

(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2017-138263

(P2017-138263A)

(43) 公開日 平成29年8月10日(2017.8.10)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------|--------------|-------------|
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 M | 4B029 |
| C12Q 1/68 (2006.01) | GO1N 33/53 D | 4B063 |
| C12M 1/00 (2006.01) | GO1N 33/53 T | |
| C12M 1/34 (2006.01) | C12Q 1/68 A | |
| | C12M 1/00 A | |

審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-20839 (P2016-20839)
 (22) 出願日 平成28年2月5日 (2016.2.5)
 (11) 特許番号 特許第6026027号 (P6026027)
 (45) 特許公報発行日 平成28年11月16日 (2016.11.16)

(出願人による申告) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 平成27年度医工連携事業化推進事業「癌の分子標的薬の適応を迅速に決定する装置の開発」、産業技術力強化法第19条の規定の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 504409543
 国立大学法人秋田大学
 秋田県秋田市手形学園町1番1号
 (71) 出願人 591108178
 秋田県
 秋田県秋田市山王4丁目1番1号
 (74) 代理人 230115864
 弁護士 永島 孝明
 (74) 代理人 100149168
 弁理士 若山 俊輔
 (72) 発明者 齋藤 芳太郎
 秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学
 法人秋田大学 本道キャンパス内

最終頁に続く

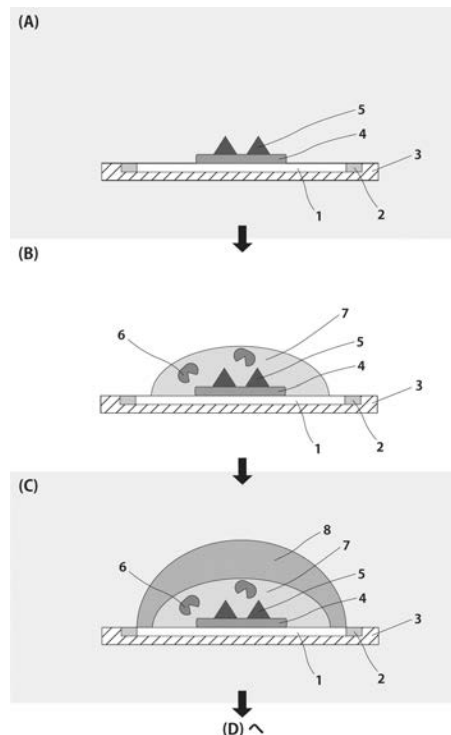
(54) 【発明の名称】 電界攪拌を用いた生体分子の迅速検出法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、高価な試薬をより節約することを可能とする、電界攪拌を用いた生体分子の検出方法を提供することを目的とする。

【解決手段】上記課題を解決するために、本発明者らは鋭意研究した結果、高価な試薬を含む反応溶液の量を少なくしても、油性の被覆液を用いて嵩増しすることにより、液滴を形成することができることを見出した。そして、変動電界を印加してその液滴を高速に振動させるためには、0.7~18.6 mPa・sの低粘度の油性の被覆液を用いるとともに、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有するプレートを用いれば、電界攪拌を好適に行うことができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

固形の生体試料中に含有される生体分子と前記生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより、前記固形の生体試料中の前記生体分子を検出する方法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記検出分子を含む溶液により、前記生体試料を覆うように液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子と前記検出分子とを結合させ、

E) 前記生体分子に結合した前記検出分子により、前記生体分子の存在を検出する、ことを含む生体分子の検出方法。

【請求項 2】

前記被覆液が、粘度が $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の被覆液である、請求項 1 に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 3】

前記被覆液が流動パラフィンである、請求項 1 又は 2 に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 4】

前記プレートが、前記液滴形成領域と前記撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、前記液滴形成領域が親水性である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 5】

前記生体分子が核酸であり、前記検出分子が前記核酸に相補的な配列を有する標識プローブである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 6】

前記生体分子がタンパク質であり、前記検出分子が前記タンパク質に特異的な抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 7】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用するプレートにおいて、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有する、生体分子検出用プレート

【請求項 8】

前記液滴形成領域と前記撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、前記液滴形成領域が親水性である、請求項 7 に記載の生体分子検出用プレート。

【請求項 9】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用するキットにおいて、請求項 7 又は 8 に記載の生体分子検出用プレートと、生体分子に特異的に結合できる検出分子を含む溶液と、粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液とを含む、生体分子検出用キット。

【請求項 10】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用する装置において、請求項 7 又は 8 に記載の生体分子検出用プレートと、前記プレート上に形成した液滴を加熱して一定の温度に保つ加熱保温装置と、前記液滴に変動電界を印加する変動電界印加装置とを含む、生体分子検出装置。

【請求項 11】

固形の生体試料中に含有される生体分子と前記生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより得られる、生体分子検出用の生体試料標本の製造方法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成

10

20

30

40

50

領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記検出分子を含む溶液により、前記生体試料を覆うように、液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子と前記検出分子とを結合させる、ことを含む生体試料標本の製造方法。

【請求項 1 2】

固形の生体試料中に含有される核酸と、前記核酸に相補的な配列を含む標識プローブとをハイブリダイズさせることにより、前記生体試料中に含有される前記核酸を検出するインサイチュハイブリダイゼーション法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液により、前記生体試料を覆うように、液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記核酸と前記標識プローブとをハイブリダイズさせ、

E) 前記核酸にハイブリダイズした前記標識プローブの標識を検出する、ことを含むインサイチュハイブリダイゼーション法。

【請求項 1 3】

固形の生体試料中に含有される生体分子と前記生体分子に特異的な抗体とを結合させることにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子を検出する免疫組織化学法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記抗体を含む溶液により、前記生体試料を覆うように、液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子と前記抗体とを結合させ、

E) 前記生体分子に結合した前記抗体を検出する、ことを含む免疫組織化学法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インサイチュハイブリダイゼーション (In situ hybridization、ISH) 法や免疫組織化学 (Immunohistochemistry、IHC) 法を含む、固形の生体試料中に含まれる生体分子を検出する方法の改良方法であって、油性の被覆液で表面を被覆した液滴を電界攪拌することを特徴とする方法に関する。

また、本発明は、当該方法に使用する生体分子検出用プレート、生体分子検出キット及び生体分子検出装置、並びに生体試料標本の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体組織切片等の固形の生体組織中に含まれる生体分子 (タンパク質、DNA、RNA、多糖等) を、生体分子を抽出することなく固形の生体組織中に存在したままで検出し、その分布をイメージングする方法には様々なものがある。例えば、生体分子に特異的に結

10

20

30

40

50

合する分子を利用して検出とイメージングを行う方法、発現するタンパク質に蛍光タンパク質（タグ）を連結し、それを目印にして検出とイメージングを行う方法、あるいは、酵素活性を利用してタンパク質の検出とイメージングを行う方法等である。これらの中でも、生体分子に特異的に結合する分子を利用した検出とイメージングが最も広く行われており、核酸同士の相補的結合を利用したインサイチュハイブリダイゼーション（*in situ hybridization*、*I S H*）法や、特定の生体分子に特異的な抗体を用いた、いわゆる免疫組織化学（*Immunohistochemistry*、*I H C*、別名「免疫染色」とも呼ばれる。）法が一般的な手法となっている。

【0003】

免疫組織化学（*I H C*）法やインサイチュハイブリダイゼーション（*I S H*）法を用いれば、患者から採取した組織や細胞に対して、特定の疾患に関連する特定のタンパク質や遺伝子の発現を顕微鏡観察することができるので、これらの手法は病理診断にもよく使用されている。

10

【0004】

例えば、*HER2* 遺伝子は、ヒト乳癌症例の15～25%で遺伝子の増幅と、*HER2* タンパク質の過剰発現が認められる癌遺伝子であるが、*HER2* 遺伝子増幅/*HER2* タンパク過剰発現のある乳癌患者は予後不良であり、ホルモン療法及び*CMF*療法に対する治療抵抗性を示すとの報告がある。また、*HER2* 遺伝子増幅/*HER2* タンパク過剰発現が確認された乳癌に対しては、ハーセプチン（登録商標、一般名トラスツズマブ）の投与により、生存期間・生存率の有意な改善が認められている。

20

したがって、乳癌患者に対しては、免疫組織化学（*I H C*）法やインサイチュハイブリダイゼーション（*I S H*）法により、*HER2* 遺伝子/*HER2* タンパク質の検査を行うことが、予後の予測と治療方針の決定において重要となる。

【0005】

しかしながら、免疫組織化学（*I H C*）法やインサイチュハイブリダイゼーション（*I S H*）法による病理診断は、抗原抗体反応やハイブリダイゼーションに長時間を要するものであった。免疫組織化学（*I H C*）法の場合には、全ての工程で通常70分～200分程度の時間を要し、インサイチュハイブリダイゼーション（*I S H*）法の場合には、通常1日～2日程度の時間を要するものであった。

