(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 8 月 5 日(05.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/087466 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/051305

(22) 国際出願日: 2010 年 1 月 26 日(26.01.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-015456 2009 年 1 月 27 日(27.01.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京農工大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町３－８－１ Tokyo (JP). 株式会社日立製作所(HITACHI, LTD.) [JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

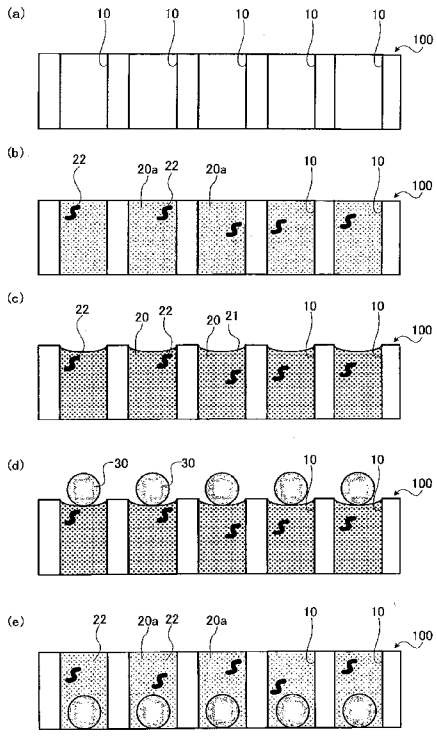
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松永是(MATSUNAGA, Tadashi) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町３－８－１国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 竹山春子(TAKEYAMA, Haruko) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町３－８－１国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 岡村好子(OKAMURA, Yoshiko) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町３－８－１国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 梶山智晴(KAJIYAMA, Tomoharu) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP). 白井正敬(SHIRAI, Masataka) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP). 神原秀記(KAMBARA, Hideki) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR PREPARING PCR CHAMBER, AND PCR KIT

(54) 発明の名称 : ＰＣＲチャンバーの調製方法およびＰＣＲキット

図１



(57) **Abstract**: Provided is a method for preparing a PCR chamber with which it is possible to control the placement of a first medium in the PCR reaction solution. Also provided is a PCR kit. The method for preparing a PCR chamber comprises a step for filling the wells of a plate having wells with a PCR reaction solution containing a hydrogel material; a step for solidifying the PCR reaction solution and forming a gel portion in the wells; a step for placing a first medium on top of the gel portion; and a step for liquefying the gel portion and thereby placing the first medium inside the wells.

(57) 要約: ＰＣＲ反応液中への第１の担体の配置を制御することができるＰＣＲチャンバーの調製方法およびＰＣＲキットを提供する。 ＰＣＲチャンバーの調製方法は、穴を有するプレートの前記穴に、ハイドロゲル材料を含むＰＣＲ反応液を充填する工程と、前記ＰＣＲ反応液を固化して、前記穴にゲル部を形成する工程と、前記ゲル部の上に第１の担体を配置させる工程と、前記ゲル部を液化させて、前記第１の担体を前記穴内に配置する工程と、を含む。

WO 2010/087466 A1

(74) 代理人: 平木祐輔(HIRAKI, Yusuke); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号　神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称

ＰＣＲチャンバーの調製方法およびＰＣＲキット

技術分野

本発明は、ＰＣＲに使用されるＰＣＲチャンバーの調製方法およびＰＣＲキットに関する。

背景技術

近年、塩基配列解析技術は革命的に進歩しており、例えば、一度に１０億（ギガ）塩基のＤＮＡを解読できる能力を有する次世代シークエンサー（ギガシークエンサー）と呼ばれる技術が実用化されている。

実用化された次世代シークエンサーの一つとして、米国４５４ライフサイエンス社によって開発された次世代シークエンサーが挙げられる。米国４５４ライフサイエンス社の次世代シークエンサーでは、１分子を鋳型（テンプレート）とするＰＣＲを並列に行なう技術を採用し、クローニングを介さずに１分子ＤＮＡの配列を決定している。

この米国４５４ライフサイエンス社の次世代シークエンサーでは、エマルジョンＰＣＲを採用している。このエマルジョンＰＣＲでは、平均粒径１００μｍ程度のエマルジョンの中に、１分子のＤＮＡテンプレートと、ＰＣＲ産物を捕捉するためのビーズとが１個ずつ入るように濃度を調整して、ＤＮＡ鋳型およびビーズをエマルジョンに封入する（非特許文献１）。

しかしながら、エマルジョンにＤＮＡ鋳型およびビーズがそれぞれ１個ずつ含まれるように制御することは通常困難であり、より効率が良いＰＣＲが求められている。

一方、微小な体積のチャンバー内での１分子鋳型ＰＣＲは以前より報告されており（非特許文献２）、この非特許文献２には、反応液に含まれる鋳型の濃度を調整することによって、チャンバー内に投入する分子数をほぼ制御できることが

示されている。

しかしながら、このような微小な体積のチャンバー内に、エマルジョンＰＣＲと同様にＰＣＲ産物捕捉用のビーズを１個投入しようとした場合、チャンバーの形状がビーズの直径によって制限される。すなわち、チャンバーの径およびチャンバーの深さの少なくとも一方がビーズの直径より大きいと、ビーズがチャンバーに２個以上入る可能性が高くなる。これを防止するために、チャンバーの径を小さくしたりまたはチャンバーの深さを浅くしたりすると、チャンバーに入れることができる反応液の体積が小さくなる。その結果、鋳型（テンプレート）を含む基質の量が少なくなり、十分な増幅産物を得ることができない場合がある。

そこで、十分な基質量を含有するＰＣＲ反応液をチャンバー内に配置することができ、かつ、ＰＣＲ反応液中へのビーズ（担体）の配置を制御することができるＰＣＲ用のプレートが求められている。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献１　Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors Margulies, M. Eghold, M. et al. Nature. 2005 Sep 15; 437(7057):326-7)

非特許文献２　On-Chip Nanoliter-Volume Multiplex TaqMan Polymerase Chain Reaction from A Single Copy Based on Counting Fluorescence Released Microchambers. Yasutaka Matsubara, Kagan Kerman, Masaaki Kobayashi, Shouhei Yamamura, Yasutaka Morita, Yuzuru Takamura, and Eiichi Tamiya, Anal. Chem., 76 (21), 6434 -6439, 2004.

発明の概要

本発明は、ＰＣＲ反応液中への第１の担体の配置を制御することができるＰＣＲチャンバーの調製方法およびＰＣＲキットを提供する。

本発明の一態様に係るＰＣＲチャンバーの調製方法は、

穴を有するプレートの前記穴に、ハイドロゲル材料を含むＰＣＲ反応液を充填する工程と、

前記ＰＣＲ反応液を固化させて、前記穴にゲル部を形成する工程と、

前記ゲル部の上に第１の担体を配置させる工程と、

前記ゲル部を液化させて、前記第１の担体を前記穴内に配置する工程と、

を含む。

上記ＰＣＲチャンバーの調製方法において、前記ＰＣＲ反応液を充填する工程において、該ＰＣＲ反応液は第２の担体を含み、前記ゲル部を形成する工程において、該ゲル部は前記第２の担体を含み、前記第１の担体を前記穴内に配置する工程において、該第１の担体とともに前記第２の担体を前記穴内に配置することができる。

上記ＰＣＲチャンバーの調製方法において、前記ゲル部は、上面に窪みを有することができる。

上記ＰＣＲチャンバーの調製方法において、前記穴は貫通穴であることができる。

上記ＰＣＲチャンバーの調製方法において、前記第１の担体が球状のビーズであり、前記穴の断面が円形であり、前記穴の直径は、前記ビーズの平均粒径に対して１～１．５倍であることができる。

上記ＰＣＲチャンバーの調製方法において、前記ハイドロゲル材料は、アガロースであることができる。

上記ＰＣＲチャンバーの調製方法において、前記ＰＣＲ反応液を充填する工程の後、前記ＰＣＲ反応液を固化させる前に、ＰＣＲを行なう工程をさらに含むことができる。

本発明の他の一態様に係るＰＣＲキットは、上記ＰＣＲチャンバーの調製方法で使用され、

穴を有するプレートと、

担体と、

ＰＣＲ反応液と、

ハイドロゲル材料と、

を含む。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2009-015456 号の明細書

および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１（ａ）～図１（ｅ）は、本発明の一実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法を模式的に説明する断面図である。

図２（ａ）～図２（ｅ）は、図１（ａ）～図１（ｅ）に示されるＰＣＲチャンバーの調製方法の一変形例を模式的に説明する断面図である。

図３は、本発明の一実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法にておいて使用されるプレートを模式的に説明する斜視図である。

図４は、図３に示されるプレートの一例を模式的に示す斜視図であり、図３の破線からプレート上面に垂直な面で切断した図である。

図５は、図３に示されるプレートの別の一例を模式的に示す斜視図であり、図３の破線からプレート上面に垂直な面で切断した図である。

図６は、本発明の実施例１で得られた、穴にゲル部が形成されたプレートの断面を示す画像である（０．７％アガロース水溶液を用いてゲル部を形成した場合）。

図７は、本発明の実施例１で得られた、穴にゲル部が形成されたプレートの断面を示す画像である（０．９％アガロース水溶液を用いてゲル部を形成した場合）。

図８は、本発明の実施例２で得られた、ゲル部の上面に第１の担体（ジルコニアビーズ）が配置されたプレートの上面を示す写真である。

図９は、本発明の実施例４で得られた、第１の担体（ジルコニアビーズ）上の蛍光標識ＰＣＲ産物を示す写真である。

図１０は、（Ａ）および（Ｂ）ともに、本発明の実施例５で得られた、第１の担体（蛍光ビーズ）を有するＰＣＲ反応液が穴（ＰＣＲチャンバー）に入ったプレートの上面を示す写真である。

