。将实施了这样改造的喷头搭载到改造成可向作为平板的石英基板上吐出墨水的吐出描图机上。向该喷头的改造槽部注入数 $100\mu\text{l}$ 上述 DNA 溶液，将 EMCS 处理基板装到吐出描图机上，向 EMCS 处理表面点印。另外，点印时的吐出量为 $4\text{pl}/\text{Droplet}$ ，点印的范围向基板上 $20\text{mm} \times 30\text{mm}$ 范围吐出 200dpi、即以 $127\mu\text{m}$ 的孔距吐出。在该条件下，点成矩阵（157 行 236 列）状的点的直径约为 $50\mu\text{m}$ 。

点印结束后、将基板于加湿盒内静置 30 分钟，使基板表面的马来酰亚胺基和核酸探针 5' 末端的巯基（-SH）反应，固定 DNA 探针。然后，用纯水清洗基板，保存在纯水中。DNA 结合基板（DNA 芯片）在通过 TOF - SIMS 分析之前吹氮气，进行干燥，于真空干燥器中进一步干燥。通过这样的条件，制作共计 15 枚 DNA 芯片。

另外，点印中使用的 DNA 溶液中的序列编号 1 的单链 DNA 浓度选择 $5\mu\text{M}$ 、 $2.5\mu\text{M}$ ，通过同样操作制作各 25 枚、35 枚 DNA 芯片。将以上 3 种作为标准 DNA 芯片。

然后，在与上述同样条件下制作使用单链 DNA 的一般溶液浓度（约 $8\mu\text{M}$ ）的 DNA 芯片。但在该 DNA 芯片中，从端部的第 1 行到第 3 行使用在标准 DNA 芯片制作中使用的同样单链 DNA 溶液三种。即，在基板最端部的第 1 行，配置以浓度 $10\mu\text{M}$ 的 DNA 溶液形成的探针点，在第 2 行，以浓度 $5\mu\text{M}$ 的 DNA 溶液形成的探针点，在第 3 行以浓度 $2.5\mu\text{M}$ 的 DNA 溶液形成的探针点。另外，使用其它组的 DNA 浓度 $8\mu\text{M}$ 溶液制作从端部的第 1 行至第 3 行以外的行（第 4 行至第 157 行）。而探针阵列的数目可以任意设定。

(实施例 11)

核酸芯片上的核酸的定量

将用 3 种 DNA 浓度制作的标准 DNA 芯片分别用酸清洗之后,使 DNA 探针溶解后,在该酸溶液不飞散的条件浓缩至 1ml 以下。然后向该浓缩溶液中加入超纯水 1ml 进行定容。将该溶液导入 ICP-MS 装置后测定 P(磷)的重量。以该值为基础,考虑测定的点数(点印的数),决定用各浓度制作的 DNA 探针的(每 1 点的)DNA 分子数的平均值。另外,在各 DNA 浓度下制作的基板的枚数在考虑 ICP-MS 装置中的 P 的检出限界浓度(约 10ppb)和各基板上的 DNA 分子数之后决定,并不限定于实施例 10 给出的枚数。

(实施例 12)

TOF-SIMS 测定

将图 5 所示的 DNA 芯片移到飞行时间型二次离子质量分析装置(TOFSIMS IV: ION TOF 社)的分析室,在表 1 的条件下照射直至 1 次离子的注入剂量达到 1×10^{12} atoms/cm² 为止,对其间检出的 2 次离子 PO₃⁻(质荷比 78.958amu(アトムマスユニット))进行累计,求累积强度。图 6 表示在从第 1 行至第 3 行的各 DNA 浓度的点位置测定的 2 次离子强度的平均值和 DNA 的形成密度(每 1 点的 DNA 分子数)的对应关系。其中,在对探针 DNA 进行固定之前,将在表面处理后基板测定 PO₃⁻的强度作为背景值。