【0006】

そこで、本発明者らは、抗体や標識核酸を含む反応溶液を用いてドーム状の液滴を形成し、液滴に変動電界を印加して液滴を高速で振動させることにより、抗原抗体反応やハイブリダイゼーションを促進して、生体分子を迅速に検出する方法を開発した（特許文献1～7及び非特許文献1）。この方法によれば、抗原抗体反応やハイブリダイゼーションを短時間で行うことが可能となり、例えば、免疫組織化学（*I H C*）法であれば、全ての工程を15～30分程度で行うことが可能となる。このため、手術中に患者から採取した組織を迅速に病理診断して（術中迅速病理診断）、手術の方針を決定することが可能となった。

30

このように液滴に変動電界を印加して振動させる方法は、「電界攪拌」とも呼ばれ、免疫組織化学（*I H C*）法等に用いれば、生体分子を検出する時間を大幅に短縮することができるため、極めて有用な方法であり、さらなる改良発展が望まれていた。

40

【0007】

ところで、免疫組織化学（*I H C*）法において、中鎖のアルカン族の油等により反応溶液をカバーすることで、蒸発を抑制する技術が開発されている（特許文献8）。しかしながら、この技術は、電界攪拌に用いる技術ではなく、また、ドーム状の液滴を油でカバーするものではなかった。

また、親水性領域とその周囲に設けた撥水性領域を有する基板を用いて、核酸増幅用溶液の液滴を形成し、その液滴をオイルで被膜して、溶液の蒸発を抑制しつつ核酸を増幅する技術が開発されている（特許文献9～12）。しかしながら、これらの技術は、核酸増幅を目的とする技術であり、電界攪拌に用いる技術ではなかった。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2010-119388号公報

【特許文献2】特開2012-013598号公報

【特許文献3】特開2014-160060号公報

【特許文献4】特開2015-155811号公報

【特許文献5】特開2015-219109号公報

【特許文献6】特許第5825618号公報

【特許文献7】特許第5839526号公報

10

【特許文献8】特開2000-046827号公報

【特許文献9】特開2009-136219号公報

【特許文献10】特開2009-171921号公報

【特許文献11】特開2009-207392号公報

【特許文献12】特開2010-158201号公報

【非特許文献1】戸田洋、南谷佳弘、外8名、アクタ・ヒストケミカ・エト・サイトケミカ (Acta Histochemica et Cytochemica、略号ActaCytochem. Cytochem.)、日本組織細胞化学会、2011年6月3日発行、44巻、3号、p. 133-139

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0009】

従来の電界攪拌を用いた生体分子の検出方法は、振動可能なドーム状の液滴を形成する必要があるため、所定量以上の反応液を必要とするものであった。このため、抗体や標識核酸等の高価な試薬を節約するには限界がある方法であった。

そこで、本発明は、上記従来の状況に鑑み、高価な試薬をより節約することを可能とする、電界攪拌を用いた生体分子の検出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】

上記課題を解決するために、本発明者らは鋭意研究した結果、高価な試薬を含む反応溶液の量を少なくしても、油性の被覆液を用いて嵩増し(かさ増し)することにより、液滴を形成することができることを見出した。そして、変動電界を印加してその液滴を高速に振動させるためには、植物油のような通常の油ではなく、 $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の低粘度の油性の被覆液を用いるとともに、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有するプレートを用いれば、電界攪拌を好適に行うことができること見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0011】

すなわち、本発明は、生体分子の検出方法に関する第1の発明と、生体分子検出用プレートに関する第2の発明と、生体分子検出用キットに関する第3発明と、生体分子検出装置に関する第4の発明と、生体試料標本の製造方法に関する第5の発明と、インサイチュハイブリダイゼーション法に関する第6の発明と、免疫組織化学法に関する第7の発明を提供する。

40

【0012】

第1の発明は、固形の生体試料中に含有される生体分子とその生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより、固形の生体試料中の生体分子を検出する方法に関する発明である。この生体分子の検出方法は、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置し、

B) 検出分子を含む溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、撥油性領域を越えない範

50

囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される生体分子と検出分子とを結合させ、

E) 生体分子に結合した検出分子により、生体分子の存在を検出する、ことを含むことを特徴とする。

第1の発明の生体分子の検出方法においては、被覆液の粘度を $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とすることがより好ましい。

上記いずれかの生体分子の検出方法においては、被覆液として、流動パラフィンを用いることが好ましい。

上記いずれかの生体分子の検出方法においては、液滴形成領域と撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、液滴形成領域が親水性であるプレートを使用することが好ましい。

上記いずれかの生体分子の検出方法においては、核酸を検出する方法とすることができ、その場合には、検出分子として、検出目的とする核酸に相補的な配列を有する標識プローブを使用することができる。

また、タンパク質を検出する方法とすることもでき、その場合には、検出分子として、検出目的とするタンパク質に特異的な抗体を使用することができる。

【0013】

第2の発明は、電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用する、生体分子検出用プレートに関する発明である。この生体分子検出用プレートは、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有することを特徴とし、第1の発明の生体分子の検出方法に用いることができる。

第2の発明の生体分子検出用プレートにおいては、液滴形成領域と撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、液滴形成領域が親水性であるプレートとすることが好ましい。

【0014】

第3の発明は、電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用する、生体分子検出用キットに関する発明である。この生体分子検出用キットは、上記いずれかの生体分子検出用プレートと、生体分子に特異的に結合できる検出分子を含む溶液と、粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を含むことを特徴とする。この生体分子検出用キットは、第1の発明の生体分子の検出方法に用いることができる。

第3の発明の生体分子検出用キットにおいては、被覆液の粘度を $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とすることが好ましい。

上記いずれかの生体分子検出用キットにおいては、被覆液として、流動パラフィンを用いることが好ましい。

上記いずれかの生体分子検出用キットにおいては、核酸検出用又はインサイチュハイブリダイゼーション用のキットとすることができ、その場合には、検出分子として、検出目的とする核酸に相補的な配列を使用する標識プローブを使用することができる。また、タンパク質検出用又は免疫組織化学用のキットとすることもでき、その場合には、検出分子として、検出目的とするタンパク質に特異的な抗体を使用することができる。

【0015】

第4の発明は、電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用する、生体分子検出装置に関する発明である。この生体分子検出装置は、上記いずれかの生体分子検出用プレートと、プレート上に形成した液滴を加熱して一定の温度に保つ加熱保温装置と、液滴に変動電界を印加する変動電界印加装置とを含むことを特徴とする。この生体分子検出装置は、第1の発明の生体分子の検出方法に用いることができる。

【0016】

第5の発明は、固形の生体試料中に含有される生体分子とその生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより得られる、生体分子検出用の生体試料標本の製造方法に関する。この生体試料標本の製造方法は、

10

20

30

40

50

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置し、
 B) 検出分子を含む溶液により、生体試料を覆うように液滴を液滴形成領域内に形成し、
 C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、撥油性領域を越えない範囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、
 D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される生体分子と検出分子とを結合させる、
 ことを含むことを特徴とする。

第5の発明の生体試料標本の製造方法においては、被覆液の粘度を $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とすることがより好ましい。

上記いずれかの生体試料標本の製造方法においては、被覆液として、流動パラフィンを用いることが好ましい。

上記いずれかの生体試料標本の製造方法においては、液滴形成領域と撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、液滴形成領域が親水性であるプレートを使用することが好ましい。

上記いずれかの生体試料標本の製造方法においては、検出分子として、検出目的とする核酸に相補的な配列を有する標識プローブを使用し、核酸検出又はインサイチュハイブリダイゼーション用の生体試料標本の製造方法とすることができる。また、検出分子として、検出目的とするタンパク質に特異的な抗体を使用し、タンパク質検出又は免疫組織化学用の生体試料標本の製造方法とすることができる。

【0017】

第6の発明は、固形の生体試料中に含有される核酸と、その核酸に相補的な配列を含む標識プローブとをハイブリダイズさせることにより、生体試料中に含有される核酸を検出するインサイチュハイブリダイゼーション法に関する発明である。このインサイチュハイブリダイゼーション法は、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置し、
 B) 標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成し、
 C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用いて、撥油性領域を越えない範囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、
 D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される核酸と標識プローブとをハイブリダイズさせ、
 E) 核酸にハイブリダイズした標識プローブの標識を検出する、
 ことを含むことを特徴とする。

第6の発明のインサイチュハイブリダイゼーション法においては、被覆液の粘度を $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とすることがより好ましい。

上記いずれかのインサイチュハイブリダイゼーションにおいては、被覆液として、流動パラフィンを用いることが好ましい。

上記いずれかのインサイチュハイブリダイゼーション法においては、液滴形成領域と撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、液滴形成領域が親水性であるプレートを使用することが好ましい。

【0018】

第7の発明は、固形の生体試料中に含有される生体分子と生体分子に特異的な抗体とを結合させることにより、生体試料中に含有される生体分子を検出する免疫組織化学法に関する。この免疫組織化学法は、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置し、
 B) 抗体を含む溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成し、
 C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、撥油性領域を越えない範

10

20

30

40

50

囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される生体分子と抗体とを結合させ、

E) 生体分子に結合した抗体を検出する、
ことを含むことを特徴とする。

第7発明の免疫組織化学法においては、被覆液の粘度を $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とすることがより好ましい。

上記いずれかの免疫組織化学法においては、被覆液として、流動パラフィンを用いることが好ましい。

上記いずれかの免疫組織化学法においては、液滴形成領域と撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、液滴形成領域が親水性であるプレートを使用することが好ましい。