図１１は、（Ａ）および（Ｂ）ともに、本発明の実施例６で得られた、第１の担体（ジルコニアビーズ）および第２の担体（蛍光ビーズ）を含む液が穴（ＰＣＲチャンバー）に入ったプレートの上面を示す写真である。

図１２は、本発明の実施例６において測定された、担体に固定化されたβ－ビオチンＤＮＡの量を示すグラフである。

図１３は、本発明の実施例７において測定された、担体に固定化されたβ－ビオチンＤＮＡの量を示すグラフである。

発明を実施するための形態

以下、本発明の一実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法およびＰＣＲキットについて具体的に説明する。

１．ＰＣＲチャンバーの調製方法

１．１．調製方法

図１（ａ）～図１（ｅ）は、本発明の一実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法を模式的に説明する断面図である。

本発明の一実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法は、図１（ａ）～図１（ｅ）に示されるように、穴１０を有するプレート１００の穴１０に、ハイドロゲル材料を含むＰＣＲ反応液２０ａを充填する工程（工程１）と、ＰＣＲ反応液２０ａを固化させて、穴１０にゲル部２０ａを形成する工程（工程２）と、ゲル部２０の上に第１の担体３０を配置させる工程（工程３）と、ゲル部２０を液化させて、第１の担体３０を穴１０内に配置する工程（工程４）と、を含む。

本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法において、ＰＣＲを行なう工程は、工程１の後、工程２の前に行なうことができる。

１．１．１．工程１

工程１は、穴１０を有するプレート１００の穴１０に、ハイドロゲル材料を含むＰＣＲ反応液２０ａを充填する工程である（図１（ａ）および図１（ｂ）参照）。

１．１．１－１．プレート

工程１において使用するプレート１００の一例を図３および図４に示す。プレート１００は、複数の配列した穴１０を有する。また、穴１０は図４に示されるように、貫通穴であることが好ましい。穴１０が貫通穴であることにより、後の工程においてＰＣＲ反応液２０ａをプレート１００の上に滴下した際に、ＰＣＲ反応液２０ａを穴１０の内部に確実に充填させることができる。すなわち、この場合、穴１０が貫通穴であることにより、プレート１００の上面から下面に落ちたＰＣＲ反応液２０ａが、毛細管現象によって貫通穴である穴１０内を上昇し、

穴１０内がＰＣＲ反応液２０ａで満たされる。

穴１０の形状、大きさ、深さ、密度、および配列パターンは、例えばＰＣＲに必要な基質や試料の量、ＰＣＲ条件等に応じて適宜決定することができる。

また、穴１０が円形であり、第１の担体３０が球状のビーズである場合、穴１０の直径は第１の担体３０の平均粒径より大きいことが好ましい。なお、本明細書におけるビーズの「平均粒径」は、ふるい分け法により測定されたものである。

加えて、第１の担体３０が球状のビーズである場合、穴１０の深さは第１の担体３０の平均粒径より大きいことが好ましい。本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、後述する工程３において、穴１０の深さに関わらず、第１の担体３０をゲル部２０上に配置することができるため、第１の担体３０の平均粒径に関わらず、穴１０の深さを大きくすることができる。これにより、穴１０に入れるＰＣＲ反応液２０ａの量（基質量）を増やすことができる。

プレート１００の別の一例を図５に示す。プレート１００は図５に示されるように、貫通穴ではない穴（凹部）１２を有するものであってもよい。

１．１．１－２．ハイドロゲル材料

ハイドロゲル材料は水を含むことにより膨潤する性質を有するポリマーである。

ハイドロゲル材料は、ＰＣＲに影響を与えない性質を有するものか、あるいは、ＰＣＲ反応液内でＰＣＲに影響を与えない範囲の濃度であることが好ましい。

また、ハイドロゲル材料は、後述する工程２において、上面に窪み２１を有するゲル部２０を形成できるものであればより好ましい。このようなハイドロゲル材料としては、例えばアガロースやゼラチンが挙げられる。例えば、ハイドロゲル材料としてアガロースを使用することにより、固化するときにゲル部２０に体積収縮が生じるため、ゲル部２０の上面に窪み２１を形成することができる。また、アガロースは、加熱によって容易に水に溶解し、かつ、冷却によって容易にゲル化する性質を有する。このため、ハイドロゲル材料としてアガロースを使用することにより、ゲル部２０を容易に形成することができる。さらに、アガロースはＰＣＲに影響を与えない性質を有する。

特に、ゲル部２０を液化する際の加熱温度を低くできる点で、ハイドロゲル材料は低融点アガロースであることが好ましい。ハイドロゲル材料として低融点ア

ガロースを使用する場合、ＰＣＲ反応液２０ａ中における低融点アガロースの濃度は０．６～４％であることが好ましく、０．７～０．９％であることがより好ましい。低融点アガロースの濃度が４％を超えると、後述する工程４においてゲル部２０を液化する際に、液化に要する時間が長くなくなる場合がある。

１．１．２．工程２

工程２は、ＰＣＲ反応液２０ａを固化して、穴１０にゲル部２０を形成する工程である（図１（ｂ）および図１（ｃ）参照）。

すなわち、工程２においては、ＰＣＲ反応液２０ａが固化することにより、ゲル部２０が形成される。

ゲル部２０の固化手段は、ＰＣＲ反応液２０ａに含まれるハイドロゲル材料の種類に応じて選択することができ、例えば、冷却、ゲル化剤の添加等が挙げられる。例えばハイドロゲル材料がアガロースの場合、冷却によりゲル部２０を固化することができる。

工程２において得られるゲル部２０は、上面に窪み２１を有することが好ましい。ゲル部２０の上面に窪み２１が設けられていることにより、後述する工程３において、ゲル部２０の上面から第１の担体３０が脱離するのを防止することができる。その結果、後述する工程４において、ゲル部２０を液化させる際に、第１の担体３０を穴１０内のＰＣＲ反応液２０ａ中に確実に入れることができる。

上面に窪み２１を有するゲル部２０を得るためには、固化（ゲル化）すると体積が収縮するようなハイドロゲル材料を使用することが好ましい。すなわち、このようなハイドロゲル材料を含有するＰＣＲ反応液２０ａが穴１０内で固化する工程において、ＰＣＲ反応液２０ａ（液体）からゲル部２０（固体）へと変化する際に体積収縮が生じる。その結果、ゲル部２０の上面に窪み２１が生じる。

この窪み２１は図１（ｃ）に示されるように、穴１０の側面から離れるにつれて深くなる形状を有することが好ましい。この形状は、体積収縮時における穴１０の側面に対する液体（ＰＣＲ反応液２０ａ）の表面張力によって生じると推測される。窪み２１がこのような形状を有することにより、第１の担体３０をゲル部２０の上面により確実に留めることができる。

ＰＣＲ反応液２０ａはテンプレート２２のほか、ＤＮＡポリメラーゼ、バッフ

ァー、フォワードプライマー、リバースプライマー、界面活性剤等を含むことができる。ＰＣＲ反応液２０ａの具体例としては、例えば後述する実施例で用いられるＰＣＲ反応液が挙げられる。

１．１．３．工程３

工程３は、ゲル部２０の上に第１の担体３０を配置させる工程である（図１（ｄ）参照）。

ゲル部２０の上に第１の担体３０を配置させる方法は特に限定されないが、例えば、第１の担体３０を分散媒（水またはアルコール等の水系媒体）に懸濁させて得られた懸濁物をプレート１００の上に滴下する方法が挙げられる。

第１の担体３０としては、ＰＣＲにおけるテンプレート２２またはＰＣＲ産物を捕捉するための担体が挙げられ、プレート１００の上に均一に配置させやすい点で、ビーズ（粒子）であるのがより好ましい。より具体的には、第１の担体３０は、例えばシリカ、アルミナ、ジルコニア、セリア、チタニア、マグネシアおよびこれらの組み合わせから主に構成される無機ビーズ、例えばアクリル系、スチレン系のポリマーから主に構成される有機ビーズ、例えば上記無機材料と上記有機材料との複合材料から主に構成される無機有機複合ビーズが挙げられる。この場合、第１の担体３０は磁性体を含有する磁性粒子であってもよい。中でも、比重が比較的大きいため、窪み２１から抜けにくいのに加えて、後述する工程４において第１の担体３０を穴１０に確実に落とすことができる点で、第１の担体３０はジルコニアビーズであることがより好ましい。

第１の担体３０は穴１０に入ることができる大きさを有する。

また、本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法では、穴１０の断面が円形であって、第１の担体３０が球状のビーズである場合、穴１０の直径は、第１の担体３０であるビーズの平均粒径に対して１～１．５倍であることが好ましい。この場合、穴１０の直径がビーズの平均粒径の１倍未満であると、当然に、穴１０にビーズを入れることができず、一方、穴１０の直径がビーズの平均粒径の１．５倍を超えると、穴１０にビーズが２個以上入る可能性が高くなる。

