(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5839790号
(P5839790)

(45)発行日　平成28年1月6日(2016.1.6)　(24)登録日　平成27年11月20日(2015.11.20)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	F
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M
G01N 37/00	(2006.01)	G01N	33/53	U
C12M 1/00	(2006.01)	G01N	37/00	102
		G01N	33/53	D

請求項の数 9　(全 16 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-216955 (P2010-216955)
(22)出願日　平成22年9月28日 (2010.9.28)
(65)公開番号　特開2012-70654 (P2012-70654A)
(43)公開日　平成24年4月12日 (2012.4.12)
審査請求日　平成25年4月9日 (2013.4.9)

（出願人による申告）平成２２年度、独立行政法人科学技術振興機構、ＣＲＥＳＴ事業、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願

(73)特許権者　504137912
国立大学法人　東京大学
東京都文京区本郷七丁目３番１号
(73)特許権者　000004112
株式会社ニコン
東京都港区港南二丁目１５番３号
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100108578
弁理士　高橋　詔男
(74)代理人　100107836
弁理士　西　和哉
(72)発明者　一木　隆範
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡマイクロアレイの製造方法、ＤＮＡマイクロアレイ、タンパク質アレイの製造方法、タンパク質アレイ、及び機能性タンパク質の同定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＤＮＡが配置された複数の微小反応槽を備えたＤＮＡマイクロアレイの製造方法であって、
（ａ）エマルション１個あたり平均１分子以下のＤＮＡと平均１個以下の前記ＤＮＡの固相担体としてのビーズが含まれるように油中水型エマルションを調製する工程と、
（ｂ）前記エマルション内で核酸増幅反応を行い、固相結合部位が付加されたＤＮＡを前記ビーズに固定化する工程と、
（ｃ）前記工程（ｂ）で得られる前記ＤＮＡが固定化されたビーズを有する前記エマルション及び前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを有する前記エマルションをそれぞれ破壊して前記ＤＮＡが固定化されたビーズ及び前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを取り出し、前記ＤＮＡが固定化されていないビーズと前記ＤＮＡが固定化されたビーズとから前記ＤＮＡが固定化されたビーズを電気泳動によって選別する工程と、
（ｄ）前記工程（ｃ）において選別された前記ＤＮＡが固定化されたビーズを含む懸濁液を、ビーズ配置用基板に接触させ、前記ビーズ配置用基板に配設された複数の微小反応槽内に前記ＤＮＡが固定化されたビーズを配置する工程を有し、
前記微小反応槽の直径が前記ビーズの直径の１～２倍であることを特徴とするＤＮＡマイクロアレイの製造方法。
【請求項２】
前記工程（ｃ）は、前記ＤＮＡが固定化された複数のビーズと前記ＤＮＡが固定化され

ていない複数のビーズとから前記ＤＮＡが固定化されたビーズを選別する工程であり、前記ＤＮＡが固定化された複数のビーズは、それぞれ異なる種類のＤＮＡが固定化されたものを含む請求項１に記載のＤＮＡマイクロアレイの製造方法。

【請求項３】

前記工程（ａ）において、前記ＤＮＡは変異ＤＮＡライブラリー由来のＤＮＡである請求項１又は２に記載のＤＮＡマイクロアレイの製造方法。

【請求項４】

前記工程（ｂ）において、前記固相結合部位はビオチンであり、前記ビーズはストレプトアビジン又はアビジンで修飾されたものである請求項１～３のいずれか一項に記載のＤＮＡマイクロアレイの製造方法。

【請求項５】

前記ビーズは、磁気ビーズであり、前記ビーズ配置用基板は、磁気ビーズ配置用基板であり、前記工程（ｄ）において、前記磁気ビーズ配置用基板の下部に磁石を配置し、前記磁気ビーズを前記微小反応槽に誘導する請求項１～４のいずれか一項に記載のＤＮＡマイクロアレイの製造方法。

【請求項６】

ＤＮＡが配置された複数の微小反応槽を備えたＤＮＡマイクロアレイの製造方法であって、

（ａ）エマルション１個あたり、平均１分子以下のＤＮＡと平均１個以下の前記ＤＮＡの固相担体としてのビーズとが含まれるように油中水型エマルションを調製し、１分子以下の第１のＤＮＡを含む第１のエマルションと１分子以下の第１のＤＮＡとは異なる種類のＤＮＡである第２のＤＮＡを含む第２のエマルションとを作製する工程と、

（ｂ）前記エマルション内で核酸増幅反応を行い、固相結合部位が付加されたＤＮＡを前記ビーズに固定化する工程と、

（ｃ）前記工程（ｂ）で得られる前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズを有する前記第１のエマルションと前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズを有する前記第２のエマルションと前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを有する前記エマルションとをそれぞれ破壊して前記ＤＮＡが固定化されたビーズ及び前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを取り出し、前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズと前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズとを、前記ＤＮＡが固定されていないビーズから電気泳動によって選別する工程と、

（ｄ）前記工程（ｃ）において選別された前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズ及び前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズを含む懸濁液を、複数の微小反応槽を有するビーズ配置用基板に接触させ、前記複数の微小反応槽のうち第１の微小反応槽内に前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズを配置し第２の微小反応槽内に前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズを配置する工程と、

を有することを特徴とするＤＮＡマイクロアレイの製造方法。

【請求項７】

（ｅ）請求項１～６のいずれか一項に記載の製造方法によってＤＮＡマイクロアレイを準備し、前記ＤＮＡマイクロアレイが備える前記微小反応槽に無細胞タンパク質合成系を用意する工程と、

（ｆ）前記微小反応槽中で合成される後記タンパク質と接触するように基板を前記ＤＮＡマイクロアレイと重ね合わせる工程と、

（ｇ）前記微小反応槽内において、前記無細胞タンパク質合成系を用いて前記ＤＮＡからタンパク質を合成し、前記タンパク質を前記基板上に固定化する工程と、を有することを特徴とするタンパク質アレイの製造方法。

【請求項８】

請求項７に記載の製造方法によってタンパク質アレイを準備し、前記タンパク質アレイを用いて機能性スクリーニングを行い、前記機能性スクリーニングにより特定された、前記工程（ｇ）において固定化されたタンパク質を、前記工程（ｅ）において対応する微小反応槽内のＤＮＡを用いて同定することを特徴とする機能性タンパク質の同定方法。

