(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
2006 年6 月15 日 (15.06.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/062009 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/021922

(22) 国際出願日: 2005 年11 月29 日 (29.11.2005)

(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2004-357224 2004 年12 月9 日 (09.12.2004) JP
特願2005-184136 2005 年6 月23 日 (23.06.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友ベークライト株式会社 (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川２丁目５番８号 Tokyo (JP). 株式会社ＤＮＡチップ研究所 (DNA CHIP RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１－１－４３ Kanagawa (JP).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 木下 健司 (KINOSHITA, Kenji) [JP/JP]; 〒6512277 兵庫県神戸市西区美賀多台１丁目３番地７１０５号 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 速水 進治 (HAYAMI, Shinji); 〒1500021 東京都渋谷区恵比寿西２－１７－１６ 代官山ＴＫビル１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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** DNA CHAIN ELONGATION METHOD, DNA CHAIN AMPLIFICATION METHOD AND MICROARRAY FOR DNA CHAIN ELONGATION

(54) 発明の名称: ＤＮＡ鎖伸長方法、ＤＮＡ鎖増幅方法およびＤＮＡ鎖伸長用マイクロアレイ

(57) **Abstract:** A primer for DNA elongation is immobilized to a substrate having a polymer, which comprises a first unit having a group induced from a phosphate constituting the hydrophilic moiety of a phospholipid and a second unit having an active ester group, on its surface. Then, a reaction system, into which a template DNA fragment having a desired sequence and a sample containing a nucleotide monomer have been introduced, is heated to a temperature at which the DNA chain is thermally denatured. Next, the temperature of the above reaction system is lowered to a temperature for performing an annealing treatment and the DNA chain elongation is carried out in this reaction system.

(57) 要約: 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活性エステル基を有する第二単位とを含む高分子物質を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、前記反応系の温度をアニール処理する温度まで下げ、前記反応系でＤＮＡ鎖の伸長反応を行う。

WO 2006/062009 A1

明 細 書

DNA鎖伸長方法、DNA鎖増幅方法およびDNA鎖伸長用マイクロアレイ

技術分野

[0001] 本発明は、プライマーDNA鎖を所定のプラスチック基板表面に固定化してDNA鎖を伸長するDNA鎖伸長方法およびDNA鎖増幅方法、ならびにこれらの方法に用いられるDNA鎖伸長用マイクロアレイに関する。

背景技術

[0002] 非特許文献1には、所定のアミノ－シラン試薬を用いて修飾されたガラス基板の表面に、プライマーとなるDNA鎖を共有結合させたDNAマイクロアレイにて固相PCR(Polymerase Chain Reaction)によるDNA増幅を行う技術が開示されている。

[0003] また、非特許文献2には、ガラス基板の代わりにポリ(メチルメタクリレート)を用いて、表面にDNA断片を固定化させたDNAマイクロアレイを用いて、所定のDNA鎖とのハイブリッド特性およびPCR様環境下における熱安定性が評価されており、新規のPCR技術に適用できるデバイスの可能性を示唆する記載がなされている。

非特許文献1:Adessi, Celine et al, "Solid phase DNA amplification: Characterisation of primer attachment and amplification mechanisms", Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 20, No. 20, e87

非特許文献2:Fixe, F. et al, "Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays", Nucleic Acids Research, 2004, January 12, Vol. 32, No.1, e9

発明の開示

[0004] 本発明者等は、非特許文献1, 2などに代表される様々なDNAマイクロアレイを用いてMPEC法(Multiple Primer Extension on a Chip)によるDNA鎖伸長反応を行ったところ、プライマーに鋳型DNA鎖を結合させて、すなわちアニール処理してDNA鎖を伸長させた後に、熱変性処理を行うと鋳型DNAと共にDNAマイクロアレイ基板に固定したプライマーが脱落するという現象を見出し、表面に所定の高分子物質を

配した基板を用いることでこの問題を解決して本発明の完成に至った。

[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。

[0006] このように、所定の基板にプライマーを固定化させて、このプライマーに鋳型DNA断片をアニールさせて、あるいは鋳型RNA断片をハイブリダイズさせて、DNA鎖伸長反応を行うと、反応後の熱変性処理にて基板上で二本鎖となっているDNAから鋳型DNA断片または鋳型RNA断片が外れて、プライマーから伸長した一本鎖DNAが基板上で残るようになる。

[0007] また、従来ではアニール処理した後で伸長反応の前に、二本鎖を組まなかったDNA断片またはRNA断片を除くための洗浄処理が必要であったが、基板上に非特異的に吸着するDNA断片またはRNA断片がないため、およびこのことがDNA鎖伸長にかかる酵素反応が有効に行われると推測され、伸長反応の前に基板の洗浄処理が不要になる。

[0008] また、従来において、ハイブリダイゼーション、洗浄、および酵素およびモノマー添加伸長の各処理を行っていたように、ハイブリダイゼーションと伸長反応とを別々の液相で行っていたのを、本発明においてはハイブリダイゼーションと伸長反応とを同じ液相で行うことが可能になる。

[0009] このDNA鎖伸長方法において、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にすることができる。

[0010] このように、基板の表面にリン脂質と同様の環境を設けることで、基板表面で起こるDNA鎖伸長反応が細胞内と同等の環境下で行うことが可能になる。したがって、DNA鎖伸長を、よりマイルドな条件で行うことが可能になる。

[0011] 前記の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断片であってもよい。

[0012] これにより、本発明のDNA鎖伸長方法を、一塩基置換多型(SNP:single nucleotide polymorphisms)解析に適用することができるようになる。

[0013] また、前記の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断片であってもよい。

[0014] これにより、本発明のDNA鎖伸長反応を、ハイブリダイゼーションによる塩基配列決定(SBH:sequencing by hybridization)解析に適用することができるようになる。

[0015] また、前記の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断片であってもよい。

[0016] これにより、本発明のDNA鎖伸長反応を、遺伝子発現プロファイル(gene expression profile)解析に適用して、通常の解析において手間と時間がかかるサンプル調製をほとんど行うことなく、ゲノムDNA又は全RNAからの逆転写産物cDNAを鋳型DNA断片として用い簡便な操作で行うことができるようになる。

[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。

[0018] このように、所定の基板にプライマーを固定化させて、このプライマーに鋳型DNA断片をアニールさせて、あるいは鋳型RNA断片をハイブリダイズさせて、DNA鎖伸長反応を行うと、反応後の熱変性処理にて基板上で二本鎖となっているDNAから鋳型DNA断片または鋳型RNA断片が外れて、プライマーから伸長した一本鎖DNAが基板上で残るようになり、鋳型DNA断片または鋳型RNA断片は次のアニール処理で未反応のプライマーと二本鎖を形成して、次のDNA鎖伸長を行う。これを繰り返すことにより、MPEC法によるDNA鎖増幅反応を行うことができるようになる。

[0019] また、従来ではアニール処理した後で伸長反応の前に、二本鎖を組まなかったDNA断片またはRNA断片を除くための洗浄処理が必要であったが、基板上に非特異的に吸着するDNA断片またはRNA断片がないため、およびこのことがDNA鎖伸長にかかる酵素反応が有効に行われると推測され、伸長反応の前に基板の洗浄処理が不要になる。

[0020] また、従来において、ハイブリダイゼーション、洗浄、および酵素およびモノマー添加伸長の各処理を行っていたように、ハイブリダイゼーションと伸長反応とを別々の液相で行っていたのを、本発明においてはハイブリダイゼーションと伸長反応とを同じ液相で行うことが可能になる。

[0021] このDNA鎖増幅方法において、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にすることができる。

[0022] このように、基板の表面にリン脂質と同様の環境を設けることで、基板表面で起こるDNA鎖増幅反応が細胞内と同等の環境下で行うことが可能になる。したがって、DNA鎖増幅を、よりマイルドな条件で行うことが可能になる。

[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表面に有する基板と、

前記基板の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。

[0024] このように、所定の基板にプライマーを固定化させて、このプライマーに鋳型DNA断片をアニールさせて、あるいは鋳型RNA断片をハイブリダイズさせて、DNA鎖伸長反応を行うと、反応後の熱変性処理にて基板上で二本鎖となっているDNAから鋳型DNA断片またはRNA断片が外れて、プライマーから伸長した一本鎖DNAが基板上で残るようになる。

[0025] また、従来ではアニール処理した後で伸長反応の前に、二本鎖を組まなかったDNA断片またはRNA断片を除くための洗浄処理が必要であったが、基板上に非特異的に吸着するDNA断片またはRNA断片がないため、およびこのことがDNA鎖伸長にかかる酵素反応が有効に行われると推測され、伸長反応の前に基板の洗浄処理が不要になる。

[0026] また、従来において、ハイブリダイゼーション、洗浄、および酵素およびモノマー添加伸長の各処理を行っていたように、ハイブリダイゼーションと伸長反応とを別々の液相で行っていたのを、本発明においてはハイブリダイゼーションと伸長反応とを同じ液相で行うことが可能になる。

[0027] このDNA鎖伸長用マイクロアレイにおいて、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にすることができる。

[0028] このように、基板の表面にリン脂質と同様の環境を設けることで、基板表面で起こるDNA鎖伸長反応が細胞内と同等の環境下で行うことが可能になるとともに、洗浄処

理が不要であることにも寄与する。したがって、DNA鎖伸長を、よりマイルドな条件で行うことが可能になる。

[0029] 本発明によれば、DNAマイクロアレイ上でDNA鎖の伸長反応を行って二本鎖にした後に、熱変性処理にてDNAマイクロアレイの基板上で一本鎖DNAを残すことができるようになる。

図面の簡単な説明

[0030] 上述した目的、およびその他の目的、特徴および利点は、以下に述べる好適な実施の形態、およびそれに付随する以下の図面によってさらに明らかになる。

[0031] [図1]本発明の第一の実施形態に係るDNA鎖増幅方法を示すフローチャートである。

[図2]第一の実施形態で用いるDNAマイクロアレイの一部を模式的に示す図である。

[図3]DNAマイクロアレイのプライマーに鋳型DNAをアニールさせた状態を示す図である。

[図4]プライマー上でDNA鎖の伸長反応を行った状態を示す図である。

[図5]伸長反応後得られた二本鎖を変性した状態を示す図である。

[図6]本発明の第二の実施形態に係るDNA鎖伸長方法を示すフローチャートである。

[図7]第二の実施形態の一適用例を示す図である。

[図8]従来の遺伝子発現プロファイル解析の一例を示す図である。

[図9]第二の実施形態のその他の一適用例を示す図である。

[図10]第二の実施形態のその他の一適用例を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0032] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0033] (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。

[0034] ステップS10では、図2に示したように、基板12の表面にDNA増幅用のプライマー14を固定させる。

[0035] ここで使用される基板の表面には、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。

[0036] この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カルボン酸誘導基を含む第二単位とを有する高分子物質は、DNA鎖の非特異的吸着を抑制する性質とDNA鎖を固定化する性質とを併せ持つポリマーである。特に、第一単位に含まれる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は鋳型DNA断片の非特異的吸着を抑制する役割を果たし、第二単位に含まれるカルボン酸誘導基はプライマーを化学的に固定化する役割を果たす。すなわち、プライマーは、この高分子物質からなるコーティング層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。