确认各行的点中的 DNA 形成密度与 2 次离子强度成比例。在相同测定条件下,对于将喷墨打印机吐出的 DNA 溶液中的核酸浓度定为 8 μM 形成的核酸探针,进行 TOF-SIMS 测定时,由 PO₃⁻的计数的数求出的各点中的 DNA 形成密度(每 1 点的 DNA 分子数)大约为 2.0×10^7 ,在任意选择的 10 个点内的偏差在 20% 以下。

表 9 TOF-SIMS 的测定条件

1 次离子		2 次离子	
离子种类	Ga ⁺	离子种类	PO ₃ ⁻
加速电压	25 kV	测定区域	300 μm × 300 μm
脉冲	2.5 kHz	累计电路	256

(实施例 13)

形成密度分布的图像表示

对实施例 12 使用的相同样品的多个核酸探针进行设定后,在样品面进行 1 次离子扫描,使发生的 2 次离子对应于各扫描点来表示,将在各扫描点得到的 P^- 的强度分为多个阶段,设定类似色彩,对 P^- 的强度分布,即核酸的面密度(每一探针点的核酸分子数)形成密度的分布进行定量比较。

产业上利用的可能性

就象以上说明的那样,通过本发明可以提供简便、且详细的分析的 DNA 微阵列。具体来说,在进行实际目的的核酸检测操作的同时,可以简便实施检定操作。另外,在同时进行该检定操作本身时,结果可以得到高精度的检定结果。因此,通过利用本发明的 DNA 微阵列,在目的核酸分子的定量分析中的定量性精度显著提高。另外,在该定量分析操作中,对应于本发明的 DNA 微阵列,作为检测用试剂盒通过使用内标准扩增用引物、外标准核酸,利用者可以非常简便地利用本发明。另外,通过在芯片基板上备有通过与上述核酸探针点形成相同的手法形成的、每点的平均核酸密度的浓度已经决定的基准用核酸探针点,配置在基板上的未知浓度的核酸探针点的核酸浓度可以通过 2 次离子质量分析法决定,与以往方法比较,再现性、定量性提高。

通过使用本发明的手法,可以提高 DNA 微阵列制品的可靠性。另外,也可以将以矩阵状配置在 DNA 微阵列内的核酸探针点的形成密度分布作为图像表示。

<110> 佳能株式会社

<120> 带有标准探针的 DNA 微阵列以及包含该阵列的试剂盒

<130> CF017338

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400> 1

actggccgctc gttttaca

18

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400> 2

gtgagctatg agaaagcgcc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400> 3	
ggtatcttta tagtcctgtc	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 探针	
<400> 4	
ggccttttgc tcacatgttc	20
<210> 5	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 外标准	
<400> 5	
tgtaaacga cggccagt	18
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 外标准	
<400> 6	
ggcgctttct catagctcac	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	

<220>

<223> 外标准

<400> 7

gacaggacta taaagatacc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 外标准

<400> 8

gaacatgtga gcaaaaggcc

20

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400> 9

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

40

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 10

gagacaataa ccctgata

18

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物

<400> 11
 ccttaacgtg agttttcg

18

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物

<400> 12
 gcttgagcg aacgacct

18

<210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物

<400> 13
 gagtcgacct gcaggcat

18

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引物

<400> 14	
ggttgactc aagacgatag	20
<210> 15	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 15	
taagttgggt aacccag	18
<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 16	
agggcgctgg caagtga	18
<210> 17	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 17	
cgtttcggtg atgacggt	18
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	