【発明の効果】

【0019】

第1の発明の生体分子の検出方法、第5の発明の生体試料標本の製造方法、第6の発明のインサイチュハイブリダイゼーション法、及び第7の発明の免疫組織化学法は、液滴を油性の被覆液で嵩増しするので、検出分子を含む溶液を少なくしても、電界攪拌に十分な大きさの液滴を形成することができ、高価な検出分子を節約することができるという効果を奏する。また、これらの発明は、 $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の低粘度の油性の被覆液を用いるため、液滴を被覆しても高速に液滴を振動させることが可能であるとともに、液滴を広範囲に被覆して液滴の蒸発を効率的に抑制することができる。このため、液滴が効率よく攪拌されて生体分子と検出分子の反応が促進されるとともに、蒸発が抑制されるため、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。さらに、これらの発明は、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートを使用して、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆する。これにより、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

第2の発明の生体分子検出用プレート、及び第4の発明の生体分子検出装置は、プレート上に液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するので、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆することができる。このため、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

第3の発明の生体分子検出用キットは、油性の被覆液を含むので、液滴を油性の被覆液で嵩増しすることができ、高価な検出分子を節約することができるという効果を奏する。また、第3の発明の生体分子検出用キットは、 $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の低粘度の油性の被覆液を用いるため、液滴を被覆しても高速に液滴を振動させることが可能であるとともに、液滴を広範囲に被覆して液滴の蒸発を効率的に抑制することができるため、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。さらに、第3の発明の生体分子検出用キットは、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有するプレートを使用するので、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆することができる。これにより、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、被覆された液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明の生体分子の検出方法の一つの実施形態を示す図面である。図1の(A)~(C)は、本発明の生体分子の検出方法のA)~C)の工程に対応させて描いた模式図である。

10

20

30

40

50

【図2】図1の続きを示す図面である。図2の(D)及び(E)は、本発明の生体分子の検出方法のD)及びE)の工程に対応させて描いた模式図である。

【図3】本発明において液滴が周期的に振動する一つの実施形態を説明する図面である。図3(A)は、上部電極(9)に供給される正の電圧が最大となっている状態を示す。図3(B)は、上部電極(9)に供給されている電圧が最小となっている状態を示す。液滴は、図3(A)と図3(B)の状態の間を周期的に往復する。

【図4】本発明の生体分子検出用プレートの実施形態を示す平面図及び断面図である。図4(A)は、本発明の生体分子検出用プレートの一つの実施形態の平面図を示し、図4(B)は、図4(A)と同一のプレートの断面図とプレートの上部に形成した液滴の状態を模式的に示す。図4(C)は、本発明の生体分子検出用プレートの他の実施形態の断面図と上部に形成した液滴の状態を模式的に示す。

10

【図5】本発明の生体分子検出用プレートのもう一つの実施形態を示す平面図及び断面図である。図5(A)は平面図を示し、図5(B)及び(C)は、プレートの上部に液滴を形成する様子を断面図により模式的に示す。

【図6】粘度の異なる複数種類の流動パラフィンを用いた場合の電界攪拌蒸散実験の結果を示すグラフである。図6(A)は、重量(蒸散量)の経時変化を示すグラフであり、図6(B)は、蒸散量と粘度の関係を示すグラフである。

【図7】粘度の異なる複数種類の流動パラフィンを用いた場合の面積カバ率の測定結果を示すグラフである。

【図8】粘度の異なる複数種類の流動パラフィンを用いた場合の振動する液滴の最大高さ
と最低高さの差(振動幅)を測定した結果を示すグラフである。

20

【発明を実施するための形態】

【0021】

1. 本発明の生体分子の検出方法

1-1. 本発明の生体分子の検出方法の概要

本発明の生体分子の検出方法は、固形の生体試料中に含有される生体分子と生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより、固形の生体試料中の生体分子を検出する方法に関する。

ここで、「固形の生体試料」とは、生物の器官、生体組織、それらの一部、又はそれらの切片などの、固形状の生体試料を意味し、生体から抽出したタンパク質や核酸等の溶液を意味するものではない。固形の生体試料としては、生体組織の切片のように生体組織の形態を維持したもののだけでなく、培養した細胞や血液、微生物等を包埋剤でブロック状又はシート状にしたもののよう、人工的に固形化した生体試料を用いてもよい。

30

【0022】

本発明において、「生体分子」とは、タンパク質、核酸、多糖類、脂質等の生体に存在する分子をいい、糖タンパク質のようにこれらの生体分子同士が結合したものも含む。

本発明において、生体分子に特異的な「検出分子」とは、これらに限定されるわけではないが、例えば、検出目的とするタンパク質に特異的な抗体、核酸に相補的な配列を有する核酸プローブ、生体分子に親和性のある低分子化合物や毒素、糖鎖と結合する能力を有するタンパク質であるレクチン等を用いることができる。

40

そして、検出分子として抗体を用いることにより、免疫組織化学(IHC)によるタンパク質の検出を行うことができ、検出分子として標識プローブを用いることにより、インサイチュハイブリダイゼーション(ISH)による核酸の検出を行うことができる。

【0023】

本発明の生体分子の検出方法は、次のA)~E)を含むことを特徴とする。

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置すること

B) 検出分子を含む溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成すること

C) 粘度が0.7~18.6 mPa・sの油性の被覆液を用い、撥油性領域を越えない範

50

囲で液滴を被覆し、ドーム状の液滴とすること

D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される生体分子と検出分子とを結合させること

E) 生体分子に結合した検出分子により、生体分子の存在を検出すること

【0024】

本発明の生体分子の検出方法の一つの実施形態を図1及び2に示す。

図1の(A)~(C)並びに図2の(D)及び(E)は、本発明の生体分子の検出方法の一つの実施形態を、本発明のA)~E)に対応させて描いた模式図である。

まず、図1(A)に示すとおり、液滴形成領域(1)とその外周に配置された撥油性領域(2)とを有するプレート(3)を用い、その液滴形成領域(1)上に、生体組織の切片等の固形の生体試料(4)を載置する。固形の生体試料(4)は、様々な生体分子を含有しているが、その一種の生体分子(5)を三角形の図形で模式的に示す。

10

【0025】

次に、図1(B)に示すとおり、生体分子(5)に特異的に結合することができる検出分子(6)を含む溶液(7)を用い、固形の生体試料(4)及び/又は液滴形成領域(1)上に溶液(7)を注入することにより、液滴を形成する。

さらに、図1(C)に示すとおり、油性の被覆液(8)を用いて、図1(B)で形成した液滴を被覆して、ドーム状の液滴とする。ここで、油性の被覆液(8)は、撥油性領域(2)に接触してもよいが、撥油性領域(2)を越えない程度の量を注入して、液滴を被覆する。これにより、油性の被覆液(8)は外周を撥油性領域(2)で囲まれることとなるため、油性の被覆液(8)を撥油性領域(2)の内周側に留めようとする力が働き、ドーム状の液滴が崩れるのを防ぐことができる。油性の被覆液は表面張力が水よりも小さいが、このように液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことが可能となり、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

20

ここで、油性の被覆液(8)は、粘度が0.7~18.6 mPa·sと粘度が低いため、後記実施例2にも示されるように、液滴を広範囲に被覆することができ、液滴の蒸発を効率的に抑制することができるという効果を奏する。

【0026】

次に、図2(D)に示すとおり、液滴の形成されたプレート(3)を、変動電界印加装置にセットする。変動電界印加装置は、上部電極(9)と下部電極(10)と変動電圧供給装置(11)を含むものであり、プレート(3)をセットすることにより、液滴の上方に上部電極(9)が位置し、プレート(3)の下に下部電極(10)に位置することとなる。そして、変動電圧供給装置(11)により変動電圧を供給することにより、両電極(9, 10)間に変動電界が発生する。液滴は偏極するため、液滴の表面にはマイナス電荷(12)が存在しており、また、液滴中に存在する検出分子(6)はマイナスの電荷を帯びることもある。したがって、変動電界印加装置により変動電界が発生させると、変動電界の周波数に合わせて液滴が周期的に振動することになる。

30

この液滴の振動により、検出分子(6)を含む溶液(7)が攪拌され、検出分子(6)と生体分子(5)の衝突機会が増加して、検出分子(6)と生体分子(5)とが結合する反応を短時間で行うことが可能になる。

40

【0027】

液滴の被覆液として、通常のオイル、例えば植物油を用いた場合には、変動電界を印加しても液滴は振動しなかったが、後記実施例2にも示されるように、本発明では、粘度が0.7~18.6 mPa·sの低粘度の油性の被覆液を用いることにより、液滴を高速で振動させることが可能になるという効果を奏する。

このように、粘度が0.7~18.6 mPa·sの低粘度の油性の被覆液を用いれば、検出分子(6)を含む溶液を嵩増しして、振動可能な液滴を形成することができるため、高価な検出分子を節約することができるという効果を奏する。