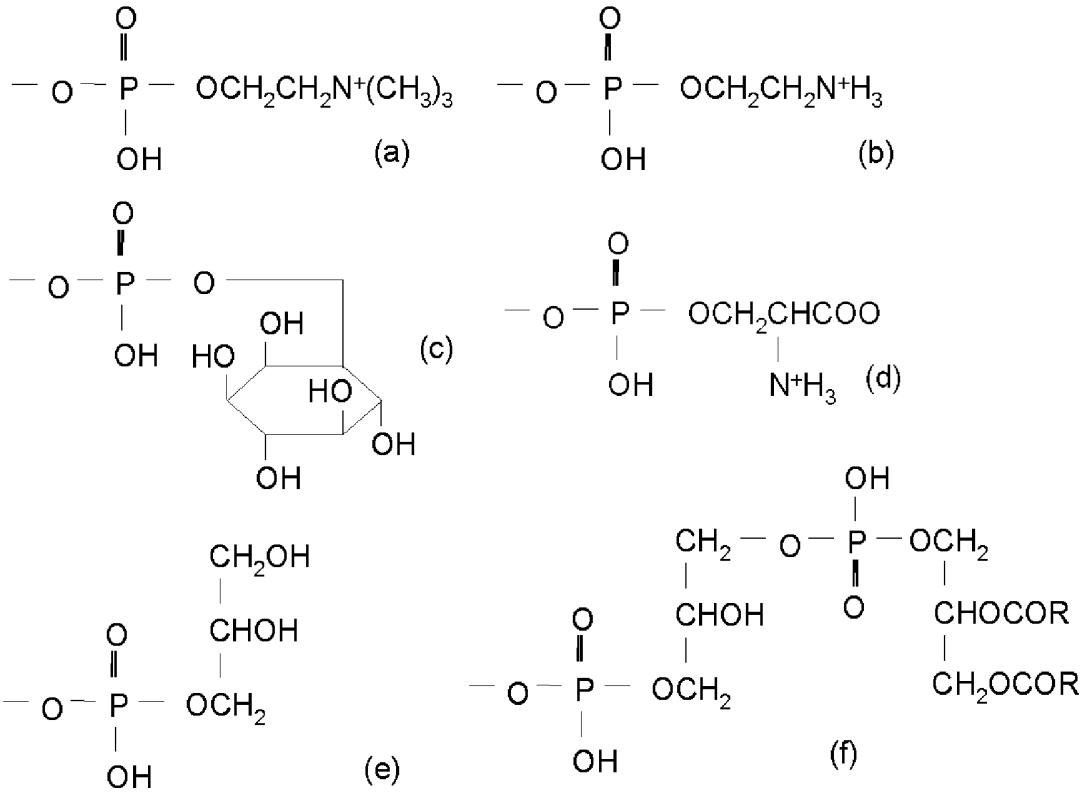
[0037] 第一の単位は、たとえば、2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン基、6－メタクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン基等の（メタ）アクリロイルオキシアルキルホスホリルコリン基；2－メタクリロイルオキシエトキシエチルホスホリルコリン基および10－メタクリロイルオキシエトキシノニルホスホリルコリン基等の（メタ）アクリロイルオキ

シアルコキシアルキルホスホリルコリン基;アリルホスホリルコリン基、ブテニルホスホリルコリン基、ヘキセニルホスホリルコリン基、オクテニルホスホリルコリン基、およびデセニルホスホリルコリン基等のアルケニルホスホリルコリン基;等の基を有し、ホスホリルコリン基がこれらの基中に含まれている構成とすることができる。

[0038] また、これらの基のうち、2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンが好ましい。第一単位が2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを有する構成とすることにより、基板表面における鋳型DNA断片の非特異的吸着をより一層確実に抑制することができる。

[0039] なお、ここでは基本骨格として下記式(a)に示すホスホリルコリン基である例を挙げたが、このホスホリルコリン基を下記式(b)のホスホリルエタノールアミン基、下記式(c)のホスホリルイノシトール基、下記式(d)のホスホリルセリン基、下記式(e)のホスホリルグリセロール基、下記式(f)に示したホスファチジルホスホリルグリセロール基などのリン酸基に置き換えてもよい(以下についても同様)。

[0040] (化1)



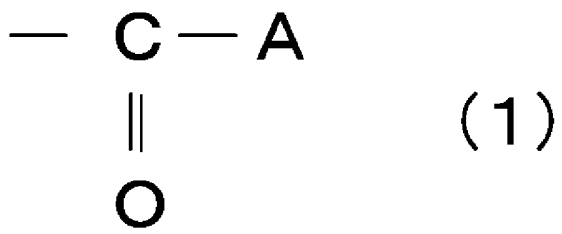
[0041] カルボン酸誘導体は、カルボン酸のカルボキシル基が活性化されたものであり、C

＝Oを介して脱離基を有するカルボン酸である。カルボン酸誘導体は、具体的には、アルコキシル基よりも電子求引性の高い基がカルボニル基に結合して求核反応が活性化された化合物である。カルボン酸誘導基は、アミノ基、チオール基、水酸基等に対する反応性を有する化合物である。

[0042] カルボン酸誘導体として、さらに具体的には、カルボン酸であるアクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸、マレイン酸、フマル酸などのカルボキシル基が、酸無水物、酸ハロゲン化物、活性エステル、活性化アミドに変換された化合物が挙げられる。カルボン酸誘導基は、こうした化合物に由来する活性化された基であり、たとえば、p－ニトロフェニル基やN－ヒドロキシスクシンイミド基等の活性エステル基;—Cl、－F等のハロゲン;等の基を有することができる。

[0043] また、カルボン酸誘導基は、下記式(1)に示される基とすることができる。

[0044] (化2)

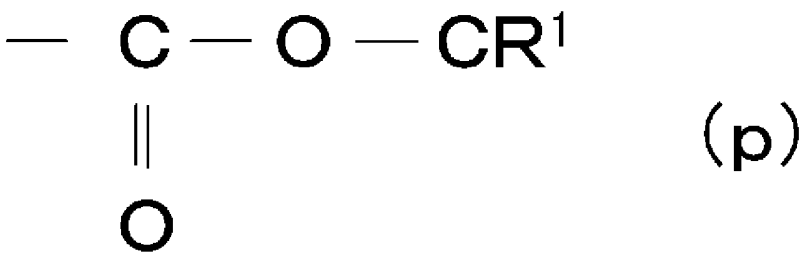


(1)

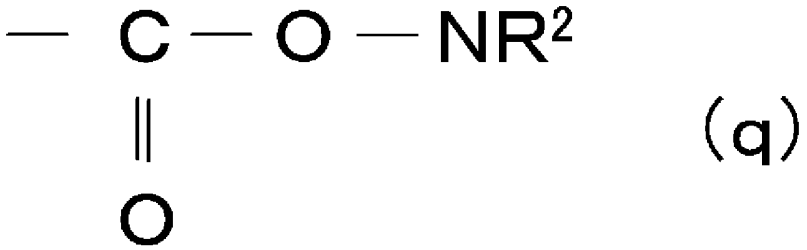
(ただし、上記式(1)において、Aは水酸基を除く脱離基である。)

[0045] 上記式(1)に示される一価の基は、たとえば下記式(p)または式(q)から選択されるいずれかの基とすることができる。

[0046] (化3)



(p)



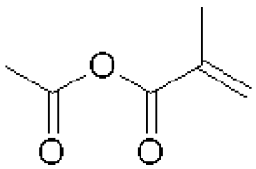
(q)

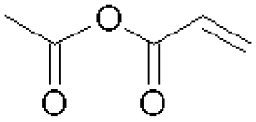
[0047] (ただし、上記式(p)および式(q)において、R^1およびR^2は、それぞれ独立して、一価の有機基であり、直鎖状、分岐状、および環状のいずれであってもよい。また、上記式(p)において、R^1はCとともに環を形成する二価の基であってもよい。また、上記式(q)において、R^2はNとともに環を形成する二価の基であってもよい。)

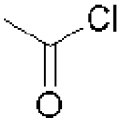
[0048] 上記式(p)に示される基として、たとえば下記式(r)、(s)、および(w)に示される基が挙げられる。また、上記式(q)に示される基として、たとえば下記式(u)に示される基が挙げられる。

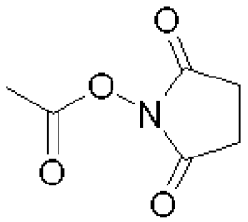
[0049] 上記式(1)に示される基は、たとえば下記式(r)、式(s)等に示される酸無水物由来の基;下記式(t)に示される酸ハロゲン化物由来の基;下記式(u)、式(w)に示される活性エステル由来の基;または下記式(v)に示される活性化アミド由来の基とすることができる。

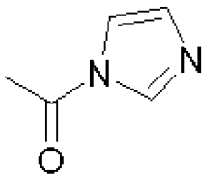
[0050] (化4)

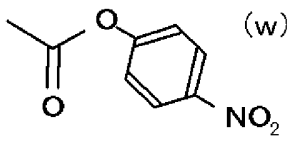

(r)


(s)


(t)


(u)


(v)


(w)

[0051] カルボン酸誘導基のうち、活性エステル基は、穏やかな条件における反応性に優れるため、好ましく用いられる。穏やかな条件としては、たとえば中性またはアルカリ性の条件、具体的にはpH7．0以上10．0以下、さらに具体的にはpH7．6以上9．0以下、さらにまた具体的にはpH8．0とすることができる。

[0052] また、本明細書において規定するところの「活性エステル基」は、その定義について厳密な規定はなされていないが、慣用の技術表現としては、エステル基のアルコール側に酸性度の高い電子求引性基を有して求核反応を活性化するエステル群、すなわち反応活性の高いエステル基を意味するものとして、各種の化学合成、たとえば高分子化学、ペプチド合成等の分野で慣用されているものである。なお、ペプチド合成の分野においては、泉屋信夫、加藤哲夫、青柳東彦、脇道典著、「ペプチド合成の基礎と実験」、1985年発行、丸善、に記載されているように、活性エステル法はアミノ酸またはペプチドのC末端を活性化する方法の一つとして用いられている。

[0053] 実際的には、エステル基のアルコール側に、電子求引性の基を有し、アルキルエステルよりも活性化されたエステル基である。活性エステル基は、アミノ基、チオール基、水酸基等の基に対する反応性を有する。さらに具体的には、フェノールエステル類、チオフェノールエステル類、N－ヒドロキシアミンエステル類、シアノメチルエステル、複素環ヒドロキシ化合物のエステル類等がアルキルエステル等に比べてはるかに高い活性を有する活性エステル基として知られている。

[0054] ここでは、高分子物質中の活性化カルボン酸誘導体基が活性エステル基である場

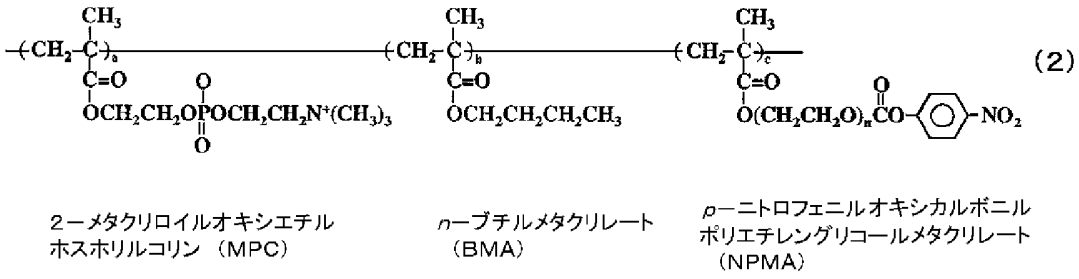
合を例に、説明する。活性エステル基としては、たとえばp－ニトロフェニル基、N－ヒドロキシスクシンイミド基、コハク酸イミド基、フタル酸イミド基、5－ノルボルネン－2，3－ジカルボキシイミド基等が挙げられるが、たとえばp－ニトロフェニル基が好ましく用いられる。

[0055] 表面にプライマーが固定化される基板の場合、第一単位と第二単位のさらに具体的な構成の組合せとして、たとえば、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が2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン基を有し、活性エステル基がp－ニトロフェニル基である構成とすることができる。

