(19) **Japan Patent Office (JP)** (12) **Unexamined Patent Gazette (**A) (11) Japanese Unexamined Patent Application Publication Number

2007**-14297**
(P2007-14297A)

(43) Publication date**: January 25, 2007 (2007.1.25)**

(51) Int. Cl.			Fl			Theme Codes (Reference)
C12Q	***1/68***	***(2006.01)***	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
C12M	***1/00***	***(2006.01)***	C12M	1/00	A	4B029
C12N	***15/09***	***(2006.01)***	C12N	15/00	F	4B063
G01N	***27/447***	***(2006.01)***	G01N	27/26	301C	

Request for examination: Not yet requested Number of claims: 17 OL (total of 24 pages)

(21) Application number: 2005-201330 (P2005-201330)
(22) Application date: July 11, 2005 (2005.7.11)

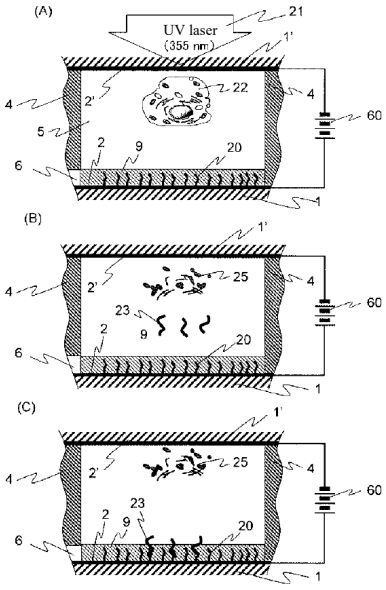
(71) Applicant: 504296024
Limited Liability Intermediary Corporation On-Chip Cellomics Consortium
YK Surugadai Building 8F, 1-7 Kanda Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo
(74) Agent: 100068504
Patent Attorney OGAWA Katsuo
(74) Agent: 100083389
Patent Attorney TAKENOUCHI Masaru
(72) Inventor: OKANO Kazunobu
23-3-204 Sanei-cho, Shinjuku-ku, Tokyo
(72) Inventor: YASUDA Kenji
2-8-14-1014 Shiomi, Koto-ku, Tokyo
F-terms (reference) 4B024 AA11C A01C A09CA11 HA14

Continued on last page

(54) [Title of the invention] Cellular constituent material isolation chip and cellular constituent material analysis system, and cellular constituent material analysis method using the same

(57) [Abstract]
[Problem] To provide a method, a chip device and a system that make it possible to perform quantitative determination of mRNA and protein localized between cells and within cells without losing local spatial information.
[Solution] The contents of a cell are captured on a substrate or electrode with the cell being projected two-dimensionally. For this purpose, electrophoretic force is utilized, or the water content in the cell is instantaneously evaporated to immobilize the cell. mRNA immobilized on the two-dimensional plane is identified using a labeled probe with a label that hybridizes with the mRNA.
[Selected drawing] FIG. 2

FIG. 2



[Scope of patent claims]

[Claim 1]

A cellular constituent material analysis system characterized in that it comprises: a substrate structure with probes immobilized on the substrate surface for capturing a predetermined biological material; a spatial structure that retains a buffer solution containing a cell on the surface of the substrate structure provided with probes for capturing the biological material; a mechanism for destroying the cell in the buffer solution retained in the spatial structure; a mechanism for two-dimensionally projecting a predetermined biological material contained in the destroyed cell onto the substrate surface; and a mechanism for distinguishing and detecting the biological material captured by the probes on the substrate surface.

[Claim 2]

A cellular constituent material isolation chip for cellular constituent material analysis, characterized in that it comprises: a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments; a means for placing the areas of the substrate into communication with each other as needed; probes which are provided on the surface of the areas of the substrate and are capable of capturing a cellular constituent material contained in the areas of the substrate, and electrodes for applying an electric field from above and below the areas of the substrate.

[Claim 3]

A cellular constituent material isolation chip as set forth in claim 2, wherein the surface of the compartmentalized areas is a polymer layer prepared by polymerizing two monomers, wherein the polymer layer has a structure wherein a first monomer having a first functional group for polymerization at two locations and a second monomer having a second functional group for polymerization at two locations are arranged in alternating fashion, and wherein one of either the first monomer or the second monomer has a biological material capture residue.

[Claim 4]

A cellular constituent material isolation chip as set forth in claim 2, wherein the surface of the compartmentalized areas is a polymer layer prepared by polymerizing two monomers, wherein the polymer layer has a structure wherein a first monomer having a first functional group for polymerization at two locations and a second monomer having a second functional group for polymerization at two locations are arranged in alternating fashion, and wherein the first monomer and the second monomer each have a different biological material capture residue.

[Claim 5]

A cellular constituent material isolation chip as set forth in claim 3 or claim 4, wherein the polymer layer is formed on an electrically conductive member surface provided on the substrate surface.

[Claim 6]

A biological material analysis system as set forth in claim 1, wherein the mechanism for two-dimensionally projecting the predetermined biological material contained in the destroyed cell onto the substrate surface is a power source and electrodes which sandwich and apply an electric field to the spatial structure that retains the buffer solution containing the cell.

[Claim 7]

A biological material analysis system as set forth in claim 1, wherein the mechanism for destroying cells is a structure capable of irradiating cells with ultraviolet light in a wavelength range of 320 nm to 400 nm.

[Claim 8]

A biological material analysis system as set forth in claim 1, wherein the mechanism for distinguishing and detecting a biological material captured by the probes on the substrate surface is a measurement means for identifying nanoparticle that label the labeled probes that hybridize to the biological material, wherein the nanoparticles are identified by size and material.

[Claim 9]

A biological material analysis system as set forth in claim 1, wherein the substrate surface on which the probes for capturing the biological material are immobilized is a polymer layer prepared by polymerizing two monomers, wherein the polymer layer has a structure wherein a first monomer having a first functional group for polymerization at two locations and a second monomer having a second functional group for polymerization at two locations are arranged in alternating fashion, and wherein one of either the first monomer or the second monomer has a biological material capture residue.

[Claim 10]

A cell constituent material analysis method characterized in that the method employs a cellular constituent material isolation chip for cellular constituent material analysis, comprising a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments; a means for placing the areas of the substrate into communication with each other as needed; probes which are provided on the surface of the areas of the substrate and are capable of capturing a constituent material of cells contained in the areas of the substrate; and electrodes for applying an electric field from above and

below the areas of the substrate, wherein the method comprises:

a step of retaining a buffer solution containing a cell in the areas of the compartments;

a step of destroying cells retained in the areas of the compartments;

a step of two-dimensionally projecting a predetermined biological material contained in the destroyed cells onto an area of the substrate and capturing the predetermined biological material on the probes;

a step of reacting the captured predetermined biological material with probes labeled with predetermined nanoparticles; and

a step of analyzing the particle diameter and elemental composition of the nanoparticles of the reacted probes to identify the type and location of the predetermined biological material for each molecule of the biological material.

[Claim 11]

A cellular constituent material isolation chip comprising a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments for retaining individual cells; a plurality of probes capable of capturing cellular constituent materials, structured so as to be arrayed in spots in the compartmentalized areas of the substrate; and a mechanism for placing the compartmentalized areas of the substrate into communication with each other as needed.

[Claim 12]

A cellular constituent material analysis method characterized in that the method employs a cellular constituent material isolation chip for cellular constituent material analysis, comprising a cellular constituent material isolation chip having a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments for retaining individual cells, a plurality of probes capable of capturing constituent materials of the cells, structured so as to be arrayed in spots in the compartmentalized areas of the substrate, and a mechanism for placing the compartmentalized areas of the substrate into communication with each other as needed; and electrodes for applying an electric field from above and below the areas of the substrate, wherein the method comprises:

a step of retaining a buffer solution containing a cell in the areas of the compartments;

a step of destroying cells retained in the areas of the compartments;

a step of capturing a predetermined biological material contained in the destroyed cells on the plurality of probes present in the areas of the substrate;

a step of reacting the captured predetermined biological material with probes labeled with predetermined nanoparticles; and

a step of analyzing the particle diameter and elemental composition of the nanoparticles of the reacted probes to identify the type and location of the predetermined biological material for each molecule of the biological material.

[Claim 13]

A cellular constituent material analysis method characterized in that the method employs a cellular constituent material isolation chip for cellular constituent material analysis comprising a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments and a means for placing the areas of the substrate into communication with each other as needed, wherein the method comprises:

a step of retaining a buffer solution containing a cell in the areas of the compartments;

a step of exposing cells retained in the areas of the compartments to a desiccating atmosphere under predetermined conditions to desiccate the cells, or desiccating after freezing the areas of the compartments in which the cells have been adhered;

a step of adding a predetermined solution to make a cell membrane material-permeable;

a step of washing away materials other than cellular constituent material immobilized in the areas of the compartments;

a step of reacting predetermined nanoparticle-labeled probes with the cellular constituent material immobilized in the areas of the compartments; and

a step of analyzing the particle diameter and elemental composition of the nanoparticles of the reacted probes to identify the type and location of the predetermined biological material for each molecule of the biological material.

[Claim 14]

A cellular constituent material analysis method characterized in that the method employs a cellular constituent material isolation chip for cellular constituent material analysis comprising a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments and a means for placing the areas of the substrate into communication with each other as needed, wherein the method comprises:

a step of retaining a buffer solution containing a cell in the areas of the compartments;

a step of immobilizing a cellular constituent material by exposing cells retained in the areas of the compartments to a solution containing aldehydes;

a step of adding a predetermined solution to make a cell membrane material-permeable;

a step of washing the cellular constituent material immobilized in the areas of the compartments;

a step of reacting predetermined nanoparticle-labeled probes with the cellular constituent material immobilized in the areas of the compartments; and

a step of analyzing the particle diameter and elemental composition of the nanoparticles of the reacted probes to identify the type and location of the predetermined biological material for each molecule of the biological material.

[Claim 15]

A cellular constituent material analysis method characterized in that the method employs a cellular constituent material isolation chip for cellular constituent material analysis, comprising a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments to which a predetermined marker has been attached; a means for placing the areas of the substrate into communication with each other as needed; probes which are provided on the surface of the areas of the substrate and are capable of capturing a constituent material of cells contained in the areas of the substrate; and electrodes for applying an electric field from above and below the areas of the substrate, wherein the method comprises:

a step of retaining a buffer solution containing a cell in the areas of the compartments;

a step of obtaining a first image including the cells retained in the areas of the compartments and the markers on a single screen;

a step of destroying cells retained in the areas of the compartments;

a step of two-dimensionally projecting a predetermined biological material contained in the destroyed cells onto an area of the substrate and capturing the predetermined biological material on the probes;

a step of reacting the captured predetermined biological material with probes labeled with predetermined nanoparticles; and

a step of obtaining a second image including the nanoparticles that label the probes and the markers on a single screen; and

a step of analyzing the particle diameter and elemental composition of the nanoparticles of the reacted probes to identify the type and location of the predetermined biological material for each molecule of the biological material.

a step of combining the first image and the second image by aligning the markers.

[Claim 16]

A cellular constituent material analysis method characterized in that the method employs a cellular constituent material isolation chip for cellular constituent material analysis comprising a substrate having compartmentalized areas divided into predetermined compartments to which a predetermined marker has been attached and a means for placing the areas of the substrate into communication with each other as needed, wherein the method comprises:

a step of retaining a buffer solution containing a cell in the areas of the compartments;

a step of obtaining a first image including the cells retained in the areas of the compartments and the markers on a single screen;

a step of exposing cells retained in the areas of the compartments to a desiccating atmosphere under predetermined conditions to desiccate the cells, or desiccating after freezing the areas of the compartments in which the cells have been adhered;

a step of adding a solution containing pepsin to make a cell membrane material-permeable;

a step of washing the cellular constituent material immobilized in the areas of the compartments;

a step of reacting predetermined nanoparticle-labeled probes with the cellular constituent material immobilized in the areas of the compartments; and

a step of obtaining a second image including the nanoparticles that label the probes and the markers on a single screen; and

a step of analyzing the particle diameter and elemental composition of the nanoparticles of the reacted probes to identify the type and location of the predetermined biological material for each molecule of the biological material.

a step of combining the first image and the second image by aligning the markers.

[Claim 17]

A cellular constituent material analysis system characterized in that it comprises: a substrate structure with probes immobilized on the substrate surface for capturing a predetermined biological material; a structure formed by application of agarose thin film for cell attachment prevention to the substrate surface on which the probes are immobilized; a spatial structure whereof the surface retains a buffer solution containing a cell on the surface of the substrate structure provided

with probes for capturing the biological material; a mechanism for destroying cells in the buffer solution retained in the spatial structure; a mechanism for two-dimensionally projecting a predetermined biological material contained in a destroyed cell onto the substrate surface; and a mechanism for distinguishing and detecting the biological material captured by the probes on the substrate surface.

[Detailed description of the invention]

[Technical field]

[0001]

The present invention relates to a cellular constituent material analysis chip and a cellular constituent material analysis system and method for quantitatively measuring mRNA or protein which is a gene product expressed in a cell or cell aggregate constituting a tissue, along with information concerning the spatial localization of the mRNA or protein in the cell or the cell aggregate constituting a tissue.

[Background art]

[0002]

With the development of genome planning, there has been more active efforts to understand living organisms, diagnose diseases, and understand biological phenomena at the DNA level. It is effective to examine the expression status of genes in order to understand biological phenomena and investigate the function of genes. A powerful method used for this purpose is a DNA probe array or DNA probe chip, in which a large number of DNA probes are compartmentalized by type and immobilized on a solid surface (these are also sometimes referred to as an oligo chip, because what is actually immobilized is oligonucleotide derivatives). The concept of protein chips in which antibodies and antigens are arrayed and immobilized on a substrate instead of DNA probes has also been put into practical use. For example, a system for allergen testing has been put into practical use for medical testing purposes, in which allergens are detected by reacting specimen blood serum with a device comprising tens to hundreds of antigens that cause allergies (allergens) immobilized on a substrate, specifically capturing the IgM present in the serum that is involved in the antigen-antibody reactions with each antigen, reacting it with an enzyme-labeled secondary antibody that binds to the IgM, and measuring the enzyme activity by incorporating chemiluminescence.

[0003]

Methods of making a DNA chip include the method of synthesizing oligomers of sequences designed for a large number of compartmentalized cells, base by base, using photochemical reactions and lithography as commonly used in the semiconductor industry (non-patent document 1: Science 251, 767-773 (1991)), and the method of implanting DNA probes or protein probes one by one in each compartment (non-patent document 2: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4613-4918 (1996)).

[0004]

Each of these chips has a structure in which compartments are defined on a plane, such as a glass slide, and a large number of probes are arranged in an array. Indexing as to the position at which any given probe is located is generally performed solely on the basis of the physical location at which the probe is immobilized.

[0005]

For detection, in DNA chips and similar, fluorescent dyes are overwhelmingly used as labels. As mentioned above, in protein chips, detection is often performed with a chemiluminescence or bioluminescence system using enzyme labels, and various methods have been put into practical use, such as fluorescent label detection and electrochemiluminescence detection.

[0006]

In the electrochemiluminescence method, an antibody for antigen capture is present on the surface of the electrode. A ruthenium complex is used as the label for antibodies for sandwiching (non-patent document 3: Clin. Chem., 37, 1534-1539 (1991)). On the surface of the electrode, the ruthenium is oxidized, and electrons of the ruthenium which entered an excited state upon reduction through coupling with TPA in a redox reaction emit light upon falling back to ground state.

[0007]

[Non-patent document 1] Science 251, 767−773 (1991)
[Non-patent document 2] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4613−4918 (1996)
[Non-patent document 3] Clin. Chem., 37, 1534−1539 (1991)

[Disclosure of the invention]

[Problem to be solved by the invention]

[0008]

According to the above-mentioned prior art, methods for the identification and detection of mRNA, which is a gene transcription product, and of proteins, which are a translation product, using DNA probe chips or protein chips have been thoroughly investigated, and measurements can be performed provided that a sample in the form of a solution can be prepared by some method. For allergen testing based on specimen serum as described with respect to the prior art above, serum samples are used. For mRNA testing, RNA components are extracted in advance from a cell specimen of sufficiently large quantity, cDNA is synthesized by reverse transcription reaction with reverse transcriptase, and amplification is performed by PCR amplification and cRNA synthesis. Furthermore, during complementary strand synthesis, labeled dNTPs are incorporated to obtain a large amount of labeled DNA strands. Recently, the mainstream method has been to incorporate aminoallyl dNTP and then react fluorescent dye with the amino groups to obtain fluorescently labeled DNA strands. The fluorescently labeled DNA strands thus obtained are hybridized to a so-called DNA chip to analyze various expression genes. In this way, analysis is possible only when a solution sample can be obtained in advance.

[0009]

When dealing with situations where cells account for a large part of the specimen, there are cases where the operation of putting the cellular constituent material to be measured into a solution state in itself poses a problem. In multicellular organisms, cells establish overall balance through mutual interaction with adjacent cell groups, so when a cell group is crushed into a uniform state, the localized information of the individual cells is lost. Furthermore, mRNA, which is an expression gene, is localized even within individual cells, and protein, which is the final product, is also localized within cells according to its function. These local mRNA and proteins are altered by cell activity, i.e., communication with adjacent cell groups, and also vary with the environment in which they are placed. That is, in order to describe biological functions more accurately and obtain information useful for medical testing and drug discovery, it is necessary to quantitatively detect mRNA and protein localized between cells and within cells while retaining local spatial information.

[0010]

Namely, it is an object of the present invention to provide a cellular constituent material analysis chip and a cellular constituent material analysis system and method that make it possible to overcome the above-mentioned problems and perform quantitative determination of mRNA and protein localized between cells and within cells without losing local spatial information.

[Means for solving the problem]

[0011]

In the present invention, to implement a method which minimizes degradation of mRNA or expressed proteins and eliminates the need for concentration dilution, the contents of a cell are first captured on a substrate or electrode with the cell being projected two-dimensionally. For this purpose, electrophoretic force can be utilized. In other words, cell contents are attracted to the electrode surface at the same time as the cells are destroyed by sandwiching the cells between two electrode sheets having an extremely thin gap and applying an electric field. Alternatively, using UV light for cell destruction is also effective. UV light of about 350 nm is not absorbed by water that serves as a solvent, but is absorbed by cells. For this reason, cells can be solubilized without boiling the solvent. At this time, electrophoretic force is also used to capture the contents of the biological material in a two-dimensionally projected form.

[0012]

With any method of cell destruction, in order to capture the contents of biological material in a two-dimensionally projected form, it is important that the lines of electric force be formed substantially perpendicular to the electrode plane. In other words, it is necessary for the electrode surface area to be sufficiently large compared to the size of the cell. In addition to this condition, if the distance between the electrodes is on the order of tens of μm, such that convection does not occur readily, the intracellular material will move substantially perpendicularly to the electrode plane. Material that binds to mRNA, such as poly T for mRNA capture, is immobilized on the surface of a substrate or electrode for capturing the contents of biological material. In the case of proteins, cations such as amino group and anions such as carboxyl groups that are densely introduced onto the surface are used to electrostatically immobilize the protein. Alternatively, the surface of the electrode can be covered with hydrophobic residues, and proteins can be immobilized all at once on the substrate surface by using the force of binding between the hydrophobic portions of the proteins using the exclusion energy of water molecules.

[0013]

When the object of determination can be anticipated, by immobilizing the corresponding DNA probes in advance on

the substrate, more accurate measurement is made possible. For example, a sequence of SEQ ID NO: 1 immobilized as a probe can be used to determine the intracellular distribution of mRNA from Homo sapiens paraoxonase 1 (PON1). Furthermore, by immobilizing a plurality of DNA probes on a substrate, mRNA sequences for a plurality of measurement parameters can be captured on the substrate. CGAAGCACCT CTGATGCAGG AGGATTCTCT GAGTCATAGA AGAAGATTTT: (SEQ ID NO: 1)

The present invention can also be applied to tissue-like specimens in which cells are aggregated. However, it is desirable for tissue-like specimens to contain a single layer of cells. Assume that ten cells are lined up in a row in a virtual tissue-like specimen. When the specimen is sandwiched between two electrodes and subjected to an electric field while being irradiated with UV, biological material from the individual cells is immobilized on the electrode surface while retaining two-dimensional information corresponding to the individual cells.

[0014]

As a second method for capturing and immobilizing the contents of biological material on a substrate, a method for instantaneously evaporating the water content of a cell to immobilize it without relying on electrodes is also effective. In this case, mRNA and proteins can be immobilized without disrupting the arrangement of cells by exposing the cells, arranged on a substrate, to high temperature to evaporate the water content. Of course, intracellular mRNA and proteins can also be immobilized while retaining intracellular two-dimensional information. Alternatively, desiccation may be performed after instantaneously freezing with liquid nitrogen. Alternatively, cells may be immobilized using reagents such as formaldehyde or glutaraldehyde. In the case of immobilization using formaldehyde or glutaraldehyde, in particular for mRNA analysis, this can be achieved by immobilizing the cells with formaldehyde, then subjecting to the action of a proteolytic enzyme such as trypsin to destroy the cell membrane surface and structural proteins so as to enable hybridization with mRNA immobilized on nanoparticle labeled probes, described later, and analyzing the reacted nanoparticles as a two-dimensional surface. Any of these methods allows subsequent detection of mRNA and proteins.