１．１．４．工程４

工程４は、ゲル部２０を液化させて、第１の担体３０を穴１０内に配置する工

程である（図１（ｅ）参照）。

すなわち、工程４においては、ゲル部２０が液化することにより、液体（ＰＣＲ反応液２０ａ）に戻るとともに、第１の担体３０が穴１０の中のＰＣＲ反応液２０ａに落ちる。これにより、本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、第１の担体３０を含有するＰＣＲ反応液２０ａが入った穴（ＰＣＲチャンバー）１０を有するプレート１００を得ることができる。

したがって、本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、穴１０内への第１の担体３０の配置を制御することができる。より具体的には、穴１０内に配置される第１の担体３０の個数を制御することができる。

また、本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、プレート１００の穴１０の深さが第１の担体３０の大きさによって制限されないため、十分な深さの穴１０を有するプレート１００を使用することができる。これにより、十分な基質量を含有するＰＣＲ反応液２０ａを穴１０に配置することができる。

本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法において、ＰＣＲを行なう工程を工程１の後でかつ工程２の前に行なう場合、第１の担体３０は、ＰＣＲによって増幅されたＤＮＡを固定化させる機能を有するものであることが好ましい。これにより、ＰＣＲによって増幅されたＤＮＡを第１の担体３０に固定化させ、例えば蛍光分光法等によって該ＤＮＡの量を測定することができる。

ゲル部２０の液化手段は、ゲル部２０を形成するために用いられるハイドロゲル材料の種類に応じて選択することができ、例えば、加熱や、ゲル部を溶解可能な溶媒の添加等が挙げられる。例えばハイドロゲル材料がアガロースの場合、加熱によりゲル部２０を液化することができる。この場合の加熱温度は５０℃以上であるのが好ましい。

１．２．変形例

図２（ａ）～図２（ｅ）は、本実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法の一変形例を模式的に示す図である。

図２（ａ）～図２（ｅ）に示されるＰＣＲチャンバーの調製方法では、第２の担体３２を含むＰＣＲ反応液２０ａを使用する点で、図１（ａ）～図１（ｅ）に示されるＰＣＲチャンバーの調製方法と異なる。

すなわち、図２（ａ）～図２（ｅ）に示されるＰＣＲチャンバーの調製方法では、ＰＣＲ反応液２０ａを穴１０に充填する工程（図２（ｂ）参照）において、ＰＣＲ反応液２０ａが第２の担体３２を含む点、ゲル部２０を形成する工程（図２（ｃ）参照）において、ゲル部２０が第２の担体３２を含む点、第１の担体３０を穴１０内に配置する工程（図２（ｄ）参照）において、第１の担体３０とともに第２の担体３２を穴１０内に配置する点で、図１（ａ）～図１（ｅ）に示されるＰＣＲチャンバーの調製方法と異なる。

第２の担体３２としては、例えば、第１の担体３０として上記に例示したものを用いることができる。また、第１の担体３０および第２の担体３２は同じものであってもよいし、あるいは、例えば形状、大きさ、密度、材質および機能のうち少なくとも１つが異なるものであってもよい。

図２（ａ）～図２（ｅ）に示されるＰＣＲチャンバーの調製方法で得られたＰＣＲチャンバー１０を有するプレート１００では、ＰＣＲ反応液２０ａの中で第２の担体３２および第１の担体３０がこの順で積み上げられている（図２（ｅ）参照）。すなわち、１つの穴１０に２個の担体を配置させることができる。これにより、例えば、機能が異なる２種類の担体を１つの穴に確実に配置させることができる。この場合、例えば、第２の担体３２がテンプレートを固定化する機能を有し、第１の担体３０が増幅されたＤＮＡを捕捉する機能を有していてもよい。

これに対して、本変形例に係るＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、１つの穴１０に第１の担体３０および第２の担体３２の２個を簡便な方法にて入れることができる。

１つの穴１０に２個の担体を入れることは従来の方法では困難である。これに対して、本変形例に係るＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、これを容易に達成することができる。

本発明の一実施形態に係る調製方法によって得られたＰＣＲチャンバー１０は、例えばギガプレートのような、１枚あたり10^{12}個以上の穴１０を有するプレート１００を用いるＰＣＲにおいて、多数の穴１０に第１の担体３０を効率良く入れることができる点で有用である。

２．ＰＣＲキット

本発明の他の一実施形態に係るＰＣＲキットは、上記実施形態に係るＰＣＲチャンバーの調製方法に使用され、穴１０を有するプレート１００と、第１の担体３０と、ＰＣＲ反応液２０ａと、ハイドロゲル材料と、を含む。

プレート１００、第１の担体３０、ＰＣＲ反応液２０ａ、およびハイドロゲル材料としては、上記実施形態で例示したものを使用することができる。

本実施形態に係るＰＣＲキットにおいて、プレート１００、第１の担体３０、ＰＣＲ反応液２０ａ、およびハイドロゲル材料はそれぞれ別個に存在してもよいし、あるいは、これらのうちのいずれかが混合した状態で存在していてもよい。例えば、ハイドロゲル材料はＰＣＲ反応液２０ａに含有された状態であってもよいし、あるいは、ＰＣＲ反応液２０ａとは別に保存され、使用時にＰＣＲ反応液２０ａに添加してもよい。

３．実施例

以下、本発明を、実施例を挙げてさらに具体的に説明する。本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。なお、実施例および比較例中の「%」および「部」は特記しない限り、それぞれ質量%および質量部であることを示している。

３．１．実施例１（ゲル部の形成試験）

実施例１では、アガロース水溶液をプレートの穴（貫通穴）に配置し、固化してゲル部を形成し、得られたゲル部の表面の観察を行なった。

まず、０．７%および０．９%のアガロース水溶液をそれぞれ調製した。本実施例では、アガロースとして低融点アガロース（商品名：NuSieve GTG Agarose、Takara 社製）を使用した。それぞれの水溶液を６０℃に保持し、青インクおよび赤インクを別々に少量垂らして着色し、直径２５μｍの円形断面を有し、かつ深さ１ｍｍの穴（貫通穴）（３．６×10^5個／１枚あたり）を有するガラス製プレート（厚さ１ｍｍ）（商品名：キャピラリプレート、浜松ホトニクス社製）に流し込んだ。このプレートは、図３および図４に示される構造を有する。なお、このプレートの穴内では、通常の効率と遜色ない効率でＰＣＲを行なうことができることを確認している。

次に、アガロース水溶液をプレート上面に供給したところ、アガロース水溶液は毛細管現象により穴に充填された。すなわち、アガロース水溶液は表面張力に

よって穴内に留まっていた。次に、このプレートを氷上に移動して冷却することにより、アガロース水溶液を固化して、穴内にゲル部を形成した。

次いで、穴内にゲル部が形成されたプレートの上面を、顕微鏡（型名「ＧＸ５１」、オリンパス製）で焦点深度を自動で１μｍずつ変えながら観察し、その断面図をコンピューターソフト（商品名「ＶＨＸ」、キーエンス製）を用いて合成して、３Ｄ画像を得た。

その結果、図６および図７に示されるように、プレート上面において、ゲル部の上面に窪みが観察された。この窪みは、液体（アガロース水溶液）から固体（ゲル部）へと固化する際の体積収縮により生じたと推測される。

図６および図７において、左図はプレートの上面近傍の断面の深度測定の結果を示し、右図は前記深度測定を３次元的に行なった結果に基づいて作成された３Ｄ合成画像である。

ゲル部上面の窪みの深さは、０．７％アガロース水溶液を用いて得られたゲル部（図６）と０．９％アガロース水溶液を用いて得られたゲル部（図７）とでほぼ同じであり、いずれも平均３．５μｍ程度であった。

３．２．実施例２（ゲル部上に第１の担体を配置した後、ゲル部を液化させる試験）

実施例２では、ゲル部の上に第１の担体（ジルコニアビーズ）を配置し、その表面の観察を行なった。

本実施例では、実施例１において得られた、０．７％アガロース水溶液を用いて形成されたゲル部を有するプレートを用い、ジルコニアビーズ(平均粒径２２．６μｍ、比重約６）をマウントした。穴（貫通穴）の直径は直径２５μｍであるため、１つのゲル部の上にビーズが並列に２個配置されることはない。また、ジルコニアビーズは比重が約６と重く、凝集しやすいため、ビーズ（１０ｍｇ）に多量のｍｉｌｌｉＱ（商品名）（１００μｌ）を加えて懸濁状態としたビーズ懸濁物をプレートの上面に滴下したところ、各ビーズはそれぞれゲル部上面の窪みに配置された（図８参照）。

ゲル部上面の窪みの深さ（平均３．５μｍ）から判断すると、ビーズの平均粒径の約１／８が穴内に位置していると推測される。また、プレートの上面に平行

な方向から水を流したところ、ゲル部上面の窪みからビーズが出ることなく、ビーズはゲル部上面に留まっていた。さらに、プレート上面の穴以外に配置された余分なビーズは、キムワイプ（商品名）で払い落として除去することができた。一方、ゲル部上面に配置されたビーズは、キムワイプ（商品名）で払ってもゲル部上面に留まったままであった。なお、キムワイプ（商品名）による払いは、プレート上面に残る水分除去にも有効であり、懸濁に用いたmilliQがゲル部を希釈することはほぼなかった。