[0056] また、本実施形態の基板のコーティング層に使用される高分子物質は、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およびカルボン酸誘導基以外に他の基を含んでもよい。また、高分子物質は共重合体とすることができる。具体的には、高分子物質がブチルメタクリレート基を含む共重合体であることが好ましい。こうすることにより、高分子物質を適度に疎水化し、この高分子物質の基板表面への吸着性をさらに好適に確保することができる。

[0057] 具体的には、高分子物質を、2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）基を有する第一単量体と、p－ニトロフェニルオキシカルボニルポリエチレングリコールメタクリレート（NPMA）基を有する第二単量体と、ブチルメタリレート（BMA）基を有する第三単量体との共重合体とすることができる。これらの共重合体であるpoly（MPC－co－BMA－co－NPMA）（PMBN）は、模式的に下記一般式（2）で示される。

[0058] （化5）



[0059] ただし、上記一般式（2）において、a、b、およびcは、それぞれ独立して、正の整数

である。また、上記一般式(2)において、第一～第三単量体がブロック共重合していてもよいし、これらの単量体がランダムに共重合していてもよい。

[0060] 上記一般式(2)で示される共重合体は、高分子物質の適度な疎水化と、鋳型DNA断片の非特異吸着を抑制する性質と、プライマーを固定化する性質とのバランスとに、より一層優れた構成である。このため、このような共重合体を用いることにより、基板表面をより一層確実に高分子物質で被覆するとともに、高分子物質がコーティングされた基板上への鋳型DNA断片の非特異的吸着を抑制しつつ、プライマーをさらに確実に共有結合により固定化して基板上に導入することができる。

[0061] なお、上記一般式(2)で示される共重合体は、MPC、BMA、およびNPMAの各単量体を混合し、ラジカル重合等の公知の重合方法により得ることができる。上記一般式(2)で示される共重合体をラジカル重合により作製する場合、たとえば、Ar等の不活性ガス雰囲気にて、30℃以上90℃以下の温度条件で溶液重合を行うことができる。

[0062] 溶液重合に使用される溶媒は適宜選択されるが、たとえば、メタノール、エタノール、イソプロパノール等のアルコールや、ジエチルエーテル等のエーテル、クロロホルム等の有機溶媒を単独でまたは複数混合して用いることができる。具体的には、ジエチルエーテルとクロロホルムを体積比で8対2とした混合溶媒とすることができる。

[0063] また、ラジカル重合反応に使用されるラジカル重合開始剤としては、通常使用されるものを用いることができる。たとえば、アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)、アゾビスバレロニトリル等のアゾ系開始剤;過酸化ラウロイル、過酸化ベンゾイル、t－ブチルペルオキシネオデカノエート、t－ブチルペルオキシピバレート等の油溶性の有機過酸化物;などが用いられる。

[0064] さらに具体的には、ジエチルエーテルとクロロホルムを体積比で8対2とした混合溶媒およびAIBNを用い、Ar中、60℃にて2～6時間程度重合を行うことができる。

[0065] なお、本実施形態では、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例を説明したが、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カルボン酸誘導基を含む第二単位とを有する高分子物質を第一の高分子物質とし、これに加えて、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んでいてもよい。

[0066] なお、上記第一の高分子物質の第一単位と上記第二の高分子物質の第一単位とは同一構造であってもよいし、異なる構造であってもよい。また、上記第一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含むとき、この第一の高分子物質の第三単位と上記第二の高分子物質の第三単位とは同一構造であってもよいし、異なる構造であってもよい。

[0067] このような第二の高分子物質は、鋳型DNA断片の非特異的吸着を抑制するポリマーとして用いられる。このようなポリマーとしては、たとえばホスホリルコリン基が30モル%、ブチルメタクリレート基が70モル%の割合で含まれているものであるMPCポリマー(日本油脂社製)を用いることができる。

[0068] なお、高分子物質が上記第一の高分子物質、第二の高分子物質からなる場合、これらの高分子物質が混合されている構成とすることができる。各々の高分子物質のポリマーは、たとえばエタノール溶液に溶解できるため、それぞれのポリマー溶液を混合することにより容易に混合ポリマーを得ることができる。

[0069] 以上のような高分子物質からなるコーティング層を表面に含む基板は、所定の形状に加工された基板の表面に高分子物質を含む液体を塗布し、乾燥することにより得られる。また、高分子物質を含む液体中に基板を浸漬し、乾燥してもよい。

[0070] また、基板として、プラスチック材料を用いた場合には、形状やサイズの変更に対する柔軟性が確保される上に、ガラス基板のものに比べて安価で提供することができるという観点から好ましい。このようなプラスチック材料としては、表面処理の容易性および量産性の観点から、熱可塑性樹脂を用いることができる。

[0071] 熱可塑性樹脂としては、蛍光発生量の少ないものを用いることができる。蛍光発生量の少ない樹脂を用いることにより、DNA鎖の検出反応におけるバックグランドを低下させることができるため、検出感度をさらに向上させることができる。蛍光発生量の少ない熱可塑性樹脂としては、たとえば、ポリエチレン、ポリプロピレン等の直鎖状ポリオレフィン;環状ポリオレフィン;含フッ素樹脂;等を用いることができる。上記樹脂の中でも、飽和環状ポリオレフィンは、耐熱性、耐薬品性、低蛍光性、透明性および成

形性に特に優れるため、光学的な分析に好適であり、基板の材料として好ましく用いられる。

[0072] ここで、飽和環状ポリオレフィンとは、環状オレフィン構造を有する重合体単独または環状オレフィンとα－オレフィンとの共重合体を水素添加した飽和重合体を指す。前者の例としては、たとえばノルボルネン、ジシクロペンタジエン、テトラシクロドデセンに代表されるノルボルネン系モノマー、及び、これらのアルキル置換体を開環重合して得られる重合体を水素添加して製造される飽和重合体である。後者の共重合体はエチレンやプロピレン、イソプロピレン、1－ブテン、3－メチル－1－ブテン、1－ペンテン、3－メチル－1－ペンテン、1－ヘキセン、1－オクテン等のα－オレフィンと環状オレフィン系モノマーのランダム共重合体を水素添加することにより製造される飽和重合体である。共重合体では、エチレンとの共重合体が最も好ましい。これらの樹脂は単独で用いてもよく、2種類またはそれ以上の共重合体あるいは混合物であってもよい。また、環状オレフィン構造を有する単量体が開環重合して得られる飽和環状ポリオレフィンだけでなく、環状オレフィン構造を有する単量体の付加重合により得られる飽和環状ポリオレフィンを用いることもできる。

[0073] 以上のような高分子物質を表面に含むプラスチック材料からなる基板は、所定の形状に加工された基板の表面に高分子物質を含む液体を塗布し、乾燥することにより得られる。また、高分子物質を含む液体中に基板を浸漬し、乾燥してもよい。

[0074] なお、基板の材料をプラスチックとした場合、形状は板状には限られず、たとえばフィルム状やシート状であってもよい。具体的には、基板を可とう性のプラスチックフィルムとすることもできる。また、基板は、一つの部材から構成されていてもよいし、複数の部材から構成されていてもよい。

[0075] 次に、基板の表面へのプライマーの固定化方法について説明する。

例えば、(i)基板上の高分子物質に含まれる複数の活性エステル基のうち、少なくとも一部の活性エステル基とプライマーとを反応させて共有結合を形成させることにより、基板表面でプライマーを固定化し、続いて(ii)プライマーを固定化した以外の基板表面の活性エステル基を不活性化する、すなわち残りの活性エステル基を不活性化することにより、プライマーを基板の表面に固定することができる。以下、それぞ

れの工程について説明する。

[0076] 上記工程(i)において、鋳型DNA断片とアニールするプライマーを基板上に固定化する際には、プライマーを溶解または分散した液体を点着する方法が好ましい。高分子物質に含まれる活性エステル基の一部がプライマーと反応して、プライマーの間で共有結合が形成される。

[0077] このプライマーを溶解または分散した液体は、例えば中性からアルカリ性、例えばpHが7．6以上とすることができる。

[0078] また、点着後、基板表面に固定化されなかったプライマーを除去するため、純水や緩衝液で洗浄してもよい。

[0079] また、上記工程(ii)に示したように、洗浄後はプライマーを固定化した以外のプラスチック基板表面の活性エステルの不活性化処理をアルカリ化合物、あるいは一級アミノ基を有する化合物で行う。

[0080] アルカリ化合物としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、ホウ酸ナトリウム、水酸化リチウム、リン酸カリウムなどを用いることができる。

[0081] 一級アミノ基を有する化合物としては、グリシン、9－アミノアクアジン、アミノブタノール、4－アミノ酪酸、アミノカプリル酸、アミノエタノール、5－アミノ2，3－ジヒドロー1，4－ペンタノール、アミノエタンチオール塩酸塩、アミノエタンチオール硫酸、2－(2－アミノエチルアミノ)エタノール、リン酸二水素2－アミノエチル、硫酸水素アミノエチル、4－(2－アミノエチル)モルホリン、5－アミノフルオレセイン、6－アミノヘキサン酸、アミノヘキシルセルロース、p－アミノ馬尿酸、2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1，3－プロパンジオール、5－アミノイソフタル酸、アミノメタン、アミノフェノール、2－アミノオクタン、2－アミノオクタン酸、1－アミノ2－プロパノール、3－アミノ－1－プロパノール、3－アミノプロペン、3－アミノプロピオニトリル、アミノピリジン、11－アミノウンデカン酸、アミノサリチル酸、アミノキノリン、4－アミノフタロニトリル、3－アミノフタルイミド、p－アミノプロピオフェノン、アミノフェニル酢酸、アミノナフタレンなどを用いることができる。これらのうち、アミノエタノール、グリシンを用いることが好ましい。

[0082] また、基板に固定化するプライマーには、活性エステル基との反応性を高めるため

、アミノ基を導入しておくことが好ましい。アミノ基は活性エステル基との反応性に優れるため、アミノ基が導入されたプライマーを用いることにより、効率よくかつ強固に基板の表面上にプライマーを固定化することができる。アミノ基の導入位置はプライマーの分子鎖末端あるいは側鎖であってもよいが、分子鎖末端に導入されていることが、相補的な鋳型DNA断片とのアニーリングをより一層効率よく行うことができるという観点からは、好ましい。

[0083] 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表面に有する基板と、基板の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。

[0084] 図1に戻り、ステップS20では、ステップS10で得られるDNAマイクロアレイ10の基板12の表面に固定化されたプライマー14にアニールさせるDNA鎖伸長用の鋳型DNA断片16およびDNA鎖伸長用酵素系、ヌクレオチドモノマーを含む試料が導入される。また、DNA増幅用に用いる鋳型としてDNA断片の代わりに、鋳型RNA断片を用いても同様の作用効果を有する。

[0085] この導入された試料からなる反応系としては、鋳型がDNA断片である場合には、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を用い、また鋳型がRNA断片である場合には、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の存在下で、ヌクレオチドモノマー(dATP, dCTP, dGTP, dTTPなど)を含有するMPEC用バッファを用いることができる。

[0086] また、DNAポリメラーゼの中でも、特に耐熱性細菌に由来するDNAポリメラーゼであるTaqDNAポリメラーゼ、TthDNAポリメラーゼ、PfuDNAポリメラーゼなどを用いることもできる。

[0087] また、これらヌクレオチドモノマーの少なくとも一種をラベルしておくことができる。例えば、dTTPの塩基の3位を蛍光ラベルしたCy3－dUTPをヌクレオチドモノマーとし

て用いることで、鋳型DNA断片のアデニン(A)に対応する伸長(プライマー)側の位置にCy3－dUTPが挿入される。これにより、伸長反応が生じたプライマーから形成されるDNA断片がCy3－dUTPで蛍光染色されて、このDNA断片の検出を行うことができるようになる。