<220>

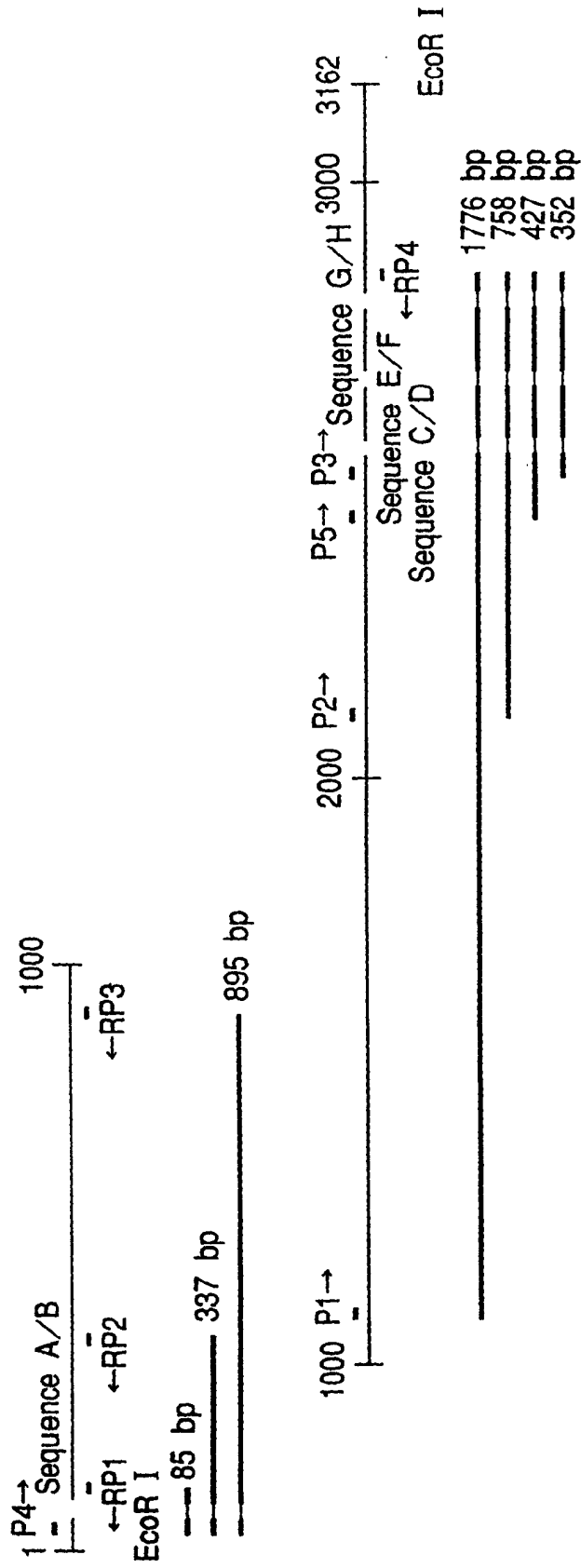
<223> 引物

<400> 18

gcgtaatac ggttatccac

