【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成18年11月30日(2006.11.30)

【公開番号】特開2006-187270(P2006-187270A)
【公開日】平成18年7月20日(2006.7.20)
【年通号数】公開・登録公報2006-028
【出願番号】特願2005-184136(P2005-184136)
【国際特許分類】
　Ｃ１２Ｎ　15/09　　(2006.01)
【ＦＩ】
　Ｃ１２Ｎ　15/00　　ＺＮＡＡ

【手続補正書】
【提出日】平成18年10月13日(2006.10.13)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
　リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板に、ＤＮＡ伸長用のプライマーを固定化させ、
　所望する配列を有する鋳型ＤＮＡ断片または鋳型ＲＮＡ断片、ＤＮＡ鎖伸長用酵素系、およびヌクレオチドモノマーを含む試料が導入された反応系を、ＤＮＡ鎖を熱変性する温度（以下、「熱変性処理温度」という）まで引き上げ、
　前記反応系の温度をアニール処理する温度（以下、「アニール処理温度」という）まで下げ、
　前記反応系でＤＮＡ鎖の伸長反応を行い、
　全処理を同一の液相系で行うことを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項２】
　請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
　前記反応系で、アニール処理してＤＮＡ鎖の伸長反応を行うまでに洗浄処理が介在しないことを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項３】
　請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
　前記鋳型がＤＮＡ断片である場合に、前記ＤＮＡ鎖伸長用酵素系は、ＤＮＡポリメラーゼまたはＤＮＡリガーゼのいずれかであることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項４】
　請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
　前記鋳型がＲＮＡ断片である場合に、前記ＤＮＡ鎖伸長用酵素系は、逆転写酵素、またはＤＮＡリガーゼおよび逆転写酵素の組合せのいずれかであることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項５】
　請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
　前記基板の第一単位に含まれるリン酸エステルより誘導される基は、ホスホリルコリン基、ホスホリルエタノールアミン基、ホスホリルセリン基、ホスホリルイノシトール基、ホスホリルグリセロール基、ホスファチジルホスホリルグリセロール基のいずれかである

ことを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項６】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記ＤＮＡ鎖伸長反応は、前記反応系の温度を、前記アニール処理温度から前記熱変性処理温度まで徐々に上昇させて行われることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項７】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記ＤＮＡ鎖伸長反応は、前記反応系の温度を、前記アニール処理温度と前記熱変性処理温度との間の所定の温度に変化させて行われることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項８】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記プライマーは、所定の着目遺伝子の特徴配列を含む塩基配列の一塩基を他の塩基に置き換えたＤＮＡ断片であることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項９】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記プライマーは所定数の塩基配列からなり、各々のプライマーは全組合せのそれぞれの配列を有するＤＮＡ断片であることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項１０】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記鋳型ＤＮＡ断片は、所定のＲＮＡを逆転写酵素で処理して得られるｃＤＮＡ断片であることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項１１】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記反応系に導入される試料に含まれるヌクレオチドモノマーの少なくとも一種がラベルされたものであることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項１２】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記プライマーが、前記基板のカルボン酸誘導基の部位で共有結合して、当該基板の最表面に固定化されることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項１３】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記高分子物質がブチルメタクリレート基を含む第三単位を有することを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項１４】
請求項１または１３に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記基板は、前記高分子物質を有する第一の高分子物質に加えて、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を含む第一単位と、ブチルメタクリレート基を含む第三単位とを有する第二の高分子物質を含み、
前記第一の高分子物質と第二の高分子物質が混合されている構成とすることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項１５】
請求項１に記載のＤＮＡ鎖伸長方法において、
前記基板が、プラスチック材料からなることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長方法。
【請求項１６】
リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板に、ＤＮＡ増幅用のプライマーを固定化させ、
所望する配列を有する鋳型ＤＮＡ断片または鋳型ＲＮＡ断片、ＤＮＡ鎖伸長用酵素系、およびヌクレオチドモノマーを含む試料が導入された反応系を、ＤＮＡ鎖を熱変性する温度（以下、「熱変性処理温度」という）まで引き上げ、