【0028】

次に、図2(E)に示すとおり、液滴の形成されたプレート(3)を変動電界印加装置

50

から取り出し、液滴を洗い流した後に、生体分子(5)と結合した検出分子(6)の発色(蛍光又は反射光)により、生体分子(5)の存在を検出する。検出分子(6)を発色させるためには、例えば、検出分子(6)に標識酵素(発色酵素)、蛍光色素、蛍光タンパク質、色素等の発色標識を連結させ、又は、これらの発色標識を連結した抗体(2次抗体)を検出分子(6)に結合させること等により、発色させることができる。

検出分子(6)の発色(蛍光又は反射光)は、顕微鏡(15)等により観察することができ、生体組織等の固形の生体試料中における生体分子の局在位置と発現量を、色彩によりイメージングすることができる。

【0029】

以上のとおり、本発明によれば、 $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の低粘度の油性の被覆液を用いるため、液滴を被覆しても高速に液滴を振動させることが可能であるとともに、液滴を広範囲に被覆して液滴の蒸発を効率的に抑制することができる。このため、液滴が効率よく攪拌されて生体分子と検出分子の反応が促進されるとともに、蒸発が抑制されるため、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

また、本発明によれば、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートを使用して、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆する。このため、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

電界攪拌を行うためには、ドーム状の液滴を形成する必要があるため、高価な検出分子を含む反応液を所定量以上必要とするが、本発明によれば、粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用いることにより、検出分子を含む溶液を嵩増しして振動可能な液滴を形成することができるため、高価な検出分子を節約することができるという効果を奏する。

【0030】

1-2. 本発明の生体分子の検出方法の詳細な説明

以下、本発明の生体分子の検出方法をさらに詳細に説明する。

本発明の生体分子の検出方法は、A)液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置すること、を含む。

ここで「プレート」とは、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を設けるための基体となるものであり、平板状に限らずどのような形状であってもよい。

【0031】

本発明において、「液滴形成領域」とは、プレート上の領域であり、液滴を形成できる領域であればどのようなものであってもよい。液滴形成領域を組成する材料としては、親水性の材料であっても、撥水性の材料であってもよく、これらに限定されるわけではないが、例えば、ガラスや、ポリエチレン、ポリスチレン等のプラスチック等を用いることができる。また、液滴形成領域の材料は、プレートと同じ材料を用いてもよく、また、プレート表面にプレートとは別の材料を塗布して液滴形成領域としてもよい。液滴形成領域の断面形状は、液滴が形成できる形状であればどのようなものであってもよく、凹凸がない平板状であっても、窪みや段差がある形状であってもよい。また、液滴形成領域の平面形状は、液滴が形成できる形状であればどのようなものであってもよいが、円形又は楕円形の形状が好ましい。

【0032】

本発明において、「撥油性領域」とは、プレート表面において撥油性材料で形成された領域であって、好ましくは、液滴形成領域とは異なる材料で形成された領域をいう。撥油性材料としては、親水撥油性の材料でも、撥水撥油性の材料でもよく、これらに限定されるわけではないが、例えば、ポリビニルアルコール、シリコン系樹脂等の撥油性プラスチックや、表面の微細構造により撥油性を発揮する材料等を用いることができる。

撥油性領域は液滴形成領域の外周に配置される。このため、液滴形成領域の平面形状が円形又は楕円形の場合には、撥油性領域も円形又は楕円形となり、平面形状が円形の液滴

10

20

30

40

50

を形成することができる。円形の液滴は、効率よく電界攪拌することができるため好ましい形状である。

【0033】

本発明においては、プレート表面の液滴形成領域と撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域をさらに設けるとともに、液滴形成領域を親水性とすることが好ましい。このようなプレートを用いれば、検出分子を含む溶液で液滴を形成するときに、液滴が撥水親油性領域に囲まれることとなり、液滴が親水性の液滴形成領域内に留まろうとする力が働き、液滴を形成しやすくなる。そして、液滴を油性の被覆液で被覆すると、被覆液は、撥油性領域に囲まれて、撥水親油性領域に留まろうとする力が働き、液滴をより安定に維持することができるという効果を奏する。

10

【0034】

本発明のA)の工程においては、プレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置する。ここで、「固形の生体試料」とは、前記のとおり、生物の器官、生体組織、それらの一部、又はそれらの切片などの、固形状の生体試料を意味する。固形の生体試料としては、生体組織の切片のように、生体組織の形態を維持したもののだけでなく、培養した細胞や血液、微生物等を包埋剤でブロック状又はシート状にしたもののように、人工的に固形化した生体試料を用いてもよい。

【0035】

本発明において、「固形の生体試料」は、化学的あるいは物理的に固定されたものを用いてもよく、また、固定されていないものを用いてもよい。化学的な固定としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、スベリミド酸ジメチル二塩酸塩、四酸化オスミウム等を、生体組織や細胞に浸潤させ、生体組織・細胞内の高分子物質を架橋することによって不動化する方法がある。また、物理的な固定としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、煮沸やマイクロウェーブ照射による熱凝固や、凍結により生体組織・細胞内の高分子物質を不動化する方法がある。また、これらを組み合わせ、例えば、固形の生体試料を急速凍結後に、ホルマリン/アセトン中で置換固定したものであってもよい。その他、固形の生体試料に対しては、抗原賦活化等の処理を行ってもよい。

20

通常、器官や生体組織の一部を固形の生体試料とする場合、そのままの大きさで顕微鏡観察することが難しいため、ある程度の厚さの切片を作製する。切片の作製方法としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、固形の生体試料をOCTコンパウンド等の凍結組織包埋剤に包埋し、凍結してから凍結マイクロトームにて薄切りする方法や、固形の生体試料を凍結せずにそのまま振動式マイクロトーム等により薄切りする方法や、固形の生体試料をパラフィンに包埋し冷却して硬くした後に、マイクロトームにて薄切りする方法などがある。

30

【0036】

本発明の生体分子の検出方法は、B)検出分子を含む溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成すること、を含む。

ここで、「検出分子」とは、検出目的とする生体分子に特異的に結合することができる分子をいう。検出目的とする「生体分子」とは、タンパク質、核酸、多糖類、脂質等の生体に存在する分子をいい、糖タンパク質のようにこれらの生体分子同士が結合したものを含む。

40

本発明において、「検出分子」としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、検出目的とするタンパク質に特異的な抗体、核酸に相補的な配列を有する核酸プローブ、生体分子に親和性のある低分子化合物や毒素、糖鎖と結合する能力を有するタンパク質であるレクチン等を用いることができる。

【0037】

本発明の生体分子の検出方法は、C)粘度が0.7~18.6mPa・sの油性の被覆液を用い、撥油性領域を越えない範囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とすること、を含む。

50

ここで、「粘度」とは、室温における粘度をいい、 23.8 の条件下に回転式レオメーター（粘性測定装置）で測定することができる。

油性の被覆液の粘度は、液滴を十分に振動させるために水の粘度 $0.7 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ よりも高くする必要があり、また、後記実施例 2 に示されるように、液滴を十分に振動させ、液滴の表面を十分に被覆するためには、 $18.6 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以下とする必要がある。

また、油性の被覆液の粘度は、より好ましくは、 $0.7 \sim 13.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ とするのがよく、さらに好ましくは、 $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ とするのがよい。

【0038】

本発明において「油性」とは、水と分離する性質をいう。そして、「油性の被覆液」としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、流動パラフィン、スクアレン、脂肪酸類、エステル類等を用いることができる。これらの中でも安定性の高い流動パラフィンを用いることが好ましい。

流動パラフィンとは、ミネラルオイルやベビーオイルなどとも呼ばれ、炭素数が少ないアルカンを多く含む低粘性のオイルである。流動パラフィンには、組成や粘度が異なる多様な種類のものが市販されており、本発明では、粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ のものを使用する。

【0039】

本発明の C) においては、油性の被覆液を用いて、撥油性領域を越えない範囲で液滴を被覆するが、「撥油性領域を越えない範囲」とは、油性の被覆液が撥油性領域に接触してもよいが、被覆液の外縁端が撥油性領域の外周にまでは達せず、撥油性領域に囲まれた状態となる範囲をいう。

【0040】

本発明の生体分子の検出方法は、D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される生体分子と検出分子とを結合させること、を含む。

ここで、変動電界とは、周期的に強さが変動する電界を意味する。この変動電界により、液滴の表面又は内部の電荷に周期的に変化するクーロン力が働くことによって、液滴が振動する。

【0041】

液滴が周期的に振動する一つの実施形態を、図 3 により説明する。

図 3 (A) は、図 2 (D) と同一の状態を示す図である。この図に示す状態では、上部電極 (9) に供給される正の電圧が最大になっている。そして、下部電極 (10) は接地されており、電位が 0 に固定されている。この状態では、上部電極 (9) から下部電極 (10) に向かう電気力線で示される電界が発生し、液滴のマイナス電荷 (12) には、上部電極のプラス電荷 (13) 側に向かうクーロン力が働き、液滴が上部電極 (9) に引き寄せられる。

【0042】

一方、図 3 (B) は、上部電極 (9) に供給される電圧が最小の 0 となっている状態を示す。この状態では、電界の作用がなくなって、液滴が上部電極に引き寄せられる力がなくなり、重力により液滴の上部の溶液が落下して、その勢いで液滴がスライドガラスに押しつぶされた状態となる。