さらに、ビーズがゲル部の上面に配置されているプレートをホットプレートに移動させて７０℃程度の熱を加えると、ゲル部は溶けてＰＣＲ反応液に戻り、ビーズは穴内のＰＣＲ反応液中に落ちたことを確認した。

図８は、ゲル部上にジルコニアビーズ（平均粒径２２．６μｍ）が配置されたプレート上面の写真であり、左の写真は倍率４０倍、右の写真は倍率４５０倍でそれぞれ撮影された。図８によれば、赤で着色されたゲル部上にビーズ（白色部分）が配置されているのが分かる。

３．３．実施例３（ＰＣＲ効率の確認試験）

実施例３では、アガロース存在下でのＰＣＲ効率を確認した。表１に示す組成を有する液に、２．８％アガロース水溶液２５μＬを加えてＰＣＲ反応液を調製した（得られたＰＣＲ反応液中のアガロース濃度：０．７％）。また、アガロース水溶液を添加しないで、表１に示す組成を有する液をＰＣＲ反応液として用いた例を比較対照とした。

ＰＣＲは、熱変性９４℃３０秒、アニーリング５６℃３０秒、伸長７２℃１分を５０サイクル行った。反応終了後、バイオアナライザーアジレントテクノロジー製を用いて増幅産物を定量した。その結果、本実施例と比較対照との間に結果の差はほとんどなく、ＰＣＲ阻害はアガロースによって阻害されないことが確認された。

表１

PCR 反応液の組成 （最終濃度）	
Gene Amp High Fidelity polymerase	0.2 U/mL
テンプレート(395 bp of ACTB gene)	1×10^5 分子 （1 コピー/穴）
10× バッファー	1×
dNTPs ea.	0.2 μM (5.9×10^{10} 分子/穴)
ACTB フォワードプライマー	1 μM (2.9×10^8 プライマー/穴)
ACTB リバースプライマー	1 μM (2.9×10^8 プライマー/穴)
PVP	0.5% (w/v)%
BSA	0.1% (w/v)%
Tween 20	0.1% (w/v)%
総量	100 μl

３．４．実施例４（ＰＣＲ試験）

実施例４では、アガロースを含むＰＣＲ反応液を用いて形成されたゲル部上に第１の担体（ジルコニアビーズ）を配置し、ゲル部を液化させて得られたＰＣＲ反応液中に第１の担体を落とした後、ＰＣＲを行った。

実施例４では、表面がカルボキシル基修飾されたジルコニアビーズ（平均粒径２２μｍ）（商品名バイオ用ビーズ（CBZ23-01-WS）、日立マクセル社製）を用いた。この表面に対して、５’末端をアミノ基で修飾したオリゴＤＮＡ（このオリゴＤＮＡの塩基配列は、ＰＣＲ反応液に添加するフォワードプライマーと同一である。）を１粒子あたり１０^{9}分子共有結合で修飾した。この修飾オリゴＤＮＡによって、ＰＣＲ産物の相補鎖（１本鎖）をハイブリダイゼーションによって捕捉した。

上述の実施例３と同様の方法にて、アガロース濃度が０．７％であるＰＣＲ反応液を調製し、このＰＣＲ反応液をプレートの穴に充填した後、氷上に移して該

ＰＣＲ反応液を固化して、穴内にゲル部を形成した。次に、１０ｍｇのジルコニアビーズおよび１００μＬのmilliQ（商品名）の懸濁物をプレート上面に滴下して、ピペットマンで均一に攪拌し、ゲル部上にビーズを配置させた。以降の処理を上述の実施例２と同様に行って、ＰＣＲ反応液中にビーズを落とした後、ＰＣＲを行った。

ＰＣＲ終了後、ビーズを回収し、表１に示すＰＣＲ反応液のバッファーで１回、０．１％ Tween-20 を含む 50mM Tris（ｐＨ７．５）で２回洗浄を行い、ビーズを１個ずつマニュピレートによって拾い、ビーズに捕捉された増幅ＤＮＡ分子をリアルタイムＰＣＲで定量した。その結果、１ビーズあたり３×１０^{5}個のＤＮＡ分子が捕捉されていた。

図９は、本実施例で得られた、ジルコニアビーズ上の蛍光標識ＰＣＲ産物の写真を示す。図９によれば、ジルコニアビーズ上に蛍光標識されたＰＣＲ産物（増幅ＤＮＡ分子）が存在していることがわかる。

本実施例では、プレートの穴の深さはビーズの平均粒径の４０倍であった。この場合においても、比重の重いジルコニアビーズ（比重約６）を１個の穴に１個のみ配置させることができ、かつ、アガロースはＰＣＲ効率にも影響を与えないことが確認された。

３．５．実施例５（異なる２担体を同一孔にいれる方法）

実施例５では、実施例１と同様の方法でゲル部をプレートの穴（貫通穴）に形成した後、第１の担体として平均粒径１０μｍの蛍光ビーズ（商品名 FluoSpheres ポリスチレンマイクロスフェア、Invitrogen 社製）を用いた以外は実施例２と同様の方法にて、ゲル部を加熱により液化させてＰＣＲ反応液を得て、第１の担体をＰＣＲ反応液中に落とした。

図１０は、本実施例で得られた、第１の担体を含むＰＣＲ反応液が入った穴（ＰＣＲチャンバー）を有するプレートの上面の写真である。図１０によれば、穴に配置されたＰＣＲ反応液中に蛍光ビーズが存在していることがわかる。

次に、実施例２と同様の方法にて、第２の担体（平均粒径２２μｍのジルコニアビーズ）をゲル部上に配置した後、ゲル部を加熱により液化させてＰＣＲ反応液を得た。これにより、第１の担体および第２の担体を含むＰＣＲ反応液が入っ

た穴（ＰＣＲチャンバー）を有するプレートが得られた。

図１１は、本実施例で得られた、第１の担体および第２の担体を含むＰＣＲ反応液が入った穴（ＰＣＲチャンバー）を有するプレートの上面の写真である。本実施例で得られた穴（ＰＣＲチャンバー）に含まれるＰＣＲ反応液中では、図２（ｅ）に示されるように、第２の担体（蛍光ビーズ）の上に第１の担体（ジルコニアビーズ）が配置されている。

図１１によれば、第２の担体（蛍光ビーズ）から生じる蛍光が第１の担体（ジルコニアビーズ）の隙間から観察されたことから、ＰＣＲ反応液中において、第２の担体の上に第１の担体が配置されていることがわかる。

３．６．実施例６（担体を用いたアビジンービオチン反応によるＰＣＲ産物の回収：予備実験）

5’末端がビオチン修飾されたＦプライマー（5’ biotin-ttttttttttttttttttttagaaaatctggcaccacacc）を用いて、表２に示されるＰＣＲ反応液を用いて、ＰＣＲチューブ内で β-アクチンＤＮＡを増幅した。増幅産物量を測定した後、これにアガロース溶液を加え（終濃度０．７％）、２×10^{12}コピー／１００μｌ（１×10^{7}コピー／穴）の濃度に調整したものを、実施例１で用いたものと同じガラス製プレートに毛細管現象を利用して充填した後、室温で静置して固めてゲル部を形成した。このプレートをミネラルオイルに浸し、キムワイプでふき取った後、アビジン修飾された担体（ジルコニアビーズ）４ｍｇ（１×10^{5}個）をプレート上に重層した。

次に、得られたプレートの上下をミネラルオイルでコーティングし、カバーガラスでフタをした後に、サーマルサイクラーにより温度を変遷させて（７０℃２０分，３７℃１０分，５０℃１０分，３７℃１０分，５０℃∞）、ゲル部を溶解させると共に、アビジンとビオチンとを結合させた後、ビオチン化 β－アクチンＤＮＡが固定化された担体を回収した。

次いで、プレートの穴内にある担体を、７０℃に温めたミネラルオイルで押し出し、２×Ｂ&Ｗバッファー（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ，１ｍＭ ＥＤＴＡ，２．０Ｍ ＮａＣｌ，ｐＨ７．５）、１×ＰＣＲバッファー、ＴＥバッファー、保存バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ，０．０２％ Ｔｗｅｅｎ２０）の順番で洗浄した後に、

該担体を精製水に分散させた。

次いで、この担体をｍｉｌｌｉＱ（商品名）に分散させた後、マニピュレータを用いて該担体を１個ずつ分取して、リアルタイムＰＣＲ法（９４℃２分，９４℃３０秒，５６℃１分，７２℃１分を５０サイクル、７２℃１０分，４℃∞）により、担体に固定化されたβ－アクチンＤＮＡの量を測定した。

また、コントロールとして、β－アクチンＤＮＡが入っていない以外は本実施例のサンプルと同じ組成を有するサンプルを調製し、同様の処理を行った。

測定結果を図１２に示す。図１２では、左が本実施例の担体を用いた場合、右がコントロールの場合のそれぞれにおける固定化されたβ－アクチンＤＮＡの量を示している。図１２に示されるように、本実施例によれば、担体にβ－アクチンＤＮＡを効率良く捕捉できたことがわかる。