【請求項９】
請求項７に記載の製造方法によってタンパク質アレイを準備し、前記タンパク質アレイを用いて、前記工程（ｇ）において固定化されたタンパク質の活性を測定する方法であって、
スポットの位置に対応するようなマイクロ凹版を用意し、
前記マイクロ凹版の微小凹部内にタンパク質の活性測定溶液を予め充填し、
タンパク質アレイとマイクロ凹版を重ね合わせて反応させてチップ上のタンパク質の活性を測定する
ことを特徴とするタンパク質の活性測定方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＤＮＡマイクロアレイの製造方法、ＤＮＡマイクロアレイ、タンパク質アレイの製造方法、タンパク質アレイ、及び機能性タンパク質の同定方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
新規機能性タンパク質は、医薬品、洗剤、食品加工、研究開発用試薬、臨床分析、さらにはバイオエネルギー、バイオセンサーなど様々なバイオ応用分野への貢献が期待されている。
【０００３】
新規機能性タンパク質の取得に際しては、タンパク質の構造情報から人知によりデザインするタンパク質工学的手法が主流であったが、より有用なタンパク質を取得するためにはタンパク質のランダムな分子構造改変と淘汰を繰り返す進化分子工学的手法が期待されている。
【０００４】
上記進化分子工学的手法において、タンパク質改変体をコードする変異ＤＮＡを１種類ごとにサンプリングして解析する場合は、１アミノ酸をコードするコドンが３塩基からなっていることを考慮すると、$(4^3)^n$（ｎ：コドン数)個の膨大な数の変異ＤＮＡ由来のタンパク質を解析する必要があり、効率的にスクリーニングを行うためには、同時並列的に評価する系が必要とされる。
そのためには、ランダム変異を導入したＤＮＡからなるＤＮＡマイクロアレイ、及び該ＤＮＡマイクロアレイに基づいて製造されたタンパク質アレイが必須である。
【０００５】
ランダム変異を導入したＤＮＡからなるＤＮＡマイクロアレイを製造する際には膨大な数の変異ＤＮＡライブラリーを用いて、ＤＮＡマイクロアレイ上の１スポットに１種類のＤＮＡ分子を固定する必要がある。
【０００６】
このような固定化を容易にするものとして、１分子エマルションＰＣＲ法を利用した方法が提案されている（例えば、特許文献１参照。）。
１分子エマルションＰＣＲ法とは、乳化剤が混和した油の中に水を攪拌して逆ミセルコロイド（Ｗ／Ｏエマルション）を形成させることで限られた反応空間の中に１分子変異ＤＮＡを容易に隔離することを可能とする方法である。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００７】
【特許文献１】特開２００６－２１１９８４号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
しかしながら、特許文献１で提案されている方法に基づいて、エマルション１個あたり

、平均１個以下の固相担体と平均１分子以下のＤＮＡとが含まれるようにエマルション化すれば、ＰＣＲを行うことにより、エマルション内で１種類のＤＮＡを増幅し、該ＤＮＡを固定した固相担体を得ることができるが、ＤＮＡを全く含まない固相担体のみのエマルションも存在することになる。

このようなエマルションから固相担体を回収し、ＤＮＡマイクロアレイを作製した場合には、ＤＮＡマイクロアレイ上に、ＤＮＡが固定されていないスポットが多数存在することになり、効率的なスクリーニングという観点からは改良の余地がある。

【０００９】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、１スポット当たり１種類の変異ＤＮＡ分子が高い精度で固定された高密度ＤＮＡマイクロアレイの製造方法、該製造方法により製造された高密度ＤＮＡマイクロアレイ、該高密度ＤＮＡマイクロアレイを用いて製造された高密度タンパク質アレイ、及び該高密度タンパク質アレイを用いた機能性タンパク質の同定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明者らは上記の課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、ＤＮＡに帯電した負の電荷を利用することにより課題を解決できることを見出した。本発明の一実施態様は、下記（１）～（９）を提供するものである。

（１）本発明の一実施態様におけるＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、

ＤＮＡが配置された複数の微小反応槽を備えたＤＮＡマイクロアレイの製造方法であって、

（ａ）エマルション１個あたり平均１分子以下のＤＮＡと平均１個以下の前記ＤＮＡの固相担体としてのビーズが含まれるように油中水型エマルションを調製する工程と、

（ｂ）前記エマルション内で核酸増幅反応を行い、固相結合部位が付加されたＤＮＡを前記ビーズに固定化する工程と、

（ｃ）前記工程（ｂ）で得られる前記ＤＮＡが固定化されたビーズを有する前記エマルション及び前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを有する前記エマルションをそれぞれ破壊して前記ＤＮＡが固定化されたビーズ及び前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを取り出し、前記ＤＮＡが固定化されていないビーズと前記ＤＮＡが固定化されたビーズとから前記ＤＮＡが固定化されたビーズを電気泳動によって選別する工程と、

（ｄ）前記工程（ｃ）において選別された前記ＤＮＡが固定化されたビーズを含む懸濁液を、ビーズ配置用基板に接触させ、前記ビーズ配置用基板に配設された複数の微小反応槽内に前記ＤＮＡが固定化されたビーズを配置する工程を有し、

前記微小反応槽の直径が前記ビーズの直径の１～２倍であることを特徴とする。

（２）本発明の一実施態様におけるＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、前記工程（ｃ）は、前記ＤＮＡが固定化された複数のビーズと前記ＤＮＡが固定化されていない複数のビーズとから前記ＤＮＡが固定化されたビーズを選別する工程であり、前記ＤＮＡが固定化された複数のビーズは、それぞれ異なる種類のＤＮＡが固定化されたものを含むことが好ましい。

（３）本発明の一実施態様におけるＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、前記工程（ａ）において、前記ＤＮＡは変異ＤＮＡライブラリー由来のＤＮＡであることが好ましい。

（４）本発明の一実施態様におけるＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、前記工程（ｂ）において、前記固相結合部位はビオチンであり、前記ビーズはストレプトアビジン又はアビジンで修飾されたものであることが好ましい。

（５）本発明の一実施態様におけるＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、前記ビーズは、磁気ビーズであり、前記ビーズ配置用基板は、磁気ビーズ配置用基板であり、前記工程（ｄ）において、前記磁気ビーズ配置用基板の下部に磁石を配置し、前記磁気ビーズを前記微小反応槽に誘導することが好ましい。