20

图1



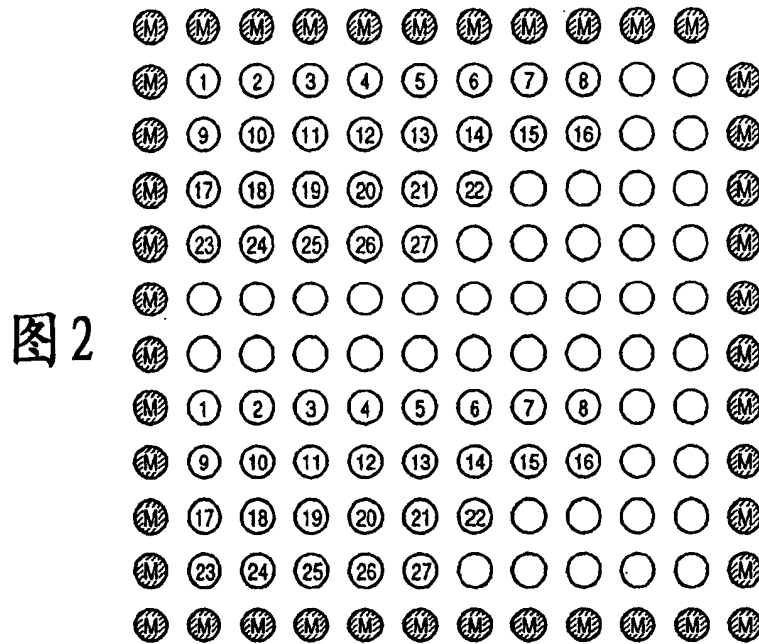
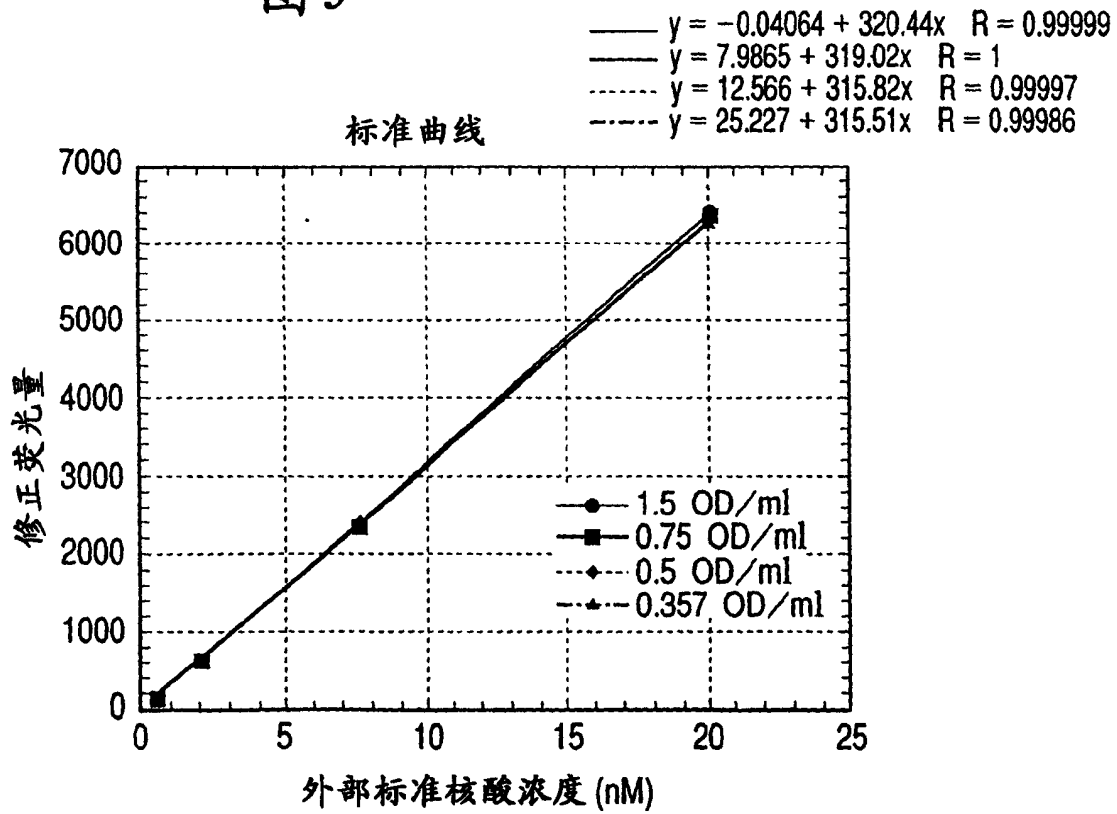