表２

PCR 反応液の組成 （最終濃度）	
Gene Amp High Fidelity polymerase	0.02 U/μL
テンプレート(395 bp of ACTB gene)	2×10^7 分子
10× バッファー	1×
dNTPs ea.	0.2 mM
5'-ビオチン化 ACTB フォワードプライマー	1 μM
ACTB リバースプライマー	1 μM
総量	100 μl

３．７．実施例７（担体を用いたアビジン－ビオチン反応によるＰＣＲ産物の回収：本実験）

実施例１で用いたものと同じガラス製プレートに、表３に示される組成を有するＰＣＲ反応液を滴下した後、室温で静置して固めてゲル部を形成した。このプレートをミネラルオイルでコーティングし、カバーガラスでフタをした後に、サ

ーマルサイクラーによりＰＣＲ（９４℃２分→９４℃３０秒，５６℃１分，７２℃１分：５０サイクル→７２℃１０分→４℃∞）を行った。

反応終了後、プレート表面をキムワイプで拭いてミネラルオイルを除去した後、アビジン修飾された担体（ジルコニアビーズ）４ｍｇ（１×１０^{5}個）をゲル部上に重層した。

このプレートをミネラルオイルでコーティングし、カバーガラスでフタをした後に、サーマルサイクラーにより温度を変遷させ（７０℃２０分，３７℃１０分，５０℃１０分，３７℃１０分，５０℃∞）、ゲル部を溶解させると共に、ビオチン化 β－アクチンＤＮＡが固定化された担体を回収した。

次いで、プレートの穴内にある担体を７０℃に温めたミネラルオイルで押し出し、２×Ｂ＆Ｗバッファー（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ，１ｍＭ ＥＤＴＡ，２．０Ｍ ＮａＣｌ，ｐＨ７．５）、１×ＰＣＲバッファー、ＴＥバッファー、保存バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ，０．０２％ Ｔｗｅｅｎ２０）の順番で洗浄した後に、該担体を精製水に分散させた。

次いで、この担体をｍｉｌｌｉＱ（商品名）に分散させた後、マニピュレータを用いて該担体を１個ずつ分取して、リアルタイムＰＣＲ法（９４℃２分，９４℃３０秒，５６℃１分，７２℃１分を５０サイクル、７２℃１０分，４℃∞）により、担体に固定化された β－アクチンＤＮＡの量を測定した。

また、コントロールとして、β－アクチンＤＮＡが入っていない以外は本実施例のサンプルと同じ組成を有するサンプルを調製し、同様の処理を行った。

測定結果を図１３に示す。図１３では、左が本実施例の担体を用いた場合（増幅効率：５．４×１０^{5}コピー／穴）、右がコントロールの場合のそれぞれにおける固定化された β－アクチンＤＮＡの量を示している。図１３に示されるように、本実施例によれば、担体に β－アクチンＤＮＡを効率良く捕捉できたことがわかる。

表３

PCR反応液の組成 （最終濃度）	
Gene Amp High Fidelity polymerase	0.5 U/μL
テンプレート(395 bp of ACTB gene)	2×10^5 分子 （1コピー/穴）
10× バッファー （$MgCl_2$を含有しない）	1×
$MgCl_2$	4 mM
dNTPs ea.	1 mM (3.0×10^{11}分子/穴)
5'-ビオチン化 ACTB フォワードプライマー	1 μM (2.9×10^8プライマー/穴)
ACTB リバースプライマー	1 μM (2.9×10^8プライマー/穴)
MPC	0.5% (w/v)%
アガロース	0.7%
総量	100 μl （490pl/穴）

本実施形態に係る説明は以上である。本発明は、上述した実施形態に限定されるものではなく、さらなる種々の変形が可能である。また本発明は、実施形態で説明した構成と実質的に同一の構成（例えば、機能、方法および結果が同一の構成、あるいは目的および結果が同一の構成）を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成の本質的でない部分を置き換えた構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成と同一の作用効果を奏する構成または同一の目的を達成することができる構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成に公知技術を付加した構成を含む。

産業上の利用可能性

上記ＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、ゲル部の上に第１の担体を配置させる工程と、ゲル部を液化させて、第１の担体を穴内に配置する工程とを含むことにより、例えば穴の断面が微小な場合であっても、プレートの穴にあるＰＣＲ反応液中に第１の担体を入れることができる。すなわち、上記ＰＣＲチャンバー

の調製方法によれば、穴内への第１の担体の配置を制御することができる。

また、上記ＰＣＲチャンバーの調製方法によれば、プレートの穴の深さが第１の担体の大きさによって制限されないため、十分な深さの穴を有するプレートを使用することができる。これにより、十分な基質量を含有するＰＣＲ反応液を穴に配置することができる。

符号の説明

１００…プレート、１０，１２…穴（チャンバー）、２０…ゲル部、２０ａ…ＰＣＲ反応液、２１…窪み、２２…テンプレート、３０…第１の担体（ビーズ）、３２…第２の担体（ビーズ）

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

１．　穴を有するプレートの前記穴に、ハイドロゲル材料を含むＰＣＲ反応液を充填する工程と、

前記ＰＣＲ反応液を固化させて、前記穴にゲル部を形成する工程と、

前記ゲル部の上に第１の担体を配置させる工程と、

前記ゲル部を液化させて、前記第１の担体を前記穴内に配置する工程と、

を含む、ＰＣＲチャンバーの調製方法。

２．　前記ＰＣＲ反応液を充填する工程において、該ＰＣＲ反応液は第２の担体を含み、

前記ゲル部を形成する工程において、該ゲル部は前記第２の担体を含み、

前記第１の担体を前記穴内に配置する工程において、該第１の担体とともに前記第２の担体を前記穴内に配置する、請求項１に記載のＰＣＲチャンバーの調製方法。

３．　前記ゲル部は、上面に窪みを有する、請求項１または２に記載のＰＣＲチャンバーの調製方法。

４．　前記穴は貫通穴である、請求項１ないし３のいずれか１項に記載のＰＣＲチャンバーの調製方法。

５．　前記第１の担体が球状のビーズであり、

前記穴の断面が円形であり、

前記穴の直径は、前記ビーズの平均粒径に対して１～１．５倍である、請求項１ないし４のいずれか１項に記載のＰＣＲチャンバーの調製方法。

６．　前記ハイドロゲル材料は、アガロースである、請求項１ないし５のいずれか１項に記載のＰＣＲチャンバーの調製方法。

７．　前記ＰＣＲ反応液を充填する工程の後、前記ＰＣＲ反応液を固化させる前に、ＰＣＲを行なう工程をさらに含む、請求項１ないし６のいずれか１項に記載のＰＣＲチャンバーの調製方法。