変動電圧供給装置は、上部電極 (9) に供給する電圧を周期的に変動させるため、図 3 (A) の状態と図 3 (B) の状態の間を周期的に往復する。これにより、液滴が周期的に振動することになる。図 3 (B) の状態でスライドガラスに押しつぶされた液滴は、スライドガラスの反作用によりパウンドして、電界の変化にあわせてスムーズに図 3 (A) の状態に戻ることができる。

変動電界の印加は、この実施形態に限らず、上部電極に周期的に変動する負の電圧を供給することによって行ってもよく、また、上部電極に供給する変動電圧とは符号が逆の変動電圧を下部電極に供給することにより行ってもよい。

【0043】

10

20

30

40

50

本発明の生体分子の検出方法は、E) 生体分子に結合した検出分子により、生体分子の存在を検出すること、を含む。

E) における検出は、例えば、検出分子の発色や放射線等を利用して検出することができる。検出分子を発色させる方法としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、検出分子に標識酵素（発色酵素）、蛍光色素、蛍光タンパク質、色素等の発色標識をあらかじめ連結させる方法や、検出分子と生体分子が結合した後に、発色標識を連結した抗体等を検出分子に結合させる方法により、検出分子を発色させることができる。また、検出分子から放射線を発する方法としては、あらかじめ検出分子に放射性同位体を取り込ませて標識する方法を用いることができる。

【0044】

本発明の生体分子の検出方法において、検出分子として抗体を用いて、免疫組織化学（IHC）による検出を行うことができる。また、検出分子として目的とする核酸に相補的な配列を有する標識プローブを用いて、インサイチュハイブリダイゼーション（ISH）による検出を行うことができる。これらの方法については、後記に詳述する。

また、これら以外の方法としては、例えば、これらに限定されるわけではないが、糖タンパク質の糖鎖にレクチンを結合させて検出する方法、F アクチンというタンパク質にファロイジンという毒素を結合させて検出する方法、核酸に結合するタンパク質を、蛍光色素で標識した核酸で検出する方法（サウスウエスタン）等がある。

【0045】

2. 本発明の生体分子検出用プレート

本発明の生体分子検出用プレートは、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有することを特徴とする。

ここで、「液滴形成領域」と「撥油性領域」については、前記「1. 本発明の生体分子の検出方法」にて説明したものと同一であるが、以下、図面を用いて、本発明の生体分子検出用プレートについてさらに説明する。

【0046】

図4は、本発明の生体分子検出用プレートの実施形態を模式的に示す平面図及び断面図である。図4(A)は、本発明の生体分子検出用プレートの一つの実施形態を示す平面図であり、図4(B)は、図4(A)と同一のプレートとその上部に形成した液滴の状態を模式的に示す断面図である。

図4(A)の平面図に示されるように、プレート(3)の表面には、液滴形成領域(1)が設けられ、その外周には撥油性領域(2)が設けられている。そして、図4(B)の断面図に示されるように、油性の被覆液(8)は、撥油性領域(2)に囲まれて、撥油性領域(2)の内周側に留まろうとする力が働き、ドーム状の液滴が崩れるのを防ぐことができる。

【0047】

図4(C)は、本発明の生体分子検出用プレートの他の実施形態を模式的に示す断面図である。図4(B)に示される実施形態では、液滴形成領域(1)と撥油性領域(2)は同一平面内にあるが、図4(C)に示される実施形態では、液滴形成領域(1)と撥油性領域(2)の間に段差が設けられ、撥油性領域(2)の方が高くなっている。このような段差を設けることにより、ドーム状の液滴をさらに安定化させることが可能となる。

【0048】

このように、本発明の生体分子検出用プレートは、プレート上に液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するので、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆することができる。このため、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

【0049】

図5は、本発明の生体分子検出用プレートのもう一つの実施形態を示す平面図及び断面

10

20

30

40

50

図である。図5(A)の平面図に示されるように、液滴形成領域(1)と撥油性領域(2)の境界部分には、撥水親油性領域(16)が設けられている。そして、この実施形態においては、液滴形成領域(1)が親水性となっている。

図5(B)及び(C)は、図5(A)と同一のプレートとその上部に液滴を形成する様子を模式的に示す断面図である。図5(B)に示されるように、親水性の液滴形成領域に溶液(7)を注入して液滴を形成すると、液滴は、撥水親油性領域(16)に囲まれて、親水性の液滴形成領域(1)に留まろうとする力が働き、液滴を容易に形成することができる。そして、次に、図5(C)に示されるように、液滴を油性の被覆液(8)で被覆すると、油性の被覆液(8)は、撥油性領域(2)に囲まれて、撥水親油性領域(16)に留まろうとする力が働き、ドーム状の液滴が崩れるのを防ぐことができる。

このような構造のプレートとすることにより、ドーム状の液滴をさらに安定に維持することが可能になるという効果を奏する。

【0050】

3. 本発明の生体分子検出用キット

本発明の生体分子検出用キットは、生体分子検出用プレートと、生体分子に特異的に結合できる検出分子を含む溶液と、粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液とを含むことを特徴とする。

ここで、「生体分子検出用プレート」については、前記「2. 本発明の生体分子検出用プレート」にて説明したものと同一のものを使用することができる。また、「生体分子に特異的に結合できる検出分子を含む溶液」と「粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液」については、前記「1. 本発明の生体分子の検出方法」で説明したものと同一のものを使用することができる。

【0051】

本発明の生体分子検出用キットは、油性の被覆液を含むので、液滴を油性の被覆液で嵩増しすることができ、高価な検出分子を節約することができるという効果を奏する。また、本発明の生体分子検出用キットは、 $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の低粘度の油性の被覆液を用いるため、液滴を被覆しても高速に液滴を振動させることが可能であるとともに、液滴を広範囲に被覆して液滴の蒸発を効率的に抑制することができるため、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。さらに、本発明の生体分子検出用キットは、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有するプレートを使用するので、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆することができる。これにより、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、被覆された液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

【0052】

4. 本発明の生体分子検出装置

本発明の生体分子検出装置は、生体分子検出用プレートと、そのプレート上に形成した液滴を加熱して一定の温度に保つ加熱保温装置と、液滴に変動電界を印加する変動電界印加装置とを含むことを特徴とする。

ここで、「生体分子検出用プレート」については、前記「2. 本発明の生体分子検出用プレート」にて説明したものと同一のものを使用することができる。

本発明の生体分子検出装置における「加熱保温装置」は、液滴又はその周囲を加熱するヒーターと、液滴又はその周囲の温度を測定する温度計と、温度計の計測結果と設定温度に基づきヒーターを制御する制御回路とを有することが好ましい。

本発明の生体分子検出装置における「変動電界印加装置」は、前記「1. 本発明の生体分子の検出方法」でも説明したものと同一である。

【0053】

本発明の生体分子検出装置は、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートを使用するので、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越

10

20

30

40

50

えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆することができる。このため、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

【0054】

5. 本発明の生体試料標本の製造方法

本発明の生体試料標本の製造方法は、固形の生体試料中に含有される生体分子とその生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより得られる、生体分子検出用の生体試料標本の製造方法に関する。

本発明の生体試料標本の製造方法は、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置し、

B) 検出分子を含む溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、撥油性領域を越えない範囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される生体分子と検出分子とを結合させる、

ことを含むことを特徴とする。

【0055】

本発明の生体試料標本の製造方法によれば、液滴を油性の被覆液で嵩増しすることができるため、高価な検出分子を節約することができるという効果を奏する。また、本発明の生体試料標本の製造方法によれば、 $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の低粘度の油性の被覆液を用いるため、液滴を被覆しても高速に液滴を振動させることが可能であるとともに、液滴を広範囲に被覆して液滴の蒸発を効率的に抑制することができるため、迅速かつ再現性よく生体試料標本を製造できるという効果を奏する。さらに、本発明の生体試料標本の製造方法によれば、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有するプレートを使用して、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆する。これにより、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、被覆された液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

【0056】

6. 本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法

本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法は、固形の生体試料中に含有される核酸と、その核酸に相補的な配列を含む標識プローブとをハイブリダイズさせることにより、生体試料中に含有される核酸を検出する方法に関する発明である。

本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法は、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置し、

B) 標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、撥油性領域を越えない範囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される核酸と標識プローブとをハイブリダイズさせ、

E) 核酸にハイブリダイズした標識プローブの標識を検出する、

ことを含むことを特徴とする。

【0057】

本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法において、A) ~ E) は、前記「1. 本発明の生体分子の検出方法」でも説明したように、検出目的とする生体分子を核酸とし

、検出分子として、その核酸に相補的な配列を有する標識プローブを用い、標識プローブの標識により生体分子（核酸）の存在を検出する方法である。

【0058】

以下、本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法について、さらに詳細に説明を行う。

本発明のインサイチュハイブリダイゼーションにおいて検出目的とする「核酸」としては、染色体上に存在するDNAや、核及び細胞質に存在するmRNAを対象とすることができる。これらのDNAやmRNAに相補的な配列を有する標識プローブを使用することにより、染色体上のDNAや、核及び細胞質に存在するmRNAを検出することができる。

染色体上のDNAを検出する方法では、DNA断片が染色体のどの位置にあるのかを決定できるとともに、そのコピー数も知る事ができる。また、mRNAを検出する方法では、細胞におけるmRNAの発現分布や発現強度を知ることができる。

