

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3911909号
(P3911909)

(45) 発行日 平成19年5月9日(2007.5.9)

(24) 登録日 平成19年2月9日(2007.2.9)

(51) Int. Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

請求項の数 6 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願平11-162038	(73) 特許権者	000005108
(22) 出願日	平成11年6月9日(1999.6.9)		株式会社日立製作所
(65) 公開番号	特開2000-342258 (P2000-342258A)		東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
(43) 公開日	平成12年12月12日(2000.12.12)	(74) 代理人	100100310
審査請求日	平成15年4月28日(2003.4.28)		弁理士 井上 学
		(72) 発明者	神原 秀記
			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
		審査官	清水 晋治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA試料調製方法及びDNA試料調製装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNA試料を制限酵素を用いて切断し、DNA断片を得る工程と、
 前記DNA断片の3'末端にオリゴマーを結合させる工程と、
 前記DNA断片を遊離プライマーと複数の担体の表面上に各々固定された複数の特異プライマーとを用いてPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)によって増幅する工程と、
 前記担体を前記担体の比重、寸法、色もしくは磁化の少なくともいずれかに応じて分取する工程と、
 前記増幅する工程で増幅されるPCR産物を回収する工程とを有し、
 前記結合させる工程では、前記オリゴマーは、前記DNA断片の全てにおいて共通な配列を有してかつ同じ長さを有する共通配列と、前記共通配列の5'末端側に位置してかつ塩基配列の長さで前記DNA断片を識別する識別配列とを含む既知配列を有し、
 前記識別配列の長さは、一の前記DNA試料に由来する前記DNA断片の間では同一であり、かつ異なる前記DNA試料に由来する前記DNA断片の間では異なり、
 各々の前記特異プライマーは特定の前記DNA断片に相補的な塩基配列を有し、
 前記担体は前記相補的な塩基配列によって複数の群に分離されるものであり、かつ前記特異プライマーの種類と前記担体の比重、寸法、色もしくは磁化の少なくともいずれかが各々対応付けられるものであり、
 前記遊離プライマーはPCRのためのものであってかつ前記共通配列にハイブリダイズするものであり、

10

20

前記回収する工程では、前記PCR産物を前記担体の比重、寸法、色もしくは磁化の少なくともいずれかに応じて前記群ごとに各々回収することを特徴とするDNA試料調製方法。

【請求項2】

前記担体は微粒子であることを特徴とする請求項1に記載のDNA試料調製方法。

【請求項3】

前記担体はファイバーであり、前記特異プライマーは種類毎に異なる前記ファイバーに各々固定されていることを特徴とする請求項1に記載のDNA試料調製方法。

【請求項4】

前記担体は微粒子であり、前記微粒子は前記群に応じて、前記PCRが行われる反応セルに収納されることを特徴とする請求項1に記載のDNA試料調製方法。

10

【請求項5】

前記担体は微粒子であり、前記微粒子はキャピラリーの内部の異なる区画に分離して保持されることを特徴とする請求項1に記載のDNA試料調製方法。

【請求項6】

前記担体は微粒子であり、前記微粒子はキャピラリーの内部の複数の区画に、前記複数の区画を分離するべく配列されるスペーサー微粒子を介して保持されることを特徴とする請求項1に記載のDNA試料調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

20

本発明は複数の検体にそれぞれ由来する複数の注目するDNA断片種の同時PCRとPCR産物の分別回収法に関し、特に各検体間で注目するDNA断片種の比較を定量的に行なうために必要なPCR、DNA検査、遺伝子診断等のDNA分析に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子又はDNA断片の増幅法として知られているPCRはターゲットDNAにハイブリダイズする2種のプライマーを用いて相補鎖合成を繰り返しこの2種のプライマーに挟まれたDNA配列部分のコピー数を増やす手法である。独立した複数の部位を1つの反応でPCR増幅させることが分析上しばしば必要になり試みられている。しかし、複数対のプライマーを用いて複数種類のDNA断片が含まれる試料をPCR増幅すると、予定してないプライマーペアでPCR増幅される断片が生じたりすることがある。また、各PCR増幅成分を分離しようとするとき非常に困難が伴う。そこで1つのプライマーペアでPCR増幅できるDNA断片群だけを増幅してPCR産物を分析するか、相互に影響しないプライマーペアだけを選んで複数のDNA断片をPCRすることが行なわれる。

30

【0003】

一方、複数種類のDNA断片の比較分析は重要課題であり、いろいろ検討されている。しかし、PCRにおける増幅率は反応条件に強く依存するので、PCR条件の異なる即ち独立に増幅されたDNA断片群間の比較は定量的な検討ができない難点があった。PCRに影響を与えるファクターには、反応温度、プライマーの配列、試薬の量、夾雑物の種類と量、等があり、異なる反応でこれらファクターを同一条件にするのはかなりやっかいである。最近、複数のDNA断片中に含まれる同種のDNA断片を定量的に比較分析するためのPCR技術が開発された。この方法はATAC PCR (adaptor-tagged competitive PCR) と呼ばれているが、複数のDNA断片中に含まれる1つのDNA断片種について注目し比較分析する方法である。注目するDNA断片種の両側に既知配列を結合させる。既知配列は、プライマーがハイブリダイズする共通配列と複数の検体を識別するための識別配列からなる。この場合、各検体中の注目DNA断片種は同じ配列を持つので、PCR増幅すると同じ長さのPCR産物を与えるので、検体の区別できない。そこで比較しようとするDNA断片毎に異なる長さの識別配列を共通配列と目的とする注目DNA断片種の配列との間に挿入し、PCR産物の長さがDNA断片毎に変化するように工夫する。これは注目DNA断片種の配列にオリゴマーをライゲーション

40

50

で結合させる時に、オリゴマーの配列を、各DNA検体の断片に共通して同じ配列を持つ共通配列と、各DNA検体を識別するための識別配列とから構成することで達成される。このように調製された注目DNA断片種を含む検体を混合して一括してPCRを行なう。プライミングサイトの配列及びPCR増幅される配列の大部分が同じ配列であり、また、1つの反応容器の中で反応するので各々の注目DNA断片種の増幅は均一な条件で行われる。このため増幅効率は注目DNA断片が由来する検体によらず一定であるため、定量的な検討ができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

定量的なPCRが必要な具体例としては、遺伝子発現をモニターするためのcDNA解析等がある。試料のcDNAは種々のDNA断片を様々な存在比で含んだ物であり、これらを種々の検体間で定量的に比較することにより、遺伝子の発現情報および機能情報を得る。注目するcDNAの多くは検体中のコピー数が僅かであり、通常PCR増幅してから計測する。この時、定量的な検討ができるようにPCR増幅することが必要であり検体間でPCR条件が異ならぬように、同時に同じ反応容器内で反応させることが望ましい。複数DNA成分(種)の同時PCR増幅は従来も試みられているが、PCR生成物を目的とするDNA断片の種類毎に分別して回収し分析する方法は重要であるにも係わらずその難しさゆえに行われてない。このような事情は遺伝子を用いた診断等のための分析にも共通する。

【0005】

以上説明した定量的なPCRは重要であるが、注目するターゲットが1種類であり、種々環境下又は種々異なる組織に含まれるターゲットについて比較する場合等には非常に有効である。しかし、複数のDNA断片種、即ち複数種類の遺伝子について比較を行なう場合には、注目する遺伝子毎あるいはDNA断片毎に反応を行なう必要があり、煩雑な手順を必要とする問題がある。種々試料に含まれる複数の種類のDNA断片を同時に増幅し、それぞれを分別回収して比較分析できれば都合がよいが、先に述べたようにプライマー同士が干渉しあい予期せぬ生成物を作り出すという問題、及び生成物の分別回収が難しい等の問題がある。

【0006】

微量でかつ複数の注目DNA断片種の比較分析は大きな研究課題である。微量なDNA断片種の分析にはPCRが用いられている、PCRによる増幅率は増幅しようとするDNA断片の配列、特にプライマーがハイブリダイズする領域の配列、温度、夾雑物の有無等に依存する。このため、PCR増幅産物ともとの増幅前の試料の間で、DNA断片種の間で存在比が変化して定量的な検討が行ないにくくなる等の問題がある。この問題を解決するために考案されたATAC PCR等の方法では、複数のDNA断片種について同時に分析できない難点があり、複数の注目するDNA断片種を含む複数の検体間で定量的に比較分析するための方法、あるいは試料調製方法の開発が重要課題であった。即ち、複数のDNAについてそれらの種類とそれが含まれていた組織あるいは検体等の種類とを区別しつつ、同じ条件下でPCR増幅して生成物を比較分析する方法の開発が重要課題であった。

【0007】

本発明は、上記の各問題点、重要課題を解決するDNA試料調製方法及びDNA試料調製装置を提供し、プライマー同士の干渉を排除し、同時に複数の検体の各々に由来する複数の注目DNA断片種を同じ条件下でPCR増幅して、検体毎に複数の注目DNA断片種のPCR産物を分別回収するDNA試料調製方法及びDNA試料調製装置を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明のDNA試料調製方法では、1つの反応セル中で複数のDNA断片種を増幅するが、DNA断片種毎に局在化した場所でPCR増幅を行なうことによりプライマーペア間の

10

20

30

40

50

干渉を防止している。具体的には、微粒子又はビーズの表面に、DNA断片の種類毎にそれぞれ特異的に結合するプライマー（特異プライマー）の種類毎に固定し、微粒子又はビーズの表面に固定化された特異プライマーと、微粒子又はビーズに固定されない遊離のプライマー（遊離プライマー又は共通プライマーという）とを対として、各微粒子又はビーズの表面でDNA断片種毎にPCR増幅が行なわれる。更に、微粒子又はビーズの表面に固定された特異プローブ（プライマー）の種類毎に微粒子又はビーズを保持するセル内の位置を変えて、プライマー間での相互干渉が起こらないようにする。PCR終了後、各微粒子又はビーズ、各ファイバー等の互いに別々の固体サポート（担体）は分別回収され、固体サポートの表面に捕捉されたDNA断片種も分別され回収される。複数の特異プライマーは、ほぼ同じ長さを持つが配列は異なる。

10

【0009】

本発明のDNA試料調製方法では、検体の違いはDNA断片の末端に結合させるオリゴマー（プライミング領域となる）の種類を変えることで識別可能とし、DNA断片の種類はそれらDNA断片に特異的に結合するプライマー（特異プライマー）を、相互に複数の群に識別可能な微粒子又はビーズに固定してPCR産物を各微粒子又はビーズに捕獲すると共に、PCR産物を微粒子又はビーズの化学的、又は物理的な性質の違いで分別することにより分取する。DNA断片種毎に分取されるが、この中には複数の検体に由来するDNA断片種が同じ比率でPCR増幅されて含まれている。PCR増幅された複数の検体に由来するDNA断片種は、末端に結合したオリゴマーの違いに基づいて分析され比較できる。本発明では、複数の検体の各々に由来する複数の注目DNA断片種の各々のPCR増幅した後に、複数の注目DNA断片種毎にPCR産物を分別回収する。各DNA断片種のPCR増幅は同一条件で行われるので、各DNA断片種の比較分析等が有効にできる。

20

【0010】

本発明のDNA試料調製方法は、複数のDNA成分（断片）が含まれる複数サンプル（検体）から多種のDNA成分を同時にPCR増幅し、分別するのにも活用できる。即ち、特異プライマーを微粒子又はビーズに固定し、1つの容器内で反応させたり、あるいは、微粒子又はビーズをプローブの種類毎に区分けした状態とし、DNAの種類毎に相互干渉が少なくなるようにPCR増幅して、増幅後、DNAの種類毎に分別回収して分析できる。

【0011】

本発明のDNA試料調製方法は、従来技術では不可能であった複数の検体に含まれる複数のDNA断片種を定量分析可能な状態で、複数の検体にそれぞれ由来する複数のDNA断片種のコピー数を増幅し、比較分析する手法を提供できる。また、従来技術ではPCR増幅されたDNA断片種の分別回収は手間と時間がかかる上、DNA断片長が同じ場合にはゲル分離が適用できず分別回収が困難であったが、本発明ではより簡単に分別回収できる。本発明の試料調製方法では、複数の検体にそれぞれ由来する複数のDNA断片種の配列決定をする場合に、複数の検体にそれぞれ由来する複数のDNA断片種に関する試料調製を1つの容器内で一括して行ない注目するDNA断片種毎に分別分取した後に、DNA断片種毎に塩基配列決定反応を行ない生成物をゲル電気泳動して非常に効率良く、複数のDNA断片種の塩基配列決定ができる。以下、本発明の代表的な構成の特徴を説明する。

30

【0012】

本発明のDNA試料調製方法は、増幅しようとする複数種類のDNA断片にそれぞれ相補な配列を持ち、前記相補な配列の種類毎に1又は複数の分別可能な担体の表面に固定され、前記DNA断片の種類毎にそれぞれ特異的に結合する特異プライマーと、溶液中に遊離する遊離プライマーとを対として、前記DNA断片のPCR増幅を行なう工程と、PCR増幅産物を前記DNA断片の種類毎に分別回収する工程とを有することに特徴があり、前記遊離プライマーが前記複数種類のDNA断片に共通してハイブリダイズする共通プライマーであること、前記遊離プライマーが前記複数種類のDNA断片に共通してハイブリダイズする共通プライマーであり、前記共通プライマーは、前記DNA断片の5'末端に導入されたオリゴヌクレオチドの配列にハイブリダイズすること、前記担体が、比重又は寸法の異なる複数の微粒子又はビーズであり、前記特異プライマーの種類と前記比重又は寸

40

50

法が対応付けられていること、前記担体が、複数のファイバーであり、前記特異プライマーは種類毎に異なる前記ファイバーの先端近傍に固定されていること、前記担体が前記複数の群に識別可能な複数の微粒子又はビーズであり、前記複数の微粒子又はビーズが単一の反応セルに収納されること、前記担体が複数の微粒子又はビーズであり、前記複数の微粒子又はビーズが単一のキャピラリーの内部の異なる区画に分離して保持されること、前記担体が前記複数の微粒子又はビーズであり、前記複数の微粒子又はビーズが単一のキャピラリーの内部の異なる区画に、前記複数の区画を分離するスペーサービーズ又はスペーサー微粒子を介して分離して保持されること、前記担体が前記複数の群に識別可能な複数の微粒子又はビーズであり、前記微粒子又はビーズのサイズ、前記微粒子又はビーズの比重、前記微粒子又はビーズに着色された色、前記微粒子又はビーズが帯びる磁化の何れかの差異により、前記複数の群が識別可能であること、等にも特徴がある。

10

【0013】

また、本発明のDNA試料調製方法は、増幅しようとする複数種類のDNA断片にそれぞれ相補な配列を持ち、前記相補な配列の種類毎に1又は複数の分別可能な担体の表面に固定され、前記DNA断片の種類毎にそれぞれ特異的に結合する特異プライマーと、溶液中に遊離する遊離プライマーとを対として、前記DNA断片のPCR増幅を行なう工程と、PCR増幅産物を前記DNA断片の種類毎に分別回収する工程とを有し、前記遊離プライマーが前記複数種類のDNA断片に共通してハイブリダイズする共通プライマーであり、前記共通プライマーは、前記DNA断片の5'末端に導入されたオリゴヌクレオチドの配列にハイブリダイズすることを特徴とする。

20

【0014】

更に、本発明のDNA試料調製装置は、増幅しようとする複数種類のDNA断片にそれぞれ相補な配列を持ち、前記DNA断片の種類毎にそれぞれ特異的に結合する特異プライマーを、前記特異プライマーの種類毎に別々に保持する複数の貫通する孔を持つホルダーと、前記DNA断片の5'末端に導入されたオリゴヌクレオチドの配列に共通してハイブリダイズする共通プライマーを含むPCR反応液、及び、前記DNA断片を収納し、前記ホルダーの一方の端部を受け入れる凹部を有し、前記各孔の内部で、前記各特異プライマーと、前記共通プライマーとを対として、前記DNA断片のPCR増幅を行ない、前記DNA断片の種類毎のPCR増幅産物を前記各孔の内部で生成することを特徴とし、前記特異プライマーが固定された微粒子又はビーズが、前記細管の内部に保持されること、前記特異プライマーが前記細管の内壁に固定されること、前記特異プライマーが固定されたファイバーを含む細い部材が、前記細管の内部に保持されることにも特徴がある。

30

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を図面を参照して実施例により詳細に説明する。物理的又は化学的性質により複数の群に識別して分類可能な、プラスチック、ガラス、セラミック等の材質からなる微粒子又はビーズ、あるいは、磁気微粒子又は磁気ビーズ等の、互いに別々の固相担体の表面に固定され、複数の各々のDNA断片種に特異的にハイブリダイズする特異プライマーと、複数のDNA断片種の少なくとも一部の複数のDNA断片種に共通してハイブリダイズし溶液中に遊離する共通プライマーとを対として行なう、複数のDNA断片種の同時PCRと、PCR後の微粒子、ビーズ等の分別回収法について説明する。ここで用いる微粒子又はビーズのサイズは、直径0.5µm～500µmである。

40

【0016】

以下、各実施例でPCR増幅とする試料の調製方法について説明する。以下の各実施例の説明では、図1に示すように、比較しようとするDNA検体を201-i (i = a、b、～、f) で表示し、DNA検体-iに由来するDNA断片種-jをDNA断片種を201-i-j (i = a、b、～、f; j = 1、2、～、9) で表示する。以下の各実施例では、複数のDNA検体に由来する複数のDNA断片種(例えば、cDNA断片種)202をPCR増幅して、DNA断片種毎に分離分取する。以下の各実施例では、検体の数は6個であり、注目するDNA断片種の種類は9個である。もちろん、DNA検体の数、注目する

50

DNA断片種の数、ターゲットDNAにより変化する。ターゲットとするDNA(ターゲットDNA)の配列の内、増幅しようとする注目領域を決定し、増幅しようとする注目領域の配列(特異配列)に特異的にハイブリダイズするプライマー(特異プライマー-j) 207-j(j=1、2、~、9)を用意する。注目領域に存在する制限酵素切断部位を制限酵素で切断し、得られた断片の末端に既知配列を持つオリゴマーをライゲーションにより結合して、既知配列と特異配列とで挟まれた領域をPCR増幅して比較分析用の試料とする。なお、以下で説明する図1、図2、図3に示す断片の例では図を簡略にするため、断片201-i-jの5'末端に既知配列を持つオリゴマーが付加されていない例を示すが、既知配列を持つオリゴマーが付加されていても良いことは言うまでもない。更に、図1、図2、図3に示す例では図を簡略にするため、1本鎖の断片201-i-jの例をとり説明するが、断片201-i-jが2本鎖である場合にも同様にして、既知配列と特異配列とで挟まれた領域をPCR増幅して比較分析用の試料とすることができることは言うまでもない。

10

【0017】

既知配列を持つオリゴマーの配列は、DNA検体の断片に共通する同じ配列からなる共通配列208と、共通配列208の5'末端に続き、DNA検体を識別する識別配列205-i(i=a、b、~、f)を持つ。識別配列205-iは、DNA検体-iに由来するDNA断片を識別するための配列であり、DNA検体毎に長さを変えている。即ち、DNA検体-i(i=a、b、~、f)に由来するDNA断片種201-i-j(j=1、2、~、9)の識別配列205-i(i=a、b、~、f)は同じ長さであり、DNA検体毎に識別配列の長さは異なっている。DNA検体-i(i=a、b、~、f)に由来するDNA断片種201-i-j(j=1、2、~、9)の5'末端の共通配列208は、DNA検体、及びDNA断片種によらず同じ配列である。反応溶液中に遊離しているPCR増幅の遊離プライマー208'は共通配列208にハイブリダイズする。なお、特異プライマーの5'末端がリンカーを介して、特異プライマーの種類毎に微粒子、ビーズ等の互いに別々の固相担体の表面に固定される。1つの固相担体の表面には複数分子の同一種類の特異プライマーが固定されていることは言うまでもない。

20

【0018】

(実施例1)

実施例1に説明する方法は、複数のDNA検体201-i(i=a、b、~、f)の各々に由来する複数のDNA断片種201-i-j(i=a、b、~、f;j=1、2、~、9)に特異的にハイブリダイズする特異プローブ(特異プライマー)207-j(j=1、2、~、9)を、複数のDNA断片種毎に異なる直径を持つ微粒子又はビーズ206-j(j=1、2、~、9)の表面に固定し、微粒子又はビーズを反応液中に分散させて、複数のDNA断片種の少なくとも一部の複数に共通してハイブリダイズする共通プライマー(遊離プライマー)208'と、特異プライマー207-j(j=1、2、~、9)とを対として、複数のDNA検体の各々に由来する複数のDNA断片種201-i-j(i=a、b、~、f;j=1、2、~、9)をPCR増幅する方法である。

30

【0019】

図1は、実施例1に於いて、特異プライマーが固定された径の異なる微粒子又はビーズを用いて複数のDNA検体の各々に由来する複数のDNA断片種を同時にPCR増幅する方法を説明する図である。図2は、実施例1に於いて、特異プライマーが固定された径の異なる微粒子又はビーズを用いて複数のDNA検体の各々に由来する複数のDNA断片種の同時PCR増幅を模式的に示す図である。

40

【0020】

PCR生成物を選別して分取するために、特異プライマー207-jはその種類毎に、それぞれ異なる直径を持つ微粒子又はビーズ206-jの表面に固定される。特異プライマー207-jが固定された微粒子又はビーズ206-j(j=1、2、~、9)をまとめて反応容器101に入れ、また、複数のDNA検体由来する複数のDNA断片種(cDNA断片)202(全ての、DNA断片種201-i-j(i=a、b、~、f;j=1

50

、2、～、9))、酵素、及び反応基質等、PCRに必要な試薬を加えPCRを実行する。

【0021】

図1の(a)に示すように、DNA断片種201-i-jの3'末端の共通配列208に相補結合する遊離プライマー208'の伸長反応により、DNA断片種201-i-jの相補鎖が生成する。図1の(b)に示すように、各微粒子又はビーズ206-jの表面では、固定された特異プライマー207-jがハイブリダイズするDNA断片種201-i-jの相補鎖を鋳型にして相補鎖合成がなされる。特異プライマー207-jは、DNA検体201-iに由来するDNA断片種201-i-jの相補鎖の3'末端(又は、DNA断片種201-i-jの5'末端に付加された既知配列のオリゴマーの相補鎖の3'末端)と識別配列205-iに相補な配列205'-iの3'末端と間の固有配列部分203-j(j=1、2、～、9)(図示せず)の領域内でハイブリダイズする。その結果、微粒子又はビーズ206-jの表面に固定された特異プライマー207-jは相補鎖伸長して複製されたDNA鎖をつくる。直径が異なる微粒子又はビーズ206-j毎に異なる特異プライマー(プローブ)207-jが固定されているので、直径が異なる微粒子又はビーズ206-j毎に異なるcDNA断片201-i-jの相補鎖が鋳型とされて、対応する相補鎖がハイブリダイズした形で微粒子又はビーズにやはりトラップされる。

10

【0022】

図1の(c)に示すように、特異プライマー207-jの伸張鎖の3'末端の共通配列208に相補結合する遊離プライマー208'の伸長反応により、特異プライマー207-jの伸張鎖の相補鎖が生成する。図2に示すように、微粒子又はビーズの表面に固定された特異プライマーの伸張鎖107-1、107-2に共通プローブ208'がハイブリダイズし共通プローブの伸張鎖108-1、108-2が生成する。図1の(d)に示すように、図1の(c)で生成した2本鎖の各鎖を鋳型、特異プライマー207-j、及び遊離プライマー208'をプライマーとしてPCR増幅が進行する。

20

【0023】

以上の反応による生成物を精製すると、図1の(e)に示すように、3'末端側に、共通配列208と、共通配列208に続きDNA検体201-iに由来するDNA断片種201-i-jを識別するための識別配列205-iとを持ち、5'末端側に、特異プライマー(微粒子又はビーズ206-jに固定されている)207-jの配列を持つ第1の1本鎖と、第1の1本鎖に相補な配列を持つ第2の2本鎖からなり、DNA断片種201-i-j(i=a、b、～、f;j=1、2、～、9)に由来する複製がえられる。この結果、DNA断片種j毎に、201'-i-j(i=a、b、～、f;j=1、2、～、9)を含む断片209-jが得られる。DNA断片種j毎に、201'-i-j(i=a、b、～、f;j=1、2、～、9)を含む断片209-jが、(i、j)の全てに組み合わせについて得られる。なお、図1では、微粒子又はビーズ206-jの大きさを印で示し、例えば、206-1の大きさを印、206-9の大きさを印で示している

30

DNA断片種j毎に複製された断片209-jを鋳型とし、蛍光標識された共通プライマー208'(共通配列208にハイブリダイズする)を用いた相補鎖を合成して電気泳動を行ない、電気泳動パターンを比較することにより、複数のDNA検体201-iの間での注目する断片種(201-i-j(i=a、b、～、f;j=2、3、～、9))の存在比を知ることができる。

40

【0024】

図2に示すように、微粒子又はビーズをPCR反応液中に分散させているので、それぞれ異なる特異プライマー207-jを保持した微粒子又はビーズ206-jの周辺での有効な反応領域103-j(j=1、2、～、9)は相互に十分離れており、PCR生成物のDNA鎖は、2本鎖状から遊離して1本鎖になってもその近傍に存在するので、各微粒子又はビーズに近傍ほど濃度が高くなる。この状況を更に良く実現するため粘度の高い物質を共存させても良い。通プローブ208'だけをプライマーとして増幅される鎖も生じるが、微粒子又はビーズにトラップされたもの以外は反応後に洗浄除去するので実害はない

50

。

【0025】

図3は、実施例1に於いて、穴付きシート又はスリット付きシートを用いて微粒子又はビーズをサイズ毎に分取して、複数のDNA断片種を種類毎に分離分取する方法を示す図である。PCR後の反応液を溶媒で希釈し、フローさせながら穴付きシート105又はスリット付きシート105'を用いて微粒子又はビーズをサイズ毎に分取する。微粒子又はビーズサイズ分離用の穴109-j (j=1、2、～、9)の直径、あるいは、微粒子又はビーズサイズ分離用のスリット109'-j (j=1、2、～、9)の径は、微粒子又はビーズ206-jをそれぞれ通過可能な大きさを持つ。

【0026】

PCR後の反応液及び希釈液を、穴付きシート105又はスリット付きシート105'を傾斜させた状態で希釈液を左から右にフローさせながら、各穴109-j、又は各スリット109'-jを通過させて、サイズ分離された微粒子又はビーズ分画106-j (j=1、2、～、9)を得る。図1に示す、増幅されたDNA断片209-1、209-2、～、209-9は、分画106-1、106-2、～、106-9として分取される。なお、図2に示す微粒子又はビーズの直径の大きさは、微粒子又はビーズ206-2、206-1 (図1では、印で示す)、206-3、～、206-9 (図1では、印で示す)の順に大きくなっている。

【0027】

図4は、実施例1に於いて、微粒子又はビーズに代えて、特異プライマーをファイバーの表面に固定して、複数のDNA検体の各々に由来する複数のDNA断片種を同時にPCR増幅して、複数のDNA断片種を種類毎に分離分取する方法を説明する図である。図4に示す構成では、特異プライマー-j (j=1、2、～、9)が種類毎に別々のファイバー408-j (j=1、2、～、9)の表面に固定されている。図2に示す構成に於いて、各微粒子又はビーズ206-j (j=1、2、～、9)に代えて、各特異プライマー207-jが固定された各ファイバー408-jが使用され、図2に示す反応容器101内の反応液に、各ファイバー408-jが浸されて、PCRが実行される。特異プライマー207-jは、ファイバー408-jの先端部及びその近傍の表面に固定される。ファイバーはプラスチック又はガラスから構成されるが、ファイバーに限らず一般に細い糸状の部材であれば良い。ファイバー等の糸状の部材は、ファイバーは容易にハンドリングできるの

【0028】

分別回収されるPCR産物を鋳型として、特異プライマーに相補な蛍光標識されたプライマーを用いた相補鎖を合成して電気泳動を行ない、電気泳動パターンを比較することにより、複数のDNA検体の間での注目する断片の存在比を知ることができる。

【0029】

(実施例2)

実施例1では、固定している特異プライマーの種類によらず微粒子又はビーズ(あるいは、ファイバー)は、まとめて1つの反応容器に入れた。実施例2では、反応容器をキャピラリーで構成し、微粒子又はビーズの表面に固定された特異プライマー(プローブ)の種類により微粒子又はビーズを区分けしてキャピラリー内に保持し、PCRを特異プライマーの種類毎に空間的に分離された状態で行なう方法を開示する。この方法では、プライマー同士の干渉を防止するとともに、PCR生成物が対応する特異プライマーを保持した微粒子又はビーズの近傍に局在するので効率のよい多成分PCRが行える。

【0030】

図5は、実施例2に於いて、特異プライマーが固定された微粒子又はビーズを特異プライマーの種類毎にキャピラリー内に区分けして保持しキャピラリー内で複数DNA断片種の同時PCRを行なう構成を示す図である。図5に示すように、内径220μmのキャピラリー505の中に、30μmの微粒子又はビーズ206-j (j=1、2、～、9)の各微粒子又はビーズが、ダミーの微粒子又はビーズ507を挟んで詰められている。微粒子

10

20

30

40

50

又はビーズ206-jには、j毎に異なる特異プライマー207-j(図示せず)が固定されている。

【0031】

特異プライマーは種類毎に、ダミーの微粒子又はビーズ507により区分けされている。ダミーの微粒子又はビーズ507として200 μ mの微粒子又はビーズを用いているので、特異プローブが固定された微粒子又はビーズ206-jはダミーの微粒子又はビーズ507をこえて混じり合わない。キャピラリー505の底部を図示しない150 μ m程度の孔を形成した膜を介して、キャピラリー保持容器506に保持して、キャピラリー505に、共通プライマーを含むPCR反応液及び鋳型DNAを入れてPCR増幅を行なう。PCR産物是对應する微粒子又はビーズが存在するキャピラリー内の位置に局在するので、
10 効率のよい増幅がそれぞれ空間的に分離された状態で行なわれる。PCR生成物はキャピラリーから順次取り出して使用できる。

【0032】

順次取り出され分別回収されるPCR生成物を、実施例1と同様にして電気泳動を行ない、複数のDNA検体の間での注目する断片の存在比を知ることができる。

【0033】

(実施例3)

実施例3は、特異プローブを表面に固定した微粒子又はビーズを特異プローブの種類毎に区分けされたホルダー302のセル(穴状反応部)に入れ、反応液及び鋳型DNAを共通反応液として反応液保持板303から供給する方法である。各セルの間で溶液は通過可能
20 となっている。

【0034】

図6は、実施例3に於いて、特異プローブの種類毎に保持する穴状反応部を持つ短冊型アレーを用いた反応デバイスの構成を示す斜視図である。反応デバイスは、特異プローブ207-jが保持される穴状反応部301-j(j=1、2、~、9)が形成されたホルダー302と、共通プライマーを含むPCR反応液及び鋳型DNAを収納し、ホルダー302の下部側面テーパを挿入可能な楔形の凹部を持つ反応液保持板303とから構成される。ホルダー302は、内径0.2mmの穴の穴状反応部301-jを持つ短冊型リボンである。内径0.2mmの各穴301-jはホルダー302を貫通している。

【0035】

図6に示す構成例では、短冊型リボンの厚さ0.5mm、高さ4mm、横方向の長さ16mmの短冊型リボンを用いた。内径0.2mm、穴の長さ4つの穴は0.1mmの間隔を置いて開けられている。図6に示す例では、穴の数は9個であるが、もちろんもっと多くすることもできる。反応液保持板303の凹部に収納された反応液は、反応液保持板303の楔形の凹部にホルダー302の下部側面テーパが挿入された時に、各穴状反応部301-jに下部から供給される。この結果、特定のDNA断片種だけが選択的に各穴で増幅される。反応液保持板303の楔形の凹部に入れる反応液の量は20 μ L(マイクロリットル)程度で良く、この量は通常のPCRに用いる1回の反応液量と変わらないので、1つの反応当たりの試薬量を約20分の1にできる。以下、特異プローブの種類毎に穴状反応部に保持する方法について具体的に説明する。
30

【0036】

図7は、図6に示す短冊型アレー(ホルダー302)の各穴状反応部に特異プローブを固定した微粒子又はビーズを特異プローブの種類毎に収納する構成を示す断面図、図8は、図6に示す短冊型アレーの各穴状反応部の内壁に特異プローブの種類毎に固定する構成を示す断面図、図9は、図6に示す短冊型アレーの各穴状反応部に特異プローブを固定したファイバーを特異プローブの種類毎に収納する構成を示す断面図である。
40

【0037】

図7の構成では、各穴状反応部301-jに、特異プローブ207-jを固定した微粒子又はビーズ206-jを特異プローブ207-j(図示せず)の種類毎に収納する(実施例3では、j=1、2、~、9)。図7に示す構成では、微粒又はビーズ206-jの径
50

は、jによらず一定として良い（もちろん、jによって異なっても良い）。図7の構成に於いて、図5に示す構成のように、j（実施例3では、j = 1、2、～、9）毎に異なる特異プライマー207-j（図示せず）が固定されている微粒子又はビーズ206-jを、特異プライマーは種類毎に、ダミーの微粒子又はビーズ507により区分けして、同一の穴状反応部301-jに収納しても良い。なお、ホルダー302の底部を図示しない微粒子又はビーズ206-jを通過しない程度の孔を形成した膜を介して、反応液保持板303にセットする。

【0038】

図8の構成では、各穴状反応部301-jの内壁に、特異プローブ207-jの種類毎に固定する（実施例3では、j = 1、2、～、9）。図9の構成では、各穴状反応部301-jに、特異プローブ207-jを固定したファイバー408-jを特異プローブ207-jの種類毎に収納する（実施例3では、j = 1、2、～、9）。各穴状反応部301-jの穴の内径は、キャピラリー電気泳動で用いるキャピラリーの寸法より大きくしている。PCR後に、各穴状反応部301-j毎で、PCR生成物を鋳型として、特異プローブ207-jに相補な蛍光標識されたプライマーを用いた相補鎖を合成し後に、電気泳動用のキャピラリーに導入して（図12を参照）、キャピラリー電気泳動を行ない電気泳動パターンを比較することにより、複数のDNA検体の間での注目する断片の存在比を知ることができる。

【0039】

なお、以上説明した、図6～図9の構成では、各穴状反応部301-jを一次元に配置したが、ホルダー302、及び反応液保持板303の大きさを変化させて、二次元に各穴状反応部301-jを配置しても良いことは言までもない。これらの配置に特徴的なことは、反応液が反応液保持板に303に一括保持され、各反応セル（穴状反応部301-j）が反応液を介して連結している点にあり、タイタープレートに反応液を分割保持する場合と異なる。実施例3のメリットは、各反応セルに反応液を分配する必要がない点にもある。

【0040】

（実施例4）

図10は、実施例4に於いて、特異プローブを種類毎に保持する溝つきプレートを用いた反応デバイスの構成を示す斜視図である。図11は、図10の反応デバイスを構成する溝付きプレート404の平面図である。図12は、図10に於けるA-A'断面図である。図10に示す反応デバイスは、特異プローブ207-j（j = 1、2、～、9）が固定された微粒子又はビーズ206-j（j = 1、2、～、9）を保持する反応部407-j（j = 1、2、～、9）と、液流路用細溝406-j（j = 1、2、～、9）とが形成された溝付きプレート404と、共通プライマーを含むPCR反応液及び鋳型DNAを導入する反応液槽401と、PCR生成物を含む液を排出する反応液出口402-j（j = 1、2、～、9）とが形成された上部プレート403とから構成される。

【0041】

微粒子又はビーズ206-jの径は、jによらず一定としても良いし、変化させても良い。反応部407-jと液流路用細溝406-jとは1本の深さが異なる繋がった溝で構成され、反応部407-jは液流路用細溝406-jよりも深さが浅い溝で構成されている。深さの浅い一方の側の液流路用細溝406-jは反応液槽401と繋がり、深さの浅い他方の側の液流路用細溝406-jは反応液出口402-jに繋がっている。

【0042】

各反応部407-j、各液流路用細溝406-j、各反応液出口402-j、及び反応液槽401はそれぞれ、微細加工技術を用いて平板に形成されている。各反応液出口402-jの細孔の内径は、キャピラリー電気泳動で用いる泳動媒体501が充填されたキャピラリー500-j（j = 1、2、～、9）の寸法より大きくしている。

【0043】

PCR後に、反応液槽401に特異プローブ207-j（j = 1、2、～、9）の混合物を入れて、反応部407-j毎で、PCR生成物を鋳型として、特異プローブ207-j

10

20

30

40

50

に相補な蛍光標識されたプライマーを用いた相補鎖を合成し後に、電気泳動用のキャピラリーに導入して(図12を参照)、キャピラリー電気泳動を行ない電気泳動パターンを比較することにより、複数のDNA検体の間での注目する断片の存在比を知ることができる。

【0044】

(実施例5)

図13は、実施例5に於いて、比重に基づいて微粒子又はビーズを分別する構成を説明する断面図である。実施例1では微粒子又はビーズの分別を微粒子又はビーズのサイズで行なったが、プラスチック微粒子又はプラスチックビーズに金属類を混ぜ、比重を変えた微粒子又はビーズを用いて分別しても良い。即ち、径は同じであるが比重を変えたプラスチック微粒子又はプラスチックビーズの比重毎に対応させて、特異プライマーをプラスチック微粒子又はプラスチックビーズに固定して、実施例1を適用して得られたPCR生成物から、微粒子又はビーズを比重の差を検出して、分別回収することにより、DNA断片種毎のPCR生成物を分離分取する。

10

【0045】

PCR生成物を含む溶液中の塩濃度を変化させる等して溶液の比重を大きい方から小さい方へ順次変えていくと比重の大きい微粒子又はビーズから順に分別できる。コック付き反応容器600の内部で、比重差のある微粒子又はビーズを用いて、実施例1を実行してPCR完了後に、PCR増幅産物を含む溶液602の塩濃度を変化させて、溶液の比重を大きい方から小さい方へ順次変えて、オンオフコック601の開閉と溶液602の塩濃度の変化を組合わせて、比重の大きい微粒子又はビーズから順に分別して、微粒子又はビーズの比重毎に異なる容器603-j(j=1、2、~、9)に微粒子又はビーズを回収できる。

20

【0046】

分別回収されたPCR増幅産物は、実施例1と同様にして電気泳動を行ない、複数のDNA検体の間での注目する断片の存在比を知ることができる。

【0047】

(実施例6)

図14は、実施例6に於いて、微粒子又はビーズの色を光学的に識別して微粒子又はビーズを分別する構成を説明する断面図である。実施例1では微粒子又はビーズの分別を微粒子又はビーズのサイズで行なったが、微粒子又はビーズを種々の色で着色して光学的に識別できるようにしておき、微粒子又はビーズの色の差を検出して微粒子又はビーズを分別しても良い。即ち、径は同じであるが色を変えたプラスチック微粒子又はプラスチックビーズの色毎に対応させて特異プライマーをプラスチック微粒子又はプラスチックビーズに固定して、実施例1を適用して得られたPCR生成物から、微粒子又はビーズを色の差を利用することにより、DNA断片種毎のPCR生成物を分離分取する。分別対象となる微粒子又はビーズは混合状態で容器730に収納されている。

30

【0048】

PCR増幅産物を含む溶液604と共に微粒子又はビーズ206-j(j=1、2、~、9)を、吸引送流ポンプ605により吸引細管740に一定速度で吸引して送流細管750に一定速度で送り込む。送流細管750は、緩衝液606が入り口から流入し内部にシースフロー607が形成されるシースフローセル710に結合されている。微粒子又はビーズ206-jは、シースフロー607中に放出される。ビーズ206-jは、空間的に互いに隣の微粒子又はビーズと間隔をおいて、シースフローセル710の出口のキャピラリー中を緩衝液と一緒に流れる。シースフローセル710の出口のキャピラリーの先端近傍で、レーザー光源608からのレーザーを照射し、レーザー照射部を通過する各微粒子又はビーズ206-jからの反射光、あるいは、各微粒子又はビーズ206-jから発する蛍光(この場合、各微粒子又はビーズ206-jはそれぞれ異なる蛍光を発するように、蛍光体が混合されたプラスチックにより微粒子又はビーズが形成されている)を、レーザーの照射方向と交叉する方向から光検出器609によりモニターして、微粒子又はビーズ

40

50

の種類を認識する。

【0049】

キャピラリーの先端近傍の下方に配置したスリット付の静電噴霧電極700に電界を加えて、帯電した緩衝液の霧滴701、帯電した各微粒子又はビーズ206-jを噴霧する。静電噴霧電極700の下方に電界の強弱で方向を制御する方向制御板702を設けておく。制御器720は、各微粒子又はビーズ206-jから検出された反射光又は蛍光の情報により、各微粒子又はビーズ206-jの種類を識別し、各微粒子又はビーズ206-jを分取すべき分画セル705-j(j=1、2、～、9)を選択して、各微粒子又はビーズ206-jに付与すべき方向制御量の大きさを決定する。制御器720は、分画セル705-jを持つ分取容器706を搭載する分取容器移動台707の移動量及び移動方向を制御して、各微粒子又はビーズ206-jを異なる分画セル705-jに集めて回収する。制御器720は、各微粒子又はビーズ206-jから検出された反射光又は蛍光の情報により、各微粒子又はビーズ206-jの種類を識別すると共に、方向制御板702に印加する電界の大きさの制御及び分取容器移動台707の駆動を制御する。

10

【0050】

分別回収されたPCR増幅産物は、実施例1と同様にして電気泳動を行ない、複数のDNA検体の間での注目する断片の存在比を知ることができる。

【0051】

【発明の効果】

以上述べた様に本発明によれば、複数の検体にそれぞれ含まれる複数のDNA断片種を同じ条件下で同時にPCR増幅し、PCR産物をDNA断片種毎に分離して回収できる。このように一方のプライマーを互いに別々の微粒子又はビーズ、ファイバー等の固体担体の表面に固定することで、PCR生成物の分布を固体担体の表面近傍に局在化させる共に、複数のDNA断片種に特異に相補結合する特異的なプライマー同士の相互作用で生成する目的外のDNA産物の生成を防止できる。これにより複数の検体の各々に含まれる複数のDNA断片種の定量比較分析が可能となる。また、本発明の方法では、DNA試料調製の手間が省けると共に、反応試薬の大幅な低減が可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1に於いて、特異プライマーが固定された径の異なる微粒子又はビーズを用いて、複数のDNA断片種を同時にPCR増幅する方法を説明する図。

30

【図2】本発明の実施例1に於いて、特異プライマーが固定された径の異なる微粒子又はビーズを用いて、複数のDNA断片種の同時PCR増幅を模式的に示す図。

【図3】本発明の実施例1に於いて、穴付きシート又はスリット付きシートを用いて微粒子又はビーズをサイズ毎に分取して、複数のDNA断片種を種類毎に分離分取する方法を示す図。

【図4】本発明の実施例1に於いて、微粒子又はビーズに代えて、特異プライマーをファイバーにの表面に固定して、複数のDNA断片種を同時にPCR増幅して、複数のDNA断片種を種類毎に分離分取する方法を説明する図。

【図5】本発明の実施例2に於いて、特異プライマーが固定された微粒子又はビーズを特異プライマーの種類毎にキャピラリー内に区分けして保持しキャピラリー内で複数DNA断片種の同時PCRを行なう構成を示す図。

40

【図6】本発明の実施例3に於いて、特異プローブを種類毎に保持する穴状反応部を持つ短冊型アレーを用いた反応デバイスの構成を示す斜視図である。

【図7】本発明の図6に示す短冊型アレーの各穴状反応部に特異プローブを固定した微粒子又はビーズを特異プローブの種類毎に収納する構成を示す断面図である。

【図8】本発明の図6に示す短冊型アレーの各穴状反応部の内壁に特異プローブの種類毎に固定する構成を示す断面図である。

【図9】本発明の図6に示す短冊型アレーの各穴状反応部に特異プローブを固定したファイバーを特異プローブの種類毎に収納する構成を示す断面図である。

【図10】本発明の実施例4に於いて、特異プローブを種類毎に保持する溝きプレート

50

用いた反応デバイスの構成を示す斜視図。

【図11】本発明の図10の反応デバイスを構成する溝付きプレートの平面図。

【図12】本発明の図10に於けるA - A'断面図。

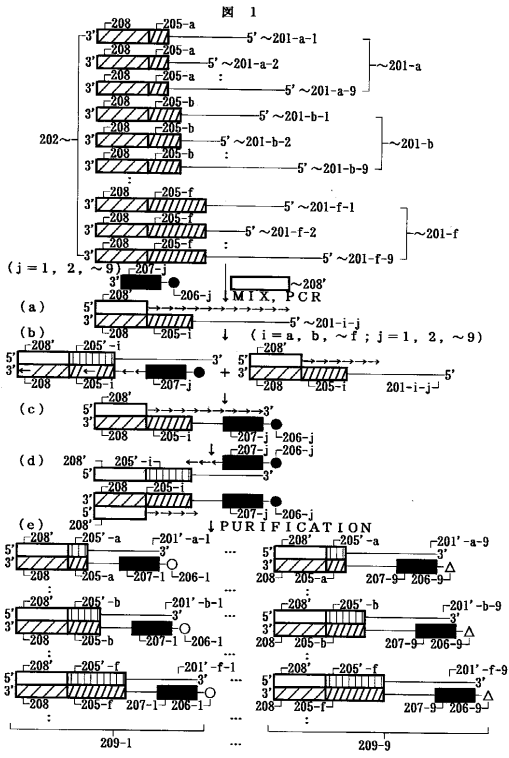
【図13】本発明の実施例5に於いて、比重に基づいて微粒子又はビーズを分別する構成を説明する断面図。

【図14】本発明の実施例6に於いて、微粒子又はビーズの色を光学的に識別して微粒子又はビーズを分別する構成を説明する断面図。

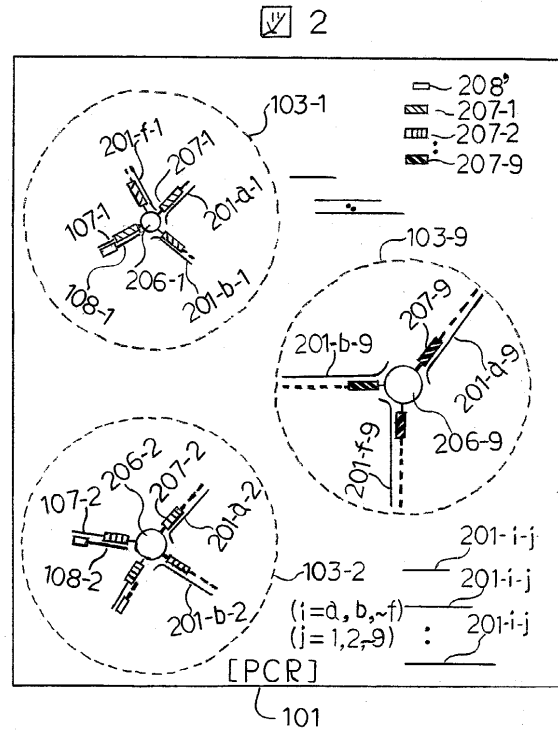
【符号の説明】

101...反応容器、103-j(j=1、2、～、9)...有効な反応領域、105...サイズ分離穴付きプレート、105'...サイズ分離スリット付きプレート、106-1、106-2、～、106-9...サイズ分離された微粒子又はビーズ、107-1、107-2...微粒子又はビーズの表面に固定された特異プライマーの伸長鎖、108-1、108-2...微粒子又はビーズに固定化された伸長DNAにハイブリダイズした共通プローブの伸張鎖、109-j(j=1、2、～、9)...微粒子又はビーズサイズ分離用の穴の直径、109'-j(j=1、2、～、9)...微粒子又はビーズサイズ分離用のスリットの径、201-i(i=a、b、～、f)...DNA検体-i、201-i-j(i=a、b、～、f;j=1、2、～、9)...DNA検体-iに由来するDNA断片種-j、202...複数のDNA検体に由来する複数のDNA断片種、201'-i-j(i=a、b、～、f;j=1、2、～、9)...複数のDNA検体の各々に由来する複数のDNA断片種の複製、203-j(j=1、2、～、9)...各DNA検体に由来するDNA断片種-j(注目するDNA断片種-j)の固有配列部分、205-i(i=a、b、～、f)...DNA検体-iに由来するDNA断片を識別するための識別配列、205'-i(i=a、b、～、f)...識別配列205に相補な配列、206-j(j=1、2、～、9)...特異プライマ-jが固定された微粒子又はビーズ-j、207-j(j=1、2、～、9)...特異プライマ-j、208...各DNA断片に共通な既知配列、208'...遊離した共通プライマー、209-j(j=1、2、～、9)...特異プライマ-jと遊離した共通プライマーにより増幅されたDNA断片、301-j(j=1、2、～、9)...特異プローブ-jが保持される穴状反応部、302...ホルダー、303...反応液保持板、401...反応液槽、402-j(j=1、2、～、9)...反応液出口、403...上部プレート、404...溝付きプレート、406-j(j=1、2、～、9)...液流路用細溝、407-j(j=1、2、～、9)...微粒子又はビーズを保持する反応部、408-j(j=1、2、～、9)...特異プライマ-jが固定されたファイバー-j、500-j(j=1、2、～、9)...電気泳動用キャピラリー-j、501...泳動媒体、505...キャピラリー、506...キャピラリー保持容器、508...ダミーの微粒子又はビーズ、600...コック付き反応容器、601...オンオフコック、602...PCR増幅産物を含む溶液、603-j(j=1、2、～、9)...容器、604...PCR増幅産物を含む溶液、605...吸引送流ポンプ、606...緩衝液、607...シースフロー、608...光源、609...光検出器、700...静電噴霧電極、701...緩衝液の霧滴、702...方向制御板、705-j(j=1、2、～、9)...分画セル、706...分取容器、707...分取容器移動台、710...シースフローセル、720...制御器、730...容器、740...吸引細管、750...送流細管。

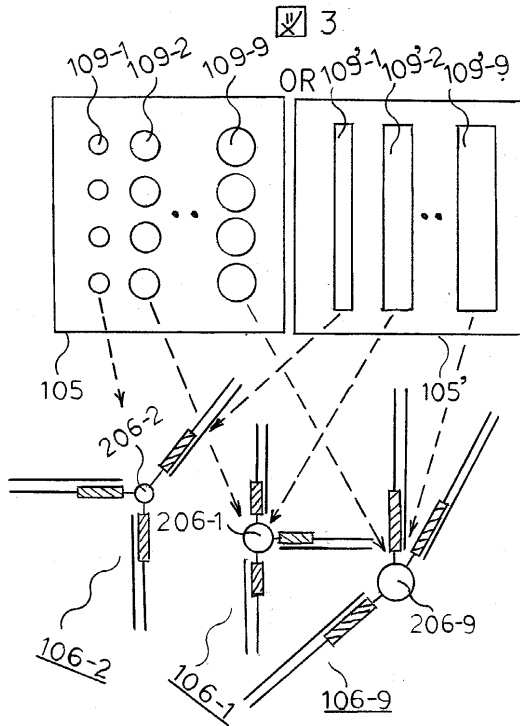
【 図 1 】



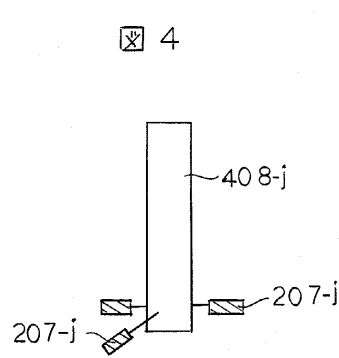
【 図 2 】



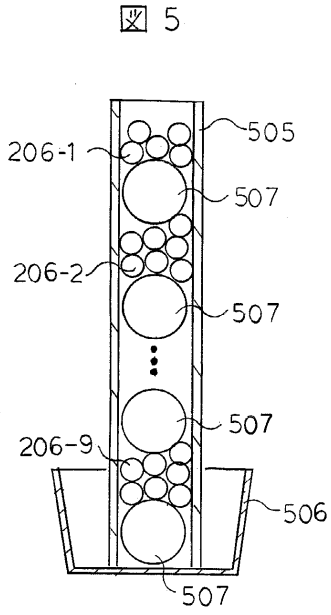
【 図 3 】



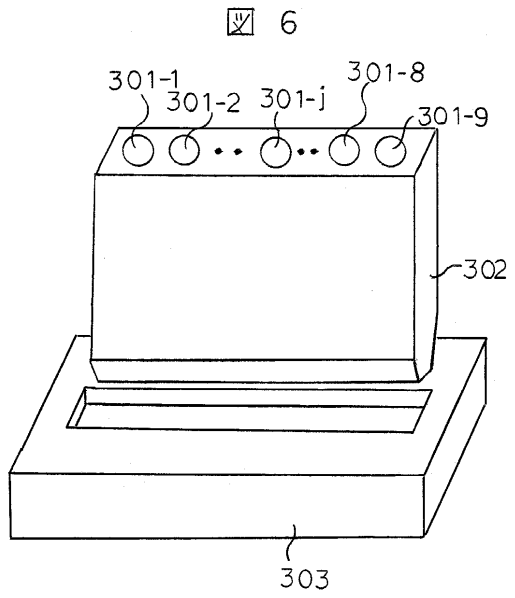
【 図 4 】



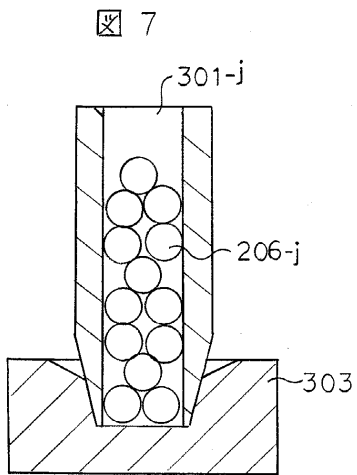
【図5】



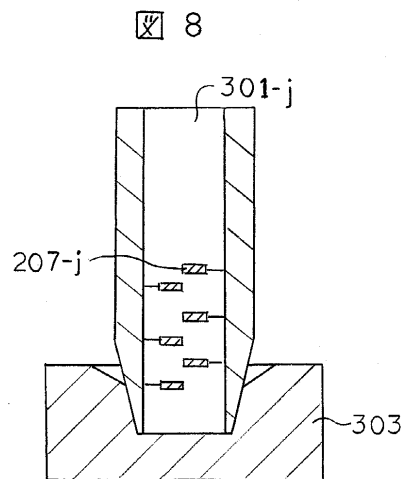
【図6】



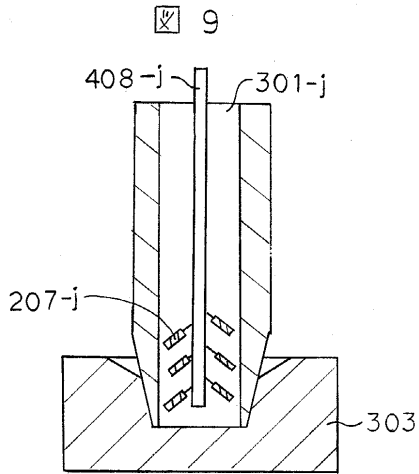
【図7】



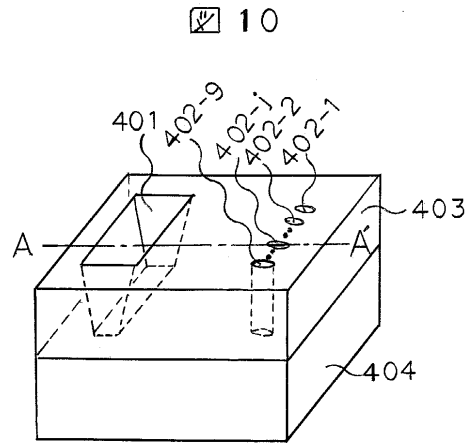
【図8】



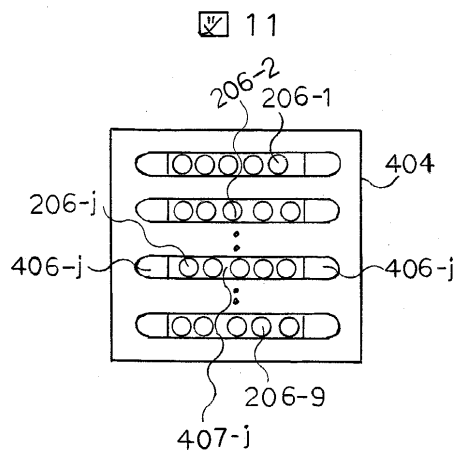
【図 9】



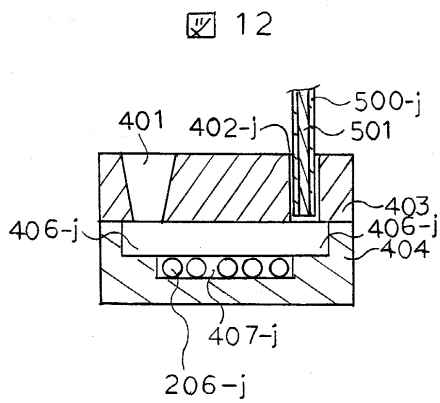
【図 10】



【図 11】

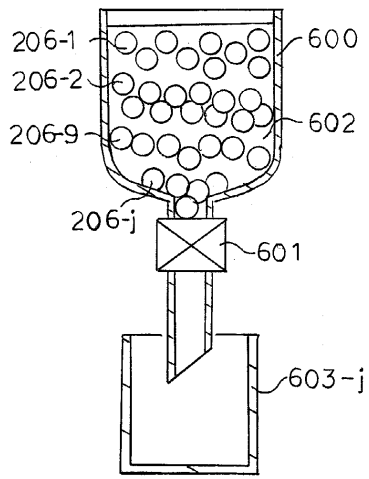


【図 12】



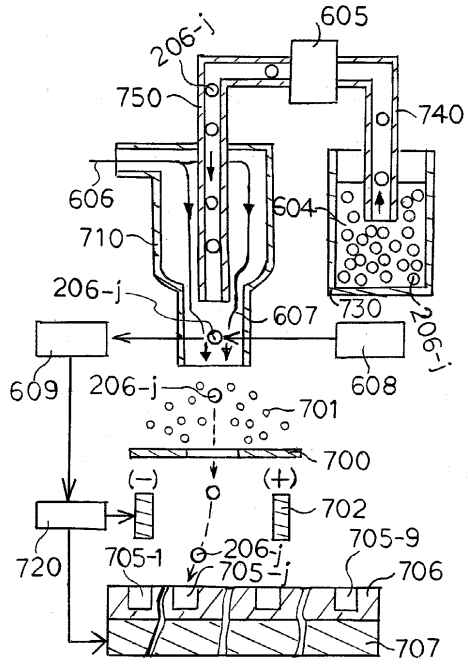
【図13】

13



【図14】

14



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平07-075599(JP,A)

乾幸治 他, 蛍光標識プライマーを用いたDMD/BMD患者、保因者診断, 平成9年度 厚生省精神・神経疾患研究委託費による研究報告集(2年度班・初年度班), 国立精神・神経センター, 1998年12月15日, 146頁

Nucleic Acids Res. 1997 Vol.25, No.22, p.4694-4696

コンビナトリアルケミストリー - 入門から応用まで -, 化学同人, 1997年 4月10日, 8-11, 46頁

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

G01N 33/50

PubMed

JSTPlus(JDream2)

JMEDPlus(JDream2)

医学・薬学予稿集全文データベース