８．　請求項１ないし７のいずれか１項に記載のＰＣＲチャンバーの調製方法に使用され、

穴を有するプレートと、

担体と、

ＰＣＲ反応液と、

ハイドロゲル材料と、

を含む、ＰＣＲキット。

図 1

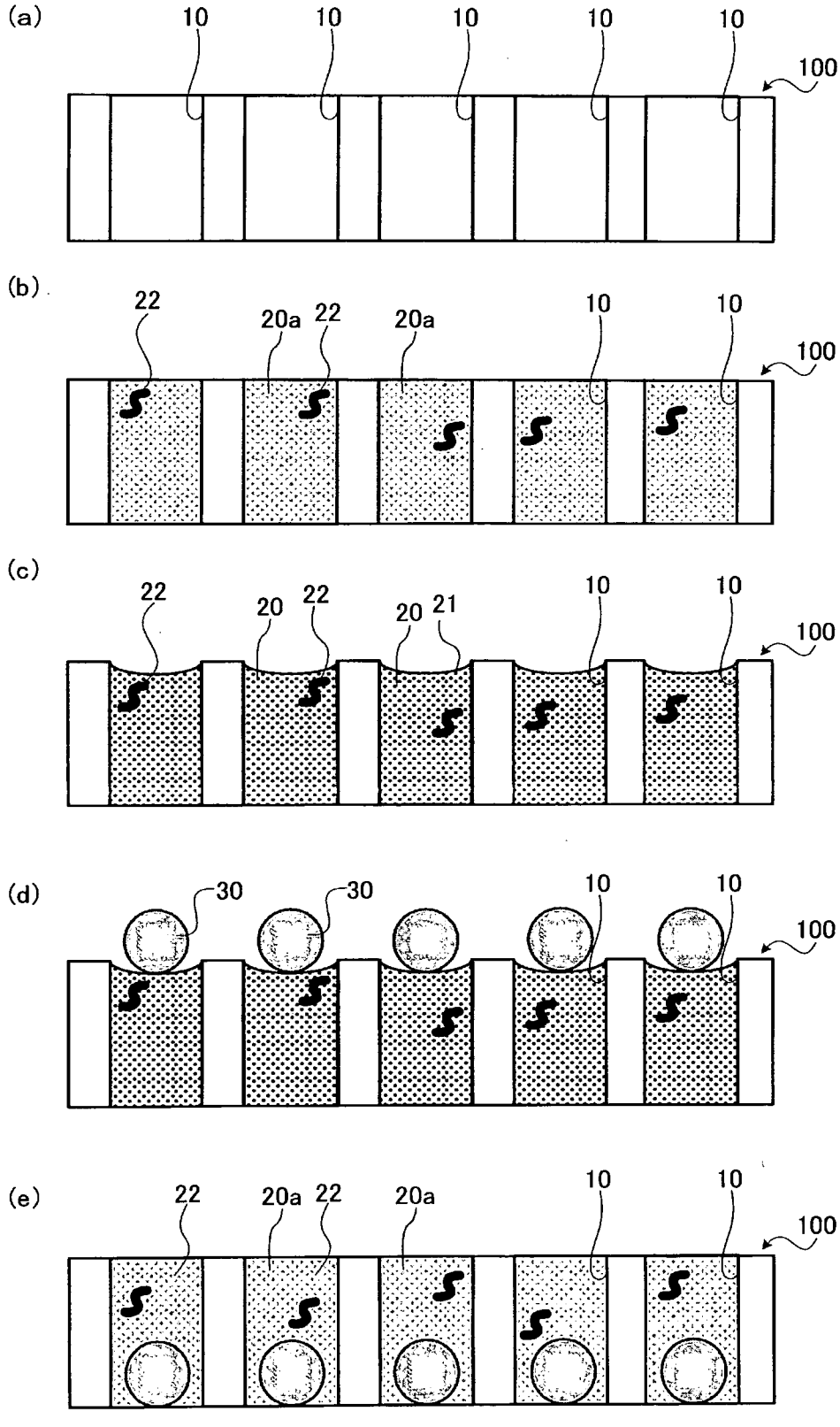

(a)
10
10
10
10
10
100
(b)
22
20a
22
20a
10
10
100
(c)
22
20
22
20
21
10
10
100
(d)
30
30
10
10
100
(e)
22
20a
22
20a
10
10
100

図 2

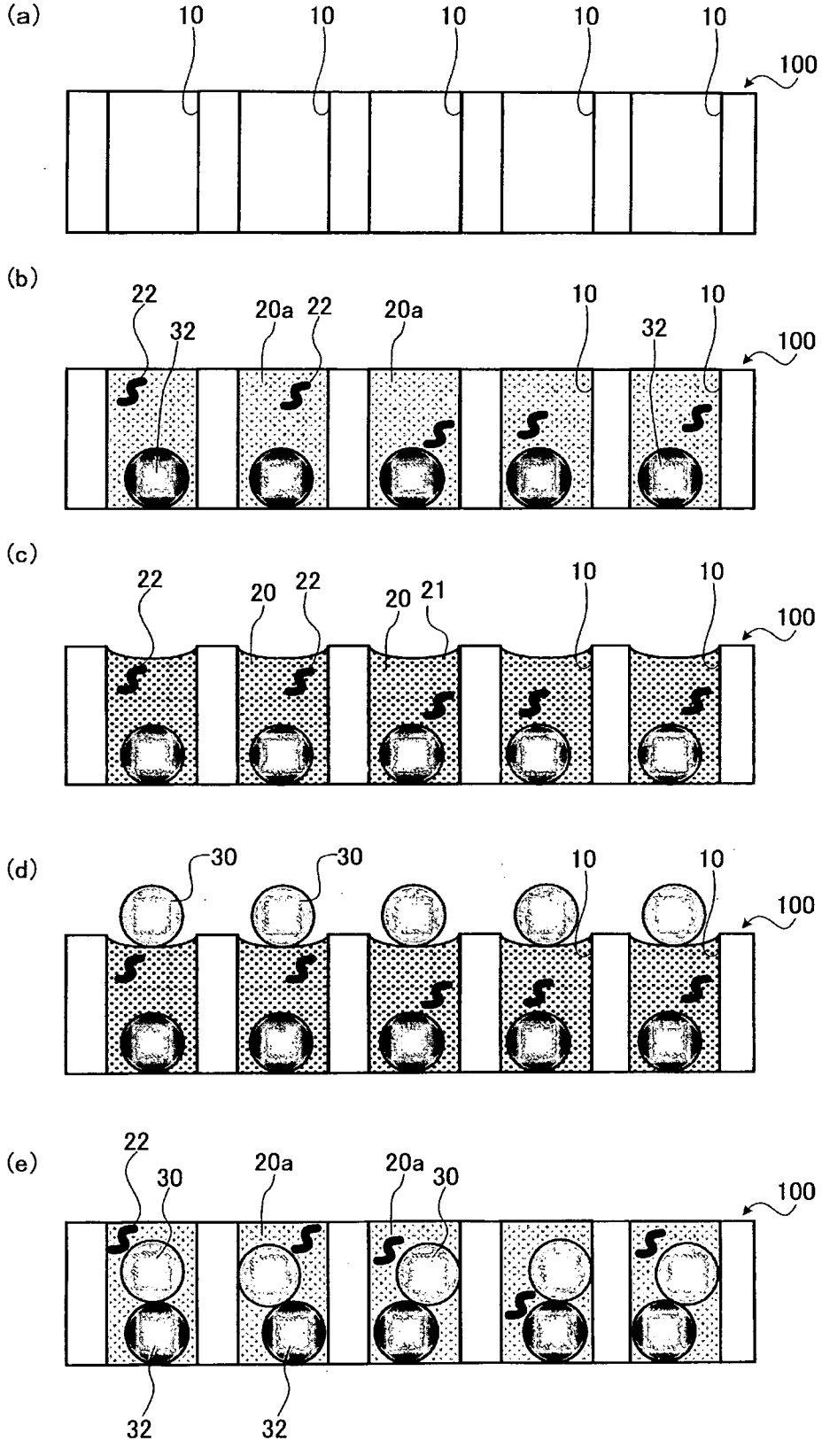

(a)
10
10
10
10
10
100
(b)
22
32
20a
22
20a
10
32
10
100
(c)
22
20
22
20
21
10
10
100
(d)
30
30
10
10
100
(e)
22
30
20a
20a
30
100
32
32