前記反応系の温度をアニール処理する温度（以下、「アニール処理温度」という）まで下げ、
前記反応系でＤＮＡ鎖の伸長反応を行い、
ＤＮＡ鎖の熱変性処理を行って、
および必要に応じてＤＮＡ鎖のアニール処理、伸長反応および熱変性処理を行い、
全処理を同一の液相系で行うことを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項１７】
請求項１６に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記反応系で、アニール処理してＤＮＡ鎖の伸長反応を行うまでに洗浄処理が介在しないことを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項１８】
請求項１６に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記鋳型がＤＮＡ断片である場合に、前記ＤＮＡ鎖伸長用酵素系は、ＤＮＡポリメラーゼまたはＤＮＡリガーゼのいずれかであることを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項１９】
請求項１６に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記鋳型がＲＮＡ断片である場合に、前記ＤＮＡ鎖伸長用酵素系は、逆転写酵素、またはＤＮＡリガーゼおよび逆転写酵素の組合せのいずれかであることを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項２０】
請求項１６に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記基板の第一単位に含まれるリン酸エステルより誘導される基は、ホスホリルコリン基、ホスホリルエタノールアミン基、ホスホリルセリン基、ホスホリルイノシトール基、ホスホリルグリセロール基、ホスファチジルホスホリルグリセロール基のいずれかであることを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項２１】
請求項１６に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記反応系に導入される試料に含まれるヌクレオチドモノマーの少なくとも一種がラベルされたものであることを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項２２】
請求項１６に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記プライマーが、前記基板のカルボン酸誘導基の部位で共有結合して、当該基板の最表面に固定化されることを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項２３】
請求項１６に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記高分子物質がブチルメタクリレート基を含む第三単位を有することを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項２４】
請求項１６または２３に記載のＤＮＡ鎖増幅方法において、
前記基板は、前記高分子物質を有する第一の高分子物質に加えて、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を含む第一単位と、ブチルメタクリレート基を含む第三単位とを有する第二の高分子物質を含み、
前記第一の高分子物質と第二の高分子物質が混合されている構成とすることを特徴とするＤＮＡ鎖増幅方法。
【請求項２５】
リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板と、
前記基板の最表面に固定化されたＤＮＡ増幅用のプライマーとを含むＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。

【請求項２６】
請求項２５に記載のＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイにおいて、
前記基板の第一単位に含まれるリン酸エステルより誘導される基は、ホスホリルコリン基、ホスホリルエタノールアミン基、ホスホリルセリン基、ホスホリルイノシトール基、ホスホリルグリセロール基、ホスファチジルホスホリルグリセロール基のいずれかであることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。
【請求項２７】
請求項２５に記載のＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイにおいて、
前記基板が、プラスチック材料からなることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。
【請求項２８】
請求項２５に記載のＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイにおいて、
前記プライマーは、５～５０個の塩基配列からなることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。
【請求項２９】
請求項２５に記載のＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイにおいて、
前記プライマーが、前記基板のカルボン酸誘導基の部位で共有結合して、当該基板の表面に固定化されることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。
【請求項３０】
請求項２５に記載のＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイにおいて、
前記基板の高分子物質がブチルメタクリレート基を含む第三単位を有することを特徴とするＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。
【請求項３１】
請求項２５または３０に記載のＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイにおいて、
前記基板は、前記高分子物質を有する第一の高分子物質に加えて、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を含む第一単位と、ブチルメタクリレート基を含む第三単位とを有する第二の高分子物質を含み、
前記第一の高分子物質と第二の混合物質が混合されている構成とすることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。
【請求項３２】
請求項２５に記載のＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイにおいて、
前記基板には一定の区画内に複数のスポットが設けられており、各スポットにプライマーが固定化されていることを特徴とするＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００５】
本発明に係るＤＮＡ鎖伸長方法は、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板に、ＤＮＡ伸長用のプライマーを固定化させ、
所望する配列を有する鋳型ＤＮＡ断片または鋳型ＲＮＡ断片、ＤＮＡ鎖伸長用酵素系、およびヌクレオチドモノマーを含む試料が導入された反応系を、ＤＮＡ鎖を熱変性する温度（以下、「熱変性処理温度」という）まで引き上げ、
前記反応系の温度をアニール処理する温度（以下、「アニール処理温度」という）まで下げ、
前記反応系でＤＮＡ鎖の伸長反応を行い、
全処理を同一の液相系で行うことを特徴としている。