（６）本発明の一実施態様におけるＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、

ＤＮＡが配置された複数の微小反応槽を備えたＤＮＡマイクロアレイの製造方法であっ

て、
（ａ）エマルション１個あたり、平均１分子以下のＤＮＡと平均１個以下の前記ＤＮＡの固相担体としてのビーズとが含まれるように油中水型エマルションを調製し、１分子以下の第１のＤＮＡを含む第１のエマルションと１分子以下の第１のＤＮＡとは異なる種類のＤＮＡである第２のＤＮＡを含む第２のエマルションとを作製する工程と、
（ｂ）前記エマルション内で核酸増幅反応を行い、固相結合部位が付加されたＤＮＡを前記ビーズに固定化する工程と、
（ｃ）前記工程（ｂ）で得られる前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズを有する前記第１のエマルションと前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズを有する前記第２のエマルションと前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを有する前記エマルションとをそれぞれ破壊して前記ＤＮＡが固定化されたビーズ及び前記ＤＮＡが固定化されていないビーズを取り出し、前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズと前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズとを、前記ＤＮＡが固定されていないビーズから電気泳動によって選別する工程と、
（ｄ）前記工程（ｃ）において選別された前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズ及び前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズを含む懸濁液を、複数の微小反応槽を有するビーズ配置用基板に接触させ、前記複数の微小反応槽のうち第１の微小反応槽内に前記第１のＤＮＡが固定化されたビーズを配置し第２の微小反応槽内に前記第２のＤＮＡが固定化されたビーズを配置する工程と、
を有することを特徴とする。
（７）本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイの製造方法は、
（ｅ）前記（１）～（６）のいずれか一つに記載の製造方法によってＤＮＡマイクロアレイを準備し、前記ＤＮＡマイクロアレイが備える前記微小反応槽に無細胞タンパク質合成系を用意する工程と、
（ｆ）前記微小反応槽中で合成される後記タンパク質と接触するように基板を前記ＤＮＡマイクロアレイと重ね合わせる工程と、
（ｇ）前記微小反応槽内において、前記無細胞タンパク質合成系を用いて前記ＤＮＡからタンパク質を合成し、前記タンパク質を前記基板上に固定化する工程と、を有することを特徴とする。
（８）本発明の一実施態様における機能性タンパク質の同定方法は、（７）に記載の製造方法によってタンパク質アレイを準備し、前記タンパク質アレイを用いて機能性スクリーニングを行い、前記機能性スクリーニングにより特定された、前記工程（ｇ）において固定化されたタンパク質を、前記工程（ｅ）において対応する微小反応槽内のＤＮＡを用いて同定することを特徴とする。
（９）本発明の一実施態様におけるタンパク質の活性測定方法は、（７）に記載の製造方法によってタンパク質アレイを準備し、前記タンパク質アレイを用いて、前記工程（ｇ）において固定化されたタンパク質の活性を測定する方法であって、
スポットの位置に対応するようなマイクロ凹版を用意し、
前記マイクロ凹版の微小凹部内にタンパク質の活性測定溶液を予め充填し、
タンパク質アレイとマイクロ凹版を重ね合わせて反応させてチップ上のタンパク質の活性を測定する
ことを特徴とする。
【発明の効果】
【００１１】
本発明のＤＮＡマイクロアレイの製造方法によれば、１スポット当たり１種類の変異ＤＮＡ分子が高い精度で固定された高密度ＤＮＡマイクロアレイが得られる。
本発明によれば、１スポット当たりに１種類の変異タンパク質が高い精度で固定されたタンパク質マイクロアレイが得られるだけではなく、前記タンパク質マイクロアレイを高密度化することも可能であり、かかる高密度タンパク質マイクロアレイは、膨大な種類のタンパク質が固定化されているだけではなく、１スポット当たりに多分子数のホモジニアスなタンパク質が固定化されたものであるため、利用価値が高い。

また、本発明の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法は、高密度化タンパク質アレイから所望の機能を有するタンパク質を迅速に同定することができるため、進化分子工学的用途に好適に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】実施例において、磁気ビーズを封入したエマルション粒子の蛍光顕微鏡像である。

【図２】実施例において、磁気ビーズ及びｃＤＮＡ結合磁気ビーズにおける電気泳動度のヒストグラムである。

【図３】実施例において、Ｃｙ５－ＧＦＰｃＤＮＡ結合磁気ビーズ及びＦＩＴＣ－ＲＦＰｃＤＮＡ結合磁気ビーズをパターニングしたガラス基板の蛍光顕微鏡像である。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

≪ＤＮＡマイクロアレイの製造方法≫

本実施形態のＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、

ＤＮＡが配置された複数の微小反応槽を備えたＤＮＡマイクロアレイの製造方法であって、

（ａ）エマルション１個あたり平均１分子以下のＤＮＡと平均１個以下の前記ＤＮＡの固相担体としてのビーズが含まれるように油中水型エマルションを調製する工程と、

（ｂ）前記エマルション内で核酸増幅反応を行い、固相結合部位が付加されたＤＮＡを前記ビーズに固定化する工程と、

（ｃ）電気泳動を行い、前記ＤＮＡが固定化されたビーズのみを選別する工程と、

（ｄ）前記ＤＮＡが固定化されたビーズを、ビーズ配置用基板に配設された複数の微小反応槽内に配置する工程を有し、

前記微小反応槽の直径が前記ビーズの直径の１～２倍であることを特徴とする。

以下、各工程について説明する。

【００１４】

工程（ａ）は、エマルション１個あたり平均１分子以下のＤＮＡと平均１個以下の前記ＤＮＡの固相担体としてのビーズが含まれるように油中水型エマルションを調製する工程である。

【００１５】

上述したように油中水型エマルションとは、乳化剤が混和した油の中に水を攪拌して形成させた逆ミセルコロイド（ｗａｔｅｒ－ｉｎ－ｏｉｌ（Ｗ／Ｏ）エマルション ）を意味する。ＤＮＡが１分子封入されたエマルション内で核酸増幅反応を行えば、１個のエマルション中には増幅された１種類のＤＮＡのみが存在することになる。

【００１６】

各々の変異ＤＮＡを解析する必要性の観点から、１個のエマルション中に複数の変異ＤＮＡが混在することは適切ではないため、本発明においては、エマルション１個あたり平均１分子以下のＤＮＡが含まれるように油中水型エマルションを調製する。よって、ＤＮＡが含まれないエマルションも存在することになるが、後記工程（ｃ）においてＤＮＡが固定化されたビーズのみを選別するため特に問題とはならない。

【００１７】

工程（ａ）では、鋳型として用いられるＤＮＡ（以下、鋳型ＤＮＡ）や核酸増幅に必要な試薬等が調製されている水性成分に、油、乳化剤を混合して油中水型エマルションを調製する。これによって、複数個の鋳型ＤＮＡが複数のエマルション（逆ミセル）によって区画化される。即ち、鋳型ＤＮＡを内包する複数のエマルション（逆ミセル）が得られる。