図 3

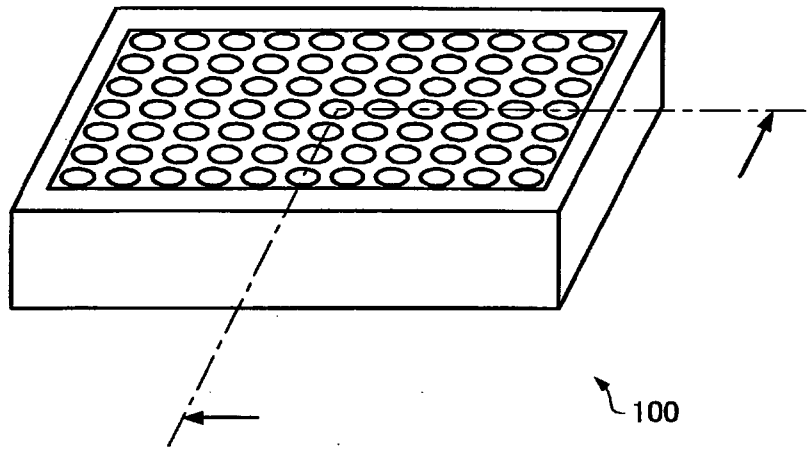


図 4

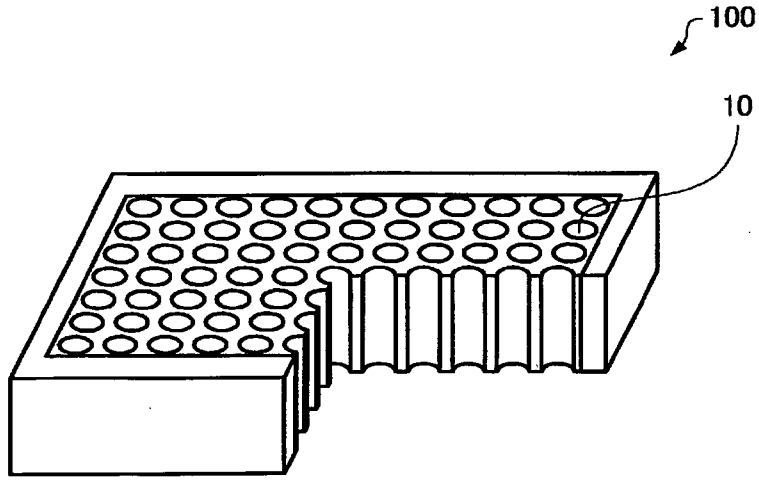


図５

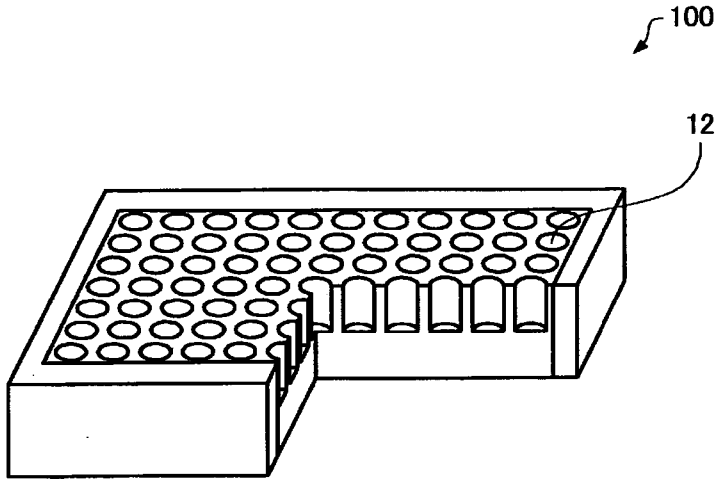
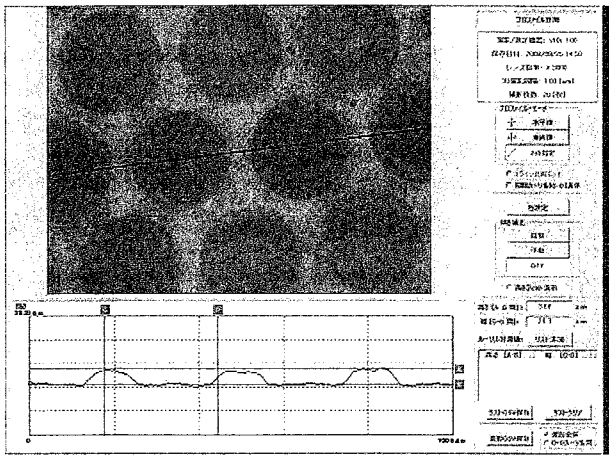
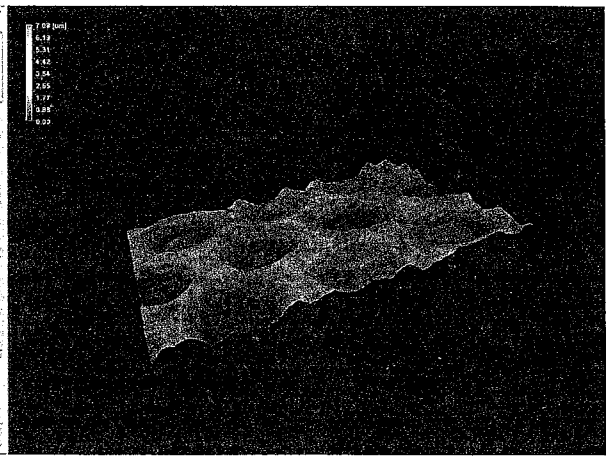


図6

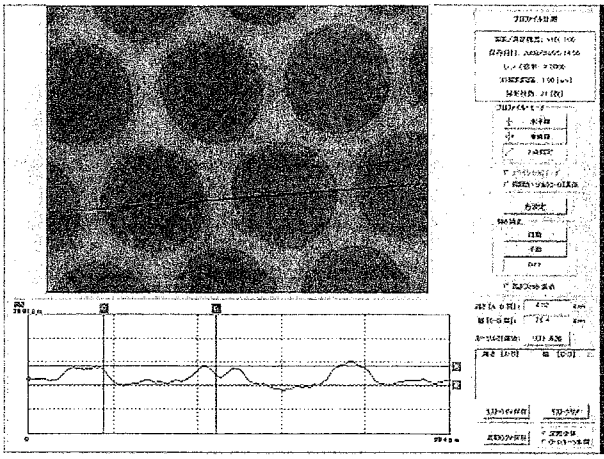


深度測定

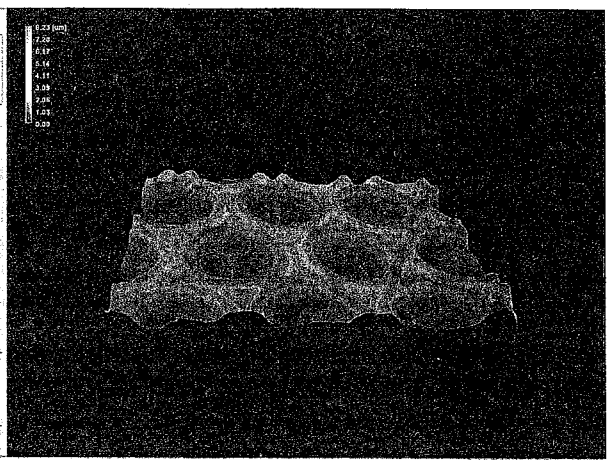


3D合成画像

図 7



深度測定



3D合成画像

図8

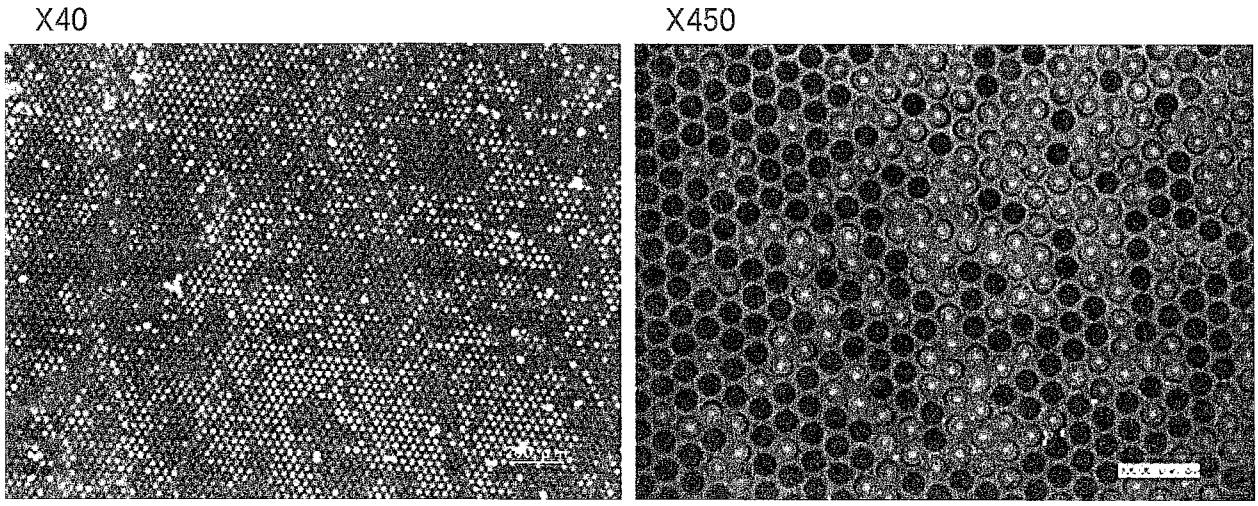
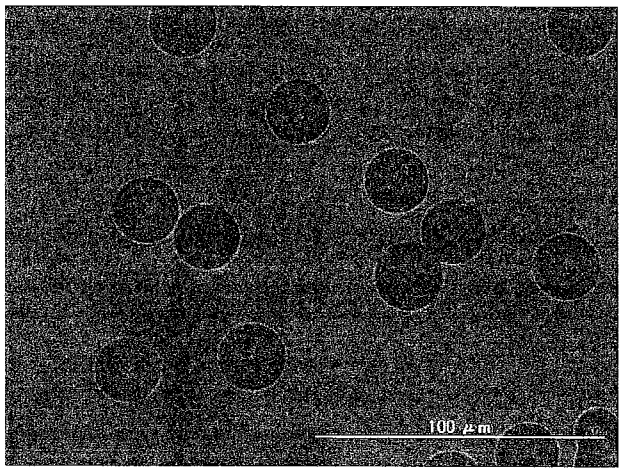