[0015]

In the second immobilization method, mRNA and proteins are immobilized on the substrate at the same time. Since cell destruction and immobilization are performed rapidly, one need not be concerned much about mRNA degradation by RNase, which is a problem when detecting mRNA. After immobilization, more precise mRNA detection is made possible by performing the operation of washing the substrate with an RNase inhibitor to eliminate RNase activity. Since common proteins are in many cases immobilized in a denatured state, there is no need to worry about degradation by protease.

[0016]

In the second immobilization method, in addition to mRNA and proteins, the genome is also immobilized on the substrate at the same time, so quantitative data including spatial information on mRNA and protein expression of the same cell on the same substrate can be obtained by reacting with the corresponding nanoparticle-tagged probes. Specific genes of the genome present in the nucleus can also be differentiated from mRNA and detected simultaneously.

[0017]

In the present invention, regardless of the method of immobilization used, intracellular material is immobilized on a substrate or electrode in a two-dimensional plane while retaining location information. Here, in the case of two-dimensional immobilization of intracellular material from one cell, different probes can be immobilized in each compartment element in the manner of a DNA chip or protein chip to identify the biological material of interest at the location of the element. Therefore, labeled probes that selectively bind to the intracellular material immobilized in a two-dimensional plane are utilized, and an appropriate identifier is provided to identify the immobilized intracellular material.

[0018]

In the case of two-dimensional immobilization of intracellular material, if the purpose is to obtain location information sufficient for differences between individual cells to be measured, two-dimensional location information and quantity of each biological material at the cell level can be determined by retaining individual cells in separate compartments while maintaining cell interaction, and arranging a plurality of probes in spots, as in the case of conventional DNA microarrays and protein chips, for each individual compartment. In this case, as in the case of two-dimensional projection and measurement of intracellular material described above, labeled probes are employed, which selectively bind to the intracellular material that is immobilized through affinity to a plurality of probes disposed in each cell immobilization compartment while maintaining the arrangement of the cells, and an appropriate identifier is

provided to identify the immobilized intracellular material.

[0019]

An appropriate identifier is, for example, a fluorescent molecule, which is detected through single-molecule detection. More readily, fluorescent nanoparticles are used as an identifier to count fluorescent points on a substrate. Discrimination of the object of measurement can be achieved by distinguishing differences in the type and intensity of the fluorescent substance with which the corresponding probe is labeled. Alternatively, nanoparticles may be used. Nanoparticles of different particle diameters and different elemental compositions are used according to the object of measurement. This makes it possible to quantitatively measure intracellular distribution while distinguishing the of object of measurement by counting the type and number of nanoparticles added to the reacted probes relative to the two-dimensional projection plane of the cell.

[Effect of the invention]

[0020]

According to the present invention, mRNA and protein expressed in cells and the genome that carries the respective information can be detected at the molecular level, including intracellular and intercellular location information and quantity.

[Best mode for carrying out the invention]

[0021]

The average size of animal cells is approximately 10 to 30 μm. They contain over 20,000 genes are express hundreds of types of mRNA consisting of at least several tens of molecules. Some consist of over 100,000 molecules, but there only a few such types. Many of the genes that are expressed in large amounts are housekeeping genes, which are constantly expressed in a substantially fixed quantity within cells. Therefore, the object of interest of the present invention is genes for which the number of expressed mRNA molecules varies depending on the state in which the cell is placed and for which the number is not particularly high.

[0022]

Assuming that 100 molecules are expressed, it is impossible to detect them without amplification when using methods such as those of conventional DNA chips. This is because the cells are crushed and become degraded or diluted at the stage of extracting mRNA, as a result of which hybridization would kinetically require nearly infinite time.

[0023]

In the present invention, the contents of a cell are captured directly on a substrate or electrode, with the cell being projected two-dimensionally. Specific embodiments will be described below with reference to the drawings.

[0024]

(Embodiment 1)

FIG. 1 (A) is a plan view showing the cellular constituent material isolation chip of embodiment 1, and (B) is a cross-sectional view in the direction of the arrow at the A-A position of FIG. 1 (A). (C) is another example of a cross-sectional view seen in the direction of the arrow at the A-A position of (A). Reference numeral 1 is a quartz substrate, on the top surface of which there is formed a 5 μm thick agarose gel membrane 4, and compartments 5 for cell retention are formed at predetermined intervals. The size of the compartments 5 is, for example, 30 μm square, which is from 9-fold the size to equal to the size of the aforementioned animal cells, assuming their average size to be 10 to 30 μm□. FIG. 1 shows the state of the cells 7 arranged in some of the compartments 5. The compartments 5 are connected to each other, if necessary, by means of grooves 6, allowing for mutual interaction between the cells 7 retained in the compartments 5. Furthermore, a transparent electrode 2 made of indium tin oxide (ITO) is formed at a position corresponding to each compartment 5 on the top surface of the substrate 1. The transparent electrode 2 may be fabricated by depositing gold or platinum or chromium so that light transmittance will be about 30 to 70%. The size of the electrode 2 is substantially equal to the size of the compartment 5. A glass substrate 1′ is provided on the top surface of the agarose gel membrane 4. The substrate 1 and the substrate 1′ have a structure wherein a certain spacing is maintained by means of a spacer 8. The spacer 8 is pre-attached to the substrate 1′ and is installed by pressing against the glass substrate 1. Here, it is better to remove in advance the agarose gel in the portion of the substrate 1 that contacts the spacer, but if the thickness of the agarose gel 4 is thin as in (C), it suffices to attach the spacer by pressing over the gel. At the location of the compartments 5 of the glass substrate 1′, there is provided a counter electrode 2′ corresponding to the electrode 2. The quartz substrate 1 and the glass substrate 1′ are provided respectively with an electrode 2 and an extraction electrode 3 connected to the counter electrode 2′. It should be noted that the agarose gel membrane 4 of the quartz substrate 1 can be easily machined

by heating through application of focused light, making it easy to form the compartments 5 and the grooves between the compartments 5. Different types of cells that are placed in the compartments 5 can be made to interact with each other at any stage by forming a groove connecting the respective compartments 5 with focused light during culture.

[0025]

Assuming the spacing between the opposing substrates 1, 1′ with electrodes is 0. 1 mm, the area of a compartment 5 sandwiched between the two substrates with electrodes will be a space of approximately 0. 03 × 0. 03 × 0. 1 mm, so that when a buffer solution or culture solution is filled into the compartments 5, and cells 7 are inserted one by one, one cell will be present in the space sandwiched between the electrodes. As a first example of FIG. 1, an example of a cellular constituent material isolation chip for floating cells is shown. Here, neuronal cells, i.e., neuronal stem cells, in a floating state suspended in culture solution are removed one by one from the suspension and are inserted into the compartments 5 and sandwiched with two substrates 1, 1′. To prevent adhesion of neuronal stem cells, on the bottom of the compartments 5, there is provided a no more than 0. 5 μm thick, 0. 05% or lower concentration agarose membrane 9 for cell attachment prevention. Such thin agarose membranes allow free permeation by mRNA and the like. If necessary, compartments 5 are connected with a groove 6′. As shown in the cross-sectional view presented in FIG. 1 (B), the agarose gel membrane 4 is formed to separate the substrates 1 and 1′, and the compartments 5 are made into independent spaces to create a structure for retain floating cells in the space 5. The two substrates 1, 1′ have a structure that can transmit 350 nm lasers. When the light absorption at 350 nm of the electrode is high, the problem can be solved by fashioning the electrode in a lattice shape or making the thickness of the thin metal film 5 nm or less so as to allow partial transmission of light.

[0026]

As a second example in FIG. 1, human COS cells 7 suspended at a concentration of 105 cells/ml in PBS are removed one by one from the suspension and are inserted at two locations into compartments 5, and sandwiched with two substrates 1, 1′. Since the COS cells 7 are implanted at a location where there is no agarose gel membrane 4, they will adhere to the substrate 1 in the compartments 5 as shown in the cross-sectional view in (C). For this reason, even if the agarose gel membrane 4′ is thin, as shown in (C), and the compartments are not completely separated from each other, a cell will not move to the adjacent compartment, and the interaction between the cells will not occur outside the groove. If necessary, compartments 5 are connected with a groove 6′. Of course, it is also possible to form an agarose gel membrane 4 to separate the substrates 1 and 1′, and make the compartments 5 into independent spaces to create a structure for retaining cells in the space 5 as shown in the cross-sectional view presented in FIG. 1 (B). In this case, a tunnel 6 is created instead of a groove between compartments.

[0027]

The two substrates 1, 1′ have a structure that can transmit 350 nm lasers. When the light absorption at 350 nm of the electrode is high, the problem can be solved by fashioning the electrode in a lattice shape or making the thickness of the thin metal film 5 nm or less so as to allow partial transmission of light.

[0028]

It should be noted that in FIG. 1, the spacer 8 is shown in a form that surrounds the entire circumference of the area where the compartments 5 are provided, but in the example of FIG. 1 (B), the spacer is made such that the substrate 1′ does not compress the agarose gel membrane 4 too strongly, and in the example of FIG. 1 (C), it may be arranged intermittently to a sufficient degree to ensure that the distance between the substrates 1 and 1′ is maintained. In this case, the distance between the substrates 1 and 1′ is small, so even in the example of FIG. 1 (C), the culture solution is not lost by outflow.

[0029]

FIG. 2 (A) is a cross-sectional view of a cell arranged in a compartment 5 sandwiched between two substrates 1, 1’ for floating cells. Here, a case in which non-adherent cells are used will be described. The cell 22 is trapped in a space delimited by the substrates 1 and 1′ and the agarose gel membrane 4. In this example, the thickness of the agarose gel membrane 4 is 0. 1 mm, and the spacing between the substrates 1 and 1′ is also 0. 1 mm. The grooves 6 are for connecting the respective compartments 5 and establishing interactions between cells, and are created at one’s discretion during culture. The grooves 6 have a cross-sectional area through which the cells cannot pass. On the inner side of the two opposed substrates, an electrode 2 is fixed to substrate 1, and probes 20 are immobilized on the surface of the electrode 2. Although the probes 20 are immobilized in a substantially embedded state in the agarose gel membrane 9, the agarose concentration is low, so that mRNA, cDNA, and the like can freely access the probes. Here, the probes 20 are made of

poly T. An electrode 2′ is present on the surface of the substrate 1′. The compartments 5 are delimited by an agarose structure 4, but may be connected as needed using tunnels 6. A buffer solution or culture solution is filled into the compartment 5, and a cell 22 is inserted. When a 355 nm pulsed laser 21 is irradiated onto the compartment 5 where the cell 22 is present from the top surface of the glass substrate 1′, the cell 22 is destroyed. It should be noted that since the electrodes 2, 2′ are intended for applying an electric field, they may also be located on the back side of the substrates.

[0030]

FIG. 2 (B) schematically illustrates the process whereby the cell in the compartment 5 is destroyed by the pulsed laser 21, and at the same time, a power supply 60 is used to apply an electric field (1. 2V) between the electrodes 2, 2′, drawing nucleic acids 23, such as mRNA and DNA, in the direction of the positive electrode 2. Much of the content of the cell, such as proteins 25, moves to the negative electrode 2′ or remain in place without moving. When an electric field is applied, a pH gradient is formed between the electrodes. Nucleic acids with low pK can move to the positive electrode, but other components with pK that is not particularly low cannot reach the positive electrode because their charge is neutralized.

[0031]

FIG. 2 (C) is a diagram schematically illustrating a state in which time has elapsed from the state of FIG. 2 (B). As time passes, nucleic acids 23 such as mRNA and DNA hybridize to the poly T probes 20 on the substrate.

[0032]

FIG. 3 is an example of a human COS cell that is an adherent cell. FIG. 3 (A) is a cross-sectional view of a cell arranged in an adhered state in a compartment 5 sandwiched between two substrates 1, 1'. The cell 22′ is trapped in a space delimited by the substrates 1 and 1′ and the walls 4-1, 4-2 of the agarose gel membrane. Since the cell is adhered to the bottom surface of the compartment, it will not enter an adjacent compartment even if the area above is open. This is because a cell cannot adhere to areas substantially coated with an agarose gel membrane, and thus cannot migrate to an adjacent compartment. Regarding the thickness of agarose for preventing such cell migration, 0. 5 μm is essentially sufficient. In this example, the thickness of the agarose gel membrane is 3 μm, and the spacing between the substrates 1 and 1′ is 0. 1 mm. The groove 6-1 is for connecting the respective compartments 5 and establishing interactions between cells, and is created at one's discretion during culture. The groove 6-1 has a width through which the cells cannot pass. On the inner side of the two opposed substrates, an electrode 2 is fixed to substrate 1, and probes 20 are immobilized on the surface of the electrode 2. Here, the probes 20 are made of poly T. An electrode 2′ is present on the surface of the substrate 1'. The compartments 5 are delimited by an agarose structure 4-1, 4-2, but may be connected as needed using tunnels 6-1. A buffer solution or culture solution is filled into the compartment 5, and a cell 22 is inserted. When a 355 nm pulsed laser 21 is irradiated onto the compartment 5 where the cell 22 is present from the top surface of the glass substrate 1′, the cell 22 is destroyed. It should be noted that since the electrodes 2, 2′ are intended for applying an electric field, they may also be located on the back side of the substrates.

[0033]

FIG. 3 (B), similarly to the example in FIG. 2, schematically illustrates the process whereby the cell in the compartment 5 is destroyed by the pulsed laser 21, and at the same time, a power supply 60 is used to apply an electric field (1. 2V) between electrodes 2, 2'. While nucleic acid components 23, such as mRNA, remain near the bottom surface of the substrate to which the cell has adhered, much of the contents of the cell, such as proteins 25, migrate toward the negative electrode 2′. When an electric field is applied, a pH gradient is formed between the electrodes. Nucleic acids with low pK can furthermore migrate toward the positive electrode and hybridize to the probes (poly T) on the substrate, but other components with pK that is not particularly low cannot reach the positive electrode because their charge is neutralized.

[0034]

FIG. 3 (C) is a diagram schematically illustrating a state in which time has elapsed from the state of FIG. 3 (B). As time passes, nucleic acids 23 such as mRNA and DNA hybridize to the poly T probes 20 on the substrate.

[0035]

The probe immobilization method will be described. For the substrate to be used by affixing over a normal electrode

or an electrode on which poly T probes 20 have been immobilized, a substrate is fabricated having a polymer layer prepared by polymerizing two monomers. In this substrate, the polymer layer has a structure wherein a first monomer having a first functional group for polymerization at two locations and a second monomer having a second functional group for polymerization at two locations are arranged in alternating fashion, and wherein one of either the first monomer or the second monomer has a biological material capture residue. Specifically, the substrate is polymerized by reacting alkyl diisocyanate as the first monomer and diaminophenyl acetate as the second monomer at an equimolar ratio. In this case, the first functional group is an isocyanate group and the second functional group is an amino group. For example, hexamethylene diisocyanate can be used as the alkyl diisocyanate. Furthermore, the biological material capture residue is a carboxyl group of diaminophenyl acetate, which is the second monomer. The polymerized thin film is thus polyurea. With respect to polymerization conditions, a thin film of the polymer can be formed on the substrate by applying a mixed solution of the two monomers with a spin coater and then baking at a predetermined temperature (150 °C to 200 °C). Alternatively, an existing vacuum deposition method (Jpn. J. Appl. Phys. 33, L1721-L1724 (1994)) can be used. The polyurea thin film formed on the substrate in this way is a structure in which alkyl diisocyanate and diaminophenyl acetate monomers alternately react to form the polyurea thin film, so that side chain carboxylic acid groups are present at relatively uniform intervals. The interval of the carboxyl group to be introduced can be adjusted by adjusting the length of the alkyl groups. This also makes it possible to form a thin film having functional groups on electrodes made of gold, platinum, etc., introducing functional groups to the surface of which has been problematic conventionally. Using a carbodiimide-based activator, a probe having amino groups as biological material capture residues may be directly immobilized to carboxyl groups that have been introduced into the substrate. Alternatively, when ethylenediamine is reacted with this side chain carboxyl group in the presence of a dicyclohexylcarbodiimide-based activator, a primary amine residue can be introduced into the side chain carboxyl groups at high yield. In other words, primary amines take on a state in which they are lined up on the surface of the substrate at substantially constant intervals. The primary amine is then modified with 1,4-phenylene diisothiocyanate as described in Nucleic Acids Research,27,1970−1977 (1999) and CHEMBIOCHEM 2, 686−694 (2001) to introduce isothiocyanate groups to the surface. Finally, poly T (T_{25}) with an amino group at the 5′ end is reacted. These reaction conditions are detailed in the above literature. The above method yields an electrode 2 (substrate) on which the poly T has been immobilized at intervals of about 9 nm.

[0036]

Alternatively, a substrate having a polymer thin film with different alternating functional groups can be fabricated by polymerizing, as the two monomers, an alkyl diisocyanate having on its side chain a residue comprising an SH group protected by an alkyl group as a first functional group, and diaminophenyl acetate having a carboxyl group as a second functional group. The protected SH group used can be made, for example, by introducing an SH protecting group as used for peptide synthesis. Alternatively, protection can be provided in the form of a pyridyldithio group. In the following case, a substrate prepared using a monomer with protection of the SH group provided in the form of a pyridyldithio group will be described. After forming the polymer on the substrate, first, the carboxyl groups are reacted with ethylenediamine in the presence of a dicyclohexylcarbodiimide-based activator, and are then reacted with 1,4-phenylene diisothiocyanate and further reacted with a first oligomer of a particular sequence having an amino group at the 5′ end to immobilize the oligomer. The SS bond is then reduced using dithiothreitol to expose the SH group to the alkyl group portion on the substrate. Reacting a second oligonucleotide having a maleimide group in an aqueous solution at a pH of about 6 causes the double-bond portion of the maleimide to react with the SH group on the substrate, making it possible to immobilize the second oligonucleotide with a thioether bond. In this example, there is the advantage that a substrate having multiple probe DNA introduced into the same substrate at substantially constant intervals can be obtained. That is, mRNA having two types of complementary sequences can be captured on the same plane. Gold nanoparticles of different particle diameters may be used to distinguish between the two types of mRNA.

[0037]

In embodiment 1, polyurea having a carboxyl group was formed on the substrate and used, but besides this, any polymer may be used that has a residue that allows for periodic introduction into the side chain of a reaction group such

as a polynucleotide or peptide, which can serve as a probe, so as to allow immobilization thereof. For example, if the combination of two monomers is acid anhydride having the structure R_1-C=O-O-O=C-R_2-R_3-C=O-O-O=C-R_4 (where R_1 to R_4 are arbitrary residues) and a diamine monomer having the structure NH_2-R_5-NH_2 (where R_5 is an arbitrary residue), a diaminophenyl acetate monomer having a carboxyl group at R[g12]5[/g12] can be used. As the acid anhydride, a structure such as 4,4′-hexafluoroisopropylidene bisphthalate anhydride can be used.

[0038]

An example of such polymers would be polyimides. As polyimides, bis-anhydrous phthalates and bis-amino compounds of this sort are generally used. Alternatively, a polyamide can be utilized to form a film on the substrate by vapor deposition polymerization of a monomer having a carboxylic acid residue at an aliphatic position of an aliphatic diamine, such as 1,10-diaminodecane or diaminophenyl acetate having a long carboxyl group, and terephthaloyl dichloride, which is a dichloride monomer. Various reactive residues may be introduced into the long-chain aliphatic diamine for probe immobilization. Deposition polymerization may be carried out on the basis of an existing method, for example, Jpn. J. Appl. Phys. 33, L1721–L1724 (1994), Thin Solid Films, 215, 94–97 (1992), with consideration to the gasification conditions for the monomers used.

[0039]

[FIG. 4] is a diagram intended to explain a method for identifying mRNA groups captured on the poly T probes 20 on the surface of an electrode 2 as shown in FIG. 3 (C). Although FIG. 3 (C) is an example of a cellular constituent material isolation chip using adherent cells, as mentioned earlier, if the probes 20 are immobilized in a state embedded in an agarose gel membrane 9 with a low agarose concentration, mRNA, cDNA, and the like can freely access the probes 20, so the following procedures and descriptions apply equally also to the case of the structure presented in FIG. 2 (C) for floating cells.

[0040]

First, the upper glass substrate 1′ is removed, the insides of the compartments 5 formed in the agarose gel membrane 4 on the top surface of the quartz substrate 1 are washed, and material that did not hybridized to the poly T probes 20 on the electrode 2 is removed. Next, the mRNA 23 that hybridized to the poly T probes 20 can be of a variety of different types, so a mixed solution of labeled probes is added for identifying these types. After incubation at 45 °C for 3 hours, washing is performed with pH 7 citrate buffer solution containing 10 mM NaCl. In this state, on the electrode 2, the mRNA group that hybridized to the poly T probes 20 and the labeled probes 31, 32, 33 hybridized to each mRNA are in a three-body bonded state. The labeled probes 31, 32, 33 are provided with easily identifiable labels 31′, 32′, 33′. Accordingly, the types and amounts of mRNA immobilized on the poly T probes 20 on the electrode 2 are measured by counting the labels 31′, 32′, 33′.