エマルションの調製には、攪拌処理（磁気攪拌子、プロペラ式などの使用）、ホモジナイズ（ホモジナイザー、乳鉢などの使用）、超音波処理（ソニケーターなどの使用）などを利用できる。

エマルションの大きさは特に限定されないが、エマルション１個の体積は、エマルションの平均粒径を基に算出できる。エマルションの平均粒径は、１μｍ～１００μｍが好ましく、５μｍ～５０μｍがより好ましく、１０μｍ～３０μｍが特に好ましい。

エマルション粒子の数は前記水性成分の体積からエマルション１個の体積を割ることにより算出される。よって、エマルション１個あたり平均１分子以下のＤＮＡが含まれるように油中水型エマルションを調製するためには、全体におけるエマルションの数以下の分子数のＤＮＡを用意すればよい。

【００１８】

エマルションとしては、熱安定性に優れているものが好ましい。熱安定性に優れたエマルションを用いれば、工程（ｂ）におけるＰＣＲ法などの高温処理を伴う核酸増幅反応の間、エマルションを維持することができる。従って、各ミセル間でコンタミネーションが起こることを防止でき、効率よく核酸増幅が行われる。これによって、各ミセル内に鋳型ＤＮＡが一分子含まれるように条件設定すれば、各ミセル内において鋳型一分子に由来する核酸分子を大量に得ることが可能となる。

従って、エマルションを用いた核酸増幅反応を行うことにより、高密度化したＤＮＡマイクロアレイを製造することができる。さらにかかるＤＮＡマイクロアレイを用いて製造されたタンパク質アレイもまた各スポットに多分子のタンパク質が固定化された高密度なものとすることができ、特定の活性を有するタンパク質を選択する際の検出感度が向上する。

かかるエマルションに用いられる乳化剤としては、ゴールドシュミット社製ＡＢＩＬ（登録商標）ＷＥ０９、ＡＢＩＬ（登録商標）ＷＳ０８、ＡＢＩＬ（登録商標）ＥＭ９０等が挙げられる。

【００１９】

工程（ａ）では、油中水型エマルションに平均１個以下のＤＮＡの固相担体としてのビーズが含まれるように調製する。

エマルションの数は、上記計算により算出され、全体におけるエマルションの数以下の個数の固相担体を用意すればよい。各エマルションに含まれる固相担体の数が２個以上の場合、核酸増幅反応後の固相担体１個当たりが固定するＤＮＡの分子数が減少することになる。これは、高密度ＤＮＡマイクロアレイを作製するという観点から適切ではない。

油中水型エマルションに平均１個以下の固相担体が含まれるようにすることで、固相担体が含まれないエマルションも存在することになるが、後記工程（ｃ）においてＤＮＡが固定化されたビーズのみを選別するため特に問題とはならない。

【００２０】

前記ＤＮＡの固相担体としては、後にＤＮＡを回収する観点から、ビーズが用いられる。更に、短時間でビーズ配置用基板に配設された複数の微小反応槽内に配置させることが可能であるという観点から、前記ビーズは磁気ビーズであることが好ましく、前記ビーズ配置用基板は、磁気ビーズ配置用基板であることが好ましい。

このようにＤＮＡの固相担体としてビーズを用いれば、基板上にＤＮＡを固定する場合より多分子数のＤＮＡを固定することができる。かかるＤＮＡの分子数は、無細胞翻訳系を用いて合成されるタンパク質の分子数に反映されるため、本実施形態によれば、基板にＤＮＡを直接固定した従来のＤＮＡマイクロアレイからタンパク質アレイを作製する方法よりも１スポット当たりに多分子数のタンパク質を固定することができる。

【００２１】

前記工程（ａ）において、膨大な数の変異ＤＮＡを用意するために、前記ＤＮＡは、変異ＤＮＡライブラリー由来のＤＮＡであることが好ましい。

変異ＤＮＡライブラリーとしては、Ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ ＰＣＲ（エラープローンＰＣＲ）を利用したライブラリー、Ｇｅｎｅ ａｓｓｅｍｂｌｙ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓを利用したライブラリー、Ｒａｎｄｏｍ ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ ａｎｄ ｄｅｌｅｔｉｏｎ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓを利用したライブラリー、ＤＮＡ ｓｈｕｆｆｌｉｎｇを利用したライブラリー、Ｆａｍｉｌｙ ｓｈｕｆｆｌｉｎｇを利用したライブラリー、Ｓｔａ

ｇｇｅｒｅｄ Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ Ｐｒｏｃｅｓｓ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎを利用したライブラリー、ＩＴＣＨＹ Ｈｙｂｒｉｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｌｉｂｒａｒｉｅｓ、ＳＣＲＡＴＣＨＹ Ｈｙｂｒｉｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｈｏｍｏｌｏｇｙ－ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎを利用したライブラリー等が挙げられる。

【００２２】

エラープローンＰＣＲ法とは、ＰＣＲ反応中に人為的にランダムなエラーを発生させる方法である。該エラープローンＰＣＲ法においては、プルーフリーディング（校正）機能のないＴａｑＤＮＡポリメラーゼを用いる。エラープローンである該ＴａｑＤＮＡポリメラーゼの本来の性質を利用したものである。更に、１突然変異が有用な頻度で起こるようにするために、反応液中にMn^{2+}を添加したり、ｄＮＴＰ濃度を不均衡にすることでＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼのエラー発生率を増加させる。

【００２３】

工程（ｂ）は、前記エマルション内で核酸増幅反応を行い、固相結合部位が付加されたＤＮＡを前記ビーズに固定化する工程である。

【００２４】

工程（ｂ）における核酸増幅反応としては、ＰＣＲ（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）、ＬＡＭＰ（Ｌｏｏｐ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、ＮＡＳＢＡ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｂａｓｅｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、ＩＣＡＮ（Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ ａｎｄ Ｃｈｉｍｅｒｉｃａｌ ｐｒｉｍｅｒ－ｉｎｉｔｉａｔｅｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ）、ＴＲＣ（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｒｅｖｅｒｓｅ－Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｃｏｎｃｅｒｔｅｄ）、ＳＤＡ（Ｓｔｒａｎｄ Ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、ＴＭＡ（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、ＳＭＡＰ（ＳＭａｒｔ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｃｅｓｓ）、ＲＰＡ（Ｒｅｃｏｍｂｉｎｅｓ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、ＨＤＡ（Ｈｅｌｉｃａｓｅ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）などが挙げられるが、ＰＣＲ法による増幅反応を利用することが好ましい。