図９

光学観察



蛍光観察

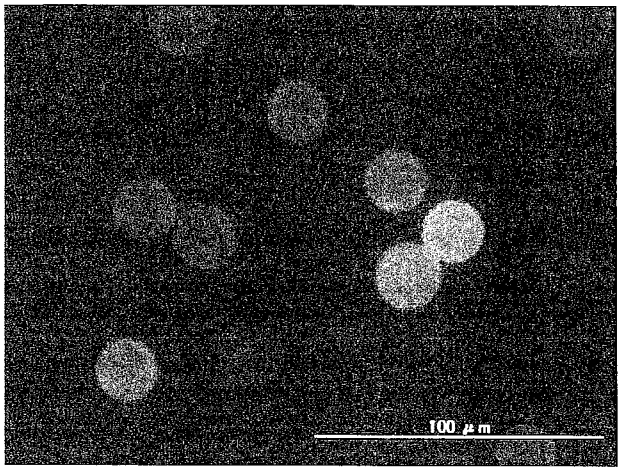


図１０

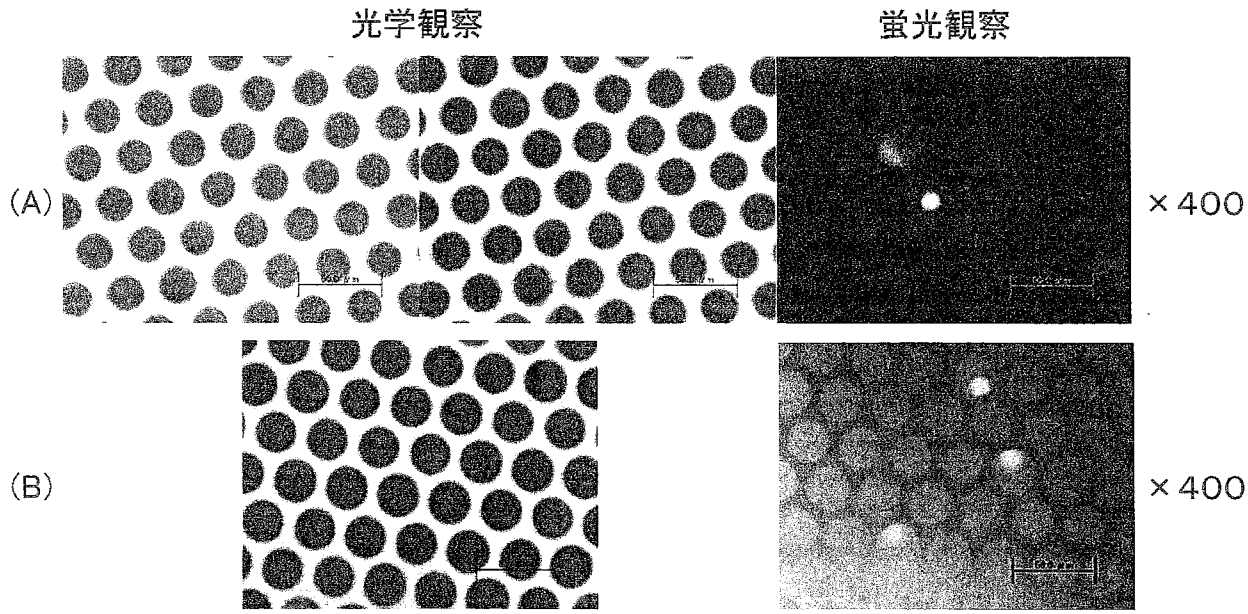


図１１

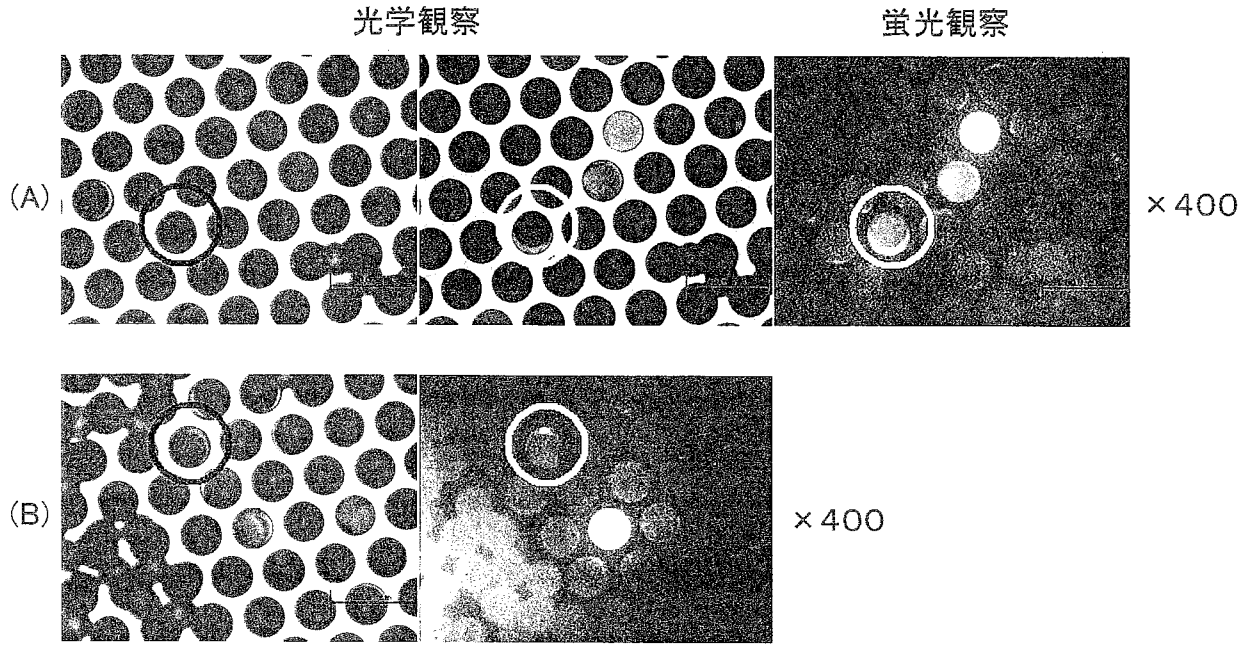


図１２

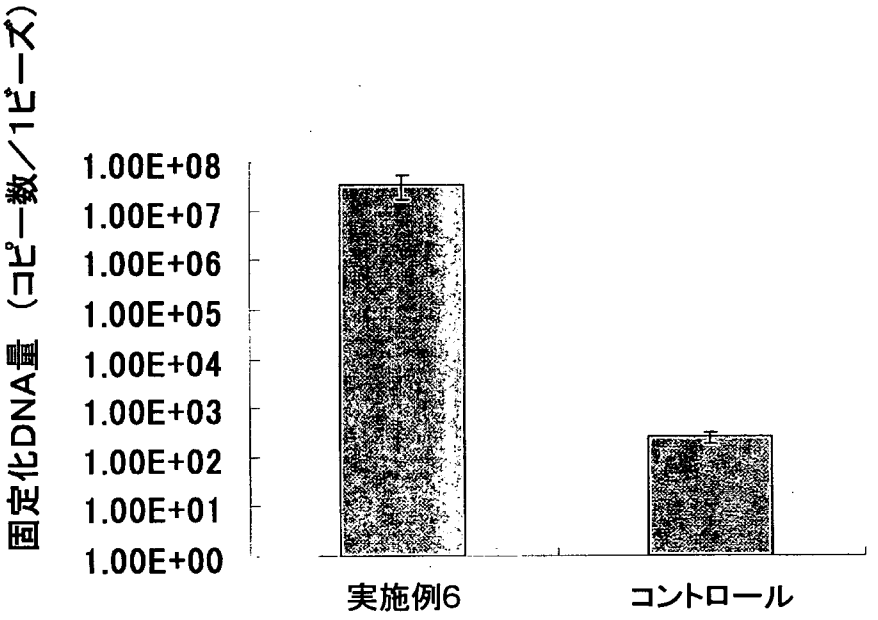
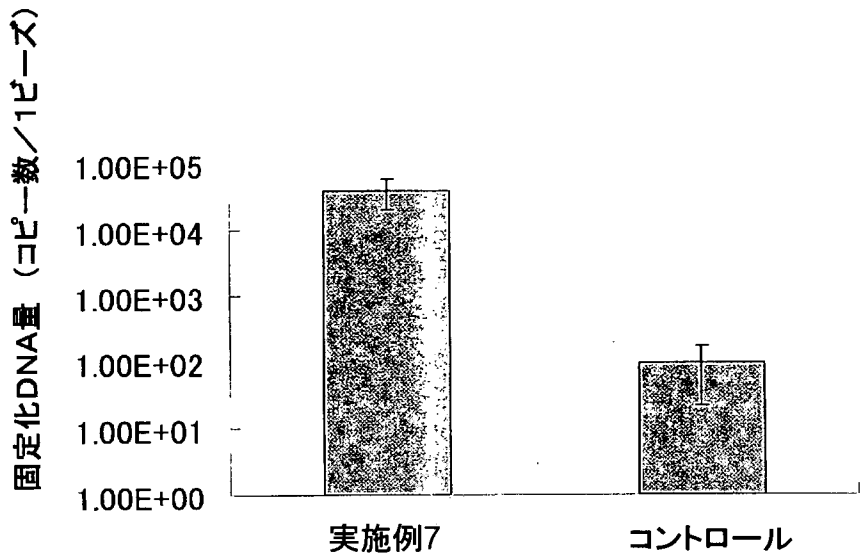

固定化DNA量（コピー数／1ビーズ）
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
実施例6
コントロール

図１３


固定化DNA量（コピー数／1ビーズ）
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
実施例7
コントロール

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/051305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M1/00(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12M1/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-304356 A (Toppan Printing Co., Ltd.), 18 December 2008 (18.12.2008), abstract; example 1; fig. 4, 5 (Family: none)	1-8
A	Kaul R et al, Coimmobilization of substrate and biocatalyst: A method for bioconversion of poorly soluble substances in water milieu, Biotechnol Bioeng, vol.28, no.9 p.1432-1437 (1986)	1-8
A	JP 2008-278791 A (Tokyo Medical and Dental University), 20 November 2008 (20.11.2008), (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 April, 2010 (12.04.10)	27 April, 2010 (27.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/051305

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-52372 A (Unitech Co., Ltd.), 25 February 2003 (25.02.2003), paragraph [0004] (Family: none)	1-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５１３０５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

PubMed

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2008-304356 A (凸版印刷株式会社) 2008.12.18, 要約、実施例１、図４、図５等（ファミリーなし）	１～８
A	Kaul R et al, Coimmobilization of substrate and biocatalyst: A method for bioconversion of poorly soluble substances in water milieu, Biotechnol Bioeng, vol.28, no.9 p.1432-1437 (1986)	１～８
A	JP 2008-278791 A (国立大学法人　東京医科歯科大学) 2008.11.20 (ファミリーなし)	１～８

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１２．０４．２０１０	２７．０４．２０１０

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９３５９
光本　美奈子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ａ	JP 2003-52372 A（ユニーテック株式会社）2003.02.25，段落【０００４】等（ファミリーなし）	１～８