[0041]

In other words, as mentioned earlier, since the intracellular material is immobilized on the substrate or electrode in a two-dimensional plane while retaining location information, it is not possible to immobilize different probes in each compartment element in the manner of a DNA chip or protein chip to identify the biological material of interest at the location of the element. Therefore, mRNA immobilized on the two-dimensional plane needs to be identified using a labeled probe with a label that hybridizes to the mRNA.

[0042]

FIG. 5 is a diagram schematically showing how the labels 31′, 32′, 33′ of mRNA immobilized on the probes 22 on the electrode 2 can be recognized in a two-dimensional plane in relation to the contour 41 of the cell 22 in accordance with the present invention. Reference numerals 61−63 are markers attached to the electrode 2 (or substrate 10). The data for the state of FIG. 5 is obtained by the following procedure.

(1) The cell is arranged in the compartment 5 formed in the agarose gel membrane 4 on the top surface of the quartz substrate 1 and the necessary culturing is performed.

(2) After culture, the cell 22 is imaged with a CCD camera from the back of the electrode 2 through a microscope.

(3) A 355 nm pulsed laser 21 is irradiated onto the compartment 5 where the cell 22 is present.

(4) After the irradiation of the pulsed laser 21, an electric field is applied between the electrodes 2, 2′ by means of the power supply 60.
(5) After going through the procedure of washing and anchoring of the labeled probes explained in FIG. 4, imaging is again performed with a CCD camera from the back of the electrode 2 through a microscope.
[0043]

Namely, data is obtained for the contour 41 of the cell 22 and the markers 61−63 through the initial imaging operation, and is stored as image data on a computer. The data for the labels 31′ , 32′ , 33′ and the markers 61−63′ of the mRNA immobilized on the probes 22 in the second imaging operation can then be obtained, which is saved to the computer as image data. If the computer performs image processing in which the two data are superimposed so that the markers match, data showing the relative locations of the contour 41 of the cell 22 and the mRNA (labels 31′, 32′, 33′) can be obtained as an image.
[0044]

Following the above method, mRNA from one cell is immobilized on a substrate in a two-dimensionally projected form, and labeled probes are designed from the sequence of the portion spanning the final exon and the exon before the final exon of the mRNA of EpCAM expressed in epithelial carcinoma cells (colorectal origin) and the sequence corresponding to the intron portion of the EpCAM gene genome, and similarly from the sequence of the portion spanning to the exon before the final exon of CD44 mRNA and the sequence of the intron portion of the CD44 genome, to attempt quantitative measurement of the distribution thereof within a single cell. Probes of EpCAM mRNA and of the intron portion of EpCAM gene genome are bonded respectively to 10 nm and 50 nm gold nanoparticles, and 20 nm and 70 nm gold nanoparticles are bonded as indexing markers (labels) to CD44 mRNA and CD44 genome intron portion probes. The particle size distribution of the particles used is within CV = 2%.
[0045]

A poly T probe for mRNA capture is immobilized on the electrode 2, a 355 nm pulsed laser 21 is irradiated onto the cell 22 in the compartment 5 to destroy the cell 22, and the entire mRNA is immobilized on the electrode 2 by the above method of capturing mRNA on poly T probes using an electric field. At this time, the intracellular mRNA is immobilized in a form that is projected onto the substrate, so that intracellular location information can be maintained. The cell 22 is adhered to the electrode 2 by placing the aforementioned epithelial cell into the compartment 5 and culturing it in a culture medium supplied to the compartment 5 in a 5% carbon dioxide, 11% oxygen atmosphere for 1 day. The position of the immobilized cell is confirmed with a microscope in advance, and imaged with a CCD camera from the back of the electrode 2 through a microscope and digitized. In this state, the physical surfaces with which the cell is in contact will be the surface of the electrode 2 to which the cell is adhered and the surface that contacts the culture medium. Thus, the data obtained in the present invention, in which mRNA and the like is projected two-dimensionally, is a two-dimensional projection onto the adhesion surface of the cell immobilized on the substrate. That is, intracellular functions will differ on the surface where the cell is bonded to the substrate and the surface where the cell is in contact with the solution. Since the intracellular material distribution can always be measured using the adhesion surface as a reference plane, useful information can be obtained even when the projection is two-dimensional rather than three-dimensional.
[0046]

To the probes 20 on the electrode 2, a suspension of the labeled probes 31, 32, 33 for EpCAM and CD44 mRNA and genomic sequences using gold nanoparticles as indexing markers 31′, 32′, 33′ is added to the compartment 5 in which polynucleotides 23 such as mRNA and genomic DNA are captured, and the polynucleotides such as mRNA and genomic DNA are hybridized. Regarding the hybridization conditions, for efficient hybridization without aggregation of gold nanoparticles, the hybridization may be performed under conditions of 10 mM citrate buffer solution containing 100 mM NaCl, pH 7. 4. As a result, results are obtained as can be seen in the schematic diagram of FIG. 6. In FIG. 6, the indexing markers (gold nanoparticles) are represented in deformed fashion so as to clarify their positional relationship to the cell.
[0047]

A carcinoma cell derived from colorectal carcinoma that was adhered in the compartment 5 for retaining cells formed on the substrate 1 with an agarose gel membrane 4 was observed under a microscope in advance, and the cell boundary and nucleus boundary as digitized with a CCD camera are represented by 41 and 42, respectively. The cell is crushed with a 355 nm pulsed laser 21, and the polynucleotide component is immobilized on the electrode 2 by means of an

electric field generated by voltage applied between the electrodes 2, 2′. Furthermore, here, the top of the electrode 2 is observed under a scanning electron microscope and digitized to allow the distribution of gold nanoparticles 43 to 46 of four sizes to be observed. Judging from the difference in size, it may be concluded that 43 is detecting a polynucleotide having a sequence corresponding to the intron of the EpCAM gene and 44 is detecting a polynucleotide having a sequence corresponding to the CD44 gene. These are mainly detected in the nucleus. The intron sequences detected in the nucleus can be concluded to be derived from sequences in the genome and immature mRNA transcribed from the genome. Particles 43′ and 44’ that recognize small amounts of intron sequences are detected in the cytoplasm, but these can be concluded to have been detected before the introns cut off from immature mRNA were degraded. Since gold nanoparticles 45 and 46 are not present in the nucleus but are present in the cytoplasm, they can be concluded to be mature mRNA of EpCAM and CD44, respectively. This is because introns drop out from mature mRNA.

[0048]

In this way, in the present invention, each particle can detect genomic gene sequences, immature mRNA and mature mRNA by molecule.

[0049]

(Embodiment 2)

In embodiment 2, a method for instantaneously fusing a cell onto a substrate is utilized, rather than relying on a laser for cell disruption and on electrolysis for moving cellular constituent material. FIG. 7 (A) is a plan view showing the cellular constituent material isolation chip of embodiment 2, and (B) is a cross-sectional view in the direction of the arrow at the A-A position of FIG. 7 (A). Reference symbol 10 is a substrate. In embodiment 2, instead of quartz, the substrate 10 is a substrate having alternating hydrophobic groups and amino groups with a positive charge, with two monomers being polymerized in alternating fashion so that mRNA and expressed proteins can be adsorbed and immobilized at the same time. For example, methylene diphenyl 4,4′-diisocyanate having a benzene ring as a hydrophobic residue as the first monomer, and diaminophenyl acetate as the second monomer, as presented in embodiment 1, are reacted at an equimolar ratio to polymerize the monomers. Alternatively, the above-described diaminophenyl acetate monomer and 4,4′-hexafluoroisopropylidene bisphthalate anhydride may be polymerized to alternately introduce hydrophilic groups and hydrophobic groups.

[0050]

In this state, hydrophobic residues are present on the surface of the substrate, but there are no residues that are charged positively, so the carboxyl group of diaminophenyl acetate is converted to an amino group. In other words, ethylenediamine is reacted with a carboxyl group in the presence of a dicyclohexylcarbodiimide-based activator to convert the carboxyl group into a primary amine residue (amino group). In this way, a substrate having a surface consisting of a polymer thin film alternating between hydrophobic residues and amino groups can be obtained. Here, a substrate having a polymer thin film having alternating amino groups and hydrophobic residues may be used, but a substrate having a thin polystyrene film or nylon, which is a polyamide, polymerized on the substrate, may also be used.

[0051]

On the substrate 10 prepared in this manner, similarly to embodiment 1, a 100 μm thick agarose gel membrane 4 is formed, and compartments 5 for cell retention are formed at predetermined intervals. The size of the compartments 5 is, for example, 30 μm square. The compartments 5 are connected to each other, if necessary, by means of tunnels 6, allowing for mutual interaction between the cells retained in the compartments 5. In embodiment 2, there is no electrode 2 and no top surface glass 1′.

[0052]

As in embodiment 1, a buffer solution or culture solution is filled into the compartments 5, cells are arranged therein, and if necessary, the cells are cultured under predetermined conditions. After lightly draining the substrate 10 with cells adhered thereto, the substrate is exposed to a dry helium atmosphere at 160°C. As a result, the cells are instantaneously desiccated and anchored to the surface of the substrate 10. Alternatively, the substrate 10 with cells adhered thereto may be desiccated after instantaneously freezing with liquid nitrogen. Alternatively, cells may be immobilized using reagents such as formaldehyde or glutaraldehyde. In this way, intracellular mRNA and proteins can also be immobilized while retaining intracellular two-dimensional information. The substrate is then immersed in 70% alcohol to remove small

molecular weight compounds.

[0053]

When formaldehyde or glutaraldehyde is used, the polynucleotide amine residues and protein amino groups are modified, so these may be repaired by exposing to water vapor at 100°C if necessary.

[0054]

To hybridize labeled probes to mRNA in the cytoskeleton, the cell membrane is treated to allow labeled probes to react. Here, treatment with commonly used enzymes is employed. For example, a solution containing pepsin is added, a hole is created in the surface of the cell membrane, and washing with PBS (pH 7. 4) is performed to allow the probe label to react with the mRNA.

[0055]

Simultaneous detection of EpCAM mRNA and proteins is performed using indexing probes comprising 10 nm gold particles bonded to probes for EpCAM mRNA sequences and indexing probes comprising 20 nm gold particles bonded to an RNA aptamer that binds to EpCAM protein.

[0056]

Synthesis of RNA aptamer with affinity for EpCAM is performed using an evolutionary engineering method. The method will be described. Preparation of an RNA aptamer that binds to EpCAM involves introducing a 26-base long sequence comprising a T7 promoter sequence at the 5′ end of a random 40-base sequence of single-stranded DNA, as shown in SEQ ID NO: 2, and synthesizing a sequence with an 89-base total length into which a priming site for PCR consisting of 24 bases is introduced at the 3’ end. The sequence from the 5′ side is TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAN (40) TTCGACAGGAGGCTCACAACAGG: (SEQ ID NO: 2).

Transcription into RNA is performed with RNA polymerase using a T7 promoter sequence. For transcription into RNA, 100 pmol of DNA is subjected to 100 u of T7 polymerase at a 500 μl scale. Each substrate is subjected to 3 mM 2′-F-CTP and 2′-F-UTP, and 1 mM each of ATP and GTP at 25 °C for 10 hours. DNA is degraded with DNase I after RNA transcription and the transcribed RNA product is collected through electrophoresis. The collected transcribed RNA product is subjected to thermal denaturation and is then passed, in PBS containing 2 mM $MgCl_2$ (pH 7. 4), through a sepharose CL4B column to which EpCAM has been immobilized. The bonded transcribed RNA components are eluted with a solution containing 7 M urea. The resulting transcribed RNA components are reverse-transcribed and PCR-amplified with primer pairs of sequences complementary to the known sequence portions at both ends. The resulting PCR product is again transcribed with a T7 promoter and similarly captured with a sepharose CL4B column to which EpCAM has been immobilized to collect the bonded transcribed RNA components. The step of transcription-capture-collection-PCR amplification is repeated 15 times to obtain an RNA aptamer that reacts specifically with EpCAM.

[0057]

In vitro transcription by the method described in the paper “Staining of cell surface human CD4 with 3′-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry”, included in Nucleic Acids Research 26, 3915−3924 (1998) was used to insert a thiolate group at the 5’ end of the aptamer. The thiolate group is reacted with biotin having an introduced iodoacetyl group to yield a 5′ biotinylated RNA aptamer. Streptavidin conjugate gold nanobeads are reacted to yield RNA aptamer that specifically reacts with EpCAM, with gold nanoparticles as the identifier material.

[0058]

Indexing probes in which 10 nm gold particles are bonded to a probe for an EpCAM mRNA sequence and indexing probes in which 20 nm gold particles are bonded to an RNA aptamer that binds to EpCAM protein are mixed at an equimolar ratio, and a solution, to which RNase inhibitor has been added, is added to the substrate on which cells have been immobilized. Incubation is performed at 45 °C for 2 hours. After completion of the reaction, washing is performed with cold water and observation is conducted under a scanning electron microscope or interatomic force microscope. The results obtained are shown in FIG. 8. Similarly to FIG. 6, which shows the results obtained in embodiment 1, the location of the cell membrane 51 and the nuclear membrane 52 are confirmed before cell immobilization. Gold

nanoparticles that are bonded to EpCAM mRNA based on particle diameter are shown as 55, and gold nanoparticles that are considered to be bonded to the EpCAM protein are shown as 56. In this case, it can be seen that mRNA is present in the cytoplasm. Also, although EpCAM protein is detected throughout, it can be considered to be localized on the cell surface in such cases because it is largely aggregated at the boundary of 51.

[0059]

It should be noted that in embodiment 2, in addition to mRNA and proteins, the genome is also immobilized on the substrate at the same time, so quantitative data including spatial information on mRNA and protein expression of the same cell on the same substrate can be obtained by reacting with the corresponding nanoparticle-tagged probes. Specific genes of the genome present in the nucleus can also be differentiated from mRNA and detected simultaneously. To achieve this, nanoparticles of different indexing should be used for mRNA, protein and genome. For example, nanoparticles of different particle diameters doped with various elements based on gold nanoparticles can be used for mRNA, similar particles based on silver for proteins, and similar particles based on platinum for genome. Alternatively, fluorescent nanoparticles or fluorescent-tagged branched probe DNA may be used for the genome. Rather than measuring at the same time, it is also effective to sequentially react nanoparticle-tagged probes for mRNA, protein, and genome and detect them on a time-delimited basis.

[0060]

(Embodiment 3)

Embodiment 3 is case where a tissue-like specimen of aggregated cells, e.g., a tissue slice, is immobilized on a two-dimensional plane while retaining location information of intracellular material. FIG. 9 (A) is a plan view showing the cellular constituent material isolation chip of embodiment 3, and (B) is a cross-sectional view in the direction of the arrow at the A-A position of FIG. 9 (A). The substrate 10 is prepared by freezing in advance, placing the tissue on it, then freezing and immobilizing one layer of cells, and then peeling. Alternatively, frozen cellular tissue may be made into a 2 μm thick section using a microtome and placed into a compartment 5 of the substrate 10. In embodiment 3, since it is intended for tissue-like specimens in which cells are aggregated, instead of providing cell unit compartments 5 as in embodiments 1 and 2, a compartment 5 capable of accommodating tissue-like specimens was created. The other aspects can be the same as in either embodiment 1 or 2, but in FIG. 9, the other aspects were made the same as in embodiment 2. Namely, simultaneous detection of EpCAM mRNA and proteins is performed using indexing probes comprising 10 nm gold particles bonded to the probe for EpCAM mRNA sequences and indexing probes comprising 20 nm gold particles bonded to an RNA aptamer that binds to EpCAM protein. When an attempt is made to detect EpCAM mRNA, 10 nm gold particles, believed to have bonded to the mRNA from EpCAM in a specified cell layer 81 of the tissue fragment 80, and 20 nm gold particles, believed to have bonded to EpCAM protein, are detected. The result obtained is that nothing is detected from the other location 82, or the number of gold nanoparticles detected therefrom is 1/100 or less as compared to the location of the cell 81.

[0061]

In the present invention, cells are observed as being projected onto a two-dimensional plane, so even when there are multiple cells, it is preferable that they be in a single layer. If there are two or more layers, the cellular constituent material of each layer will overlap, so the expected information cannot be obtained.

(Embodiment 4)

Embodiment 4 uses the cellular constituent material isolation chip shown in FIG. 10, which can retain multiple cells in separate compartments while maintaining interaction between the cells, similarly to embodiment 1. Here, the description will focus mainly on the aspects that differ from FIG. 1. In the area of compartment 5 (approximately 0. 05 mm × 0. 05 mm), different probes 5-1 are applied in spots. Here, a system will be described in which a total of 16 probes are created at 10 μm so as to form spots of about 5 μm. By using an inkjet, the spot diameter can be reduced to about 1 μm, so by creating spots at a pitch of 2 μm, it is possible to create a chip that can measure up to about 500 parameters simultaneously. Moreover, this chip can measure multiple cells individually. First, a cell 7 is arranged in each compartment 5 and cultured for a set period of time to create a network between cells and form an artificial tissue consisting of the cells arranged on the chip. The member 4 that demarcates the individual cell compartments is made of

agarose gel, and after the cells have been put into place, the areas between the compartments are heated with a laser to remove the agarose from this area and form a tunnel 6, in this way allowing arbitrary cells to be made to interact in an arbitrary order. Of course, it is also possible to create the cell retention compartments in advance using a photocurable resin such as SU-8. In this case, the flow paths 6 are also prepared in advance.

[0062]

In the steps described below, in order to prevent the diffusion of biological material as much as possible, it is best to fabricate a chip with sub-compartments 5-2 of SU-8, as shown in FIG. 11 in advance, creating a structure in which agarose gel thin film 4 is present between the individual compartments. Sub-compartments 5-2 of SU-8 have slits 5-3 that open in four directions, and when a groove 6 in which agarose has been removed is created between compartments 5-2, the cells 7 arranged in the compartments can create junctions 7-1 with each other using the slits 5-3 and grooves 6.

[0063]

The cells are then destroyed using UV light. In this state, especially if a biological material immobilization operation is not carried out, the biological material will spread inside the sub-compartment 5-2 demarcated essentially by SU-8. Since a demarcation of SU-8 is present, leakage of biological material outside the compartment can be minimized. Incubation is performed for a set period of time, or else a predetermined voltage is applied to the electrode 2, as described in embodiment 1, inducing affinity-bonding of the biological material to the probes 5-1 arranged in the compartment 5. Namely, materials corresponding to the 16-parameter probe will be captured at the spot locations on the substrate. The captured biological material is further classified and labeled with nanoparticle labeled probes, and the particles are counted with a scanning electron microscope or an interatomic force microscope.

[0064]

For example, three types of capture probes are immobilized as a mixture in each spot, and detection DNA probes corresponding to each capture probe are used, being labeled with nanoparticles in 10 combinations of different particle diameters and different materials. Namely, there are 16 x 10 types of DNA probes for detection, and each of the 16 types is a mixture of groups labeled with 10 types of nanoparticles of different particle diameters. Various particle diameters such as 10, 20, 30, 40, 50 nm are utilized. If gold and silver are used as materials, there will be a total of 10 types of labels.

[0065]

For example, the cell arranged in compartment 5 is destroyed with UV light following the embodiments described above, the mRNA is allowed to hybridize for 2 hours, then a nanoparticle-labeled DNA probe mixture is added, and is allowed to hybridize for 2 hours to mRNA groups thinly disposed on the substrate surface. After washing and drying, the numbers of the 10 types of nanoparticles on each spot can be counted by comprehensively scanning the nanoparticles bonded to the surface of each compartment 5 with a scanning electron microscope. As a result, it becomes possible to quantitatively analyze 160 items of mRNA per cell.

[0066]

A system utilizing aptamers as the material to be immobilized in spots for proteins or glycoproteins synthesized inside a cell will be described. For aptamers corresponding to the proteins and glycoproteins of each measurement parameter, in the present embodiment, DNA aptamers are used. Regarding the preparation method for DNA aptamers, these are prepared by the SELEX method, following known examples (J. Clin. Invest. 98, 2688−2692 (1996), Nucleic Acids Res. 24, 702−706 (1996)). Each aptamer is applied in spots in all the compartments 5 demarcated by an SU-8 structure 5-2. Since the aptamers have an amino group introduced at the 5′ end, they are immobilized on the substrate using the method described in embodiment 1. On the substrate, for example, there is immobilized an aptamer for CD62L as described in the above-mentioned J. Clin. Invest. 98, 2688−2692 (1996) and an aptamer for thrombin as described in Nucleic Acids Res. 24, 702−706 (1996). A cell 7 is inserted into each compartment 5 of the multiple cell compatible chip 1 having an aptamer spot array (5-1 in FIG. 11) prepared in this manner in all the compartments 5, with gap junctions 5-4 being formed between them to form a cell network. The cells are destroyed with UV laser and incubated for 30 minutes, whereupon the proteins and glycoproteins corresponding to the aptamers are captured at each spot in the compartments 5. Next, unreacted biological material is washed away with PBS (pH 7.4) containing 0. 05% Tween 20 and 10 mg/ml BSA. A mixture of nanoparticle labeled antibodies of various particle diameters suspended in the same solution is added to the surface of the substrate 1 and allowed to react for 15 minutes.