【００２５】

核酸増幅反応に用いられる試薬は、採用する核酸増幅反応に合わせて適当な核酸増幅反応用試薬を使用する。例えば、核酸増幅反応としてＰＣＲを採用する場合には、ＰＣＲを構成する各反応に必要な試薬、即ちｄＮＴＰ及びＤＮＡポリメラーゼが用いられる。ＤＮＡポリメラーゼとしては、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｔｈ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｖｅｎｔ ＤＮＡポリメラーゼ等の熱安定性ＤＮＡポリメラーゼを用いることが好ましく、試験開始前の伸長を防ぐためにホットスタート機能を持つＤＮＡポリメラーゼや、プルーフリーディング（校正）機能を持つＤＮＡポリメラーゼを使用することがより好ましい。これらの試薬は市販されており、容易に入手可能である。

【００２６】

鋳型ＤＮＡや核酸増幅に必要な試薬等を含む水性成分は、核酸増幅反応に適した溶液として調製される。例えば、ＰＣＲ反応が良好に進行するように、トリス－塩酸等のバッファーを用いて、ｐＨ７．０～ｐＨ９．０程度の溶液とする。

【００２７】

本実施形態では、鋳型ＤＮＡの特定領域をＰＣＲ反応で増幅可能な一対のプライマーセット（以下、便宜上「第１プライマーと第２プライマー」と称する）が用いられる。この態様において片方のプライマー（第２プライマー）を固相化しておけば、第２プライマーを介して固相担体に結合した状態で増幅産物を得ることができる。

【００２８】

前記第２プライマーと固相担体の結合としては、アビジン－ビオチン結合を利用する方法の他、前記第２プライマーをアミノ基、アルデヒド基、ＳＨ基、などの官能基で修飾し

、固相をアミノ基、アルデヒド基、エポキシ基などを有するシランカップリング剤で表面処理したものを利用する方法などを用いることができるが、特に、アビジン－ビオチン結合を利用した方法が好ましい。

更に、固定化としては、ストレプトアビジン又はアビジンを固相に固定化し、固相結合部位としてビオチンをＤＮＡに結合させたものがより好ましい。

【００２９】

エマルションＰＣＲを行った後、ＤＮＡ固定化ビーズを取出すためにエマルションを破壊させる必要がある。該エマルションの破壊は、当技術分野で公知の任意の手段によって可能であり、例えば、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ１００やノニデット（Ｎｏｎｉｄｅｔ）Ｐ４０等の界面活性剤を加えることにより行われる。

【００３０】

工程（ｃ）は、電気泳動を行い、前記ＤＮＡが固定化されたビーズのみを選別する工程である。

上述したように、工程（ａ）において、エマルション１個あたり平均１分子以下のＤＮＡと平均１個以下の前記ＤＮＡの固相担体としてのビーズが含まれるように油中水系エマルションを調製しているため、エマルション中にビーズに固定化されていないＤＮＡやＤＮＡが固定化されていないビーズが存在する。工程（ｃ）において、ＤＮＡに帯電した負の電荷を利用し、電気泳動を行い、電気泳動度の違いを利用することでＤＮＡが固定化されたビーズのみを選別することができる。本実施形態に用いられる電気泳動装置としては、公知のもので良く、例えば、フリーフロー電気泳動装置等が挙げられる。

【００３１】

工程（ｄ）は、前記ＤＮＡが固定化されたビーズを、ビーズ配置用基板に配設された複数の微小反応槽内に配置する工程である。

本実施形態において、ビーズ配置用基板は、複数の微小反応槽が配設されており、前記複数の微小反応槽内にＤＮＡが固定化されたビーズが配置されることにより、ＤＮＡマイクロアレイとして用いられる。

【００３２】

従来のＤＮＡマイクロアレイの製造方法は、基板にＤＮＡを直接固定する方法である。かかる方法においては、固定化に用いられるＤＮＡの分子数には制限がある。一方、本実施形態においては、微小反応槽に多分子数のＤＮＡを添加することができるため、後記する無細胞タンパク質合成系を用いることにより、多分子数のタンパク質を合成することができる。従って、本実施形態においては、１スポット当たり多分子数のタンパク質を固定化したタンパク質アレイを作製することができる。

【００３３】

ビーズ配置用基板の表面及び微小反応槽内壁を、ＤＮＡ等生体分子の非特異吸着防止用ブロッキング剤、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）や２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）で好適にコーティングすることができる。かかるブロッキング剤をコーティングすることで、基板表面や微小反応槽の内壁への生体分子の非特異吸着を抑制することができる。

【００３４】

ビーズ配置用基板に用いられる基板材料は、透明なガラス又はポリマー材であることが好ましく、リークを抑える目的からは、ポリジメチルシロキサンなどのエラストマー材料であることがより好ましい。なお、ビーズ配置用基板に用いられる基板材料にエラストマー材料を用いる場合、微小なゴミなどの粒子がビーズ配置用基板と後述するタンパク質アレイ作製に用いられる基板との間に挟まれた時に生じるビーズ配置用基板全体の基板との密着性に及ぼす悪影響がエラストマーの局所的な変形により回避される利点がある。

【００３５】

上述したように、本実施形態において、前記ビーズ配置用基板は、磁気ビーズ配置用基板であることが好ましく、前記磁気ビーズ配置用基板に用いられる基板材料下に、磁性体板が配設されていることがより好ましい。

かかる構造の磁気ビーズ配置用基板を用いることにより、微小反応槽内に磁気ビーズを容易にかつ高い精度で配置することができる。具体的には、該基板材料の下部に磁石を配置し、該基板材料上にＤＮＡを固定した磁気ビーズを分散させた分散液を滴下する。磁気ビーズ及び磁性体薄膜による磁力の作用により、微小反応槽内へ磁気ビーズが誘引されることにより配置されやすくなる。さらに磁石を適宜基板に対し平行方向に動かすことで磁気ビーズが分散し、微小反応槽内への充填率が向上する。磁石によりビーズ配置用基板に印加する磁場の強さは、所望の効果を得る上で、好ましくは１００～１００００ガウスである。

また、磁石を取り除いた後も磁性体板の磁化は残るため、磁気ビーズは安定した配置を保持し続けることが可能となる。

【００３６】

かかる磁性体の材料としては、ニッケル、ニッケル合金、鉄および鉄合金などの金属を好適に用いることができ、本実施形態においては残留磁化の大きな磁性材料を用いることが好ましい。