【0059】

インサイチュハイブリダイゼーションによる検出は、蛍光標識を使用するFISH (Fluorescence in situ hybridization) や、酵素標識を使用するCISH (Chromogenic in situ hybridization) が知られており、また、放射性標識を用いることもできる。

プローブに使用する核酸としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、合成オリゴDNA、一本鎖RNA、二本鎖cDNA、一本鎖cDNA等を使用することができる。

【0060】

標識プローブは、蛍光標識、酵素標識、放射性標識等をプローブ核酸に直接連結することにより得ることができ、また、プローブ核酸にハプテン物質を標識として連結することにより得ることもできる。

プローブ核酸にハプテン物質を連結した場合には、蛍光標識、酵素標識等を連結したハプテン認識抗体等を用いて、間接的にプローブ核酸を標識することができる。

ハプテン物質としては、ジゴキシゲニン、T-Tダイマー、ジニトロフェニル等を用いることができる。複数種類の核酸プローブを、それぞれ異なるハプテン物質で標識することにより、同時に複数種類の遺伝子を検出することも可能である。

【0061】

本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法によれば、液滴を油性の被覆液で嵩増しすることができるため、高価な標識プローブを節約することができるという効果を奏する。また、本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法によれば、0.7~18.6 mPa・sの低粘度の油性の被覆液を用いるため、液滴を被覆しても高速に液滴を振動させることが可能であるとともに、液滴を広範囲に被覆して液滴の蒸発を効率的に抑制することができるため、迅速かつ再現性よく核酸を検出できるという効果を奏する。さらに、本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法によれば、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有するプレートを使用して、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆する。これにより、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、被覆された液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく核酸を検出することができるという効果を奏する。

本発明のインサイチュハイブリダイゼーション法を用いれば、例えば、後記実施例1に示されるように、通常の方法では約20~22時間を要するインサイチュハイブリダイゼーションを、6時間にまで短縮することも可能である。

【0062】

7. 本発明の免疫組織化学法

本発明の免疫組織化学法は、固形の生体試料中に含有される生体分子と生体分子に特異的な抗体とを結合させることにより、生体試料中に含有される生体分子を検出する方法に関する。

10

20

30

40

50

本発明の免疫組織化学法は、

- A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの液滴形成領域上に、固形の生体試料を載置し、
 - B) 抗体を含む溶液により、生体試料を覆うように、液滴を液滴形成領域内に形成し、
 - C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用いて、撥油性領域を越えない範囲で液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、
 - D) 液滴に変動電界を印加することで液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、生体試料中に含有される生体分子と抗体とを結合させ、
 - E) 生体分子に結合した抗体を検出する、
- ことを含むことを特徴とする。

10

【0063】

本発明の免疫組織化学法において、A) ~ E) は、前記「1. 本発明の生体分子の検出方法」でも説明したように、検出分子として抗体を使用する方法である。

以下、本発明の免疫組織化学法について、さらに詳細に説明を行う。

本発明の免疫組織化学法のE)の工程において、抗体を検出する手法としては、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等の酵素を標識として連結させた抗体を用い、酵素による発色により抗体を検出する酵素抗体法と、蛍光色素を標識として連結させた抗体を用い、蛍光により抗体を検出する蛍光抗体法とが2本の柱となる手法である。

【0064】

この二つの手法のうち、酵素抗体法は、病理診断等で組織切片の生体分子を検出するのに適している。酵素抗体法について詳しく述べると、標識として用いられる酵素としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、ペルオキシターゼ(西洋ワサビペルオキシダーゼ、Horseradish peroxidase: HRP)、アルカリホスファターゼ(alkaline phosphatase: AP)、グルコースオキシダーゼ(-D galactosidase: GAL)等の酵素を用いることができる。

20

これらの酵素の基質としては、ペルオキシターゼに対しては、例えば、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)を用いて茶色に発色させたり、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)を用いて赤色に発色させることができる。

【0065】

酵素抗体法には、大きく分けて直接法と間接法とがある。直接法は、抗体に直接酵素を連結して標識した上で、抗原と反応させるものである。一方、間接法は、検出すべき抗原に対する抗体(一次抗体)には酵素標識せず、その抗体に対する抗体(二次抗体)に酵素標識して検出する方法である。間接法は、直接法に比べて反応回数が多いが、一次抗体を同種の動物で作製すれば、1種類の二次抗体であらゆる免疫染色をすることができ、また、感度の面でも優れている。したがって、酵素抗体法では、間接法が使用されることが多い。

30

【0066】

本発明の免疫組織化学法によれば、液滴を油性の被覆液で嵩増しすることができるため、高価な抗体を節約することができるという効果を奏する。また、本発明の免疫組織化学法によれば、 $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の低粘度の油性の被覆液を用いるため、液滴を被覆しても高速に液滴を振動させることが可能であるとともに、液滴を広範囲に被覆して液滴の蒸発を効率的に抑制することができるため、迅速かつ再現性よく生体分子を検出できるという効果を奏する。さらに、本発明の免疫組織化学法によれば、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域を有するプレートを使用して、液滴形成領域に液滴を形成し、その周囲の撥油性領域を越えない範囲で、油性の被覆液により液滴を被覆する。これにより、油性の被覆液の外周を撥油性領域が取り囲むこととなり、被覆された液滴が崩れるのを防ぐことができるため、十分な電界攪拌を行うことができ、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができるという効果を奏する。

40

【0067】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものでは

50

ない。

【実施例 1】

【0068】

(実施例 1 : 本発明の方法によるインサイチュハイブリダイゼーション)

A) ZytoDot 2C SPEC HER2CEN 17 Probe Kit (ZytoVision社製) のキット試薬を用い、プロトコルを改良してインサイチュハイブリダイゼーションを行った。乳癌組織の切片を、プロトコルに従い 1 時間前処理 (脱パラフィン処理及び賦活化処理) したものを被検試料として用いた。インサイチュハイブリダイゼーションに用いるプレートを作成するために、撥油性のシートである 3 M l a b e l c o v e r (3 M 社製) を用い、シートの中央を円形にくり抜き、これをスライドガラス上に貼付した。スライドガラス上でシートに囲まれた円形の領域に、乳癌組織の切片を載置した。

10

B) キットの DNA プロブ溶液 10 μ l を 80 で熱処理した後、乳癌組織の切片に滴下した。DNA プロブ溶液は、ジゴキシゲニン (DIG) で標識した HER2 遺伝子用プロブと、ジニトロフェニル (DNP) で標識した染色体セントロメア 17 (CEN17) 用プロブのカクテルである。

C) DNA プロブ溶液の液滴を 40 μ l の流動パラフィン (カナダ社製ハイコール K-140N) で被覆し、ドーム状の液滴を形成した。使用した流動パラフィンの粘度は、23.8 において 5.5 mPa \cdot s であった。

D) 変動電界印加装置を用い、15 Hz、4, 5 kV の変動電圧を供給して変動電界を印加することにより、液滴を 3 時間電界攪拌させながらハイブリダイゼーション反応を行った。

20

E) ハイブリダイゼーション後、洗浄して、マウス抗 DIG 抗体とウサギ抗 DNP 抗体のカクテル溶液 30 μ l を滴下して液滴とし、30 μ l の流動パラフィンで被覆してドーム状の液滴を形成した。変動電界印加装置を用い、15 Hz、4, 5 kV の変動電圧を供給して変動電界を印加することにより、液滴を 20 分間電界攪拌させながら、抗原抗体反応を行った。洗浄を行った後に、HRP 標識抗マウス抗体及び ALP 標識抗ウサギ抗体のカクテル溶液を用いて、同様の方法により 30 分間抗原抗体反応を行った。次に、HRP - Green を用いて標識酵素による発色反応を 15 分間行い、HER2 遺伝子を緑色に染色して可視化した。さらに AP - Red を用いて標識酵素による発色反応を 15 分間行い、CEN17 を赤色に染色して可視化した。

30

(実施例 1 の結果)

87 検体中 85 検体において、染色に成功し、成功率はプロトコルの方法よりも高いものであった。また、インサイチュハイブリダイゼーションの全行程を約 6 時間に短縮することに成功した。

【0069】

(比較例 1)

ZytoDot 2C SPEC HER2CEN 17 Probe Kit (ZytoVision社製) のキット試薬を用い、プロトコルに従ってインサイチュハイブリダイゼーションを行った。

プレートとして通常のスライドガラスを用い、流動パラフィンによる被覆や電界攪拌は行わず、ハイブリダイゼーションは 16 ~ 18 時間、抗原抗体反応は 30 分ずつ行った他は、実施例 1 と同様に行った。

40

(比較例 1 の結果)

87 検体中 82 検体において、染色に成功した。また、インサイチュハイブリダイゼーションの全行程に約 20 ~ 22 時間を要した。

【0070】

(比較例 2)

ZytoDot 2C SPEC HER2CEN 17 Probe Kit (ZytoVision社製) のキット試薬を用い、プロトコルを改良してインサイチュハイブリダイゼーションを行った。

流動パラフィンによる被覆は行わず、DNA プロブ溶液 10 μ l に 40 μ l の水を加えて高増しし、ドーム状の液滴を形成して電界攪拌を行った他は、実施例 1 と同様の処理