Each antibody is individually labeled with gold nanoparticles of different particle diameters for each type. Here, the particles binding to the antibody corresponding to CD62L are 20 nm gold nanoparticles. After the reaction, upon determining if gold nanoparticles of this particle diameter are present, 20 nm gold nanoparticles are measured at locations where aptamer for CD62L had been applied in spots. At other spot locations, only a background level number was counted.

[Sequence Listing]

SEQUENCE LISTING

<110> Onchip Cellomics Consortium

<120> A preparation chip and a preparation system for materials composed in a cell and analysis methods for materials composed in a cell

<130> NT05P0453

<160> 2

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

cgaagcacct ctgatgcagg aggattctct gagtcataga agaagatttt50

<210> 2

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> n indicates random sequence of a c g and t

<400> 2

taatacgact cactataggg agacaa nnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnttcg acaggaggct cacaacagg79

[Brief description of the drawings]

[0067]

[FIG. 1] is a plan view showing the cellular constituent material isolation chip of embodiment 1, and (B) is a cross-sectional view in the direction of the arrow at the A-A position of FIG. 1 (A).

[FIG. 2] mainly relates to a cellular constituent material isolation chip for floating cells, where (A) is a cross-sectional view of a cell arranged in a compartment 5 sandwiched between two substrates 1, 1', (B) schematically illustrates the process whereby the cell in the compartment 5 is destroyed by a pulsed laser 21, and at the same time, a power supply 60 is used to apply an electric field (1. 2V) between the electrodes 2, 2′, drawing nucleic acids 23, such as mRNA and DNA, in the direction of the positive electrode 2, and (C) schematically illustrates the state where time has elapsed since the state of FIG. 2 (B).

[FIG. 3] relates to a cellular constituent material isolation chip for adherent cells, where (A) is a cross-sectional view of a state in which a cell has been arranged in a compartment 5 sandwiched between two substrates 1, 1′, (B) schematically illustrates the process whereby the cell in the compartment 5 is destroyed by a pulsed laser 21, and at the same time, a power supply 60 is used to apply an electric field (1. 2V) between the electrodes 2, 2′, drawing nucleic acids 23, such as mRNA and DNA, in the direction of the positive electrode 2 and pulling proteins away from the substrate bottom surface, and (C) schematically illustrates the state where time has elapsed since the state of FIG. 2 (B) and the nucleic acids 23 have hybridized to the probes 20.

[FIG. 4] is a diagram intended to explain a method for identifying mRNA groups captured on the poly T probes 20 on the surface of an electrode 2.

[FIG. 5] is a diagram schematically illustrating how the labels 31′, 32′, 33′ of mRNA immobilized on the probes 22 on an electrode 2 can be recognized in a two-dimensional plane in relation to the contour 41 of the cell 22.

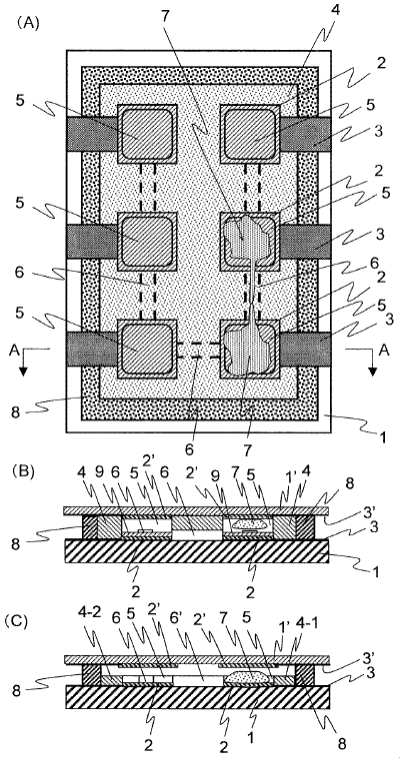
[FIG. 6] is another example diagram schematically illustrating labels of mRNA immobilized on the electrode 2.

[FIG. 7] (A) is a plan view showing the cellular constituent material isolation chip of embodiment 2, and (B) is a cross-sectional view in the direction of the arrow at the A-A position of FIG. 6 (A).
[FIG. 8] is a diagram of another example schematically illustrating labels of mRNA immobilized on a substrate.
[FIG. 9] (A) is a plan view illustrating the cellular constituent material isolation chip of embodiment 3, and (B) is a cross-sectional view in the direction of the arrow at the A-A position of FIG. 8 (A).
[FIG. 10] is a plan view illustrating the cellular constituent material isolation chip of embodiment 3.
[FIG. 11] is a plan view illustrating a modified example of the cellular constituent material isolation chip of embodiment 3.
[Description of reference symbols]
[0068]

1 □ quartz substrate; 1′ □ glass substrate; 2 □ transparent electrode; 2′ □ counter electrode; 3 □ extraction electrode; 4, 4-1, 4-2 □ agarose gel membrane; 5 □ compartment; 6, 6′□ groove; 7 □ cell; 8 □ spacer; 9 □ agarose membrane for cell attachment prevention; 10 □ substrate; 20 □ probe; 21 □ pulse laser; 22, 22' □ cell; 23 □ nucleic acid; 25 □ protein; 60 □ power supply; 31, 32, 33 □ labeled probe; 31′, 32′, 33 □ label; 41 □ cell boundary; 42 □ nucleus boundary; 43, 44, 45, 46 □ gold nanoparticles; 43′, 44′ □ particles that recognize small amounts of intron sequences; 51 □ cell membrane; 52 □ nuclear membrane; 55, 56 □ gold nanoparticles; 61, 62, 63 □ marker; 80 □ tissue fragment; 81 □ specified cell layer; 82 □ other location of the tissue fragment.

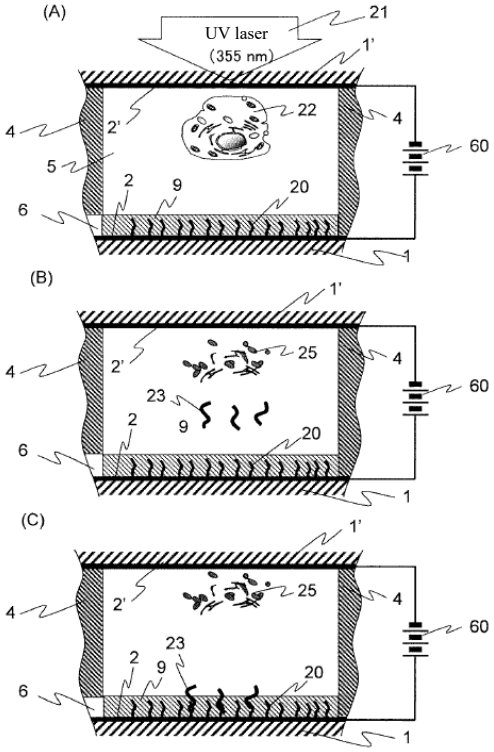
[FIG. 1]

FIG. 1



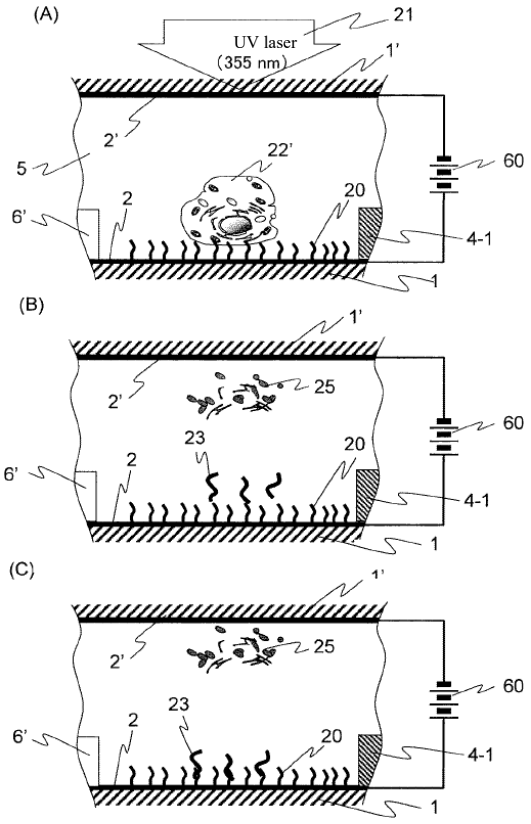
[FIG. 2]

FIG. 2



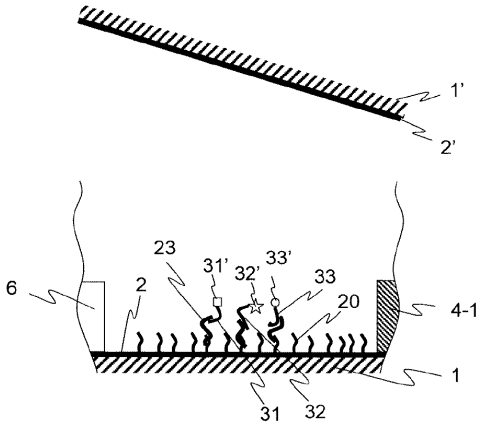
[FIG. 3]

FIG. 3



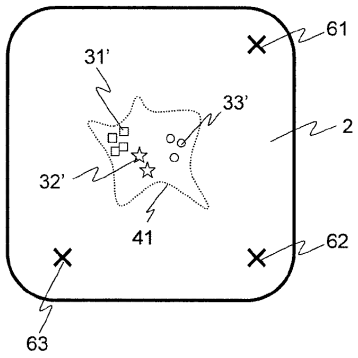
[FIG. 4]

FIG. 4



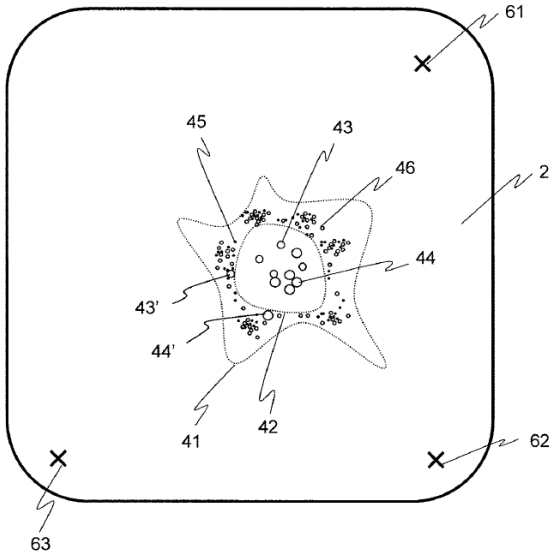
[FIG. 5]

FIG. 5



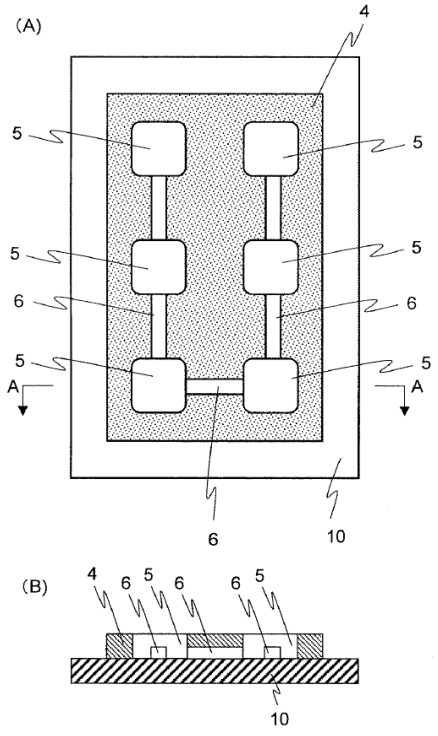
[FIG. 6]

FIG. 6



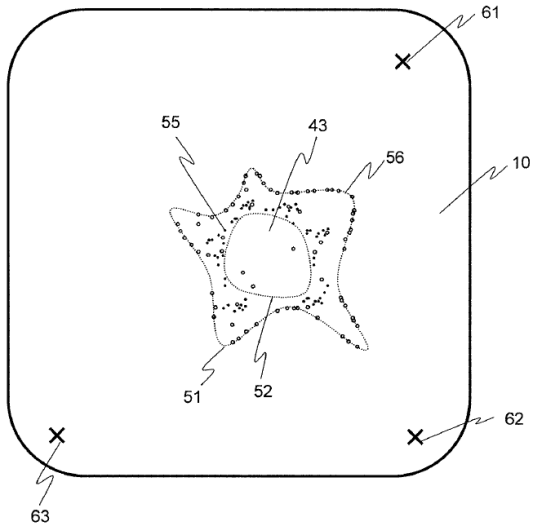
[FIG. 7]

FIG. 7



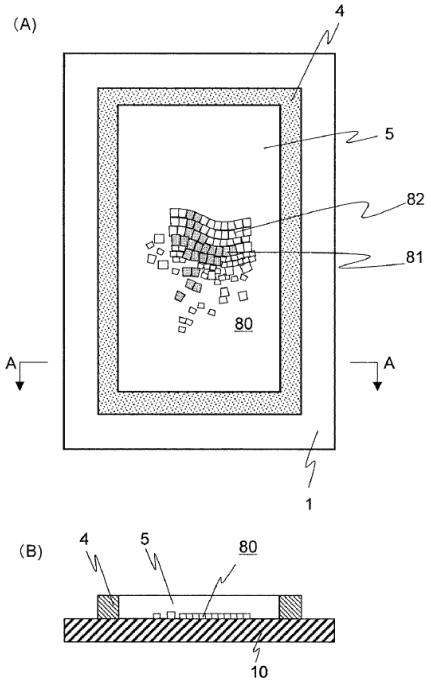
[FIG. 8]

FIG. 8



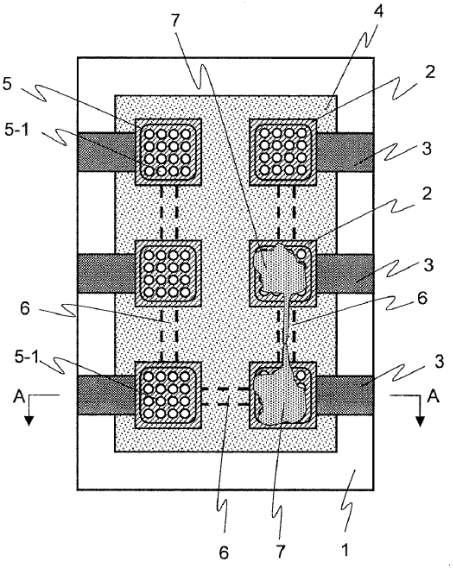
[FIG. 9]

FIG. 9



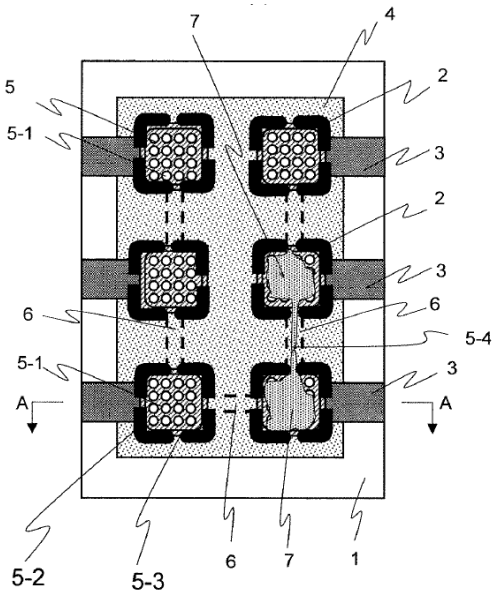
[FIG. 10]

FIG. 10



[FIG. 11]

FIG. 11



[Written amendment of proceedings]
[Submission date] December 7, 2005 (2005.12.7)
[Amendment of proceedings 1]
[Title of document to be amended] Specification
[Title of section to be amended] 0066
[Method of amendment] Modification
[Content of amendment]
[0066]
A system utilizing aptamers as the material to be immobilized in spots for proteins or glycoproteins synthesized inside a cell will be described. For aptamers corresponding to the proteins and glycoproteins of each measurement parameter, in the present embodiment, DNA aptamers are used. Regarding the preparation method for DNA aptamers, these are prepared by the SELEX method, following known examples (J. Clin. Invest. 98, 2688−2692 (1996), Nucleic Acids Res. 24, 702−706 (1996)). Each aptamer is applied in spots in all the compartments 5 demarcated by an SU-8 structure 5-2. Since the aptamers have an amino group introduced at the 5′ end, they are immobilized on the substrate using the method described in embodiment 1. On the substrate, for example, there is immobilized an aptamer for CD62L as described in the above-mentioned J. Clin. Invest. 98, 2688−2692 (1996) and an aptamer for thrombin as described in Nucleic Acids Res. 24, 702−706 (1996). A cell 7 is inserted into each compartment 5 of the multiple cell compatible chip 1 having an aptamer spot array (5-1 in FIG. 11) prepared in this manner in all the compartments 5, with gap junctions 5-4 being formed between them to form a cell network. The cells are destroyed with UV laser and incubated for 30 minutes, whereupon the proteins and glycoproteins corresponding to the aptamers are captured at each spot in the compartments 5. Next, unreacted biological material is washed away with PBS (pH 7.4) containing 0. 05% Tween 20 and 10 mg/ml BSA (pH 7. A mixture of nanoparticle labeled antibodies of various particle diameters suspended in the same solution is added to the surface of the substrate 1 and allowed to react for 15 minutes. Each antibody is individually labeled with gold nanoparticles of different particle diameters for each type. Here, the particles binding to the antibody corresponding to CD62L are 20 nm gold nanoparticles. After the reaction, upon determining if gold nanoparticles of this particle diameter are present, 20 nm gold nanoparticles are measured at locations where aptamer for CD62L had been applied in spots. At other spot locations, only a background level number was counted.
[Sequence Listing]
SEQUENCE LISTING
<110> Onchip Cellomics Consortium
<120> A preparation chip and a preparation system for materials composed in a cell and analysis methods for materials composed in a cell
<130> NT05P0453
<160> 2
<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221>
<223> Synthesized DNA
<400> 1
cgaagcacct ctgatgcagg aggattctct gagtcataga agaagatttt50
<210> 2
<211> 89
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<221>
<223> n stands for random sequence of a c g and t
<400> 2
taatacgact cactataggg agacaannnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
nnnnnnttcg acaggaggct cacaacagg89

Continuation of front page

F-terms (Reference) 4B029 AA07 BB15 BB20 CC03 CC08 FA15
4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR35 QR55 QR84 QS34
QX01

(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2007-14297
(P2007-14297A)
(43)公開日　平成19年1月25日(2007.1.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A	4B029
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	F	4B063
G01N 27/447	(2006.01)	G01N	27/26	301C	

審査請求 未請求　請求項の数 17　ＯＬ　（全 24 頁）

(21)出願番号　特願2005-201330 (P2005-201330)
(22)出願日　平成17年7月11日 (2005.7.11)

(71)出願人　504296024
有限責任中間法人　オンチップ・セロミクス・コンソーシアム
東京都千代田区神田駿河台１－７　ＹＫ駿河台ビル８階
(74)代理人　100068504
弁理士　小川　勝男
(74)代理人　100083389
弁理士　竹ノ内　勝
(72)発明者　岡野　和宣
東京都新宿区三栄町２３－３－２０４
(72)発明者　安田　賢二
東京都江東区潮見２－８－１４－１０１４

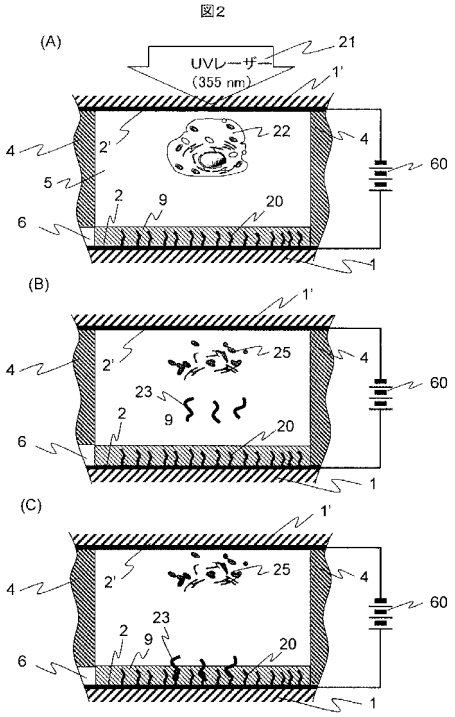
Ｆターム(参考)　4B024 AA11　CA01　CA09　CA11　HA14

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞構成物質分取チップならびに細胞構成物質解析システム及びこれらを用いる細胞構成物質解析法