【００３７】

１種類のＤＮＡが結合したビーズ１個をビーズ配置用基板の各微小反応層に配置する観点から、微小反応槽の直径はビーズの直径とほぼ同じであることが好ましい。しかしながら、ビーズの微小反応槽への充填率は該微小反応槽の直径に依存するため、微小反応槽の直径がビーズの直径よりも若干広い方が充填率が高い。更に微小反応槽の直径はビーズの直径の１～２倍であることが好ましくない。また、１個の微小反応槽に１個のビーズを充填する上で、微小反応槽の深さは、ビーズの直径の１～２倍であることが好ましい。

【００３８】

微小反応槽は、親水化されていることが好ましく、該微小反応槽を酸素プラズマ照射などにより親水化処理することにより、微小反応槽内部へのビーズを分散させた液の充填が容易になり、充填率が向上する。

【００３９】

≪ＤＮＡマイクロアレイ≫

本実施形態のＤＮＡマイクロアレイの製造方法を用いて製造されたＤＮＡマイクロアレイは、１スポット当たり１種類の変異ＤＮＡ分子が高い精度で固定されたものであり、スポットの高密度化にも対応し得るものである。

【００４０】

≪タンパク質アレイの製造方法≫

本実施形態のタンパク質アレイの製造方法は、

（ｅ）先に記載のＤＮＡマイクロアレイが備える微小反応槽に無細胞タンパク質合成系を用意する工程と、

（ｆ）前記微小反応槽中で合成される後記タンパク質と接触するように基板を前記ＤＮＡマイクロアレイと重ね合わせる工程と、

（ｇ）前記微小反応槽内において、前記無細胞タンパク質合成系を用いて前記ＤＮＡからタンパク質を合成し、前記タンパク質を前記基板上に固定化する工程と、を有することを特徴とする。

以下、各工程について説明する。

【００４１】

工程（ｅ）は、先に記載のＤＮＡマイクロアレイが備える微小反応槽に無細胞タンパク質合成系を用意する工程である。

【００４２】

上述したように、本実施形態においては、複数の微小反応槽中に多分子数のＤＮＡを用意することができるため、無細胞翻訳系を用いることにより、多分子数のタンパク質を合成することができる。従って、本実施形態のタンパク質アレイの製造方法においては、１スポット当たり多分子数の変異タンパク質を固定化したタンパク質アレイを作製することができる。また、本実施形態では、複数の微小反応槽を備えたＤＮＡマイクロアレイを用

いるため、転写段階と翻訳段階とを１度に行うことができ、効率的である。
【００４３】
工程（ｆ）は、前記微小反応槽中で合成される後記タンパク質と接触するように基板を前記ＤＮＡマイクロアレイと重ね合わせる工程である。
工程（ｆ）は、版の凹んだ部分にインクをいれ、上から紙などを押し当てる凹版印刷（インタリプチンティング）技術を利用したものである。具体的には、前記工程（ｆ）は、ＤＮＡマイクロアレイ上の凹部である微小反応槽に反応溶液を滴下し、上から基板を前記ＤＮＡマイクロアレイと重ね合わせ、ハンドプレス器等を用いて、押し当てる工程である。そして、後記工程（ｇ）において、基板上にタンパク質が固定される。よって、前記ＤＮＡマイクロアレイにおいて固定化されたＤＮＡの位置情報を変更することなく、該ＤＮＡからタンパク質を合成し、該タンパクを基板上に固定することができる。
【００４４】
前記工程（ｆ）において用いられる基板としては、ガラス基板、シリコン基板、ポリマー基板、金属基板等が挙げられる。
本実施形態においては、ＤＮＡマイクロアレイと重ね合わせる基板の表面は必ずしも平坦である必要はなく、例えば、タンパク質を固定する表面積を増やすために凹凸を加工してもよい。ただし、基板とＤＮＡマイクロアレイを重ね合わせた際に、ＤＮＡマイクロアレイ上の全ての微小反応槽内の試薬等の漏れがなく封じられるように、ＤＮＡマイクロアレイが接触する部分の基板表面は平坦である必要がある。
【００４５】
工程（ｇ）は、前記微小反応槽内において、前記無細胞タンパク質合成系を用いて前記ＤＮＡからタンパク質を合成し、前記タンパク質を前記基板上に固定化する工程である。
【００４６】
無細胞タンパク質合成系とは、適当な細胞から抽出されたタンパク質合成能を有する成分からなるタンパク質翻訳系であり、この系にはリボゾーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子等、翻訳に必要な要素が含まれている。このようなタンパク質翻訳系として、大腸菌抽出、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液等が一般的に用いられる。
このような系を用いることにより、前記微小反応槽内においてタンパク質が製造される。
合成されるタンパク質は、分解や変性により失活しやすいため、基板への固定の際にはできるだけ安定な状態で該タンパク質を維持する必要がある。本実施形態においては、微小反応槽内で合成したタンパク質を、そのまま基板に固定するため、タンパク質の失活を極力抑えたタンパク質アレイを作製することができる。
【００４７】
前記工程（ｇ）においては、無細胞タンパク質転写系を用いて前記ＤＮＡからｍＲＮＡを合成する工程も含まれる。前記ｍＲＮＡは、スクリーニングすべきタンパク質をコードする固定化されたＤＮＡから、ＲＮＡポリメラーゼにより転写させることにより得られる。ＲＮＡポリメラーゼとしては、例えばＴ７ＲＮＡポリメラーゼが挙げられる。
転写反応及び翻訳反応を最適な状態で行わせるために、微小反応槽内の温度やｐＨ条件などを制御する他の装置などを組み合わせてもよい。
また、簡便であることから、転写翻訳がカップルした系を用いてもよい。
【００４８】
工程（ｇ）において、前記タンパク質の合成に続いて、前記タンパク質の基板への固定化が行われる。具体的には、工程（ｅ）において、ＤＮＡマイクロアレイが備える微小反応槽に無細胞タンパク質合成系を添加した後に、工程（ｆ）において、基板を用いて上からＤＮＡマイクロアレイに封をし、密閉状態にする。工程（ｇ）において、試薬を混ぜた先から、ＤＮＡ→ｍＲＮＡ→タンパク質の一連の転写／翻訳反応が進行し、さらに翻訳されたタンパク質が前記基板に固定される。
【００４９】
本実施形態において、合成されたタンパク質を基板に固定するため、前記タンパク質は

、固相結合部位としてのアミノ酸配列を含み、前記基板は前記アミノ酸配列に親和性を有する固相結合部位認識部位を有することが好ましい。

このような固相結合部位／固相結合部位認識部位の組み合わせとしては、マルトース結合タンパク質／マルトース、Ｇタンパク質／グアニンヌクレオチド、ポリヒスチジン／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／グルタチオン、ＤＮＡ結合タンパク質／ＤＮＡ、抗体／抗原分子（エピトープ）、カルモジュリン／カルモジュリン結合ペプチド、ＡＴＰ結合タンパク質／ＡＴＰ、あるいはエストラジオール受容体タンパク質／エストラジオールなどの、各種受容体タンパク質／そのリガンドなどが挙げられる。