[0088] なお、他のヌクレオチドモノマーをラベルしてもよく、また複数の種類のヌクレオチドモノマーをラベルしてもよい。また、ラベル方法も蛍光体の導入の他に、光吸収体の導入の方法、放射線ラベルの方法(P^{32}-ATP、P^{32}-dATP)、酵素標識などの非放射性ラベルの方法などによってもDNA鎖を検出することができる。

[0089] この酵素標識の方法においては、ビオチン(biotin)化またはジゴキシゲニン(DIG:ステロイド系天然物)を結合した核酸(例えば、biotin-dUTP、DIG-dUTP)を使用してプライマーを伸張させた後、蛍光標識化したアルカリフォスファターゼまたはアルカリフォスファターゼ処理しニトロブルーテトラゾリウム(NBT)と5－ブロモ－4－クロロ－3－インドリルリン酸(BCIP)液中で数時間反応させることによってDNAを検出することができる。

[0090] ステップS30では、試料が導入された反応系の温度を、DNA鎖の熱変性温度(melting temperature:Tm)以上、例えば90℃～95℃まで上昇させる。この熱変性処理により、自己相補鎖などで見られる折れたたみ構造を有する鋳型DNA断片やプライマーが直鎖状の一本鎖になる。

[0091] 続いて、ステップS40では、反応系の温度をプライマーと鋳型DNA断片とがアニールする温度(アニール温度)、例えば4℃～65℃、好ましくは50℃～65℃まで下降させる。このアニール処理により、鋳型DNA断片の一部と相補的な配列を有するプライマーと、この鋳型DNA断片とが二本鎖になる(図3)。この反応系に対して、洗浄処理を行わずにそのままステップS50に進む。

[0092] ここで、従来では、アニール処理した後で伸長反応の前に、二本鎖を組まなかったDNA断片(またはRNA断片)を除くため、の洗浄処理が必要であったが、本実施形態では、基板上に非特異的に吸着するDNA断片(またはRNA断片)がないため、およびこのことがDNA鎖伸長にかかる酵素反応が有効に行われると推測され、基板の洗浄処理が不要になる。このようにして、ハイブリダイゼーション、洗浄、および酵

素およびモノマー添加伸長の各処理を行っていたように、ハイブリダイゼーションと伸長反応とを別々の液相で行っていたのを、本実施形態では、ハイブリダイゼーションと伸長反応とを同一の液相系、すなわち反応系をそのまま用いることができる。

[0093] ステップS50では、アニール処理を行った反応系の温度を、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るよう制御する。あるいは、当該反応系の温度を、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、例えば65℃～75℃に変化させるように制御する。このように反応系の温度を制御することにより、MPEC法によるDNA鎖の伸長反応が起こる、すなわち鋳型DNA断片16に相補的なDNA断片が、基板上に形成され、DNAの二本鎖が得られるようになる(図4)。

[0094] ここでは、鋳型DNA断片に対して耐熱性DNAポリメラーゼを用いた例を示したが、DNA鎖を鋳型として新たなDNA鎖を合成する酵素であれば特に限定はされない。このようなDNAポリメラーゼとしては、ポルI型DNAポリメラーゼ(大腸菌DNAポリメラーゼI、クレノウ断片など)、α型DNAポリメラーゼ(ピロコッカス・フリオサス由来DNAポリメラーゼ、VENT DNAポリメラーゼ、KOD DNAポリメラーゼ、DEEP VENT DNAポリメラーゼ)及び非α非ポルI型DNAポリメラーゼ(国際公開第97／24444号パンフレット記載のDNAポリメラーゼ)等が挙げられる。

[0095] DNAポリメラーゼの代わりに、DNAリガーゼを用いてもDNA鎖伸長反応を行うことができるため、DNA鎖増幅を行うことが可能である。

[0096] また、鋳型RNA断片を用いた場合、鋳型RNA断片に直接基板上のプライマーを作用させて、逆転写酵素を用いて、プライマー側にDNA鎖伸長させることが可能である。また、鋳型RNA断片に逆転写酵素を作用させて一旦cDNA(相補的DNA)を合成(第一鎖合成)してから、DNAポリメラーゼまたはDNAリガーゼを作用させても、プライマー側にDNA鎖伸長させることが可能である。

[0097] 図1に戻り、ステップS60では、伸長反応後の反応系を、DNA鎖の熱変性温度、例えば90℃～95℃で維持する。この熱変性処理により、基板12の表面では二本鎖DNAから鋳型DNA断片16(図4)が脱離して、一本鎖DNA断片18が残された状態になる(図5)。

[0098] ステップS70では、次の伸長反応を行うか否かが判別される。この判別は、温度調整装置(サーモサイクラー)などを用いて反応回数を指定してその回数に達したか否かを自動で行ってもよいし、毎回操作者の判断により行ってもよい。

[0099] この判別結果がYES、すなわち次の伸長反応を行う場合にはステップS40に戻り、アニール処理(ステップS40)～伸長反応(ステップS50)～熱変性処理(ステップS60)が繰り返され、未反応のプライマーでDNA伸長反応が行われる。このサイクルを1～50回繰り返す結果、基板上でMPEC法によるDNA鎖増幅が行われる。

[0100] また、ステップS70での判別結果がNO、すなわち次の伸長反応を行わない場合には、ステップS80に進み、反応液を捨てて、DNAマイクロアレイを、例えば0．1wt%のSDS溶液を用いて洗浄して、終了する。

[0101] このDNA鎖増幅のためには、基板上の一定の区画内に複数のスポットを設けておき、各スポットにプライマーを固定化しておき、マイクロアレイを形成しておくことが好ましい。

[0102] また、基板の表面に固定化させるDNA増幅用プライマーの長さを目的や用途に応じて任意に決定することができ、例えば5～50塩基とすることができる。

[0103] (第二の実施形態)

図6は、第二の実施形態としてのDNA鎖伸長方法の手順を示すフローチャートである。図6において、図1と手順が同様な部分については、図1と同様の符号を付して、説明を省略する。

[0104] 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。

[0105] 前述したように、ステップS20では、基板の表面に固定化されたプライマーにアニールさせるDNA伸長用の鋳型DNA断片およびヌクレオチドモノマーを含む試料を導入し、この試料およびこの試料が導入されてなる反応系は、前述したのと同様のものを適用することができる。

[0106] また、ステップS50での伸長反応の後に、ステップS55にて反応液を捨てて、DNAマイクロアレイを、例えば0．1wt%のSDS溶液を用いて洗浄して、終了する。

[0107] 以下に、本実施形態のDNA鎖伸長方法の適用例について説明する。

[0108] (SNP解析)

所定の着目遺伝子の特徴配列を含む塩基配列と相補的な配列を完全マッチ配列とするとき、プライマーをこの完全マッチ配列の一塩基を他の塩基に置き換えることで、SNP解析を行うことが可能になる。なお、プライマーは25塩基以内の長さを有するものを用いることが好ましい。

[0109] すなわち、ステップS10にて、ある着目遺伝子の特徴配列と一塩基だけミスマッチとなるDNA断片をプライマーとして基板の表面に固定化する。このとき、例えば384穴(各穴256スポット)、96穴(各穴1024スポット)のマイクロアレイを用いて、各スポットに固定化されたプライマーの配列を把握しておくようにする。ステップS20にて、この特徴配列を含むDNA鎖を鋳型DNA断片として用いてサンプル導入を行い、ステップS30にて熱変性処理を行って、ステップS40ではアニール処理を行う。ステップS50では、アニール処理により鋳型DNA鎖断片と二本鎖を形成したプライマーにだけ伸長反応が起こる。

[0110] また、前述したようにステップS20にて導入されるサンプル中にラベルされたヌクレオチドモノマーを含めておくことで、プライマーから伸長反応により得られるDNA断片がラベルされ、ステップS55で洗浄後の基板に残った蛍光DNA断片を含むスポットの検出を行い、各アレイに固定化されたプライマーの配列が把握されていることから、検出されたスポットに固定化されたプライマーの配列を知ることができる。これにより、伸長反応が起こったプライマーの塩基配列がわかり、前記着目遺伝子の特徴配列を含む鋳型DNA断片に対する一塩基多型を解析することが可能になる。

[0111] (SBH解析)

所定数、例えば6～10mer、好ましくは8merの塩基配列を有するプライマーを、全組合せ、例えば8merのプライマーを用いた場合には、全組合せである4^8＝65536種類のプライマーを用意して、各々のプライマーがマイクロアレイのひとつのスポットに固定化させることにより、塩基配列決定（SBH）解析を行うことが可能になる。

[0112] すなわち、ステップS10にて前記の各プライマーをマイクロアレイの各スポットにそれぞれ固定化する。このとき、各スポットに固定化されたプライマーの配列を把握しておくようにする。ステップS20にて、未知の塩基配列のDNA断片を鋳型DNA断片として用いてサンプル導入を行い、ステップS30にて熱変性処理を行って、ステップS40ではアニール処理を行う。ステップS50では、アニール処理により鋳型DNA鎖断片と二本鎖を形成したプライマーにだけ伸長反応が起こる。

[0113] また、前述したようにステップS20にて導入されるサンプル中にラベルされたヌクレオチドモノマーを含めておくことで、プライマーから伸長反応により得られるDNA断片がラベルされ、ステップS55で洗浄後の基板に残った蛍光DNA断片を含むスポットの検出を行い、各アレイに固定化されたプライマーの配列が把握されていることから、検出されたスポットに固定化されたプライマーの配列を知ることができる。これにより、伸長反応が起こったプライマーの塩基配列がわかる。

[0114] ここで、図7に示したように、基板41上で伸長反応が起こったスポットを検出した後、検出されたスポットに固定化されているプライマーのランダム配列群45の各配列を取り出し、配列の前後で一塩基ずらしてオーバーラップするように順番付けして順番付け配列群47が得られる。この順番付け配列群47に示された順番にしたがって、各プライマーの先頭の塩基を読んで行き、最後のプライマーについては全塩基配列を読んで得られる塩基配列に基づいて、未知の塩基配列43を有する鋳型DNA断片の塩基配列49を決定することができる。

[0115] なお、プライマーが6塩基長の場合は4096種類のプライマーを用意する必要があり、プライマーが7塩基長の場合は16384種類のプライマーを用意する必要がある。これらのプライマーは、機能未知（nc）RNAおよびマイクロ（mi）RNAなどの20mer～50merの比較的小分子の探索、遺伝子配列解析に用いることができる。

[0116] また、プライマーが8塩基長の場合は65536種類のプライマーを用意する必要があ

り、プライマーが9塩基長の場合および10塩基長の場合は、それぞれ262144および1048576種類のプライマーを用意する必要がある。これらのプライマーは、通常の遺伝子配列解析に用いることができる。

[0117] (遺伝子発現プロファイル解析)

図8は、遺伝子発現プロファイル用サンプルとして、ラベルを導入したサンプルを調整および発現プロファイル解析するための従来の方法を示す。

[0118] 目的に応じた生体組織から全RNA(totalRNA)を抽出する。さらに全RNAからは逆転写酵素を用いた反応によって、cDNAを合成する(第一鎖合成)。逆転写酵素を用いた反応の際にはdNTPとアミノアリルdUTPを一定の割合で混合したものを加えて、アミノアリルdUTPを取り込んだcDNAを合成する。

[0119] なお、組織から得た全RNA量が少ない場合は、逆転写反応によりcDNAを合成した後、2本鎖のcDNA(転写鋳型DNA断片)を合成し(第二鎖合成)、それを鋳型として、RNAポリメラーゼを作用させてアンチセンス鎖のRNA(aRNA)を増幅する。このRNA増幅の際にdNTPとアミノアリルdUTPとを一定の割合で混合したものを加えることで、アミノアリルdUTPを取り込んだaRNAを合成することができる。