(57)【要約】
【課題】細胞間や細胞内で局在化しているｍＲＮＡやタンパク質を、局在空間情報を失わずに定量測定を行うことのできる方法とチップデバイスとシステムを提供すること。
【解決手段】細胞を２次元投影した形で基板あるいは電極上に、細胞の内容物を捕捉する。このために、電気泳動的な力を利用する、あるいは、細胞の水分を瞬時に蒸発させて固定する。２次元平面に固定されたｍＲＮＡを、これにハイブリダイズする標識物付きの標識プローブで同定する。
【選択図】図２

図2



Curio EX1025-p. 25
Curio v Prognosys
IPR2024-01289

【特許請求の範囲】
【請求項１】
所定の生体物質を捕捉するためのプローブが基板表面に固定された基板構造、前記基板構造の生体物質を捕捉するためのプローブが設けられた面に細胞を含む緩衝液を保持する空間構造、前記空間構造に保持された緩衝液中の細胞を破壊する機構、該破壊された細胞に含まれる所定の生体物質を前記基板表面に２次元投影する機構、前記基板表面のプローブに捕捉された生体物質を区別して検出する機構からなることを特徴とする細胞構成物質解析システム。
【請求項２】
所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記領域間を必要に応じて連通する手段と、前記基板の領域表面に設けられた前記基板の領域に収容された細胞の構成物質を捕捉することのできるプローブと、前記基板の領域の上下から電界を印加するための電極と、を備えることを特徴とする細胞構成物質解析のための細胞構成物質分取チップ。
【請求項３】
前記区分された領域の表面が２種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層とされ、該ポリマー層が重合用の第１の官能基を２箇所に有する第１のモノマーと重合用の第２の官能基を２箇所に有する第２のモノマーを交互に配するように重合した構造で、前記第１のモノマーおよび前記第２のモノマーの片方には生体物質捕捉用残基を持つ構造である請求項２記載の細胞構成物質分取チップ。
【請求項４】
前記区分された領域の表面が２種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層とされ、該ポリマー層が重合用の第１の官能基を２箇所に有する第１のモノマーと重合用の第２の官能基を２箇所に有する第２のモノマーを交互に配するように重合した構造で、前記第１のモノマーおよび前記第２のモノマーのそれぞれには異なる生体物質捕捉用残基を持つ構造である請求項２記載の細胞構成物質分取チップ。
【請求項５】
前記ポリマー層が前記基板表面に設けられた電気伝導性の部材表面に形成された請求項３または請求項４記載の細胞構成物質分取チップ。
【請求項６】
前記破壊された細胞に含まれる所定の生体物質を前記基板表面に２次元投影する機構が前記細胞を含む緩衝液を保持する空間構造を挟んで電界を印加する電極と電源である請求項１記載の生体物質解析システム。
【請求項７】
前記細胞を破壊する機構が細胞に３２０ｎｍから４００ｎｍの波長範囲の紫外光を照射できる構造である請求項１記載の生体物質解析システム。
【請求項８】
前記基板表面のプローブに捕捉された生体物質を区別して検出する機構が、前記生体物質にハイブリダイズする標識プローブを標識するナノ粒子とこれを識別する計測手段であり、前記ナノ粒子は、サイズと材料で特定されるものである請求項１記載の生体物質解析システム。
【請求項９】
前記生体物質を捕捉するためのプローブを固定する基板表面が、２種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層とされ、該ポリマー層が重合用の第１の官能基を２箇所に有する第１のモノマーと重合用の第２の官能基を２箇所に有する第２のモノマーを交互に配するように重合した構造で、前記第１のモノマーおよび前記第２のモノマーの片方には生体物質捕捉用残基を持つ構造である請求項１記載の生体物質解析システム。
【請求項１０】
所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記領域間を必要に応じて連通する手段と、前記基板の領域表面に設けられた前記基板の領域に収容された細胞の構成物質を捕捉することのできるプローブと、前記基板の領域の上下から電界を印加するための

電極とを備える細胞構成物質解析のための細胞構成物質分取チップを使用して、
前記区画の領域に細胞を含む緩衝液を保持する工程、
前記区画の領域に保持された細胞を破壊する工程、
該破壊された細胞に含まれる所定の生体物質を前記基板の領域に２次元投影し、前記プローブに所定の生体物質を捕捉する工程、
該捕捉された所定の生体物質に、所定のナノ粒子で標識されたプローブを反応させる工程、
該反応したプローブのナノ粒子の粒子径および元素組成を解析し所定の生体物質の種類と位置を生体物質の分子毎で同定する工程、
からなることを特徴とする細胞構成物質解析法。

【請求項１１】
個々の細胞を保持するための所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記区分された領域にスポット状に配列された構造の前記細胞の構成物質を捕捉することのできる複数種のプローブと、前記基板の前記区分された領域間を必要に応じて連通する機構と、を有する細胞構成物質分取チップ。

【請求項１２】
個々の細胞を保持するための所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記区分された領域にスポット状に配列された構造の前記細胞の構成物質を捕捉することのできる複数種のプローブと、該基板の前記領域間を必要に応じて連通する機構とを有する細胞構成物質分取チップと、前記基板の領域の上下から電界を印加するための電極とを備える細胞構成物質解析のための細胞構成物質分取チップを使用して、
前記区画の領域に細胞を含む緩衝液を保持する工程、
前記区画の領域に保持された細胞を破壊する工程、
該破壊された細胞に含まれる所定の生体物質を前記基板の領域に存在する前記複数種のプローブ所定の生体物質を捕捉する工程、
該捕捉された所定の生体物質に、所定のナノ粒子で標識されたプローブを反応させる工程、
該反応したプローブのナノ粒子の粒子径および元素組成を解析し所定の生体物質の種類と位置を生体物質の分子毎で同定する工程、
からなることを特徴とする細胞構成物質解析法。

【請求項１３】
所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記領域間を必要に応じて連通する手段とを備える細胞構成物質解析のための細胞構成物質分取チップを使用して、
前記区画の領域に細胞を含む緩衝液を保持する工程、
前記区画の領域に保持された細胞を所定の条件の乾燥雰囲気に曝して細胞を乾燥させるか、あるいは、細胞が着床した前記区画の領域を凍結させた後に乾燥させる工程、
所定の溶液を添加し、細胞膜を物質透過性にする工程、
前記区画の領域に固定された細胞構成物質以外を洗浄する工程、
前記区画の領域に固定された細胞構成物質に、所定のナノ粒子で標識されたプローブを反応させる工程、
該反応したプローブのナノ粒子の粒子径および元素組成を解析し所定の生体物質の種類と位置を生体物質の分子毎で同定する工程、
からなることを特徴とする細胞構成物質解析法。

【請求項１４】
所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記領域間を必要に応じて連通する手段とを備える細胞構成物質解析のための細胞構成物質分取チップを使用して、
前記区画の領域に細胞を含む緩衝液を保持する工程、
前記区画の領域に保持された細胞をアルデヒド類を含む溶液に曝して細胞構成物質を固定する工程、
所定の溶液を添加し、細胞膜を物質透過性にする工程、

Curio EX1025-p. 27
Curio v Prognosys
IPR2024-01289

前記区画の領域に固定された細胞構成物質を洗浄する工程、
前記区画の領域に固定された細胞構成物質に、所定のナノ粒子で標識されたプローブを反応させる工程、
該反応したプローブのナノ粒子の粒子径および元素組成を解析し所定の生体物質の種類と位置を生体物質の分子毎で同定する工程、
からなることを特徴とする細胞構成物質解析法。
【請求項１５】
所定のマーカーが付されるとともに所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記領域間を必要に応じて連通する手段と、前記基板の領域表面に設けられた前記基板の領域に収容された細胞の構成物質を捕捉することのできるプローブと、前記基板の領域の上下から電界を印加するための電極とを備える細胞構成物質解析のための細胞構成物質分取チップを使用して、
前記区画の領域に細胞を含む緩衝液を保持する工程、
前記区画の領域に保持された細胞と前記マーカーが一つの画面中に入る第１の画像を得る工程、
前記区画の領域に保持された細胞を破壊する工程、
該破壊された細胞に含まれる所定の生体物質を前記基板の領域に２次元投影し、前記プローブに所定の生体物質を捕捉する工程、
該捕捉された所定の生体物質に、所定のナノ粒子で標識されたプローブを反応させる工程、
前記プローブを標識するナノ粒子と前記マーカーが一つの画面中に入る第２の画像を得る工程、
該反応したプローブのナノ粒子の粒子径および元素組成を解析し所定の生体物質の種類と位置を生体物質の分子毎で同定する工程、
前記第１の画像と前記第２の画像とをマーカーを一致させて合成する工程、
からなることを特徴とする細胞構成物質解析法。
【請求項１６】
所定のマーカーが付されるとともに所定の区画に区分された領域を有する基板と、該基板の前記領域間を必要に応じて連通する手段とを備える細胞構成物質解析のための細胞構成物質分取チップを使用して、
前記区画の領域に細胞を含む緩衝液を保持する工程、
前記区画の領域に保持された細胞と前記マーカーが一つの画面中に入る第１の画像を得る工程、
前記区画の領域に保持された細胞を所定の条件の乾燥雰囲気に曝して細胞を乾燥させるか、あるいは、細胞が着床した前記区画の領域を凍結させた後に乾燥させる工程、
ペプシンを含む溶液を添加し、細胞膜を物質透過性にする工程、
前記区画の領域に固定された細胞構成物質を洗浄する工程、
前記区画の領域に固定された細胞構成物質に、所定のナノ粒子で標識されたプローブを反応させる工程、
前記プローブを標識するナノ粒子と前記マーカーが一つの画面中に入る第２の画像を得る工程、
該反応したプローブのナノ粒子の粒子径および元素組成を解析し所定の生体物質の種類と位置を生体物質の分子毎で同定する工程、
前記第１の画像と前記第２の画像とをマーカーを一致させて合成する工程、
からなることを特徴とする細胞構成物質解析法。
【請求項１７】
所定の生体物質を捕捉するためのプローブが基板表面に固定された基板構造、前記プローブを固定した基板表面には細胞吸着防止用のアガロース薄膜が塗布された構造、表面が前記基板構造の生体物質を捕捉するためのプローブが設けられた面に細胞を含む緩衝液を保持する空間構造、前記空間構造に保持された緩衝液中の細胞を破壊する機構、該破壊さ

Curio EX1025-p. 28
Curio v Prognosys
IPR2024-01289

れた細胞に含まれる所定の生体物質を前記基板表面に２次元投影する機構、前記基板表面のプローブに捕捉された生体物質を区別して検出する機構からなることを特徴とする細胞構成物質解析システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は細胞ないし細胞集合体である組織で発現している遺伝子産物であるｍＲＮＡないしタンパク質を、ｍＲＮＡないしタンパク質の細胞や細胞集合体である組織での空間局在の情報とともに定量的に計測するための細胞構成物質解析チップ、細胞構成物質解析システムおよび方法に関するものである。

【背景技術】

【０００２】

ゲノム計画の進展とともにＤＮＡレベルで生体を理解し、病気の診断や生命現象の理解をしようとする動きが活発化してきた。生命現象の理解や遺伝子の働きを調べるには遺伝子の発現状況を調べることが有効である。この有力な方法として、固体表面上に数多くのＤＮＡプローブを種類毎に区分けして固定したＤＮＡプローブアレー、あるいはＤＮＡプローブチップ（実際には固定されているのはオリゴヌクレオチドの誘導体であるのでオリゴチップと呼ぶこともある）が用いられている。ＤＮＡプローブのかわりに抗体や抗原を基板上にアレイ状に固定したプロテインチップの概念も実用化されている。たとえば、基板上にアレルギーを起こす数十から数百の抗原（アレルゲン）を固定したデバイスに検体血清を反応させ、各抗原と抗原抗体反応を起こす血清中に存在するＩｇＭを特異的に捕捉し、ＩｇＭに結合する酵素標識２次抗体を反応させ、酵素活性を化学発光と組み合わせることで測定して、アレルゲンを検出するアレルゲン検査用のシステムが医療検査用に実用化されている。

【０００３】

ＤＮＡチップを作るには光化学反応と半導体工業でよく用いられるリソグラフィーを用いて区画された多数のセルに設計された配列のオリゴマーを一塩基ずつ合成して行く方法（非特許文献１：Science 251, 767-773(1991)）、あるいはＤＮＡプローブやタンパク質プローブを各区画に一つ一つ植え込んでいく方法（非特許文献２：Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4613-4918 (1996)）などがある。

【０００４】

これらチップは、いずれもスライドガラスなどの平面上に区画を区切り、多数のプローブを、アレイ状に整列させた構造をしている。どのプローブがどの位置にあるかは、プローブが固定されている物理的な位置のみでインデクシングされるのが一般的である。

【０００５】

検出には、ＤＮＡチップの類では標識物に蛍光色素を用いるケースが圧倒的に多い。プロテインチップでは上記したとおり、酵素標識物を用いて化学発光ないし生物発光の系で検出するケースが多いが、蛍光標識検出や、電気化学発光検出を行うケースと多様な方法が実用化されている。

【０００６】

電気化学発光法では、電極表面に抗原捕捉用の抗体が存在する。サンドイッチ用抗体の標識物にはルテニウム錯体を用いる（非特許文献３：Clin. Chem., 37, 1534-1539 (1991)）。電極表面ではルテニウムが酸化され、ＴＰＡのレドックス反応とカップルさせて還元するときに励起状態となったルテニウムの電子が基底状態に落ちる時に光を発する。

【０００７】

【非特許文献１】Science 251, 767-773(1991)
【非特許文献２】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4613-4918(1996)
【非特許文献３】Clin. Chem., 37, 1534-1539 (1991)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】
上記従来技術では、ＤＮＡプローブチップあるいはプロテインチップを用いる遺伝子転写産物であるｍＲＮＡや翻訳産物であるタンパク質の識別や検出法に関してはよく検討されており、何らかの方法で溶液状の試料が準備できていれば測定ができる。上記従来技術で説明した検体血清からのアレルゲン検査では、血清試料を用いる。ｍＲＮＡ検査では予め十分多量な細胞検体からＲＮＡ成分を抽出し、リバーストランスクリプターゼによる逆転写反応でｃＤＮＡを合成し、ＰＣＲ増幅やｃＲＮＡ合成により増幅を行う。また相補鎖合成時に標識ｄＮＴＰを取り込ませて多量の標識ＤＮＡ鎖を得る。最近ではアミノアリルｄＮＴＰを取り込ませて、その後にアミノ基に蛍光色素を反応させて蛍光標識ＤＮＡ鎖を得る方法が主流となっている。このようにして得られた蛍光標識ＤＮＡ鎖を、いわゆる、ＤＮＡチップとハイブリダイズさせて各種発現遺伝子の解析を行う。このように、予め溶液試料が得られる場合のみ解析が可能となる。

【０００９】
検体の内、かなりの部分を占める細胞を扱う場合、測定対象となる細胞構成物資を溶液状態にする操作そのものが問題となるケースがある。多細胞生物においては、細胞は隣接する細胞群との相互インタラクションにより全体の調和を成立させているので、細胞群をすりつぶして均一な状態としてしまうと各細胞の持つ局在的な情報が失われる。さらに、個々の細胞内においても発現遺伝子であるｍＲＮＡは局在化しているし、最終産物であるタンパク質も細胞内でその機能に従い局在している。これら局在ｍＲＮＡやタンパク質は、細胞の活動状態すなわち隣接する細胞群とのコミュニケーションにより変化するし、おかれている環境に対しても変動する。すなわち、生体機能をより正確に記述し、医療向けの検査や創薬に役立つ情報を得ようとすると、細胞間や細胞内で局在化しているｍＲＮＡやタンパク質を、局在空間情報を保持した状態で定量検出する必要がある。

【００１０】
すなわち、本発明の目的は、上記問題点を克服し、細胞間や細胞内で局在化しているｍＲＮＡやタンパク質を、局在空間情報を失わずに定量測定を行うことのできる細胞構成物質解析チップ、細胞構成物質解析システムおよび方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１１】
本発明では、まず、ｍＲＮＡあるいは発現タンパク質の分解を極力少なくし、濃度希釈が不要な方法を実現するために、細胞を２次元投影した形で基板あるいは電極上に、細胞の内容物を捕捉することとする。このためには、電気泳動的な力を利用することができる。すなわち、極薄い間隔からなる２枚の電極で細胞を挟み、電界をかけることで細胞を破壊すると同時に細胞の内容物を電極表面に引き寄せる。あるいは、細胞の破壊にＵＶ光を用いることも効果的である。３５０ｎｍ程度のＵＶ光は溶媒である水では吸収されず、細胞で吸収される。このため、溶媒を沸騰させること無く細胞を可溶化することができる。このときも生体物質の内容物を２次元投影した形で捕捉するには電気泳動力を用いる。

【００１２】
いずれの細胞破壊の方法でも生体物質の内容物を２次元投影した形で捕捉するには、電気力線が電極平面に対してほぼ垂直方向に形成されることが重要である。すなわち、電極面積としては細胞のサイズに比べて十分広いことが必要となる。この条件に加え、電極間の距離が対流の起きにくい数十μｍ程度であれば、細胞内物質は電極平面に対してほぼ垂直方向に移動する。生体物質の内容物を捕捉する基板、あるいは、電極表面にはｍＲＮＡの捕捉用にポリＴのようなｍＲＮＡに結合する物質を固定しておく。タンパク質の場合は、たとえばアミノ基の様なカチオンやカルボキシル基のようなアニオンを表面に緻密に導入したもので静電的にタンパク質を固定する。あるいは電極表面を疎水性残基で覆い、タンパク質の疎水部分同士が水分子の排除エネルギーを利用して結合する力を利用してタンパク質を一網打尽に基板表面に固定することができる。

【００１３】
測定したいものが予測される場合は、それらに対応するＤＮＡプローブを予め基板上に

固定して用いることで、より精度のよい測定が可能となる。たとえば、配列番号１の配列をプローブとして固定したものを用いると、Homo sapiens paraoxonase １（ＰＯＮ１）由来のｍRNAの細胞内分布を測定することができる。さらに複数のDNAプローブを基板上に固定することで、複数の測定項目のｍＲＮＡ配列を基板上に捕捉することができる。
CGAAGCACCT CTGATGCAGG AGGATTCTCT GAGTCATAGA AGAAGATTTT：（配列番号１）

本発明は細胞が集合した組織様の検体にも適用することができる。ただし、組織様の検体は細胞が一層のものが望ましい。仮に細胞１０個が１列に連なったものを仮想的な組織様の検体としよう。検体を２枚の電極間にはさみＵＶ照射しながら電界をかけると、個々の細胞に対応して個々の細胞由来の生体物質が２次元情報を保持したまま電極表面に固定される。

【００１４】

生体物質の内容物を基板上に捕捉して固定する第２の方法として、電極によらず、細胞の水分を瞬時に蒸発させて固定する方法も有効である。この場合、基板上に細胞を配置した状態で高温にさらして水分を蒸発させることで、ｍＲＮＡやタンパク質を細胞の配置を崩さずに固定することができる。もちろん、細胞内のｍＲＮＡやタンパク質も細胞内の２次元情報を保ったままで固定することができる。あるいは、液体窒素で瞬間的に凍結した後に、乾燥させてもよい。あるいは、ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドのような試薬を用いて細胞を固定してもよい。ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドを用いる固定の場合で特にｍＲＮＡの解析には、ホルムアルデヒドによる細胞固定後に、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を作用させて、細胞膜表面や構造タンパク質を破壊して、後述するナノ粒子標識プローブを固定されたｍＲＮＡにハイブリダイズできるようにして、反応したナノ粒子を２次元表面的に解析することで達成できる。いずれの方法でもその後のｍＲＮＡやタンパク質の検出が可能である。

【００１５】

第２の固定法では、ｍＲＮＡとタンパク質が同時に基板上に固定される。細胞破壊と固定が短時間で行われるので、ｍＲＮＡを検出するときに問題となるＲＮａｓｅによるｍＲＮＡ分解はあまり気にしなくてもよい。固定後はＲＮａｓｅインヒビターで基板を洗浄し、ＲＮａｓｅ活性をなくす操作を行えばより正確なｍＲＮＡ検出が可能となる。一般のタンパク質は変性した状態で固定されるケースが多いので、プロテアーゼによる分解は気にする必要は無い。

【００１６】

第２の固定方法ではｍＲＮＡとタンパク質に加え、ゲノムも同時に基板上に固定されるので、これらに対応するナノ粒子付きプローブを反応させることで同一基板上で同一細胞のｍＲＮＡとタンパク質発現の空間的情報付きの定量データを得ることができる。核に存在するゲノムの特定遺伝子もｍＲＮＡと区別して同時検出することができる。

【００１７】

本発明では、いずれの方法で固定するにしても、基板あるいは電極上に、細胞内の物質を位置情報を保ったまま２次元平面に固定することになる。このとき１細胞中の細胞内物質を２次元固定する場合では、ＤＮＡチップやプロテインチップのように各区画エレメントに異なるプローブを固定してエレメントの位置で対象となる生体物質を識別することはできない。そこで、２次元平面に固定された細胞内の物質に選択的に結合する標識プローブを利用し、これに適当な識別子を設けて固定された細胞内の物質を識別する。