图2

图3



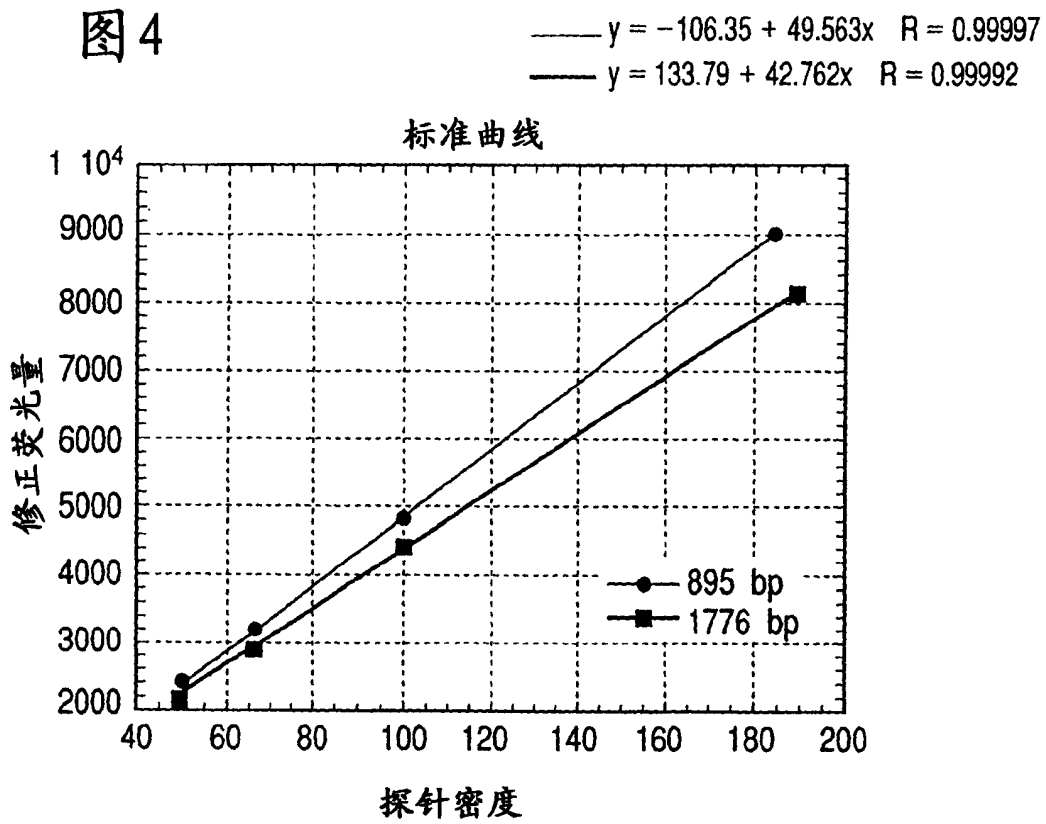


图 5

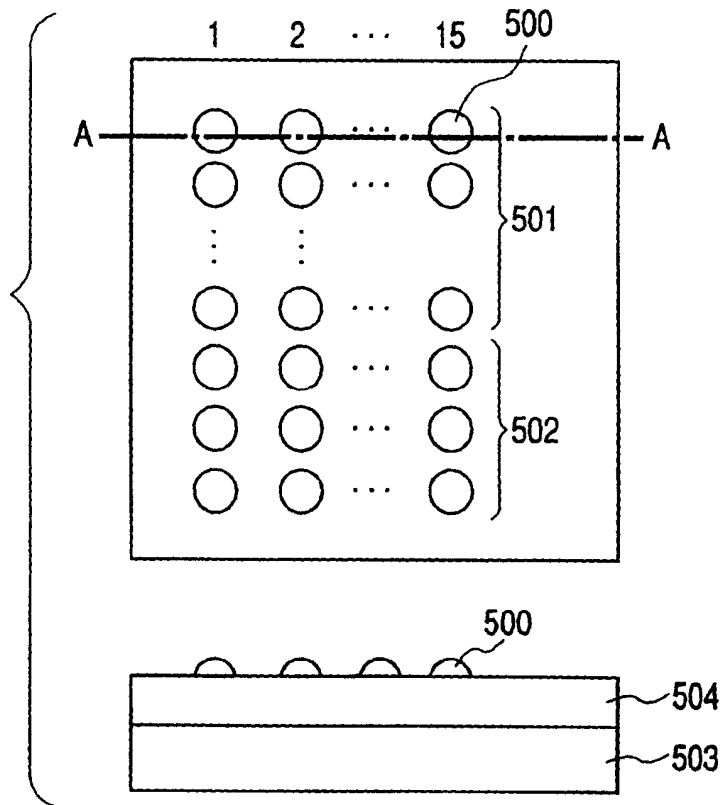


图6