50

を行った。

(比較例2の結果)

インサイチュハイブリダイゼーションの全ての処理工程を行ったが、染色には成功しなかった。

【0071】

(比較例3)

ZytoDot 2C SPEC HER2CEN 17 Probe Kit (ZytoVision社製)のキット試薬を用い、プロトコルを改良してインサイチュハイブリダイゼーションを行った。

撥油性のシートを使用しなかった他は、実施例1と同様の処理を行った。

(比較例3の結果)

電界攪拌を行う際に液滴が崩れてしまい、それ以降の処理を行うことができなかった。

【実施例2】

【0072】

(実施例2:流動パラフィンの粘度の検討)

粘度が異なる6種類の流動パラフィンを用いて、電界攪拌の被覆液として用いる場合の最適な粘度の検討を行った。6種類の流動パラフィンの名称と、23.8の条件下にHAKE RheoStress 1(登録商標、Thermo Scientific社製)を用いて測定した粘度は以下のとおりである。

| | | |
|-------------------|------|-------------|
| ・K - 140N (カナダ社製) | 粘度 = | 5.5 mPa・s |
| ・K - 160 (カナダ社製) | 粘度 = | 13.5 mPa・s |
| ・K - 230 (カナダ社製) | 粘度 = | 18.6 mPa・s |
| ・K - 290 (カナダ社製) | 粘度 = | 57.8 mPa・s |
| ・K - 350 (カナダ社製) | 粘度 = | 171.0 mPa・s |
| ・E - 7 (カナダ社製) | 粘度 = | 143.0 mPa・s |

(電界攪拌蒸散実験)

撥油性シートの中央を円形に切り抜いたものをスライドガラスに貼付した。洗浄液(DaikoWashing bufferにTween20を0.05%添加したもの)で洗浄した後、スライドガラス上でシートに囲まれた円形の領域に、TEバッファ10 μ lを注入して液滴とした。さらに流動パラフィンを40 μ l注入してドーム状の液滴を形成し、変動電界を印加して電界攪拌を行い、60分、90分、120分、180分経過時の重量を測定して、TEバッファの蒸散量を測定した。その結果を図6に示す。

図6(A)は、重量(蒸散量)の経時変化を示すグラフであり、図6(B)は、蒸散量と粘度の関係を示すグラフである。

この結果から、低粘度である程、蒸散量が少ないことが明らかとなった。

(面積カバー率の測定)

電界攪拌蒸散実験で用いたスライドガラス上のドーム状の液滴について、平面画像を撮影し、TEバッファが流動パラフィンにより被覆されている面積の割合(面積カバー率)を測定した。その結果を図7に示す。

図7に示されるとおり、流動パラフィンの粘度が低いほど面積カバー率が大きく、18.6 mPa・s以下の粘度であるK-140N、K-160及びK-230の3つの流動パラフィンをを用いた場合に、特に面積カバー率が大きかった。

(液滴挙動観察)

電界攪拌蒸散実験を行ったスライドガラス上のドーム状の液滴について、側面から振動する様子を撮影し、振動する液滴の最大高さとの最低高さの差(振動幅)を測定した。その結果を図8に示す。

図8に示されるように、流動パラフィンの粘度が低いほど振動幅が大きく、18.6 mPa・s以下の粘度であるK-140N、K-160及びK-230の3つの流動パラフィンをを用いた場合に、特に振動幅が大きく、十分な電界攪拌が行われていることが確認された。逆に、流動パラフィンの粘度が大きい場合には、十分な電界攪拌が行われなかった。データは示さないが、参考実験として、流動パラフィンの代わりに粘度の高い植物油を

10

20

30

40

50

用いて変動電界を印加したが、電界攪拌を行うことはできなかった。

【産業上の利用可能性】

【0073】

本発明の生体分子の検出方法、生体分子検出用プレート、生体分子検出用キット、生体分子検出装置、生体試料標本の製造方法、インサイチュハイブリダイゼーション法及び免疫組織化学法は、迅速かつ再現性よく生体分子を検出することができ、高価な試薬を節約することを可能とするため、臨床検査及び臨床検査用試薬の分野で有用である。

【符号の説明】

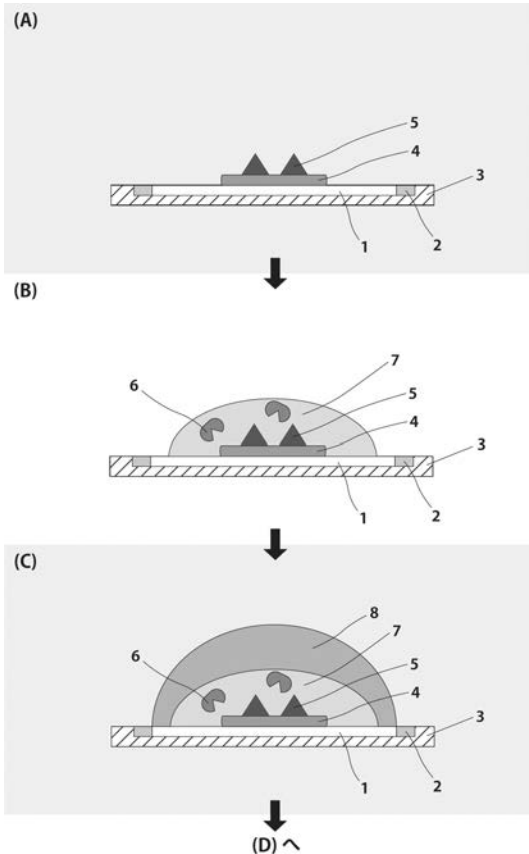
【0074】

- 1 液滴形成領域
- 2 撥油性領域
- 3 プレート
- 4 固形の生体試料
- 5 生体分子
- 6 検出分子
- 7 溶液
- 8 油性の被覆液
- 9 上部電極
- 10 下部電極
- 11 変動電圧供給装置
- 12 液滴の電荷
- 13 上部電極の電荷
- 15 顕微鏡
- 16 撥水親油性領域