【００１８】

細胞内物質を２次元固定する場合では、個々の細胞間での差異が測定できる程度の位置情報を得る目的であれば、個別の細胞を細胞のインタラクションを保ったままで各細胞を個別区画に保持し、この個別区画ごとに従来のＤＮＡマイクロアレイやプロテインチップのように複数のプローブをスポット上に配することで、各生体物質の細胞レベルの２次元位置情報と量を測定することができる。このケースでも前記した細胞内物質を２次元投影して測定するケースと同様に、細胞の配置を保持した状態で各細胞固定区画に配した複数プローブに親和的に固定された細胞内物質に選択的に結合する標識プローブを利用し、こ

れに適当な識別子を設けて固定された細胞内の物質を識別する。

【００１９】

適当な識別子とは、たとえば蛍光分子であり、これを１分子検出する。更に容易には、蛍光ナノ粒子を識別子用いて基板上の蛍光点を計数する。測定対象の区別は、対応するプローブを標識する蛍光体の種類や強度の違いを区別することで達成できる。あるいは、ナノ粒子を用いる。ナノ粒子には測定対象に対して異なる粒径や異なる元素組成のナノ粒子を用いる。これにより、細胞の２次元投影面に対して、反応したプローブに付加されたナノ粒子の種類と数を計数することで測定対象を区別しながら細胞内分布を定量的に計測できる。

【発明の効果】

【００２０】

本発明により、細胞内発現しているｍＲＮＡやタンパク質および、これらの情報を担うゲノムを、細胞内および細胞間の位置情報と量を分子レベルで検出できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２１】

動物細胞の平均的な大きさはおおよそ１０～３０μｍである。この中に２万数１０００種の遺伝子が存在し、少ないもので数十分子のｍＲＮＡが数百種以上発現している。中には１０万分子数に及ぶものもあるがわずか数種に過ぎない。多量に発現している遺伝子の多くは、ハウスキーピング遺伝子が多く、細胞内でほぼ一定数、常に発現している。よって本発明で対象とするのはあまり数が多くなく、細胞の置かれている状態で発現ｍＲＮＡ分子数が変動する遺伝子である。

【００２２】

仮に１００分子が発現しているとすると、従来のＤＮＡチップのような方法では増幅なしに検出することは不可能である。細胞を磨り潰し、ｍＲＮＡを抽出する段階で分解したり濃度が薄まったりしてしまい、ハイブリダイゼーションが速度論的に無限に近い時間必要になるからである。

【００２３】

本発明では、細胞を２次元投影した形で基板あるいは電極上に、直接、細胞の内容物を捕捉することとする。以下、具体的な実施例について図面を参照しながら説明する。

【００２４】

（実施例１）

図１（Ａ）は実施例１の細胞構成物質分取チップを示す平面図、（Ｂ）は図１（Ａ）のＡ－Ａ位置で矢印方向に見た断面図である。（Ｃ）は（Ａ）のＡ－Ａ位置で矢印方向に見た断面図の他の例である。１は石英基板であり、この上面に厚さ５μｍのアガロースゲル膜４が形成されており、所定の間隔で細胞保持のための区画５が作成される。区画５の大きさは、例えば、３０μｍ四方とされるが、これは、上記動物細胞の平均的な大きさを１０～３０μｍφとするとき、この９倍ないし等倍にあたる。図１では細胞７を区画５のいくつかに配した状態を示す。各区画５間は、必要なら、溝６で連結され、区画５に保持された細胞７間の相互インタラクションが可能とされる。また、基板１の上面の各区画５に対応する位置には、インジウムスズ酸化物（ＩＴＯ）からなる透明電極２が形成されている。透明電極２は、透過光が３０～７０％程度になるように金あるいは白金あるいはクロムを蒸着して作成したものでもよい。電極２の大きさは区画５の大きさとほぼ等しいものとされる。前記アガロースゲル膜４の上面にはガラス基板１’が設けられる。基板１と基板１’はスペーサー８で一定間隔が保たれる構造となっている。スペーサー８は基板１’に予め取り付けられており、ガラス基板１に押し付ける形で装着する。この際、スペーサーと接触する基板１の部分のアガロースゲルは予め除去しておくほうが良いが，（Ｃ）のようにアガロースゲル４の厚みが薄い場合はゲルの上からスペーサーを押し付けるだけでよい。ガラス基板１’の、前記区画５の位置には、電極２に対応する対向電極２’を設ける。石英基板１、ガラス基板１’には、それぞれ、電極２、対向電極２’に接続されている引き出し電極３が設けられる。なお、石英基板１のアガロースゲル膜４は、集束光を当

てて加熱して容易に加工することができるから、区画５の形成、区画５間の溝の形成は容易である。区画５に入れる細胞を培養中に各区画５を連結する溝を集束光で形成することにより複数の種類の異なる細胞を任意の段階で相互インタラクションするものにできる。

【００２５】

前記対向する電極付の基板１，１’の間隔を０．１ｍｍとすると、両電極付基板ではさまれる区画５の領域は、ほぼ０．０３×０．０３×０．１ｍｍの空間になり、区画５に緩衝液または培養液を入れ、細胞７を１個ずつ挿入すると、この電極に挟まれる空間に細胞１個が存在することになる。図１の第１の例として、浮遊細胞用の細胞構成物質分取チップの例を示す。ここでは浮遊状態にあるニューロン細胞、すなわちニューロン幹細胞を培養液に懸濁した懸濁液からニューロン幹細胞を１個ずつ取り出して、区画５に挿入し２枚の基板１，１’でサンドイッチしている。ニューロン幹細胞は着床しないように区画５の底辺にも０．５μｍ以下の厚みで濃度が０．０５％以下のアガロース膜９を細胞吸着防止用として塗布しておく。このような薄いアガロース膜はｍＲＮＡなどを自由に透過することができる。必要に応じて区画５は溝６’でつながれる。図１（Ｂ）記載の断面図の様に、アガロースゲル膜４を基板１と１’の間を分離するように形成し、区画５を独立した空間とすることで浮遊細胞を空間５に保持する構造としている。２枚の基板１，１’は３５０ｎｍのレーザーを透過することができる構造とする。電極における３５０ｎｍの光吸収が大きい場合には、電極を格子状にしたり、金属薄膜の厚みを５ｎｍ以下としたりすることで部分的に光を透過させることで解決する。

【００２６】

図１の第２の例としては、10^5 細胞／ｍｌの濃度のヒトＣＯＳ細胞７をＰＢＳに懸濁した懸濁液から細胞を１個ずつ取り出して、区画５の２箇所に挿入し２枚の基板１，１’でサンドイッチしている。ＣＯＳ細胞７はアガロースゲル膜４の無いところに着床するので、（Ｃ）にその断面図を示すように区画５の基板１上に接着することになる。このために、（Ｃ）に示すようにアガロースゲル膜４’の厚みが薄くて、完全に区画が他とは区切られない状態でも、各細胞が隣接する区画に移動したり、細胞間の相互インタラクションが溝以外で起きたりすることは無い。必要に応じて区画５は溝６’でつながれる。もちろん図１（Ｂ）記載の断面図の様に、アガロースゲル膜４を基板１と１’の間を分離するように形成し、区画５を独立した空間とすることで細胞を空間５に保持する構造としてもよい。この場合、区画間は溝に代えてトンネル６とする。

【００２７】

２枚の基板１，１’は３５０ｎｍのレーザーを透過することができる構造とする。電極における３５０ｎｍの光吸収が大きい場合には、電極を格子状にしたり、金属薄膜の厚みを５ｎｍ以下としたりすることで部分的に光を透過させることで解決する。

【００２８】

なお、図１では、スペーサー８は区画５の設けられる領域の全周を取り囲む形で示したが、図１（Ｂ）の例では、基板１’が、アガロースゲル膜４を強く圧迫することが無いようにし、図１（Ｃ）の例では、基板１と１’との距離を確保するのに十分な程度に断続的に配置するものとして良い。この場合、基板１と１’との距離は小さいので、図１（Ｃ）の例でも、培養液が流失してしまうことはない。

【００２９】

図２（Ａ）は浮遊細胞用の２枚の基板１，１’でサンドイッチされた区画５に細胞が配された状態の断面を示す図である。ここでは、非着床性の細胞を用いるケースについて説明する。細胞２２は基板１と１’とアガロースゲル膜４で区切られた空間に閉じ込められている。この例では、アガロースゲル膜４の厚みは０．１ｍｍで、基板１と１’の間隔も０．１ｍｍである。溝６は各区画５を連結し、細胞間のインタラクションを取るためのもので、培養中に任意に作成する。溝６は細胞が通り抜けられない断面積を有している。２枚の対向する基板の内側には基板１上に電極２、電極２の表面にプローブ２０が固定されている。プローブ２０は実質的にアガロースゲル膜９に埋もれた状態で固定されているが、アガロース濃度が薄いので、ｍＲＮＡやｃＤＮＡなどは自由にプローブにアクセスでき

る。ここではプローブ２０はポリＴからなるものを使用する。基板１’の表面には電極２’が存在する。区画５はアガロース構造体４で仕切られているが、必要により、トンネル６で連絡される。区画５には緩衝液または培養液が入れられるとともに、細胞２２が挿入される。ガラス基板１’の上面から、３５５ｎｍのパルスレーザ２１を細胞２２の存在する区画５に照射すると、細胞２２が破壊される。なお、電極２，２’は、電界を印加するためのものであるから、基板の裏側にあっても良い。

【００３０】

図２（Ｂ）は区画５内の細胞をパルスレーザ２１によって破壊すると同時に電極２，２’の間に電源６０により、電界（１．２Ｖ）をかけ、ｍＲＮＡやＤＮＡなどの核酸２３をプラスの電極２の方向に引き寄せる過程の様子を模視的に示す図である。タンパク質２５などの細胞の内容物の多くはマイナス極２’に移動するか、移動しないで元の位置に留まっている。電界をかけると電極間にｐＨの勾配ができる。ｐＫが低い核酸類は陽極に移動できるが、ｐＫのあまり低くない他の成分は電荷が中和されるので陽極に達することができない。

【００３１】

図２（Ｃ）は、図２（Ｂ）の状態から時間が経過した状態を模視的に示す図である。時間が経過するのに応じて、ｍＲＮＡやＤＮＡなどの核酸２３は基板上のポリＴプローブ２０にハイブリダイズする。

【００３２】

図３は着床細胞であるヒトＣＯＳ細胞の例である。図３（Ａ）は２枚の基板１，１’でサンドイッチされた区画５に細胞が着床した状態で配された断面を示す図である。細胞２２’は基板１と１’とアガロースゲル膜の壁４－１，４－２で区切られた空間に閉じ込められている。細胞は区画の底面に着床しているので、上部が開いていても隣の区画に入り込むことは無い。実質的にアガロースゲル膜が塗布されている部分に細胞が着床できないので、隣接する区画に移動できないからである。このような細胞の移動を防ぐためのアガロースの厚みは実質０．５μｍあれば十分である。この例では、アガロースゲル膜の厚みは３μｍで、基板１と１’の間隔は０．１ｍｍである。溝６－１は各区画５を連結し、細胞間のインタラクションを取るためのもので、培養中に任意に作成する。溝６－１は細胞が通り抜けられない幅を有している。２枚の対向する基板の内側には基板１上に電極２、電極２の表面にプローブ２０が固定されている。ここではプローブ２０はポリＴからなるものを使用する。基板１’の表面には電極２’が存在する。区画５はアガロース構造体４－１，４－２で仕切られているが、必要により、トンネル６－１で連絡される。区画５には緩衝液または培養液が入れられるとともに、細胞２２が挿入される。ガラス基板１’の上面から、３５５ｎｍのパルスレーザ２１を細胞２２の存在する区画５に照射すると、細胞２２が破壊される。なお、電極２，２’は、電界を印加するためのものであるから、基板の裏側にあっても良い。

【００３３】

図３（Ｂ）は図２の例と同様に区画５内の細胞をパルスレーザ２１によって破壊すると同時に電極２，２’の間に電源６０により、電界（１．２Ｖ）をかけた様子を模視的に示す図である。ｍＲＮＡなどの核酸成分２３は細胞の着床していた基板底面近傍にとどまっているが、タンパク質２５などの細胞の内容物の多くはマイナス極２’に移動する。電界をかけると電極間にｐＨの勾配ができる。ｐＫが低い核酸類はさらに陽極に移動し、基板上のプローブ（ポリＴ）とハイブリダイズできるが、ｐＫのあまり低くない他の成分は電荷が中和されるので陽極に達することができない。

【００３４】

図３（Ｃ）は、図３（Ｂ）の状態から時間が経過した状態を模視的に示す図である。時間が経過するのに応じて、ｍＲＮＡやＤＮＡなどの核酸２３は基板上のポリＴプローブ２０にハイブリダイズする。

【００３５】

プローブ固定法について説明する。ポリＴプローブ２０を固定した電極あるいは通常の

Curio EX1025-p. 34
Curio v Prognosys
IPR2024-01289

電極上に貼り付けて使用する基板は２種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層を有するものを作成する。これは、前記ポリマー層が重合用の第１の官能基を２箇所に有する第１のモノマーと重合用の第２の官能基を２箇所に有する第２のモノマーを交互に配するように重合した構造で、前記第１のモノマーおよび前記第２のモノマーの片方に生体物質捕捉用残基を持つ構造をしている。具体的には、基板に第１のモノマーとしてアルキルジイソシアナートと第２のモノマーとしてジアミノフェニル酢酸を等モル比で反応させ重合させる。このケースでは、第１の官能基はイソシアナート基、第２の官能基はアミノ基ということになる。アルキルジイソシアナートとしてはたとえばヘキサメチレンジイソシアナートを用いることができる。また、生体物質捕捉用残基は第２のモノマーであるジアミノフェニル酢酸のカルボキシル基ということになる。重合生成薄膜はポリ尿素ということになる。重合上条件に関しては、上記２種類のモノマーの混合溶液をスピンコーターで塗布した後、所定の温度（１５０℃～２００℃）でベークすることによりポリマーの薄膜を基板上に形成することができる。あるいは、既存の真空蒸着法（Jpn. J. Appl. Phys. 33, L1721-L1724 (1994) ）を用いることができる。このようにして基板上に形成したポリ尿素薄膜はアルキルジイソシアナートとジアミノフェニル酢酸モノマーが交互に反応して形成する構造のため、側鎖のカルボン酸基が比較的そろった間隔で存在することになる。アルキル基の長さを調製することで導入するカルボキシル基の間隔を調製できる。また、これにより、従来は表面に官能基を導入することが困難であった金や白金などの電極上にも官能基を持つ薄膜を形成することができる。基板上に導入したカルボキシル基をカルボジイミド系の活性化剤を用いて生体物質捕捉用残基としてアミノ基を有するプローブを直接固定してもよい。あるいは、この側鎖カルボキシル基にジシクロヘキシルカルボジイミド系の活性化剤存在下でエチレンジアミンを反応させると、高収率で側鎖カルボキシル基に一級アミン残基を導入することができる。すなわち基板表面には一級アミンがほぼ一定間隔で並んだ状態となる。次にNucleic Acids Research,27,1970-1977(1999)およびCHEMBIOCHEM2, 686- 694(2001)記載の１，４－フェニレンヂイソチオシアナートで一級アミンを修飾し、表面にイソチオシアナート基を導入する。最後に５’末端にアミノ基を有するポリＴ（T_{25}）を反応させる。この反応条件は上記文献に詳しい。上記方法でポリＴが約９ｎｍ間隔で固定された電極２（基板）が得られる。

【００３６】

あるいは、２種類のモノマーを第１の官能基としてアルキル基に保護されたＳＨ基を有する残基を側鎖に持つアルキルジイソシアナートと第２の官能基としてカルボキシル基を持つジアミノフェニル酢酸を重合させれば、異なる官能基を交互に持つポリマー薄膜を持つ基板を作成できる。ここで、保護されたＳＨ基とは、たとえば、ペプチド合成のときに使用されるＳＨ機の保護基を導入したものを利用することができる。あるいは、ピリジルジチオ基の形で保護することができる。以下のケースでは、ピリジルジチオ基の形でＳＨ基を保護したモノマーを用いて作成した基板について説明する。基板上にポリマーを形成後に、まず、カルボキシル基に上記方法と同様にジシクロヘキシルカルボジイミド系の活性化剤存在下でエチレンジアミンを反応させ、引き続き１，４－フェニレンヂイソチオシアナートを反応させ、５’末端にアミノ基を有する特定配列の第１のオリゴマーを反応させて、オリゴマーを固定する。次にジチオスレイトールを用いてＳＳ結合を還元し、ＳＨ基を基板上のアルキル基部分に露出させる。マレイイミド基を有する第２のオリゴヌクレオチドをｐＨ６程度の水溶液中で反応させることで、マレイイミドの２重結合部分が基板上のＳＨ基と反応し、チオエーテル結合で第２のオリゴヌクレオチドを固定することができる。この例では、同一基板上に複数のプローブＤＮＡをほぼ一定間隔で導入した基板を得ることができるメリットがある。すなわち、同一面で、２種類の相補配列を持つｍＲＮＡを捕捉することができる。２種類のｍＲＮＡの区別には異なる粒子径の金ナノ粒子を用いればよい。

【００３７】

実施例１では、カルボキシル基をもつポリ尿素を基板上に形成して用いたが、このほかにも、側鎖にプローブとなるポリヌクレオチドやペプチドなどを固定できるような反応基

を導入できる残基を周期的に持つポリマーであれば利用することができる。たとえば、２種のモノマーの組み合わせがR_1－Ｃ＝Ｏ－Ｏ－Ｏ＝Ｃ－R_2－R_3－Ｃ＝Ｏ－Ｏ－Ｏ＝Ｃ－R_4の構造を有する酸無水物（R_1～R_4は任意の残基）とNH_2－R_5－NH_2の構造を有するジアミンモノマー（R_5は任意の残基）で、R_5にカルボキシル基を有するジアミノフェニル酢酸モノマーを用いることができる。酸無水物としては、４，４’－ヘキサフルオロイソプロピリデンビスフタル酸無水物のような構造のものを用いることができる。

【００３８】

このようなポリマーは、すなわちポリイミドである。ポリイミドは一般的にこのようなビス無水フタル酸とビスアミノ化合物を用いる。あるいは、たとえば長カルボキシル基を有するジアミノフェニル酢酸あるいは１，１０－ジアミノデカンのような脂肪族ジアミンの脂肪族位置にカルボン酸残基を有するモノマーとジ酸クロリドモノマーであるテレフタロイルジクロリドを蒸着重合により基板上に膜形成を行うポリアミドを利用することができる。プローブ固定用には長鎖脂肪族ジアミンに各種反応性残基を導入しておけばよい。蒸着重合としては既存の方法、たとえば、Jpn. J. Appl. Phys. 33, L1721-L1724(1994), Thin Solid Films, 215, 94-97 (1992)記載の方法に準じて、使用するモノマーの気化条件を考慮して行えばよい。

【００３９】

図４は、図３（Ｃ）に示したように、電極２の表面上のポリＴプローブ２０に捕捉したｍＲＮＡ群の識別方法を説明する図である。図３（Ｃ）は着床性の細胞を用いる細胞構成物質分取チップの例であるが、先にも述べたように、プローブ２０がアガロース濃度が薄いアガロースゲル膜９に埋もれた状態で固定されている場合は、ｍＲＮＡやｃＤＮＡなどは自由にプローブ２０にアクセスできるので、浮遊性の細胞用の図２（Ｃ）記載の構造の場合でも以下の手順ならびに説明は共通である。

【００４０】

まず、上部ガラス基板１’をはずし、石英基板１の上面のアガロースゲル膜４に形成した区画５の中を洗浄し、電極２上のポリＴプローブ２０にハイブリダイズしなかった物を除去する。次に、ポリＴプローブ２０にハイブリダイズしたｍＲＮＡ２３は、種々の異なったものがあるので、これを識別するための標識プローブの混合溶液を添加する。３時間４５℃でインキュベーションした後、１０ｍＭのＮａＣｌを含むクエン酸緩衝液ｐＨ７で洗浄する。この状態で電極２の上には、ポリＴプローブ２０にハイブリダイズしたｍＲＮＡ群と各ｍＲＮＡにハイブリダイズした標識プローブ３１，３２，３３が３体結合した状態になっている。標識プローブ３１，３２，３３には、容易に識別できる標識物３１’、３２’、３３’をつけておく。したがって、標識物３１’、３２’、３３’をカウントすることで、電極２上のポリＴプローブ２０に固定されたｍＲＮＡの種類と量を測定する。

【００４１】

すなわち、先にも述べたように、基板あるいは電極上に、細胞内の物質を、位置情報を保ったまま２次元平面に固定することになるから、ＤＮＡチップやプロテインチップのように各区画エレメントに異なるプローブを固定してエレメントの位置で対象となる生体物質を識別することはできない。したがって、２次元平面に固定されたｍＲＮＡを、これにハイブリダイズする標識物付きの標識プローブで同定することが必要である。

