【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25年6月20日(2013.6.20)

【公開番号】特開2012-70654(P2012-70654A)
【公開日】平成24年4月12日(2012.4.12)
【年通号数】公開・登録公報2012-015
【出願番号】特願2010-216955(P2010-216955)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/53　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　37/00　(2006.01)
Ｃ１２Ｍ　 1/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ｆ
Ｇ０１Ｎ　33/53　Ｍ
Ｇ０１Ｎ　33/53　Ｕ
Ｇ０１Ｎ　37/00　１０２
Ｇ０１Ｎ　33/53　Ｄ
Ｃ１２Ｍ　 1/00　Ａ

【手続補正書】
【提出日】平成25年5月2日(2013.5.2)
【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】
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ＤＮＡマイクロアレイの製造方法。
【請求項２】
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（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１～３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】
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を用いて製造されたことを特徴とするＤＮＡマイクロアレイ。
【請求項６】
（ｅ）請求項５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タンパク質アレイの製造方法。
【請求項７】
請求項６に記載のタンパク質アレイの製造方法を用いて製造されたことを特徴とするタンパク質アレイ。
【請求項８】
請求項７に記載の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。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【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）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。

（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（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。
（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（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。
（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。
（５）本発明の一実施態様におけるＤＮＡマイクロアレイは、（１）～（４）のいずれかに記載のＤＮＡマイクロアレイの製造方法を用いて製造されたものであることを特徴とする。（６）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）（５）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。
（７）本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイは、（６）に記載のタンパク質アレイの製造方法を用いて製造されたことを特徴とする。
（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。