これらの中で、固相結合部位／固相結合部位認識部位の組合せとしては、マルトース結合タンパク質／マルトース、ポリヒスチジン／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／グルタチオン、抗体／抗原分子（エピトープ）などが好ましく、使い勝手の良さからポリヒスチジン／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオンの組合せが最も好ましい。

ポリヒスチジンとしては、ヘキサマー以上のものが好ましく用いられる。タンパク質中にポリヒスチジンを含ませるためには、ＰＣＲ等で予めｃＤＮＡの末端に該ポリヒスチジンをコードする塩基配列を付加しておくことが好ましい。

【００５０】

次に、重ね合わせた前記基板を前記ＤＮＡマイクロアレイから剥がす（工程ｈ）。前記基板上のスポットは、対応するＤＮＡマイクロアレイ上に固定化されたＤＮＡの位置情報を変更することなく固定されたものである。

【００５１】

このようにしてタンパク質が固定化された基板をＰＢＳ等で洗浄して、タンパク質アレイが製造される（工程ｉ）。

【００５２】

≪タンパク質アレイ≫

本実施形態のタンパク質アレイの製造方法を用いて製造されたタンパク質アレイは、１スポット当たり１種類の変異タンパク質が高い精度で固定されたものであり、スポットの高密度化にも対応し得るものである。また、該タンパク質アレイは、使用時に、随時、前記ＤＮＡマイクロアレイから製造されるものであるため、アレイ上のタンパク質の変性等を抑制することができる。

【００５３】

≪機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法≫

本実施形態における機能性タンパク質の同定方法は、上述したタンパク質アレイを用いて、機能性スクリーニングを行い、前記機能性スクリーニングにより特定された、前記工程（ｇ）において固定化されたタンパク質を、前記工程（ｅ）において対応するＤＮＡマイクロアレイにおける微小反応槽内のＤＮＡを用いて同定することを特徴とする。

【００５４】

前記機能性スクリーニング方法としては、所望の機能に依存するものであるが、タンパク質の活性を測定する場合、工程（ｅ）におけるＤＮＡマイクロアレイと同様に、タンパク質アレイ上に固定化されているスポットの位置に対応するようなマイクロ凹版を用意し、マイクロ凹版の微小凹部内にタンパク質の活性を測定するために必要な溶液を予め充填し、タンパク質アレイとマイクロ凹版を重ね合わせて反応させることで、チップ上のタンパク質の活性を測定することができる。

【００５５】

本実施形態のタンパク質アレイの製造方法により製造されたタンパク質アレイは、対応するＤＮＡマイクロアレイに固定化されたＤＮＡの位置情報を変更することなく基板上に固定されたものである。よって、該タンパク質アレイを用いて、前記機能性スクリーニングにより特定されたスポットに対応するＤＮＡマイクロアレイにおける微小反応槽内のＤＮＡを回収し、その塩基配列を解析することにより、特定の機能を有するタンパク質等及

び、該タンパク質等をコードするＤＮＡを同定することができる。

【００５６】

本実施形態の機能性タンパク質の同定方法によれば、１スポット当たり１種類の変異タンパク質が高い精度で固定された高密度化タンパク質アレイから所望の機能を有するタンパク質を迅速に同定することができるため、進化分子工学的用途に好適に用いられる。

【００５７】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【００５８】

（１分子ビーズ内包エマルションＰＣＲ）

油／乳化剤混合物をＡＢＩＬ（登録商標）ＷＥ０９（ゴールドシュミット社）３６％、Ｔｅｇｏｓｏｆｔ（登録商標）ＤＥＣ（ゴールドシュミット社）ＤＥＣ５０％、ミネラルオイル１４％の割合で調製し、４℃以下で、ＭｉｃｒｏＴｕｂｅＭｉｘｔｕｒｅで攪拌しながら、直径約２．８μｍのストレプトアビジン修飾磁気ビーズを含んだＰＣＲ溶液２５μｌ(１０×Ｅｘ　ＴａｑＢｕｆｆｅｒ：２．５μｌ，ｄＮＴＰｍｉｘ各２．０ｍＭ:４．０μｌ，ストレプトアビジン修飾磁気ビーズ:６～７×10^5ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／μｌ,ビオチン結合リバースプライマー０．０１ｍＭ:２．０μｌ，ＦＩＴＣ標識フォワードプライマー又はＣｙ５標識フォワードプライマー１００ｍＭ:２．０μｌ，鋳型ｃＤＮＡ［ＲＦＰ（Ｒｅｄ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）ｃＤＮＡ、又はＧＦＰ（Ｇｒｅｅｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）ｃＤＮＡ］０．０１５ｎＭ:４．６４μｌ，ＨＳ　ＴａｑＰｏｌｙｍｅｒａｓｅ（５Ｕ／μｌ):０．３μｌ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｆｒｅｅ　ｗａｔｅｒ：ｕｐ　ｔｏ　２５μｌ)を滴下した。攪拌を３０ｍｉｎ以上続けることで、ストレプトアビジン修飾磁気ビーズを内包させたＷ／Ｏ（ｗａｔｅｒ－ｉｎ－ｏｉｌ）エマルション粒子を形成できた。

また、エマルション粒子のヒストグラムは、ポアソン確率により計算したエマルション粒子のヒストグラムと非常によく一致した。

次いで、サーマルサイクラ装置で７０ｃｙｃｌｅのＰＣＲを行い、ビーズ上に鋳型ｃＤＮＡを増幅させた。増幅したｃＤＮＡの確認は、蛍光顕微鏡を用いて行った。

結果を図１に示す。図１右図は、磁気ビーズを封入したエマルション粒子の蛍光顕微鏡像であり、図１左図は、対応する位相差顕微鏡像である。蛍光顕微鏡観察による結果から、エマルション粒子１個に２分子以上の鋳型ｃＤＮＡを内包する確率が０．１％であることが確認された。

【００５９】

（電気泳動によるｃＤＮＡ結合ビーズの選別）

図２にｃＤＮＡが結合したビーズと結合していないビーズの電気泳動度の測定値を示す。このようにｃＤＮＡの結合したビーズはｃＤＮＡが有する負電荷により、ｃＤＮＡが結合していないビーズよりも電気泳動度の絶対値が大きく、そのヒストグラムは重なりが生じない程度に大きく異なる。この事実を利用して、上記１分子ビーズ内包エマルションＰＣＲを行った磁気ビーズをフリーフロー電気泳動することにより、ｃＤＮＡ結合磁気ビーズを選別できた。