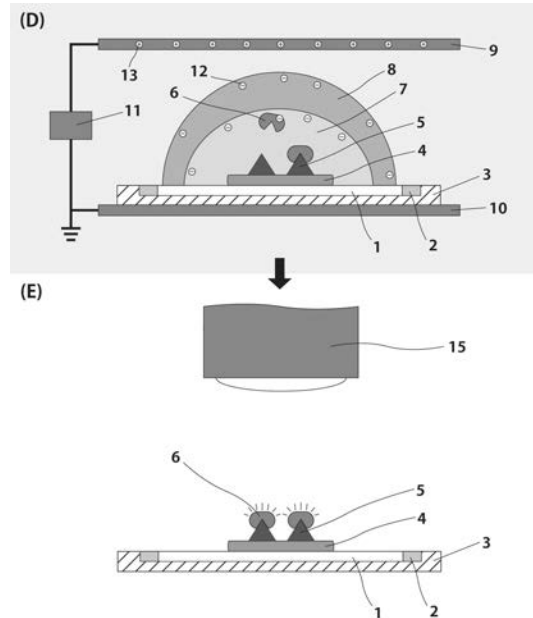
10

20

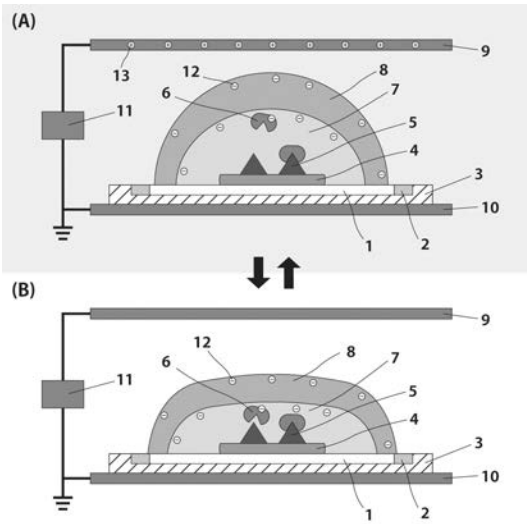
【図1】



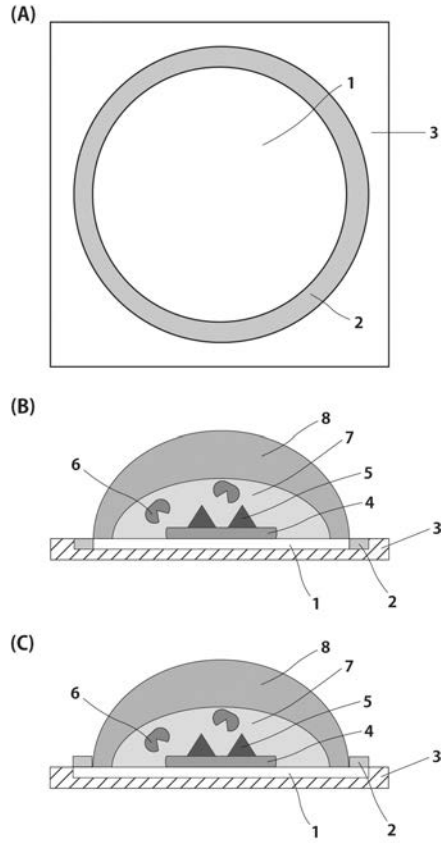
【図2】



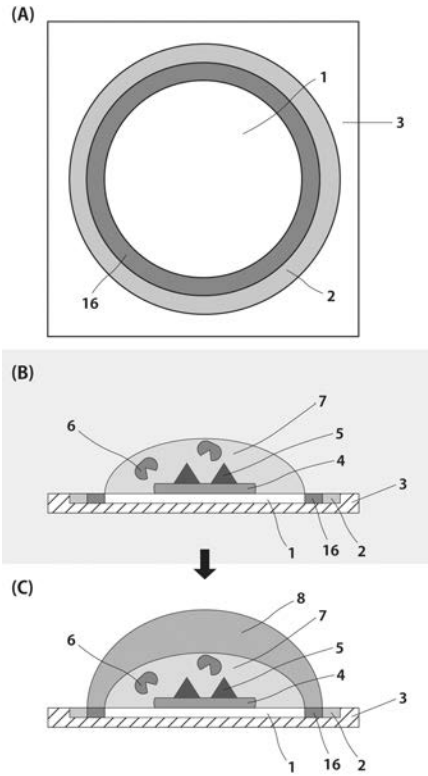
【図3】



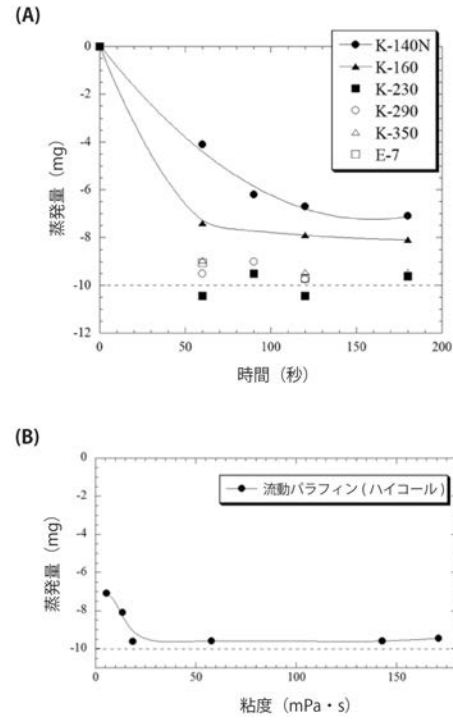
【図4】



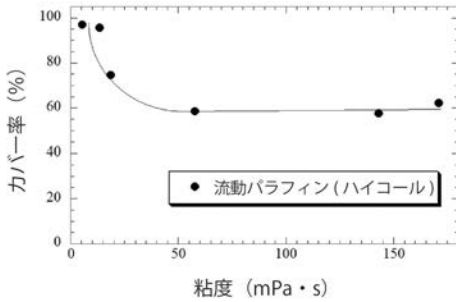
【図5】



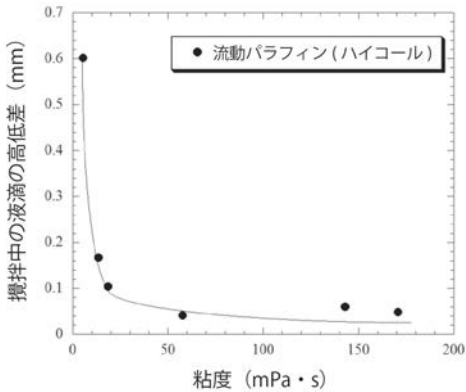
【図6】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成28年7月8日 (2016.7.8)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

固形の生体試料中に含有される生体分子と前記生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより、前記固形の生体試料中の前記生体分子を検出する方法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記検出分子を含む溶液により、前記生体試料を覆うように液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子と前記検出分子とを結合させ、

E) 前記生体分子に結合した前記検出分子により、前記生体分子の存在を検出する、ことを含む生体分子の検出方法。

【 請求項 2 】

前記被覆液が、粘度が $0.7 \sim 5.5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の被覆液である、請求項 1 に記載の生体分子の検出方法。

【 請求項 3 】

前記被覆液が流動パラフィンである、請求項 1 又は 2 に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 4】

前記プレートが、前記液滴形成領域と前記撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、前記液滴形成領域が親水性である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 5】

前記生体分子が核酸であり、前記検出分子が前記核酸に相補的な配列を有する標識プローブである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 6】

前記生体分子がタンパク質であり、前記検出分子が前記タンパク質に特異的な抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生体分子の検出方法。

【請求項 7】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用するプレートにおいて、
液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有し、前記液滴形成領域と前記撥油性領域の間に、前記撥油性領域の方が高くなるような段差が設けられた、生体分子検出用プレート。

【請求項 8】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用するプレートにおいて、
プレート上に、撥油性シートを切り抜いたものを設けることにより、液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを設けた、生体分子検出用プレート。

【請求項 9】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用するプレートにおいて、
液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有し、
前記液滴形成領域と前記撥油性領域の境界部分に撥水親油性領域を有し、前記液滴形成領域が親水性である、生体分子検出用プレート。

【請求項 10】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用するキットにおいて、
液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有する生体分子検出用プレートと

、
生体分子に特異的に結合できる検出分子を含む溶液と、
粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液とを含む、生体分子検出用キット。

【請求項 11】

電界攪拌を用いた生体分子の検出に使用する装置において、
液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有する生体分子検出用プレートと

、
前記プレート上に形成した液滴を加熱して一定の温度に保つ加熱保温装置と、
前記液滴に変動電界を印加する変動電界印加装置とを含む、生体分子検出装置。

【請求項 12】

固形の生体試料中に含有される生体分子と前記生体分子に特異的な検出分子を結合させることにより得られる、生体分子検出用の生体試料標本の製造方法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記検出分子を含む溶液により、前記生体試料を覆うように、液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子と前記検出分子とを結合させる、
ことを含む生体試料標本の製造方法。

【請求項 13】

固形の生体試料中に含有される核酸と、前記核酸に相補的な配列を含む標識プローブとをハイブリダイズさせることにより、前記生体試料中に含有される前記核酸を検出するインサイチュハイブリダイゼーション法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液により、前記生体試料を覆うように、液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記核酸と前記標識プローブとをハイブリダイズさせ、

E) 前記核酸にハイブリダイズした前記標識プローブの標識を検出する、ことを含むインサイチュハイブリダイゼーション法。

【請求項 14】

固形の生体試料中に含有される生体分子と前記生体分子に特異的な抗体とを結合させることにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子を検出する免疫組織化学法において、

A) 液滴形成領域とその外周に配置された撥油性領域とを有するプレートの前記液滴形成領域上に、前記固形の生体試料を載置し、

B) 前記抗体を含む溶液により、前記生体試料を覆うように、液滴を前記液滴形成領域内に形成し、

C) 粘度が $0.7 \sim 18.6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ の油性の被覆液を用い、前記撥油性領域を越えない範囲で前記液滴を被覆して、ドーム状の液滴とし、

D) 前記液滴に変動電界を印加することで前記液滴を振動させる電界攪拌を行うことにより、前記生体試料中に含有される前記生体分子と前記抗体とを結合させ、

E) 前記生体分子に結合した前記抗体を検出する、ことを含む免疫組織化学法。

 フロントページの続き

| | | | |
|-------------|---------|------|------------|
| (51)Int.Cl. | F I | | テーマコード(参考) |
| | C 1 2 M | 1/34 | F |
| | C 1 2 M | 1/34 | B |

(72)発明者 南谷 佳弘

秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学法人秋田大学 本道キャンパス内

(72)発明者 南條 博

秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学法人秋田大学 本道キャンパス内

(72)発明者 赤上 陽一

秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内

(72)発明者 中村 竜太

秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB01 BB11 FA15

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR55 QR62

QS25 QS34 QX02

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 使用电场搅拌快速检测生物分子 | | |
| 公开(公告)号 | JP2017138263A | 公开(公告)日 | 2017-08-10 |
| 申请号 | JP2016020839 | 申请日 | 2016-02-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国立大学法人秋田大学 秋田县 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 国立大学法人秋田大学 秋田县 | | |
| [标]发明人 | 齋藤芳太郎 南谷佳弘 南條博 赤上陽一 中村竜太 | | |
| 发明人 | 齋藤 芳太郎 南谷 佳弘 南條 博 赤上 陽一 中村 竜太 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/53.T C12Q1/68.A C12M1/00.A C12M1/34.F C12M1/34.B C12N15/09.Z C12Q1/6841.Z | | |
| F-TERM分类号 | 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB01 4B029/BB11 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 | | |
| 其他公开文献 | JP6026027B1 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种利用电场搅拌检测生物分子的方法，以进一步节省昂贵的试剂。解决方案：为了解决上述问题，发明人发现通过使用油性涂料液增加体积可以形成液滴当仔细研究结果时，含有昂贵试剂的反应溶液量减少。然后，发明人发现，为了施加波动的电场以使液滴高速振动，可以通过使用具有0.7-18.6mPa·s的低粘度的油性涂料流体适当地进行电场搅拌，并且使用具有液滴形成区域和设置在其外周边的拒油区域的板，以完成本发明。图1：图1