【００４２】

図５は、本発明によって、電極２上のプローブ２２に固定されたｍＲＮＡの標識物３１’、３２’、３３’が細胞２２の輪郭４１との関係において、２次元平面で認識できることを模式的に示す図である。６１－６３は電極２（または基板１０）に付けられたマーカーである。図５の状態のデータは、以下の手順で得られる。

（１）石英基板１の上面のアガロースゲル膜４に形成した区画５に細胞を配して必要な培養を行う。

（２）培養後、細胞２２を電極２の背面から顕微鏡を通してＣＣＤカメラで撮影する。

（３）３５５ｎｍのパルスレーザ２１を細胞２２の存在する区画５に照射する。

（４）パルスレーザ２１の照射後に、電源６０により電極２，２’間に電界を加える。
（５）図４で説明した洗浄、標識プローブの固着の手順を踏んだ後、再度、電極２の背面から顕微鏡を通してＣＣＤカメラで撮影する。

【００４３】

すなわち、最初の撮影で細胞２２の輪郭４１とマーカー６１－６３を持ったデータが得られるので、これを、画像データとしてコンピュータに保存する。次いで、２度目の撮影でプローブ２２に固定されたｍＲＮＡの標識物３１’、３２’、３３’とマーカー６１－６３を持ったデータが得られるので、これを、画像データとしてコンピュータに保存する。コンピュータで二つのデータをマーカーが一致するようにして重ねる画像処理をすれば、細胞２２の輪郭４１とｍＲＮＡ（標識物３１’，３２’，３３’）の相対的な位置も分かるデータが画像として得られることになる。

【００４４】

上記方法により１個の細胞からのｍＲＮＡを２次元投影する形で基板上に固定し、上皮がん（大腸由来）の細胞で発現するＥｐＣＡＭのｍＲＮＡの最終エクソンと最終エクソンの手前のエクソンにまたがる部分の配列とＥｐＣＡＭ遺伝子ゲノムのイントロン部分に対する配列、同様にＣＤ４４のｍＲＮＡの最終エクソンの手前のエクソンにまたがる部分の配列及びＣＤ４４ゲノムのイントロン部分の配列より標識プローブを設計し、これらの一細胞内での分布と定量的計測を試みる。ＥｐＣＡＭのｍＲＮＡとＥｐＣＡＭ遺伝子ゲノムのイントロン部分のプローブにはそれぞれ１０ｎｍと５０ｎｍの金ナノ粒子、ＣＤ４４のｍＲＮＡ及びＣＤ４４ゲノムのイントロン部分のプローブには２０ｎｍと７０ｎｍの金ナノ粒子がインデクシング用のマーカー（標識物）として結合している。各粒子の粒度分布はＣＶ＝２％以内のものを使用する。

【００４５】

電極２上にｍＲＮＡ捕捉用のポリＴプローブを固定し、区画５の細胞２２に３５５ｎｍのパルスレーザ２１を照射して細胞２２を破壊し、電界を用いてｍＲＮＡをポリＴプローブに捕捉する上記の方法でｍＲＮＡ全体を電極２上に固定する。このとき、細胞内のｍＲＮＡは基板に対して投影される形で固定されるので細胞内位置情報を保つことができる。細胞２２は、上記上皮細胞を区画５に配し、５％二酸化炭素、１１％酸素雰囲気中で１日間区画５に供給した培地中で培養することで電極２上に着床する。固定されている細胞の位置は予め顕微鏡で確認し、電極２の背面から顕微鏡を通してＣＣＤカメラで撮像してデータ化しておく。この状態では、細胞は、電極２に対して着床した面と培地に接する面の物理的な面に接することになる。よって、ｍＲＮＡなどを２次元的に投影する本発明で得られるデータは、細胞が基板上に固定された細胞の着床面に対しての２次元投影ということになる。すなわち、細胞が基板と結合している面と溶液に接している面では、細胞内の機能が異なる。常に着床面を基準面として細胞内の物質分布を測定することができるので、３次元ではなく２次元投影でも有用な情報が得られる。

【００４６】

電極２上のプローブ２０にｍＲＮＡやゲノムＤＮＡなどのポリヌクレオチド２３を捕捉した区画５に金ナノ粒子をインデクシングマーカ３１’、３２’、３３’としたＥｐＣＡＭとＣＤ４４のｍＲＮＡおよびゲノム配列に対する標識プローブ３１、３２、３３の懸濁液を添加し、ｍＲＮＡやゲノムＤＮＡなどのポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションさせる。ハイブリダイゼーション条件は金ナノ粒子が凝集しないでハイブリダイゼーションが効率よく行われる条件として、１００ｍＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭクエン酸緩衝液ｐＨ７．４で行う。その結果、図６の模式図に見られるような結果が得られる。図６では細胞に対する各インデクシングマーカ（金ナノ粒子）の位置関係がわかるようにデフォルメして記載している。

【００４７】

アガロースゲル膜４で基板１上に形成した細胞を保持する区画５に着床した大腸がん由来のがん細胞を予め顕微鏡観察し、ＣＣＤカメラでデータ化したときの細胞の境界を４１、核の境界を４２で表す。細胞は３５５ｎｍのパルスレーザ２１で破砕し、電極２，２’

Curio EX1025-p. 37
Curio v Prognosys
IPR2024-01289

間にかける電圧による電界でポリヌクレオチド成分を電極２上に固定している。一方、ここでは、電極２上を走査型電子顕微鏡で観察し、データ化すると、４種類のサイズの金ナノ粒子４３～４６の分布が観察される。サイズの違いから判断して、４３はＥｐＣＡＭ遺伝子のイントロンに対応する配列を有するポリヌクレオチド、４４はＣＤ４４遺伝子に対応する配列を有するポリヌクレオチドを検出していると思われる。これらはおもに核内に検出される。核内に検出されるイントロン配列は、ゲノム上の配列とゲノムから転写された未成熟ｍＲＮＡに由来すると考えることができる。少量のイントロン配列を認識する粒子４３’と４４’が細胞室に検出されるが、これらは未成熟ｍＲＮＡから切り取られたイントロンが分解される前に検出されたものと考えることができる。金ナノ粒子４５と４６は核には存在せず、細胞室に存在するので、それぞれＥｐＣＡＭとＣＤ４４の成熟ｍＲＮＡと考えることができる。成熟ｍＲＮＡではイントロンが抜け落ちるからである。

【００４８】

本発明ではこのように各粒子はゲノム上の遺伝子配列や未成熟ｍＲＮＡや成熟ｍＲＮＡを分子別に検出できる。

【００４９】

（実施例２）

実施例２では、細胞の破砕をレーザーによらず、細胞構成物質も電解による移動ではなく、細胞を瞬時に基板上に焼き付ける方法を利用する。図７（Ａ）は実施例２の細胞構成物質分取チップを示す平面図、（Ｂ）は図７（Ａ）のＡ－Ａ位置で矢印方向に見た断面図である。１０は基板である。実施例２では、基板１０は石英に代えて、ｍＲＮＡと発現タンパク質を同時に吸着固定できるように、２種類のモノマーを交互に重合させて、プラスチャージを持つアミノ基や疎水基を交互に有する基板とする。第１のモノマーとしてはたとえば疎水性残基としてベンゼン環を持つメチレンジフェニル４，４’ヂイソシアナートと第２のモノマーとしては実施例１で示したジアミノフェニル酢酸を等モル比で反応させ重合させる。あるいは、前記したジアミノフェニル酢酸モノマーと４，４’－ヘキサフルオロイソプロピリデンビスフタル酸無水物を重合させて親水基と疎水基を交互に導入したものを利用してもよい。

【００５０】

この状態では基板表面には疎水性残基は存在するがプラスにチャージする残基は無いので、ジアミノフェニル酢酸のカルボキシル基をアミノ基に変換する。すなわち、カルボキシル基にジシクロヘキシルカルボジイミド系の活性化剤存在下でエチレンジアミンを反応させ、カルボキシル基を一級アミン残基（アミノ基）に変換する。これにより、疎水性残基とアミノ基を交互に有するポリマー薄膜からなる表面を有する基板を得ることができる。ここではアミノ基と疎水性残基を交互に有するポリマー薄膜を有する基板を用いたが、ポリアミドであるナイロンを基板上に重合させた薄膜やポリスチレン薄膜を有する基板を用いてもよい。

【００５１】

このようにして調整した基板１０上に、実施例１と同様に、厚さ１００μｍのアガロースゲル膜４が形成されており、所定の間隔で細胞保持のための区画５が作成される。区画５の大きさは、例えば、３０μｍ四方とされる。各区画５間は、必要なら、トンネル６で連結され、区画５に保持された細胞間の相互インタラクションが可能とされる。実施例２では電極２と上面ガラス１’は持たない。

【００５２】

実施例１と同様に、区画５に緩衝液または培養液を入れ、細胞を配した後、必要なら、所定の条件で細胞を培養する。細胞が着床した基板１０を軽く水切りした後、１６０℃の乾燥ヘリウム雰囲気に曝す。これにより瞬間的に細胞を乾燥させて基板１０の表面に固着する。あるいは、細胞が着床した基板１０を液体窒素で瞬間的に凍結した後に、乾燥させてもよい。あるいは、ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドのような試薬を用いて細胞を固定してもよい。これにより、細胞内のｍＲＮＡやタンパク質も細胞内の２次元情報を保ったままで固定することができる。次に、７０％アルコールに浸し、低分子化合物を除

去する。

【００５３】

ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドを使用した場合はポリヌクレオチドのアミン残基やタンパク質のアミノ基が修飾されているので、必要に応じて１００℃の水蒸気にさらし、これらを修復する。

【００５４】

標識プローブを細胞骨格内のｍＲＮＡにハイブリダイズさせるために、細胞膜を処理して標識プローブが反応できるようにする。ここでは一般的に用いられている酵素による処理を用いる。たとえば、ペプシンを含む溶液を添加し、細胞膜表面に穴を開け、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で洗浄し、プローブ標識物がｍＲＮＡに反応できるようにする。

【００５５】

ＥｐＣＡＭのｍＲＮＡ配列に対するプローブに１０ｎｍの金粒子を結合したインデクシングプローブと、タンパク質のＥｐＣＡＭに結合するＲＮＡアプタマーに２０ｎｍの金粒子を結合したインデクシングプローブを用いてＥｐＣＡＭのｍＲＮＡとタンパク質の同時検出を行う。

【００５６】

ＥｐＣＡＭに親和性のあるＲＮＡアプタマー合成は進化工学的な方法を用いて作成する。方法を説明する。ＥｐＣＡＭに結合するＲＮＡアプタマーの調製は、配列番号２に示すように、４０塩基からなるランダムな配列の１本鎖ＤＮＡの５’末端にＴ７プロモーター配列を含む２６塩基長の配列を導入し、３’末端に２４塩基からなるＰＣＲ用のプライミングサイトを導入した全長８９塩基長の配列を合成する。配列は５’側から
ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＣＡＡＮ（４０）ＴＴＣＧＡＣＡＧＧＡＧＧＣＴＣＡＣＡＡＣＡＧＧ：（配列番号２）
である。Ｔ７プロモーター配列を用いてＲＮＡポリメラーゼでＲＮＡに転写する。ＲＮＡへの転写には５００μｌスケールで１００ｐｍｏｌのＤＮＡに１００ｕのＴ７ポリメラーゼを作用させる。基質は各々３ｍＭの２’－Ｆ－ＣＴＰ，２’－Ｆ－ＵＴＰ，各々１ｍＭのＡＴＰとＧＴＰで２５℃で１０時間行う。ＲＮＡ転写後ＤＮａｓｅＩでＤＮＡを分解し電気泳動で転写ＲＮＡ産物を回収する。回収した転写ＲＮＡ産物を熱変性後、２ｍＭの$MgCl_2$を含むＰＢＳ（ｐＨ７．４）中でＥｐＣＡＭ固定セファロースＣＬ４Ｂカラムに通す。結合した転写ＲＮＡ成分を７Ｍ尿素を含む溶液で溶出させる。得られる転写ＲＮＡ成分を逆転写し両端の既知配列部分に相補な配列のプライマーペアーでＰＣＲ増幅する。得られるＰＣＲ産物を再度Ｔ７プロモーターで転写し同様にＥｐＣＡＭ固定セファロースＣＬ４Ｂカラムで捕捉し、結合した転写ＲＮＡ成分を回収する。転写－捕捉－回収－ＰＣＲ増幅の工程を１５回繰り返し、ＥｐＣＡＭに特異的に反応するＲＮＡアプタマーを得る。

【００５７】

得られるアプタマーにNucleic Acids Research 26,3915-3924 (1998)記載の論文Staining of cell surface human CD4 with 3'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry記載の方法のインビトロトランスクリプションでアプタマーの５’末端にはチオリン酸基を挿入する。このチオリン酸基にヨードアセチル基を導入したビオチンを反応させ、５’ビオチン化ＲＮＡアプタマーを得る。ストレプトアビジンコンジュゲート金ナノビーズを反応させ、識別物質が金ナノ粒子で、ＥｐＣＡＭに特異的に反応するＲＮＡアプタマーを得る。

【００５８】

ＥｐＣＡＭのｍＲＮＡ配列に対するプローブに１０ｎｍの金粒子を結合したインデクシングプローブと、タンパク質のＥｐＣＡＭに結合するＲＮＡアプタマーに２０ｎｍの金粒子を結合したインデクシングプローブを等モル比で混合し、さらにＲＮａｓｅインヒビターを添加した溶液を、細胞を固定した基板に添加する。２時間４５℃でインキュベーションする。反応終了後、冷水で洗浄し、走査型電子顕微鏡あるいは原子間力顕微鏡で観察する。得られる結果を図８に示す。実施例１で得られた結果を示す図６と同様に、細胞膜５

１と核膜５２の位置を細胞固定の前に確認する。粒径から考えてＥｐＣＡＭのｍＲＮＡに結合している金ナノ粒子を５５、ＥｐＣＡＭのタンパク質に結合していると考えられる金ナノ粒子を５６に示す。このケースでは細胞室にｍＲＮＡが存在することがわかる。また、ＥｐＣＡＭタンパク質は全体に検出されるが、５１の境界上に多く集結していることから、このようなケースでは細胞表面に局在していると考えることができる。

【００５９】

なお、実施例２ではｍＲＮＡとタンパク質に加え、ゲノムも同時に基板上に固定されるので、これらに対応するナノ粒子付きプローブを反応させることで、同一基板上で同一細胞のｍＲＮＡとタンパク質発現の空間的情報付きの定量データを得ることができる。核に存在するゲノムの特定遺伝子もｍＲＮＡと区別して同時検出することができる。これを実現するには、ｍＲＮＡとタンパク質とゲノムに対して異なるインデクシングのナノ粒子を用いればよい。たとえば、ｍＲＮＡには金ナノ粒子をベースとして種々元素をドープした粒子径の異なるナノ粒子、タンパク質には銀をベースにした同様な粒子、ゲノムに対してはプラチナをベースとした同様な粒子を用いることができる。あるいは、ゲノムに関しては蛍光ナノ粒子や蛍光付き分岐プローブＤＮＡを用いてもよい。同時に計測するのではなく、ｍＲＮＡとタンパク質とゲノムに対するナノ粒子付きプローブを順次反応させて、時間で区切って検出することも有効である。

【００６０】

（実施例３）

実施例３は細胞が集合した組織様の検体、例えば、組織切片を細胞内の物質の位置情報を保ったまま２次元平面に固定する場合である。図９（Ａ）は実施例３の細胞構成物質分取チップを示す平面図、（Ｂ）は図９（Ａ）のＡ－Ａ位置で矢印方向に見た断面図である。基板１０は予め凍結しておき、その上に組織を乗せて細胞１層分を凍結固定するとともに、剥がして調製する。あるいは、凍結細胞組織を、ミクロトームを用いて２μｍの厚さで切片として基板１０の区画５に配置してもよい。実施例３では、細胞が集合した組織様の検体を対象としているので、実施例１，２のように、細胞単位の区画５を設けるのに代えて、組織様の検体が収納できる区画５とした。その他の点では、実施例１，２のいずれの態様でも良いが、図９では実施例２と同じものとした。すなわち、ＥｐＣＡＭのｍＲＮＡ配列に対するプローブに１０ｎｍの金粒子を結合したインデクシングプローブと、タンパク質のＥｐＣＡＭに結合するＲＮＡアプタマーに２０ｎｍの金粒子を結合したインデクシングプローブを用いてＥｐＣＡＭのｍＲＮＡとタンパク質の同時検出を行う。ＥｐＣＡＭのｍＲＮＡ検出を試みると、組織断片８０の特定細胞層８１にＥｐＣＡＭ由来のｍＲＮＡに結合したと考えられる１０ｎｍの金粒子と、ＥｐＣＡＭタンパク質に結合したと考えられる２０ｎｍの金粒子が検出される。他の部位８２からは検出されないか検出される金ナノ粒子の数が細胞８１の位置に比べ１／１００以下である結果を得る。

【００６１】

本発明では、細胞を２次元面に投影したものとして観察することになるから、細胞が複数連なっていても、一層のものであることが望ましい。仮に、２層以上あれば、それぞれの層の細胞構成物質が重なってしまうから、期待している情報が得られない。

（実施例４）

実施例４は、実施例１と同様、複数の細胞のインタラクションを保ちながら個別区画に保持することのできる図１０に示した細胞構成物質分取チップを用いる。ここでは図１と異なる点を中心に説明する。区画５の領域（ほぼ０．０５ｍｍ×０．０５ｍｍ）には異なるプローブ５－１がスポットされている。ここではプローブを約５μｍのスポットとなるように１０μｍで計１６点作成した系で説明する。インクジェットを用いることでスポット径を１μｍ程度まで小さくすることが可能となるので、スポットを２μｍピッチで作成することで５００項目程度までの同時測定が可能なチップを作成することができる。しかもこのチップは複数の細胞を個別に測定できる。まず、細胞７を各区画５に配し、一定時間培養することで細胞間のネットワークを作成し、チップ上に細胞を配した人工組織を形成させる。各細胞区画を仕切る部材４はアガロースゲルでできており、細胞を配した後で

Curio EX1025-p. 40
Curio v Prognosys
IPR2024-01289

、区画間をレーザー過熱してこの部分のアガロースゲルを除去し、トンネル６を形成することで、任意の細胞間を任意の順序で相互作用させて作成する。もちろん細胞保持区画をＳＵ８のような光硬化性の樹脂で作成しておくことも可能である。この場合は、流路６も予め作製しておく。

【００６２】

後述する工程で、生体内物質が拡散してしまうのを極力防ぐために、図１１に示すようにＳＵ８の部分区画５－２を予め作成したチップで、各区画間はアガロースゲル薄膜４が存在するような構造とすることが最も適している。ＳＵ８の部分区画５－２はスリット５－３が四方に開いており、区画５－２間のアガロースを除去した溝６を作成すると各区画に配した細胞７がスリット５－３と溝６を利用してお互いにジャンクション７－１を作成することができる。

【００６３】

次にＵＶ光を利用して細胞を破壊する。この状態で特に生体物質の固定操作を行わなければ実質的にＳＵ８で仕切られた部分区画５－２内に生体内物質が広がる。ＳＵ８の仕切りがあるので区画外に生体物質が漏れ出ることを最小にすることができる。一定時間インキュベートするか、電極２に実施例1で示したような所定の電圧を印加し、生体物質を区画５の中に配したプローブ５－１に親和的に結合させる。すなわち、１６項目のプローブに対応する物質が基板上のポット位置に捕捉される。捕捉された生体物質はナノ粒子標識プローブで更に分類標識し、操作型電子顕微鏡や原子間力顕微鏡で粒子をカウントする。

【００６４】

たとえば、各スポットに３種類の捕捉用プローブをミクスチャーとして固定し、各々捕捉用プローブに対応する検出用のＤＮＡプローブに１０種類の異なる粒子径と異なる材質組み合わせのナノ粒子を標識したものを用いる。すなわち検出用ＤＮＡプローブの種類は１６×１０種類で、１６種ごとに異なる１０種類の粒子径のナノ粒子で標識したグループの混合液になっている。粒子径として１０、２０、３０、４０、５０ｎｍの各種を利用する。材質としては金、銀を利用すると、合計１0種類の標識物となる。

【００６５】

たとえば、区画５に配した細胞を前記実施例に従いＵＶ光で破壊し、ｍＲＮＡを2時間ハイブリダイズさせた後、ナノ粒子標識ＤＮＡプローブ混合液を添加し、基板表面に細くされているｍＲＮＡ群に対して2時間ハイブリサイズさせる。洗浄乾燥後、各区画５の表面に結合しているナノ粒子を走査型電子顕微鏡で網羅的にスキャンすると、各スポット上の１０種類のナノ粒子の数を計数することができる。その結果、各細胞あたり１６０項目のｍＲＮＡの定量解析が可能となる。