[0120] 続いて、上記のcDNAまたはアンチセンスアミノアリルRNA(aRNA)をエタノール沈殿した後、0.2M炭酸ナトリウムバッファー($NaHCO_3$－Na_2CO_3(pH9.0))に溶解する。DMSOに溶解しておいた蛍光色素(Cy3またはCy5)を加えて、常法に従い、cDNAまたはaRNAに取り込ませておいたアミノアリルdUTPとカップリング反応させ、cDNAまたはaRNAを蛍光標識する。遊離の蛍光色素をゲルろ過カラムまたはフィルターなどを用い常法の精製により除去した後、aRNAについてはさらにフラグメンテーションバッファー(終濃度0.04M酢酸トリアミノメタン(pH8.1)、0.1M酢酸カリウム、0.03M酢酸マグネシウム)を加えて95℃で15分間反応後、クラッシュアイスで急冷してaRNAを断片化する。ゲル電気泳動などの方法によりフラグメント化を確認した後、ゲルろ過フィルターで精製・濃縮する。

[0121] 次に、調製したcDNAまたはaRNAとマイクロアレイのプライマーとのハイブリダイゼーションを行う。cDNAまたはaRNAにハイブリダイゼーションバッファー(最終濃度5×SSC、0.5(v/v)%SDS、4×Denhardt's solution)及びホルムアミド(Formamide

)を適宜混合し、DNAマイクロアレイと45℃～60℃で一晩ハイブリダイゼーションする。ハイブリダイゼーション後、2×SSC－0．1(v／v)％SDS溶液、2×SSC溶液、1×SSC溶液で5分間ずつ洗浄したのち、蛍光読取装置(例えば、CRBIO(r) IIe;日立ソフトウエアーエンジニアリング製)を用いて画像をスキャンし、解析ソフト(例えば、DNASIS(r)Array;日立ソフトウエアーエンジニアリング製)を用いてシグナル強度を定量化する。なお、図8においては、aRNAの合成を示しているが、途中の工程で得られるcDNAが解析に十分な量であれば、このcDNAを直接解析してもよい。

[0122] この方法では、複雑な前処理工程を行うため、それぞれの試料で条件選定など設定条件が多くなる上に、全工程で少なくとも5日～一週間はかかってしまうのが迅速な遺伝子検査の上で問題であった。

[0123] そこで、本実施形態では、予め図1のステップS10と同様の方法にて基板の表面に、解析対象となる遺伝子の特徴配列に相当する塩基配列を有するDNA断片をプライマーとして用いて、各々のプライマーをマイクロアレイのひとつのスポットに固定化させておく。そこで、全RNAに逆転写酵素を作用させてcDNAを得る第一鎖合成を行った後に、第一鎖合成により得られるcDNA(または必要に応じて増幅させて得られるaRNA)を鋳型DNA断片として用いて、DNAポリメラーゼまたはDNAリガーゼの作用により基板上のプライマー側で伸長反応を行うことで、発現遺伝子を特定することが可能になる。

[0124] また、前述のように、全RNAを鋳型として、前記の基板上に設けられた所定の配列を有するプライマーをハイブリダイズさせて、逆転写酵素を作用させることで、直接基板上のプライマー側で伸長反応を行うことが可能であり、これによっても発現遺伝子を特定することが可能になる。

[0125] すなわち、既知の遺伝子が有する特徴配列と相補的な塩基配列を有するプローブが、特定の細胞由来の全RNAから得られる鋳型DNA断片中に存在するか否かが分かる。

[0126] すなわち、全RNAに対するcDNAを鋳型DNA断片として用いる例をとって説明すると、ステップS10にて前記の各プライマーをマイクロアレイの各スポットにそれぞれ固定化する。このとき、各スポットに固定化されたプライマーの配列を把握しておくよう

にする。ステップS20にて、前述したようにして得られる所定の全RNAから合成されたcDNAを鋳型DNA断片として用いてサンプル導入を行い、ステップS30にて熱変性処理を行って、ステップS40ではアニール処理を行う。ステップS50では、アニール処理により鋳型DNA鎖断片と二本鎖を形成したプライマーにだけ伸長反応が起こる。

[0127] また、前述したようにステップS20にて導入されるサンプル中にラベルされたヌクレオチドモノマーを含めておくことで、プライマーから伸長反応により得られるDNA断片がラベルされ、ステップS55で洗浄後の基板に残った蛍光DNA断片を含むスポットの検出を行い、各アレイに固定化されたプライマーの配列が把握されていることから、検出されたスポットに固定化されたプライマーの配列を知ることができる。これにより、伸長反応が起こったプライマーの塩基配列がわかり、全RNAがどの遺伝子から発現されて得られたものであるか、すなわち遺伝子発現プロファイルを解析することが可能になる。

[0128] この方法によれば、遺伝子発現プロファイル(gene expression profile)解析を、通常の解析において手間と時間がかかるサンプル調製をほとんど行うことなく、ゲノムDNA又は全RNAからの逆転写産物cDNAを鋳型DNA断片として用い簡便な操作で行うことができるようになる。

[0129] 以上の用途のほかには、 マイクロサテライト解析、染色体異常解析(CGH:Comparative Genomic Hybridization)、機能未知(nc)RNA探索などの遺伝子解析用基本ツールへの適用;

これらツールを使用した臓器・疾患別遺伝子発現解析チップ、変異原性試験キット(環境ホルモン)、遺伝子組換え食品検査キット、ミトコンドリア遺伝子配列解析キット、親子鑑定・犯罪捜査のための解析キット、先天性疾患解析キット、染色体・遺伝子異常解析キット、遺伝子診断(着床前・出生前)キット、薬物反応関連遺伝子多型解析キット、脂質代謝関連遺伝子多型解析キット、耳鼻科・眼科領域遺伝子多型解析キットなどの用途別カスタムチップへの適用;

ガン予後予測チップ、医薬品開発(臨床・創薬)用チップ、健康食品開発用チップなどの診断・臨床用カスタムチップへの適用;

微生物限度試験や食品飲料水中の微生物検査などの薬品・食品製造工程、およびう蝕・歯周病関連菌の検出、日和見感染菌の検出などの歯科領域の臨床検査、および食品工場・厨房施設環境検査、飲料・公衆浴場、井戸水などの水質検査における環境検査、および感染症・食中毒の予防、会社従業員の衛生管理などの保健衛生、および耐性菌を含む一般細菌同定、肝炎ウイルス、ヘリコバクターピロリ、肝炎クラミジア菌、エイズウイルス、SARSウイルス、ウエストナイルウイルス、ノロウイルス(生カキ由来の食中毒)、インフルエンザウイルス、真菌・カビなどの臨床検査などの微生物同定検査キットへの適用などが挙げられる。

(実施例)

[0130] (実験例1)

以下の手法にて、プライマーを、本実施形態に対応するプラスチックおよびガラス基板、および従来の基板に対応するアルデヒド基板の各基板の表面に固定化して、各基板上でDNA鎖伸長反応を行って、プライマーのDNA鎖伸長反応を検出した。

[0131] (プラスチック基板の製造)

飽和環状ポリオレフィン樹脂(5－メチル－2ノルボルネンの開環重合体の水素添加物(MFR(Melt flow rate):21g/10分、水素添加率:実質的に100%、熱変形温度123℃)を用い、射出成形によりスライドガラス形状の基板を得た。基板を2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン－ブチルメタクリレート－p－ニトロフェニルオキシカルボニルポリエチレングリコールメタクリレート(NPMA)共重合体(各基は、モル%で25:74:1)の0.5重量%エタノール溶液に浸漬することにより、基板表面にホスホリルコリン基と活性エステル基とを有する高分子物質を導入して、プラスチック基板を得た。

[0132] (ガラス基板の製造)

通常のガラス基板を、2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン－ブチルメタクリレート－p－ニトロフェニルオキシカルボニルポリエチレングリコールメタクリレート(NPMA)共重合体(各基は、モル%で25:74:1)の0.5重量%エタノール溶液に浸漬することにより、基板表面にホスホリルコリン基と活性エステル基とを有する高分子物質を導入して、ガラス基板を得た。

[0133] （アルデヒド基板の製造）

飽和環状ポリオレフィン樹脂5－メチル－2－ノルボルネンの開環重合体の水素添加物（MFR：21g／10分、水素添加率：実質的に100％、熱変形温度：123℃）を用い、射出成形によりスライドグラス形状の基板を得た。この成形物に低温酸素プラズマ処理により表面に親水化処理を施した。次に、アミノアルキルシランとしてγ－アミノプロピルトリエトキシシランをメタノール中に5％の濃度で溶解させたものをアミノ基導入処理液として調製し、この溶液の中に2時間浸漬の後、基板を溶液から取り出し、超純水中に浸漬し放置後基板を取り出し乾燥した。グルタルアルデヒドをPBS（－）中に2％の濃度で溶解させてグルタルアルデヒド溶液を調製し、アミノアルキルシラン処理を行なった基板をグルタルアルデヒド溶液中に浸漬し、4時間放置した後、基板を取り出して超純水中に浸漬し、洗浄乾燥した。これにより、表面にアルデヒド基を有するアルデヒド基板が得られた。

[0134] （プライマー固定）

5’末端がアミノ基で修飾されたオリゴDNA（20塩基鎖）を0．25M炭酸バッファ（pH9．0）を用いて溶解し、10μMのオリゴDNA溶液を調製した。この溶液をスポッタ（日立ソフトウェアーエンジニアリング製Marks-I）を用い、100μm径クロスカットピンでプラスチック基板およびガラス基板、およびアルデヒド基板の表面上に、それぞれスポットした。オリゴDNAをスポットした各基板を、200μlの0．25Mリン酸バッファ（pH8．5）で内部を湿らせた密閉容器（10cm×15cm×3cm）中で一昼夜浸して、オリゴDNA（プライマー）を固定化させた。

[0135] （DNA鎖伸長反応）

図6のステップS20で導入する鋳型DNA断片として、所定の50merの、予め5’末端をCy5にて標識したDNA断片を用いて、鋳型DNA断片の濃度が100pMとなるような反応系とした。また、DNA鎖伸長用酵素系として、DNAポリメラーゼ（タカラバイオ株式会社製Ex Taq）を用いた。

[0136] 続いて、図6のステップS30の熱変性処理、ステップS40のアニール処理、ステップS50の伸長反応をそれぞれ95℃5分（変性）－95℃1分（変性）－50℃3分（アニール）－95℃1分（変性）とした。

[0137] 以下、サンプル中にCy3－dUTPを含めておいて各基板において行ったDNA鎖伸長反応検出におけるCy3－dUTP由来の蛍光強度を測定した結果を表1に示す。

[0138] （表1）

プローブ塩基数	蛍光強度（MPEC伸長反応）		
	プラスチック	ガラス	アルデヒド基板
20	6281	3383	1725
25	3602	2412	0

[0139] 本実施形態に対応するプラスチック基板およびガラス基板では、基板上でのDNA鎖伸長が検出された一方で、従来の基板に対応するアルデヒド基板ではDNA鎖伸長は検出されていないと考えられる。

[0140] （実験例2）

実験例1でDNA鎖伸長が検出されたプラスチック基板を用いて、20mer、25mer、30merの各プローブについてMPEC法によるDNA鎖伸長を1サイクル、5サイクル、10サイクル、20サイクルで行って、DNA鎖増幅反応を行って、各区切りのサイクル終了後に蛍光強度を測定した。

[0141] なお、図1のステップS30の熱変性処理、ステップS40のアニール処理、ステップS50の伸長反応、ステップS60の熱変性処理をそれぞれ95℃5分（変性；初回のみ）～95℃1分（変性）～50℃3分（アニール）～95℃1分（変性）とした。

以下に、結果を表2に示す。

[0142] （表2）

プローブ塩基数	蛍光強度（MPEC法による伸長反応後）			
	MPECサイクル数			
	1	5	10	20
20mer	6487	14012	35502	45668
25mer	3808	5348	15287	35469
30mer	2766	4340	9656	27939

[0143] 所定の高分子物質で表面処理したプラスチック基板では、いずれの長さのプローブであってもDNA鎖増幅が検出された。

[0144] （実験例3）

図9に示したように、5'-Cy5-AAGGCGGGAGGGAGCGCAATCCGGGAGTTTAC AAATGGACAAACTTCTAT-3'の5'位から21番目の塩基Cを変異部位としたSNPタイピングを行う目的で、計5種類のプローブ(21mer)を設計し、プラスチック基板上に固定化した。このマイクロアレイを用いて、MPEC(multiple primer extension on a chip)反応によるSNPタイピング(伸張反応)を行う。

[0145] このSNPタイピングは、DNAポリメラーゼ(0.05U/ml)、Cy3-dUTP(0.05mM)、50μlのPCRバッファ中にdATP, dCTP, dGTP(各0.2mM)の存在下で、95℃(1分)～50℃(3分)の温度サイクルで行う。

この伸長反応の結果、上記の50merのDNA断片をターゲットとして、このターゲットと相補的な配列を有する完全マッチ配列プローブのみが伸長し、その結果蛍光発色する。

[0146] (実験例4)

実験例1のMPEC反応をp53ガン抑制遺伝子の検出に応用する。

このp53遺伝子の異常は大腸がんや肺がんで高頻度に求められており、p53遺伝子に異常(一塩基多型:SNP)があると、抗がん剤が効きにくくなり、ガン細胞の細胞死(アポトーシス)を起こせずガン細胞が増殖することになる。

[0147] そこで、正常なp53遺伝子およびがん細胞のp53遺伝子を用いたSNPタイピング(伸張反応)を行う。p53遺伝子の993番目と1069番目に変異があることは公知であり、この位置の塩基を3'末端とし、Tm値をほぼ一定となるようなプローブ設計を行い、プラスチック基板上に固定する。設計した計16種のプローブ5'-ATGGGCGGCATG AACN-3', 5'-TGAGGATGGGCCTCCN-3', 5'-GGAACAGCTTTGAGGTGCN-3', 5'-CCAGGACAGGCACAAACAN-3' (N=A,G,C,T)を用い、MPEC反応によるSNPタイピングを行う。

[0148] (実験例5)

SBH法による塩基配列決定解析のシミュレーション実験を行う。

図10に示したように、3'末端がCy5でラベルされた50塩基長のターゲットの塩基配列が決定できるように、一塩基ずつ3'末端方向にずらした8塩基(8mer)のプローブ(計50)をプラスチック基板上に固定したマイクロアレイを用いて、MPEC反応によ

るSBHを行う。各プローブの3’末端の一塩基にミスマッチを設定した8塩基(8mer)の50種類のプローブも加え基板上に固定した。このSBHシュミレーション用アレイを用いた塩基配列決定を行う。

請求の範囲

[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。

[2] 請求の範囲第1項に記載の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。

[3] 請求の範囲第1項に記載の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。

[4] 請求の範囲第1項に記載の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。

[5] 請求の範囲第1項に記載の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。

[6] 請求の範囲第1項に記載の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。

[7] 請求の範囲第1項に記載の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。

[8] 請求の範囲第1項に記載の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。

[9] 請求の範囲第1項に記載の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。

[10] 請求の範囲第1項に記載の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。

[11] 請求の範囲第1項に記載の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。

[12] 請求の範囲第1項に記載の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、当該基板の表面に固定化されることを特徴とするDNA鎖伸長方法。

[13] 請求の範囲第1項に記載の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。

[14] 請求の範囲第1項または第13項に記載の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むことを特徴とするDNA鎖伸長方法。

[15] 請求の範囲第1項に記載の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。

[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。

[17] 請求の範囲第16項に記載の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。

[18] 請求の範囲第16項に記載の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。

[19] 請求の範囲第16項に記載の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。

[20] 請求の範囲第16項に記載の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。

[21] 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表面に有する基板と、

前記基板の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。

[22] 請求の範囲第21項に記載の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。

[23] 請求の範囲第21項に記載の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。

[24] 請求の範囲第21項に記載の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。

[25] 請求の範囲第21項に記載の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。

[26] 請求の範囲第21項に記載の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。

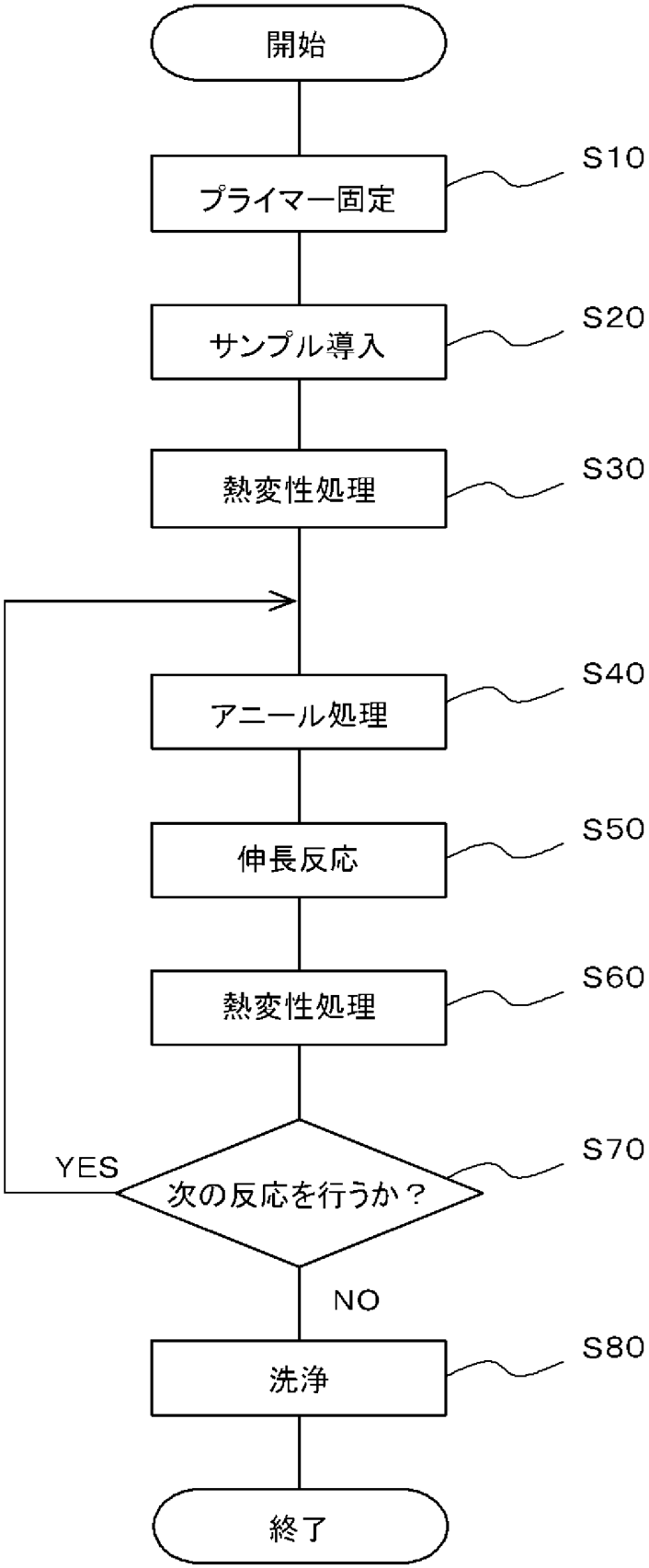
[27] 請求の範囲第21項または第26項に記載のDNA鎖伸長用マイクロアレイにおいて、 前記基板は、前記高分子物質に加えて、リン脂質の親水部を構成するリン酸エス

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むことを特徴とするDNA鎖伸長用マイクロアレイ。

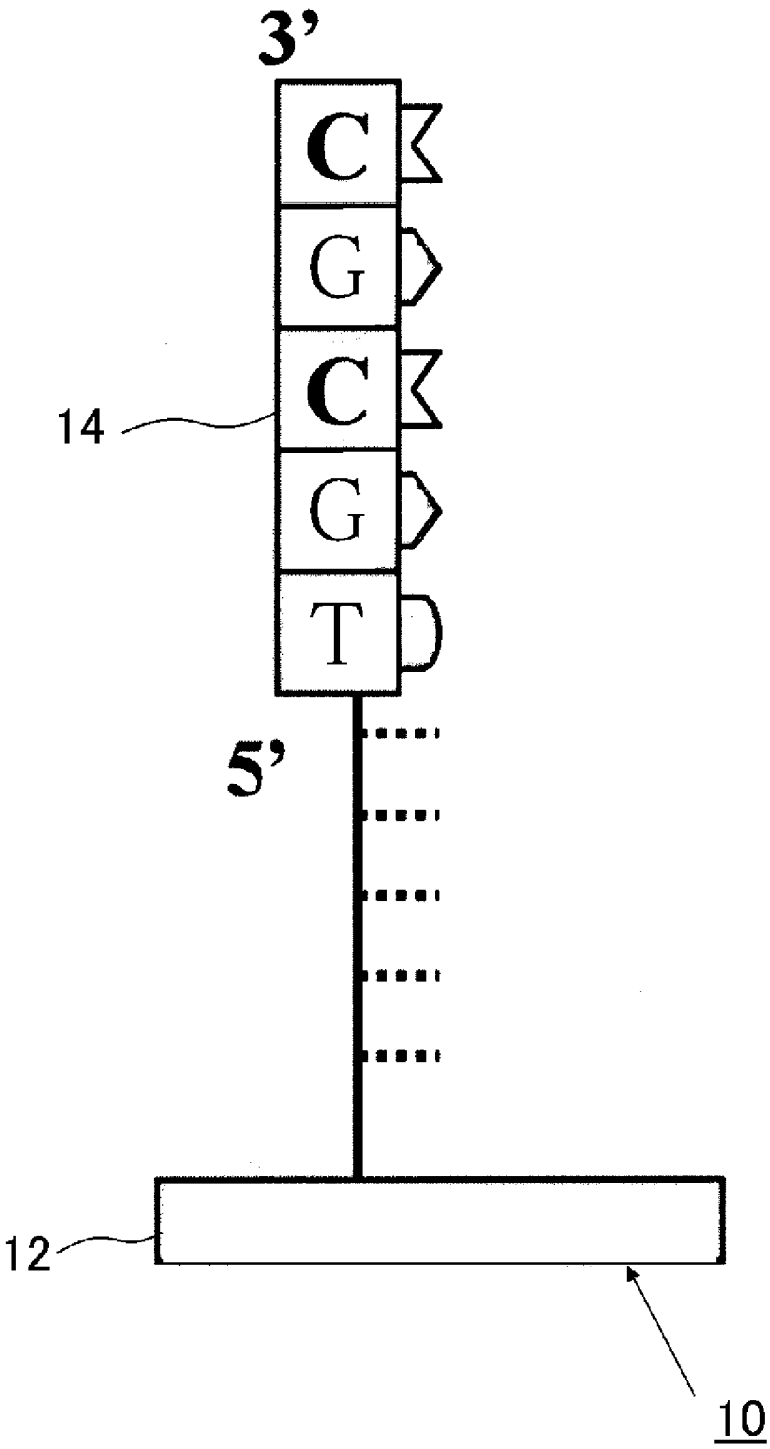
[28] 請求の範囲第21項に記載のDNA鎖伸長用マイクロアレイにおいて、

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。

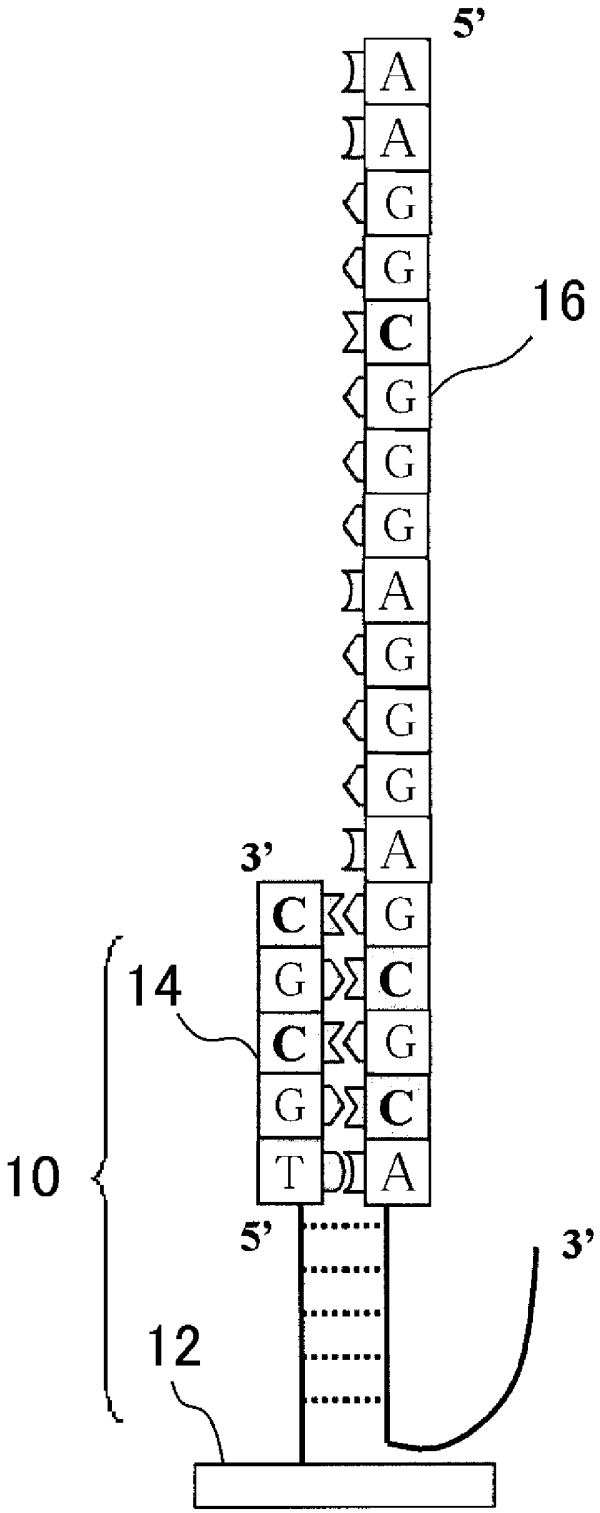
[図1]


開始
プライマー固定
S10
サンプル導入
S20
熱変性処理
S30
アニール処理
S40
伸長反応
S50
熱変性処理
S60
次の反応を行うか？
S70
YES
NO
洗浄
S80
終了

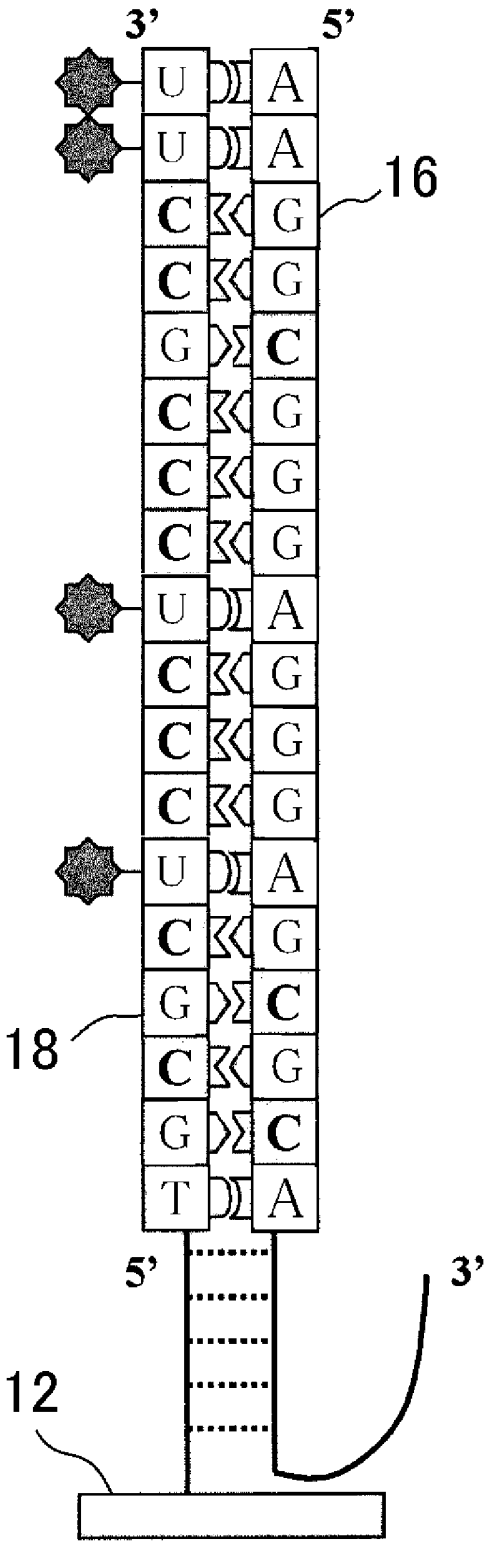
[図2]



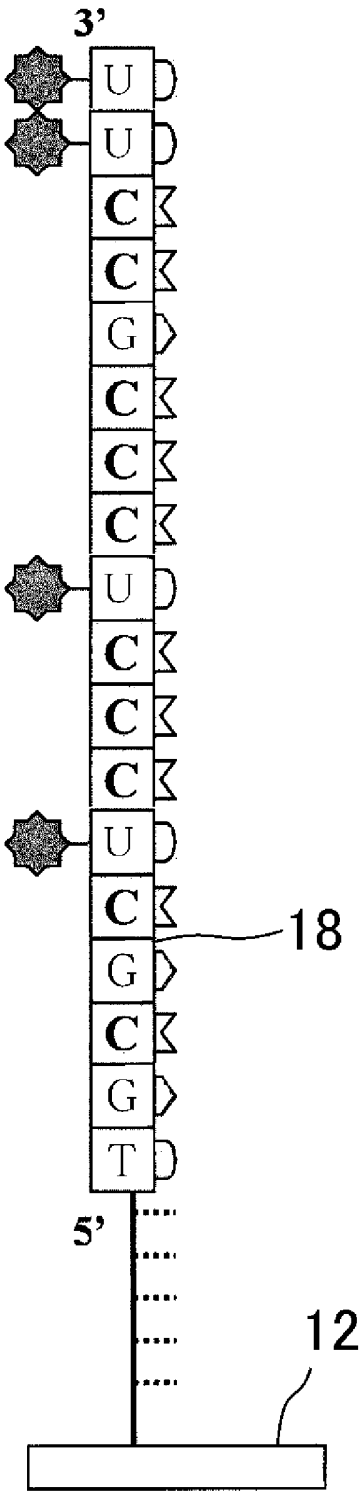
[図3]



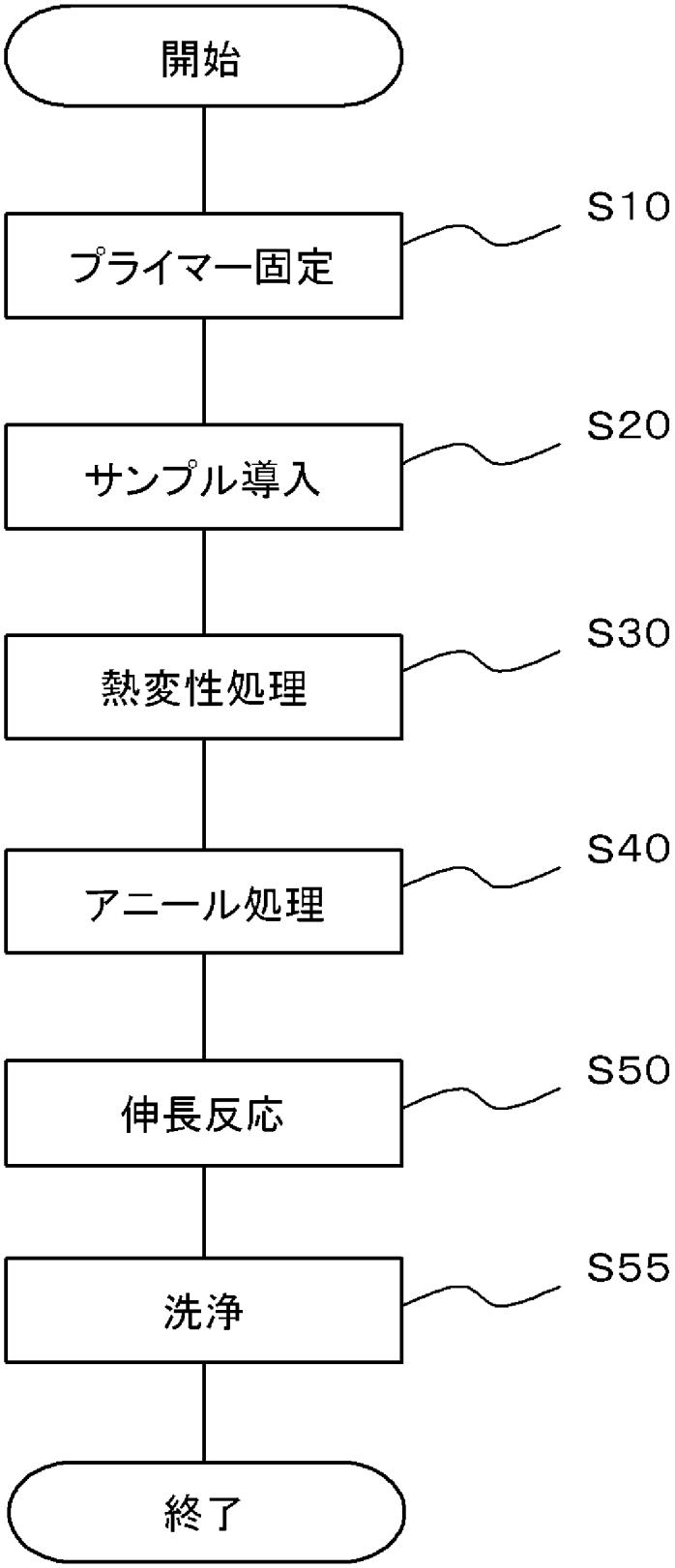
[図4]



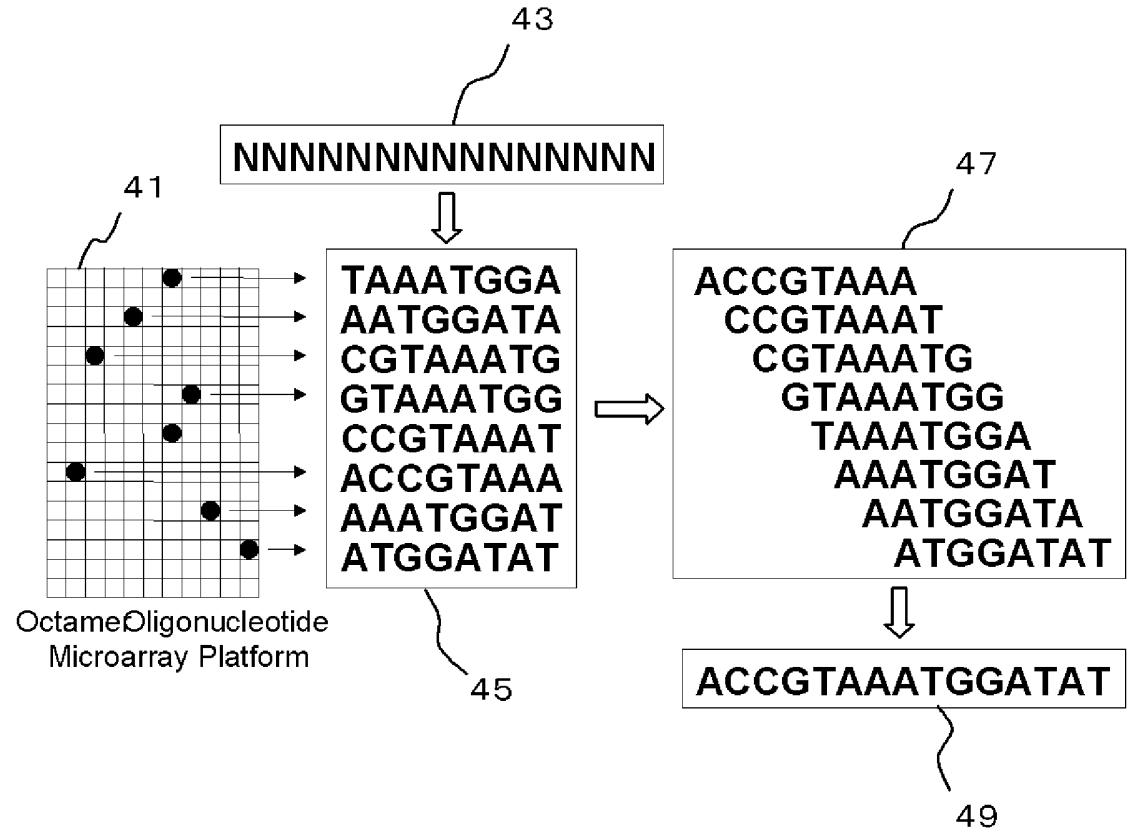
[図5]



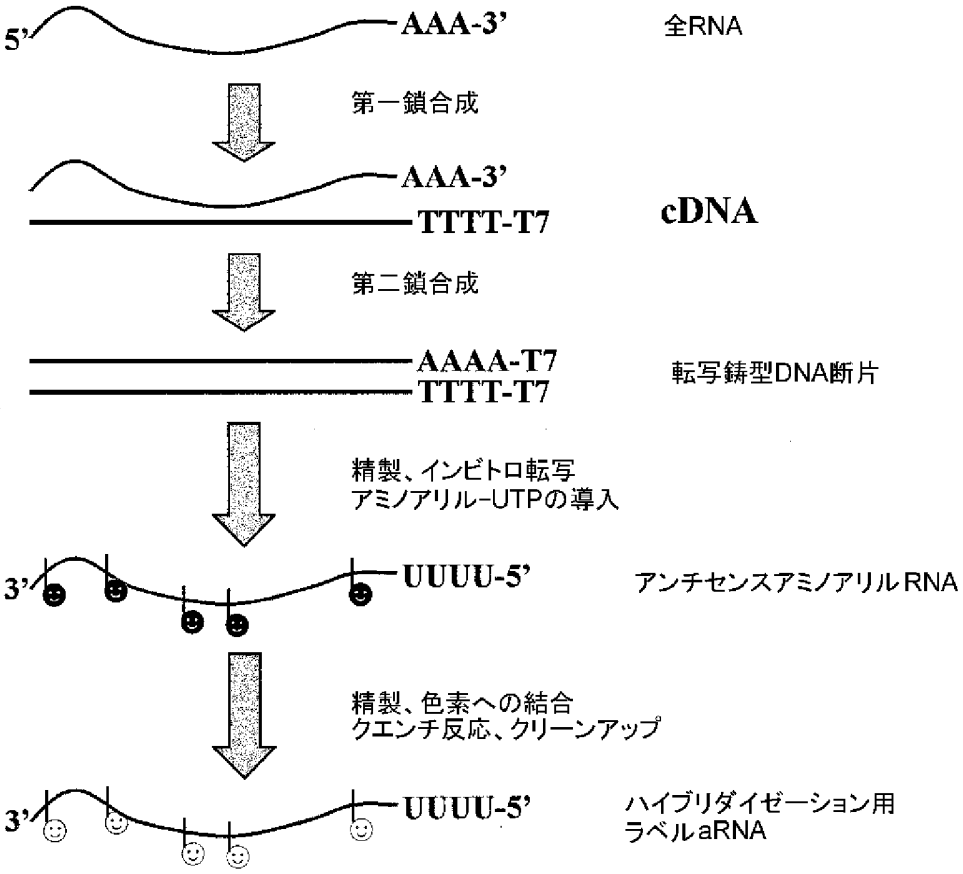
[図6]


開始
S10
プライマー固定
S20
サンプル導入
S30
熱変性処理
S40
アニール処理
S50
伸長反応
S55
洗浄
終了

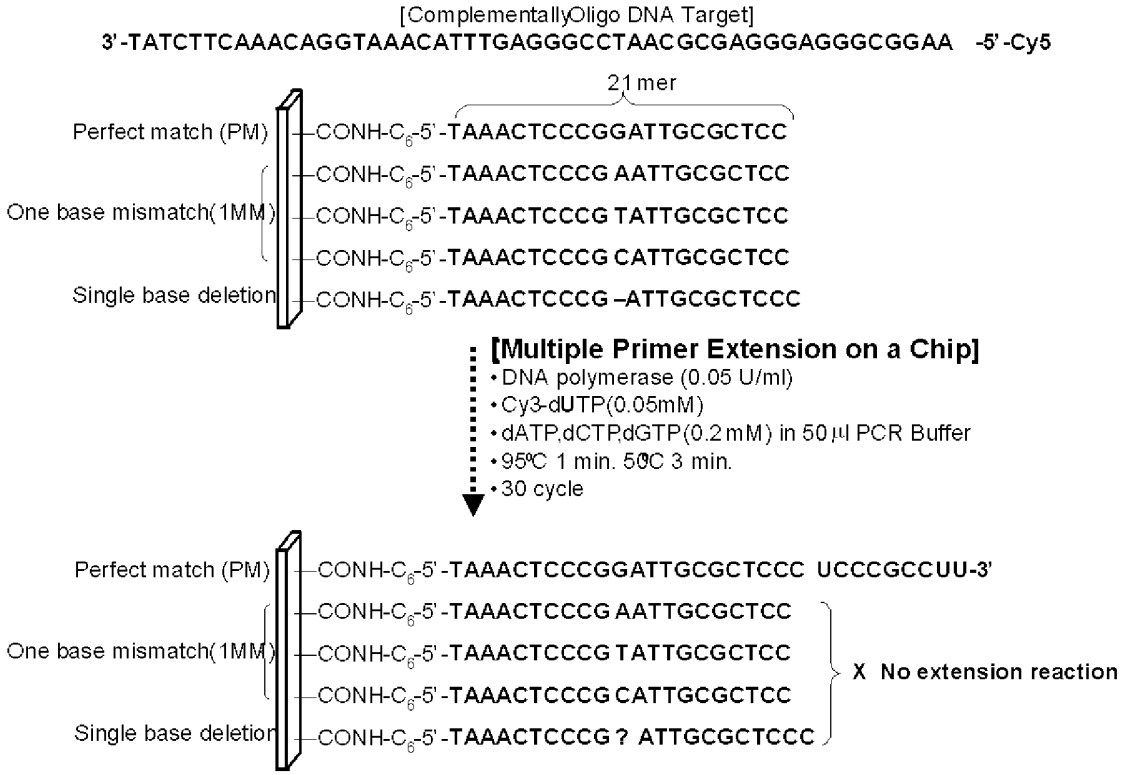
[図7]


43
NNNNNNNNNNNNNN
41
TAAATGGA
AATGGATA
CGTAAATG
GTAAATGG
CCGTAAAT
ACCGTAAA
AAATGGAT
ATGGATAT
47
ACCGTAAA
CCGTAAAT
CGTAAATG
GTAAATGG
TAAATGGA
AAATGGAT
AATGGATA
ATGGATAT
ACCGTAAATGGATAT
Octamer Oligonucleotide
Microarray Platform
45
49

[図8]


5'
AAA-3'
全RNA
第一鎖合成
AAA-3'
TTTT-T7
cDNA
第二鎖合成
AAAA-T7
TTTT-T7
転写鋳型DNA断片
精製、インビトロ転写
アミノアリル-UTPの導入
3'
UUUU-5'
アンチセンスアミノアリルRNA
精製、色素への結合
クエンチ反応、クリーンアップ
3'
UUUU-5'
ハイブリダイゼーション用
ラベルaRNA

[図9]


[ComplementallyOligo DNA Target]
3'-TATCTTCAAACAGGTAAACATTTGAGGGCCTAACGCGAGGGAGGGCGGAA -5'-Cy5
21mer
Perfect match (PM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCGGATTGCGCTCC
One base mismatch(1MM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG AATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG TATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG CATTGCGCTCC
Single base deletion
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG –ATTGCGCTCCC
[Multiple Primer Extension on a Chip]
• DNA polymerase (0.05 U/ml)
• Cy3-dUTP(0.05mM)
• dATP,dCTP,dGTP(0.2 mM) in 50μl PCR Buffer
• 95℃ 1 min. 50℃ 3 min.
• 30 cycle
Perfect match (PM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCGGATTGCGCTCCC UCCCGCCUU-3'
One base mismatch(1MM)
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG AATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG TATTGCGCTCC
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG CATTGCGCTCC
Single base deletion
CONH-C6-5'-TAAACTCCCG ? ATTGCGCTCCC
X No extension reaction

[図10]


[ComplementallyOligo DNA Target]
3'-TATCTTCAAACAGGTAAACATTTGAGGGCCTAACGCGAGGGAGGGCGGAA -5'-Cy5
5'-GGTGGATA-3'
GTGGATAG
TGGATAGA
GGATAGAA
GATAGAAG
ATAGAAGT
8-mer primers
CCCGCCTT
CCGCCTT T
CGCCTT TC
GCCTT TCT
CCTT TCTC
5'-CTT TCTCC-3'
MPEC 反応
5'-GGTGGATAGAAGTTTGTCCATTTGTAAACTCCCGGATTGCGCTCCCTCCCGCCTT TCTCC-3'

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/021922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01), ***C12M1/00***(2006.01), ***G01N33/53***(2006.01), ***G01N37/00***(2006.01)

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)
C12N15/09(2006.01), ***C12M1/00***(2006.01), ***G01N33/53***(2006.01), ***G01N37/00***(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-198402 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), (Family: none)	1-28
Y	ADESSI, C. et al., Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment an amplification mechanisms. Nucleic Acids Res. 2000, Vol.28, No.20, page e87	1-28
P,X	WO 2005/029095 A1 (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 31 March, 2005 (31.03.05), (Family: none)	1-28

☐ 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
23 February, 2006 (23.02.06)	07 March, 2006 (07.03.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０２１９２２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　*C12N15/09(2006.01), C12M1/00(2006.01), G01N33/53(2006.01), G01N37/00(2006.01)*

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.　*C12N15/09(2006.01), C12M1/00(2006.01), G01N33/53(2006.01), G01N37/00(2006.01)*

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

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）

BIOSIS/WPI(DIALOG)

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	関連する請求の範囲の番号
Y	JP 2004-198402 A (住友ベークライト株式会社) 2004.07.15 (ファミリーなし)	1-28
Y	ADESSI, C. et al. Solid phase DNA amplification:characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. Nucleic Acids Res. 2000, Vol.28, No.20, p.e87	1-28
P,X	WO 2005/029095 A1 (住友ベークライト株式会社) 2005.03.31 (ファミリーなし)	1-28

☐ 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
２３．０２．２００６	０７．０３．２００６

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	９２８１
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	高堀　栄二 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		