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１７】
　また、本発明に係るＤＮＡ鎖増幅方法は、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板に、ＤＮＡ増幅用のプライマーを固定化させ、
　所望する配列を有する鋳型ＤＮＡ断片または鋳型ＲＮＡ断片、ＤＮＡ鎖伸長用酵素系、およびヌクレオチドモノマーを含む試料が導入された反応系を、ＤＮＡ鎖を熱変性する温度（以下、「熱変性処理温度」という）まで引き上げ、
　前記反応系の温度をアニール処理する温度（以下、「アニール処理温度」という）まで下げ、
　前記反応系でＤＮＡ鎖の伸長反応を行い、
　ＤＮＡ鎖の熱変性処理を行って、
　および必要に応じてＤＮＡ鎖のアニール処理、伸長反応および熱変性処理を行い、
　全処理を同一の液相系で行うことを特徴としている。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２３】
　また、本発明に係るＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイは、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板と、
　前記基板の最表面に固定化されたＤＮＡ増幅用のプライマーとを含むものである。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３１】
（第一の実施形態）
　図１は、第一の実施形態としてのＤＮＡ鎖増幅方法の手順を示すフローチャートである。
　このＤＮＡ鎖増幅方法は、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板に、ＤＮＡ増幅用のプライマー（以下、「プライマー」という）を固定化させ（ステップＳ１０）、所望する配列を有する鋳型ＤＮＡ断片または鋳型ＲＮＡ断片、ＤＮＡ鎖伸長用酵素系、およびヌクレオチドモノマーを含む試料が導入された反応系を、ＤＮＡ鎖を熱変性する温度（以下、「熱変性処理温度」という）まで引き上げ（ステップＳ３０）、この反応系の温度をアニール処理する温度（以下、「アニール処理温度」という）まで下げ（ステップＳ４０）、当該反応系でＤＮＡ鎖の伸長反応を行い（ステップＳ５０）、ＤＮＡ鎖の熱変性処理を行って（ステップＳ６０）、必要に応じてＤＮＡ鎖のアニール処理、伸長反応および熱変性処理を行う（ステップＳ４０～ステップＳ６０の繰り返し）ものである。さらに、これら各処理

を同一の液相系で行う。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３３】
ここで使用される基板の最表面には、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位とカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質が存在するようになっている。
【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８１】
以上により、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板と、基板の最表面に固定化されたＤＮＡ増幅用のプライマーとを含むＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ、すなわち図２に示したような基板１２の最表面上にプライマー１４が固定化されたＤＮＡマイクロアレイ１０が得られる。
【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０２】
このＤＮＡ鎖伸長方法は、リン脂質の親水部を構成するリン酸エステルより誘導される基を有する第一単位と電子求引性の置換基がカルボニル基に結合してなるカルボン酸誘導基を有する第二単位とを含む高分子物質を最表面に有する基板に、ＤＮＡ伸長用のプライマー（以下、「プライマー」という）を固定化させ（ステップＳ１０）、所望する配列を有する鋳型ＤＮＡ断片または鋳型ＲＮＡ断片、ＤＮＡ鎖伸長用酵素系、およびヌクレオチドモノマーを含む試料が導入された反応系を、ＤＮＡ鎖を熱変性する温度まで引き上げ（ステップＳ３０）、この反応系の温度をアニール処理する温度まで下げ（ステップＳ４０）、この反応系でＤＮＡ鎖の伸長反応を行い（ステップＳ５０）、ここまでの各処理を同一の液相系で行うものである。