【００６６】

スポットに固定する物質として、細胞内で合成されるタンパク質や糖タンパク質に対するアプタマーを利用する系を説明する。個々の測定項目のタンパク質や糖たんぱく質に対応するアプタマーは本実施例ではＤＮＡアプラマーを用いる。ＤＮＡアプタマーの調製法は、公知例に従いＳＥＬＥＸ法で調整する（J. Clin. Invest. 98, 2688-2692(1996), Nucleic Acids Res. 24, 702-706(1996)）。各アプタマーをＳＵ８構造体５－２で仕切られた全ての区画５にスポットする。各アプタマーには５’末端にアミノ基が導入されているのでこれを実施例１記載の方法を用いて基板上に固定する。基板上にはたとえば、上記J. Clin. Invest. 98, 2688-2692(1996)記載のＣＤ６２Ｌに対するアプタマーやNucleic Acids Res. 24, 702-706(1996)記載のトロンビンに対するアプタマーが固定されることになる。このようにして調整したアプタマースポットアレイ（図１１の５－１）を複数の区画５に全て持つ複数細胞対応のチップ１の各区画５に細胞７を挿入し、お互いにギャップジャンクション５－４を形成させ、細胞ネットワークを形成する。ＵＶレーザーで細胞を破壊し３０分間インキュベートすると、区画５の各スポットにアプタマーに対応するタンパク質や糖タンパク質が捕捉される。次に、未反応の生体物質を０．０５％のＴｗｅｅｎ２０と１０ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを含むＰＢＳ（ｐＨ７．４）で洗浄する。同じ溶液に懸濁した各種粒子径のナノ粒子標識抗体の混合液を基板１表面に添加し、１５分間反応させる。

各抗体は種類ごとに異なる粒子径の金ナノ粒子で個別標識されている。ここで、ＣＤ６２Ｌに対応する抗体に結合している粒子は２０ｎｍの金ナノ粒子である。反応後、この粒子径の金ナノ粒子の存在を測定すると、ＣＤ６２Ｌに対するアプタマーをスポットした位置に粒子は２０ｎｍの金ナノ粒子が計測される。他のスポット位置ではバックグランドレベルの数しか計測されない結果を得る。

［配列表］

SEQUENCE LISTING

<110> Onchip Cellomics Consortium

<120> A preparation chip and a preparation system for materials composed in a cell and analysys methods for materials composed in a cell

<130> NT05P0453

<160> 2

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

cgaagcacct ctgatgcagg aggattctct gagtcataga agaagatttt 50

<210> 2

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> n indicates random sequence of a c g and t

<400> 2

taatacgact cactataggg agacaa nnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnttcg acaggaggct cacaacagg 79

【図面の簡単な説明】

【００６７】

【図１】実施例１の細胞構成物質分取チップを示す平面図、（Ｂ）は図１（Ａ）のＡ－Ａ位置で矢印方向に見た断面図である。

【図２】主に浮遊細胞用の細胞構成物質分取チップに関し、（Ａ）は２枚の基板１，１’でサンドイッチされた区画５に細胞が配された状態の断面を示す図、（Ｂ）は区画５内の細胞をパルスレーザ２１によって破壊すると同時に電極２，２’の間に電源６０により、電界（１．２Ｖ）をかけ、ｍＲＮＡやＤＮＡなどの核酸２３をプラスの電極２の方向に引き寄せる過程の様子を模視的に示す図、（Ｃ）は、図２（Ｂ）の状態から時間が経過した状態を模視的に示す図である。

【図３】着床性細胞用の細胞構成物質分取チップに関し、（Ａ）は２枚の基板１，１’でサンドイッチされた区画５に細胞が配された状態の断面を示す図、（Ｂ）は区画５内の細胞をパルスレーザ２１によって破壊すると同時に電極２，２’の間に電源６０により、電界（１．２Ｖ）をかけ、ｍＲＮＡやＤＮＡなどの核酸２３をプラスの電極２の方向に引き寄せ、タンパク質などを基板底面から引き離す過程の様子を模視的に示す図、（Ｃ）は、図２（Ｂ）の状態から時間が経過し、核酸２３がプローブ２０にハイブリダイズした状態を模視的に示す図である。

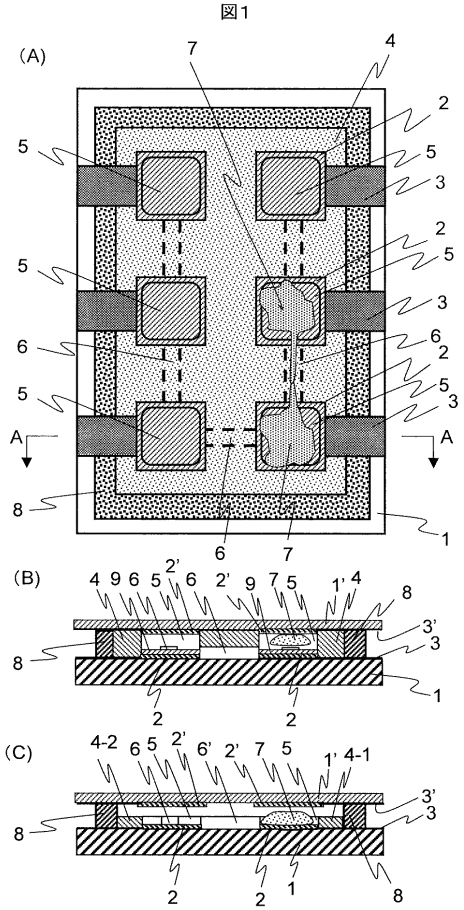
【図４】電極２の表面上のポリＴプローブ２０に捕捉したｍＲＮＡ群の識別方法を説明する図である。

【図５】電極２上のプローブ２２に固定されたｍＲＮＡの標識物３１’、３２’、３３’が細胞２２の輪郭４１との関係において、２次元平面で認識できることを模式的に示す図である。

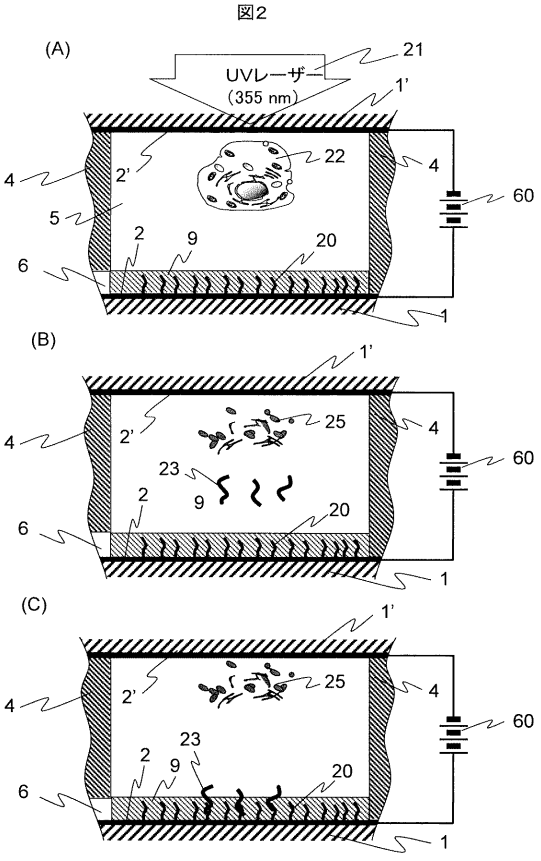
【図６】電極２上に固定されたｍＲＮＡの標識物を模式的に示す他の例の図である。

【図７】（Ａ）は実施例２の細胞構成物質分取チップを示す平面図、（Ｂ）は図６（Ａ）のＡ－Ａ位置で矢印方向に見た断面図である。
【図８】基板上に固定されたｍＲＮＡの標識物を模式的に示す他の例の図である。
【図９】（Ａ）は実施例３の細胞構成物質分取チップを示す平面図、（Ｂ）は図８（Ａ）のＡ－Ａ位置で矢印方向に見た断面図である。
【図１０】実施例３の細胞構成物質分取チップを示す平面図である。
【図１１】実施例３の細胞構成物質分取チップの変形例を示す平面図である。
【符号の説明】
【００６８】
１…石英基板、１’…ガラス基板、２…透明電極、２’…対向電極、３…引き出し電極、４，４－１，４－２…アガロースゲル膜、５…区画、６，６’…溝、７…細胞、８…スペーサー、９…細胞吸着防止用アガロース膜、１０…基板、２０…プローブ、２１…パルスレーザ、２２，２２’…細胞、２３…核酸、２５…タンパク質、６０…電源、３１，３２，３３…標識プローブ、３１’，３２’，３３’…標識物、４１…細胞の境界、４２…核の境界、４３，４４，４５，４６…金ナノ粒子、４３’，４４’…少量のイントロン配列を認識する粒子、５１…細胞膜、５２…核膜、５５，５６…金ナノ粒子、６１，６２，６３…マーカー、８０…組織断片、８１…特定細胞層、８２…組織断片のその他の部位。

【図１】

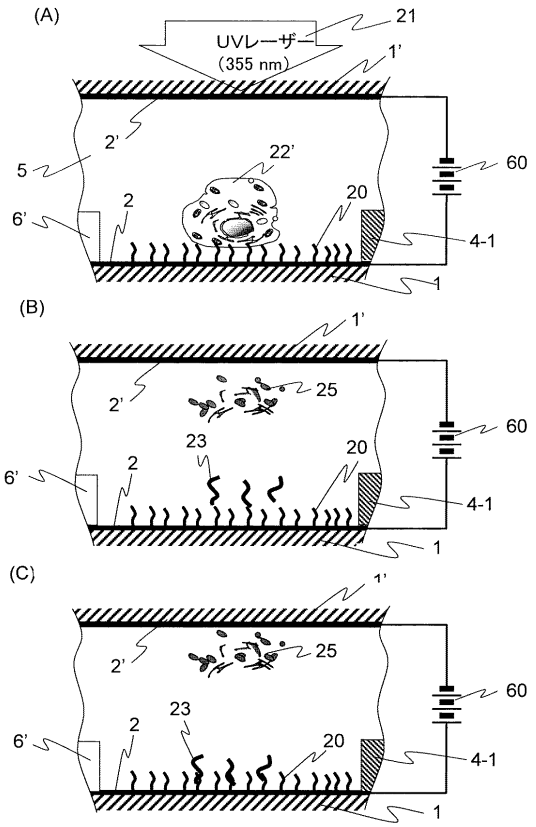


【図２】



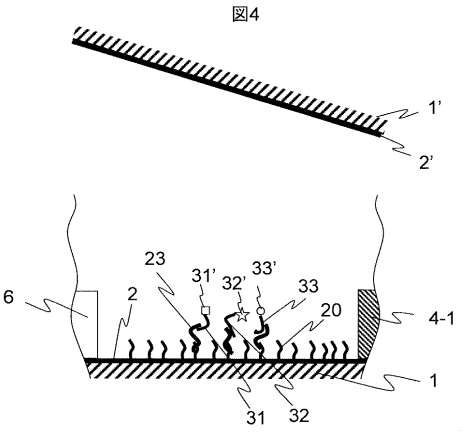
【図３】

図3



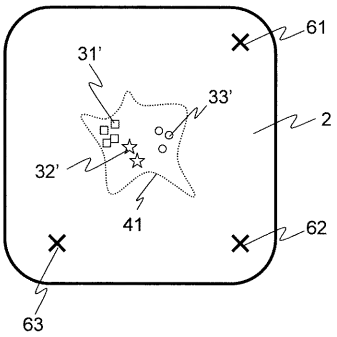
【図４】

図4



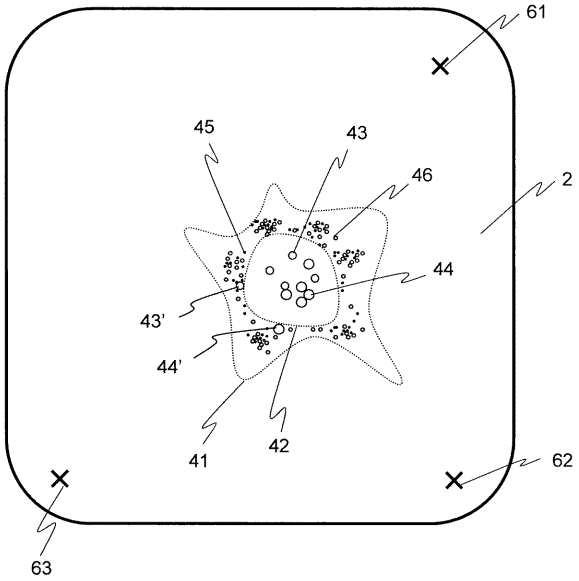
【図５】

図5



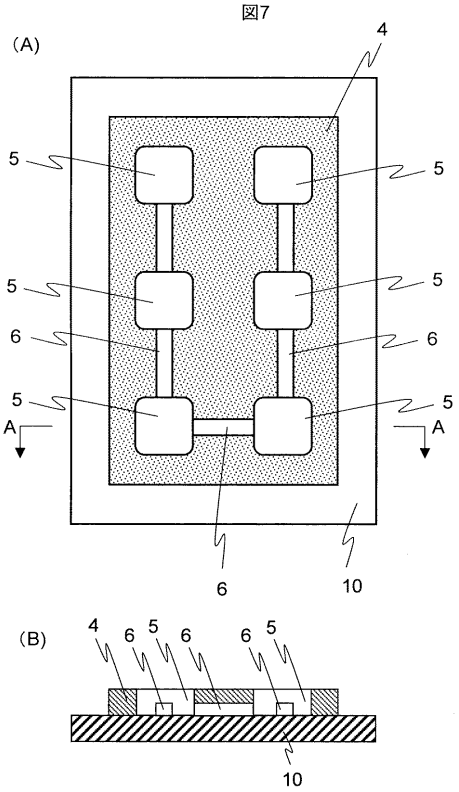
【図６】

図6



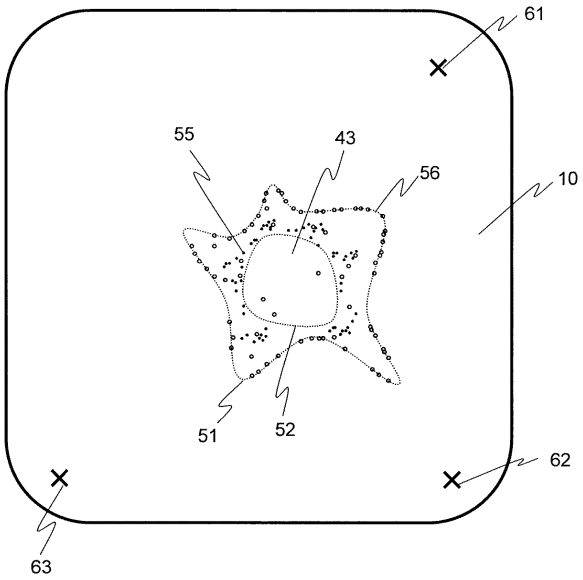
【図７】

図7



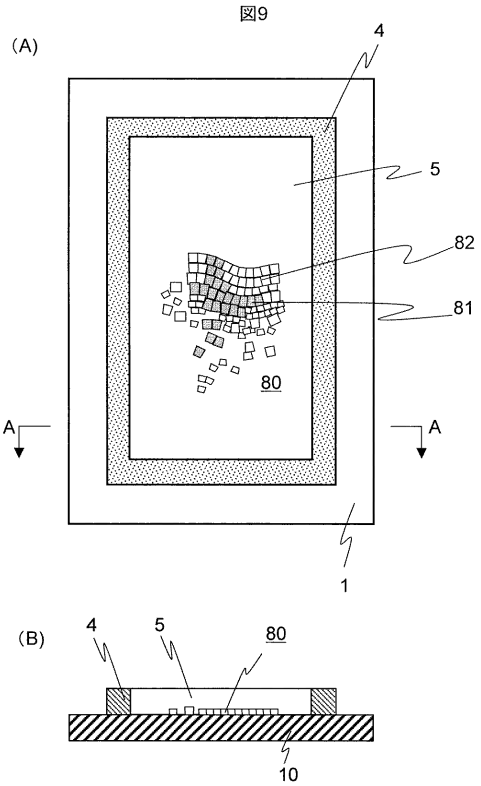
【図８】

図8



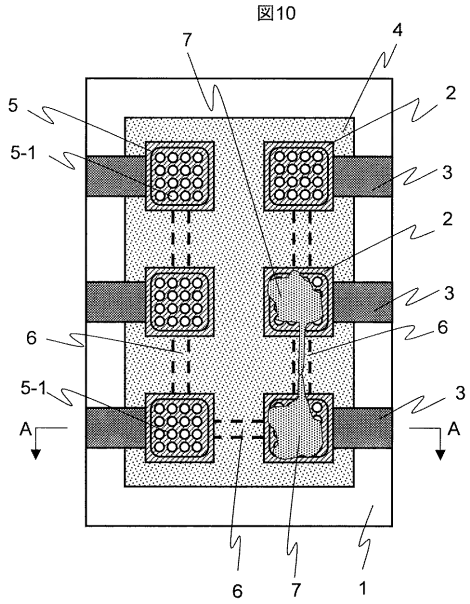
【図９】

図9



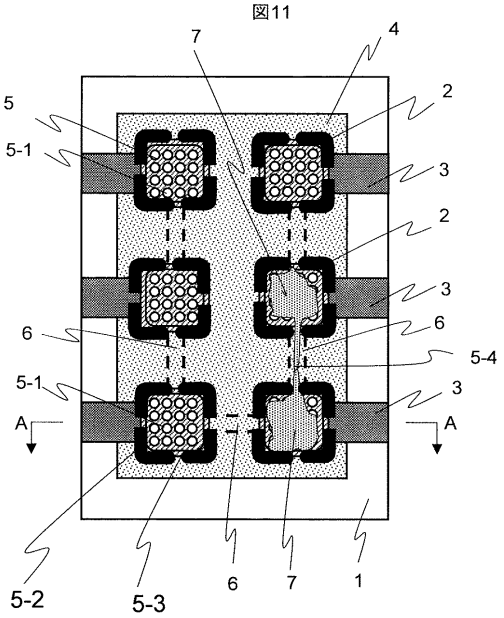
【図１０】

図10



【図１１】

図11



【手続補正書】
【提出日】平成17年12月7日(2005.12.7)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６６】
スポットに固定する物質として、細胞内で合成されるタンパク質や糖タンパク質に対するアプタマーを利用する系を説明する。個々の測定項目のタンパク質や糖たんぱく質に対応するアプタマーは本実施例ではＤＮＡアプラマーを用いる。ＤＮＡアプタマーの調製法は、公知例に従いＳＥＬＥＸ法で調整する（J. Clin. Invest. 98, 2688-2692(1996), Nucleic Acids Res. 24, 702-706(1996)）。各アプタマーをＳＵ８構造体５－２で仕切られた全ての区画５にスポットする。各アプタマーには５’末端にアミノ基が導入されているのでこれを実施例１記載の方法を用いて基板上に固定する。基板上にはたとえば、上記J. Clin. Invest. 98, 2688-2692(1996)記載のＣＤ６２Ｌに対するアプタマーやNucleic Acids Res. 24, 702-706(1996)記載のトロンビンに対するアプタマーが固定されることになる。このようにして調整したアプタマースポットアレイ（図１１の５－１）を複数の区画５に全て持つ複数細胞対応のチップ１の各区画５に細胞７を挿入し、お互いにギャップジャンクション５－４を形成させ、細胞ネットワークを形成する。ＵＶレーザーで細胞を破壊し３０分間インキュベートすると、区画５の各スポットにアプタマーに対応するタンパク質や糖タンパク質が捕捉される。次に、未反応の生体物質を０．０５％のＴｗｅｅｎ２０と１０ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを含むＰＢＳ（ｐＨ７．４）で洗浄する。同じ溶液に懸濁した各種粒子径のナノ粒子標識抗体の混合液を基板１表面に添加し、１５分間反応させる。各抗体は種類ごとに異なる粒子径の金ナノ粒子で個別標識されている。ここで、ＣＤ６２Ｌに対応する抗体に結合している粒子は２０ｎｍの金ナノ粒子である。反応後、この粒子径の金ナノ粒子の存在を測定すると、ＣＤ６２Ｌに対するアプタマーをスポットした位置に粒子は２０ｎｍの金ナノ粒子が計測される。他のスポット位置ではバックグランドレベルの数しか計測されない結果を得る。
［配列表］
SEQUENCE LISTING
<110> Onchip Cellomics Consortium
<120> A preparation chip and a preparation system for materials composed in a cell and analysys methods for materials composed in a cell
<130> NT05P0453
<160> 2
<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221>
<223> Synthesized DNA
<400> 1
cgaagcacct ctgatgcagg aggattctct gagtcataga agaagatttt 50
<210> 2
<211> 89
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<221>
<223> n stands for random sequence of a c g and t
<400> 2
taatacgact cactataggg agacaannnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
nnnnnnttcg acaggaggct cacaacagg 89

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4B029 AA07 BB15 BB20 CC03 CC08 FA15
4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR35 QR55 QR84 QS34
QX01