【００６０】

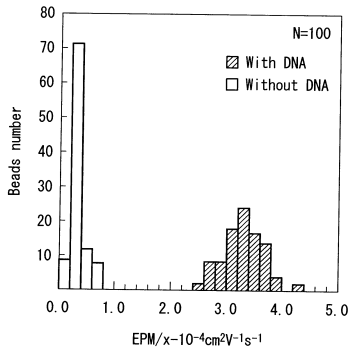
（ｃＤＮＡ結合磁気ビーズの微小反応槽への導入）

上記により作製したＣｙ５－ＧＦＰｃＤＮＡ結合磁気ビーズとＦＩＴＣ－ＲＦＰｃＤＮＡ結合磁気ビーズの懸濁液１０μｌを１００×１００個の微小反応槽(直径５μｍ、深さ５μｍ)がアレイ状に並んだシリカガラス製の鋳型(３０ｍｍ×３０ｍｍ，ｔ＝０．５、鋳型の下部に磁石を配置)に滴下し、鋳型の下部の磁石を鋳型に対して平行方向に適宜移動させることで、ｃＤＮＡ磁気ビーズを微小反応槽に導入した。該ｃＤＮＡ結合磁気ビーズがマイクロウェルモールドの中に導入されているかどうか、蛍光顕微鏡を用いて観察した。結果を図３に示す。

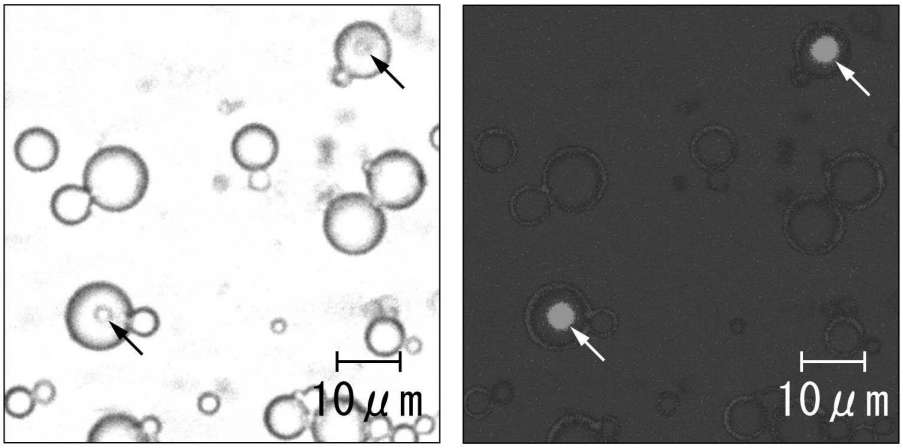
【００６１】
図３中、各々の微小反応槽がＣｙ５由来の赤色、又はＦＩＴＣ由来の緑色を呈しており、混色（黄色）を呈していないことから、各微小反応槽に１つずつｃＤＮＡ結合磁気ビーズが導入されていることが明らかである。このように、効率よく磁気ビーズがマイクロウェルモールド中に導入されていることが確認された。尚、１０，０００ウェル中、ｃＤＮＡの封入率は９８．３％だった。

【００６２】
以上の結果から、本実施形態のＤＮＡマイクロアレイの製造方法によれば、１スポット当たり１種類の変異ＤＮＡ分子が高精度に固定されたＤＮＡマイクロアレイが得られる。従って、本実施形態のＤＮＡマイクロアレイが進化分子工学的用途に好適に用いられることは明らかである。

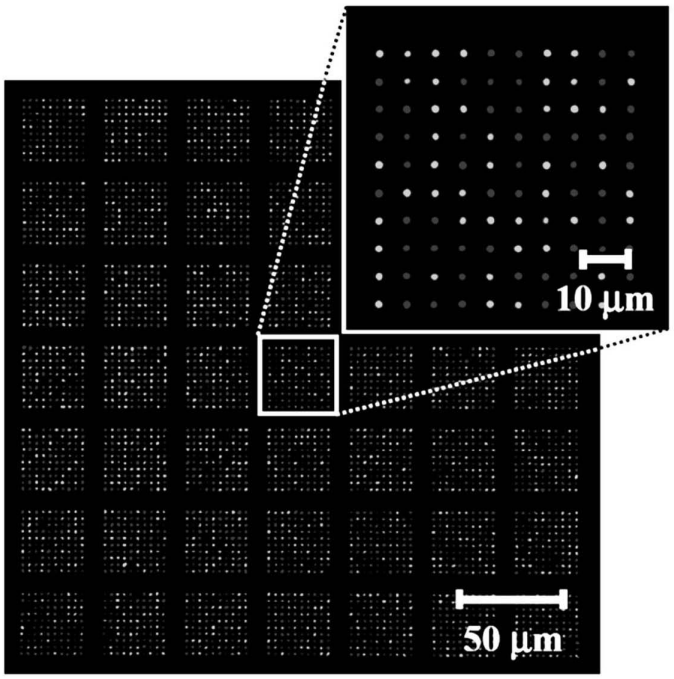
【図２】



【図１】



【図３】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C12M 1/00 A

(72)発明者 マニッシュ ビヤニ
東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内
(72)発明者 塩野 博文
東京都千代田区有楽町一丁目１２番１号 株式会社ニコン内

審査官 渡邉 潤也

(56)参考文献 国際公開第２００９／０１２１１２（WO, A1）
国際公開第２００８／０５３５９８（WO, A1）
特開２００９－０００００７０（JP, A）
国際公開第２０１２／０２６５４１（WO, A1）
森安 純平 Junpei Moriyasu, In vitro 転写・翻訳システムを利用したインタリオプリンティング法によるプロテインアレイパターニング Intaglio printing of protein array pattern using coupled transcription-translation system, ２０１０年秋季第７１回応用物理学会学術講演会講演予稿集, ２０１０年 8月３０日
Curr. Opin. Biotechnol., ２００８年, vol.19, no.1, pp.4-9
佐藤 秀介 S. Sato, 大規模化ＤＮＡマイクロアレイチップを目指した１分子エマルジョンＰＣＲ技術 Single-molecule ePCR technology for large-scale DNA microarray tip, ２０１０年秋季第７１回応用物理学会学術講演会講演予稿集, ２０１０年 8月３０日
Nature, 2005, Vol. 437, No. 7057, pp. 376-380, Supplementary Methods pp. 12-15

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ
ＤＷＰＩ（Ｔｈｏｍｓｏｎ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ）