

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-545984
(P2008-545984A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 I O 2	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-515270 (P2008-515270)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月27日 (2006.4.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月8日 (2008.2.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2006/001550
 (87) 国際公開番号 W02006/131687
 (87) 国際公開日 平成18年12月14日 (2006.12.14)
 (31) 優先権主張番号 0511717.1
 (32) 優先日 平成17年6月9日 (2005.6.9)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

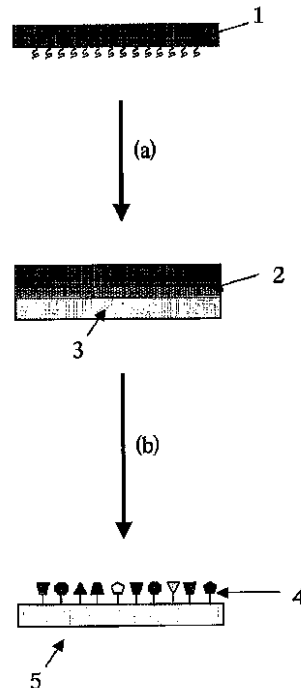
(71) 出願人 507404514
 バブラハム・インスティテュート
 BABRAHAM INSTITUTE
 英国シービー22・3エイティ、ケンブリ
 ッジ、バブラハム・リサーチ・キャンパス
 、バブラハム・ホール
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 繰り返し調製可能なタンパク質アレイ

(57) 【要約】

本発明は、担体表面(1)上の核酸アレイから対応するタンパク質アレイ(5)を別の表面(3)上に作製する方法、その方法から作製されたタンパク質アレイ、そのアレイとされたタンパク質と他の分子との相互作用を同定する際のタンパク質アレイの使用、およびそのタンパク質アレイを作製するためのキットに関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

タンパク質アレイを作製する方法であって、第 1 の担体表面上の核酸アレイを、転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系に曝すことにより、その核酸アレイから発現されたタンパク質が第 2 の担体表面上に対応するアレイとして固定化されることを含み、第 2 の担体表面が直接または間接的に第 1 の担体表面と接触することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記の間接的接触が、第 1 と第 2 の担体表面の間に配置されたタンパク質浸透性物質によって成される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

タンパク質浸透性物質が膜である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

タンパク質浸透性物質が、第 1 と第 2 の担体表面の間で自由なタンパク質拡散が可能となる開口部を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

タンパク質浸透性物質が、転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を含有する、請求項 2 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

無細胞系が、大腸菌、ウサギ網状赤血球およびコムギ胚芽のような原核または真核系から選択される無細胞ライセートである、前記請求項のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

第 1 および第 2 の担体表面が、ガラス、プラスチック、ナイロンまたは他のタイプの膜である、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

核酸アレイが、ゲノムDNA、クローニングDNAフラグメント、プラスミドDNA、cDNAライブラリー、PCR産物、合成オリゴヌクレオチドまたはmRNAを含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

第 2 の担体表面が、発現されたタンパク質または発現されたタンパク質上に存在する固定化タグのいずれかに、共有結合または非共有結合的に結合するよう構成されたタンパク質固定剤で予めコーティングされている、前記請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 10】

第 2 の担体表面が、発現されたタンパク質に共有結合または非共有結合的に結合するよう構成された抗体などのタンパク質固定剤で予めコーティングされている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

固定化タグがヘキサヒスチジンのようなポリヒスチジン配列であり、タンパク質固定剤がNi-NTAなどのキレート化剤である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

固定化タグがペプチド、ドメインまたはタンパク質であり、タンパク質固定剤が該タグに特異的な抗体である、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 13】

固定化タグがビオチンであり、タンパク質固定剤がビオチン結合分子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

ビオチン結合分子がアビジンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

タンパク質アレイを作製する、以下を含む方法：

(i) 無細胞系による転写および翻訳が可能なタンパク質コードDNA分子を、第 1 の担体

50

表面上に固定化する；および

(ii) 転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を担持するタンパク質浸透性物質を、第1の担体表面とタンパク質固定剤を担持する第2の担体表面との間に配置する；ことにより

(iii) 該DNA分子から発現されたタンパク質がそれらが形成されると第2のタンパク質固定化担体表面上に固定化されるようにして、対応するタンパク質アレイを作製する。

【請求項16】

タンパク質アレイを作製する、以下を含む方法：

(i) 無細胞系による転写および翻訳が可能なタンパク質コードDNA分子を、第1の担体表面上に固定化する；

(ii) 転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を、第1の担体表面にアプライする；および

(iii) 第1の担体表面をタンパク質固定剤を担持する第2の担体表面に接触するように配置する；ことにより

(iv) 該DNA分子から発現されたタンパク質がそれらが形成されると第2のタンパク質固定化担体表面上に固定化されるようにして、対応するタンパク質アレイを作製する。

【請求項17】

無細胞系が、アレイとされたタンパク質と相互作用する追加物質、または該相互作用する追加物質をコードする物質を含有する、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】

前記の相互作用する追加物質をコードする物質が、無細胞系による転写および/またはタンパク質への翻訳が可能な核酸を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

無細胞系が、アレイとされたタンパク質に修飾を行う追加物質を含有する、請求項15または16に記載の方法。

【請求項20】

前記追加物質が、翻訳時もしくは翻訳後修飾、蛍光基のような非天然もしくは化学修飾アミノ酸、を生ぜしめる生体分子または分子を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記追加物質が、1以上のタンパク質折り畳み促進剤を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

アレイとされたタンパク質と1以上の分子との間の相互作用を同定する、以下を含む方法：

(i) 無細胞系による転写および翻訳が可能なタンパク質コードDNA分子を、第1の担体表面上に固定化する；

(ii) 転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を担持し、かつ前記1以上の分子を含有するタンパク質浸透性物質を、第1の担体表面とタンパク質固定剤を担持する第2の担体表面との間に配置する；ことにより

(iii) 該DNA分子から発現されたタンパク質がそれらが形成されると第2のタンパク質固定化担体表面上に固定化されるようにして、対応するタンパク質アレイを作製する；および

(iv) アレイとされたタンパク質と前記1以上の分子との相互作用をタンパク質アレイ上で検出し得る。

【請求項23】

前記の1以上の分子が、抗体、他のタンパク質もしくはドメイン、ペプチド、低分子量要素もしくはリガンド、細胞抽出物または核酸から選択される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記核酸が、タンパク質アレイと相互作用するための1以上の可溶性タンパク質の合成

10

20

30

40

50

を導くことができる、遊離のDNAまたはmRNAを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

アレイとされたタンパク質と 1 以上のさらなるタンパク質との相互作用を同定するための方法であって、請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載されているようにタンパク質アレイを作製することを含み、前記核酸アレイに複数の異なる核酸分子を共にスポットする方法。

【請求項 2 6】

担体表面上に位置する核酸アレイテンプレートから無細胞タンパク質合成によって別の担体表面上に作製された対応するタンパク質アレイであって、第 2 の担体表面が直接または間接的に第 1 の担体表面と接触することを特徴とするタンパク質アレイ。

10

【請求項 2 7】

抗体、他のタンパク質もしくはドメイン、ペプチド、低分子量要素もしくはリガンド、細胞抽出物または核酸から選択される 1 以上の分子とアレイとされたタンパク質との相互作用を同定するための、請求項 2 6 に記載のタンパク質アレイの使用。

【請求項 2 8】

ファージディスプレイまたはリボソームディスプレイライブラリーのようなライブラリーに掲示された他の分子とアレイとされたタンパク質との相互作用を同定するための、請求項 2 6 に記載のタンパク質アレイの使用。

【請求項 2 9】

リボソームディスプレイライブラリーが、アレイとされたタンパク質の合成に用いた無細胞系内に取り入れたDNAから生成される、請求項 2 8 に記載のタンパク質アレイの使用。

20

【請求項 3 0】

細胞発現プロファイルを研究するための、請求項 2 6 に記載のタンパク質アレイの使用。

【請求項 3 1】

細胞タンパク質の翻訳後修飾を研究するための、請求項 2 6 に記載のタンパク質アレイの使用。

【請求項 3 2】

タンパク質アレイを作製するための、以下を含むキット：

30

(i) タンパク質をコードするDNA分子をその上に固定化するのに適している、第 1 の担体表面；および

(ii) タンパク質固定剤をその上に固定化するのに適している、第 2 の担体表面、ここで、第 1 と第 2 の担体表面は互いが直接または間接的に接触できるように構成されている。

【請求項 3 3】

転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系をさらに含む、請求項 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記の無細胞系を第 1 の担体表面に輸送するためのマイクロ流体チャネリング系をさらに含む、請求項 3 2 または 3 3 に記載のキット。

40

【請求項 3 5】

第 1 の担体表面が第 2 の担体表面と確実に接触し続けるようにするための固定手段をさらに含む、請求項 3 2 から 3 4 のいずれかに記載のキット。

【請求項 3 6】

第 1 と第 2 の担体表面の間に配置するべき、請求項 3 から 5 のいずれかに記載のタンパク質浸透性物質をさらに含む、請求項 3 2 から 3 5 のいずれかに記載のキット。

【請求項 3 7】

請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の方法によって前記キットを使用するための説明書をさらに含む、3 2 から 3 6 のいずれかに記載のキット。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一方の担体表面上の核酸アレイから別の表面上に対応するタンパク質アレイを作製する方法、その方法によって作製されたタンパク質アレイ、そのアレイとされたタンパク質と他の分子との相互作用を同定する際のそのタンパク質アレイの使用、およびそのタンパク質アレイを作製するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

アレイは正確に並べられた要素の配列であり、これにより要素を平行に陳列し試験することが可能となる(Emili, A. Q. and Cagney, G. (2000) *Nature Biotechnology* 18, 393-397)。アレイには通常、個々の種の分子または粒子のセットが規則正しい格子状の型式に配列されて含まれており、ここでアレイを利用して、アプライされた第2の分子または粒子のセットとの相互作用を認識または選択に基づいて検出することができる。

10

【0003】

アレイは、複数のサンプルを取扱って調査する際に有利である。アレイでは各要素に固定位置が与えられているので、アッセイにおける陽性スコアを即座に同定でき、網羅的かつ高密度にすることが可能で、また高処理ロボット操作により少量の試薬を用いて作製およびスクリーニングすることができ、各アッセイ値を多数の同一アッセイの結果と比較することが可能である。

20

【0004】

アレイの型式は核酸の包括的な分析のためによく確立されており、オリゴヌクレオチドおよびcDNAアレイ(DNAチップ)は遺伝子発現分析に利用される。よく知られている型式においては、多数の(例えば何千の)DNAハイブリダイゼーションプローブが、ナイロン、ガラスまたはシリコンなどの表面に秩序だったパターンで付着しており、蛍光標識化された全細胞mRNAまたはcDNAがハイブリダイズする;各アレイ要素の定量的シグナルを読み取り装置によって平行に測定する。

【0005】

アレイによるアプローチはペプチドおよびタンパク質ディスプレイに適用することもできる;ディスプレイされる要素は関連するタンパク質もしくはペプチドのセット、または生物の全タンパク質補体であり得る。タンパク質アレイ技術により、遺伝子発現および分子相互作用のハイスループットスクリーニングが可能となる。タンパク質アレイを用いて、DNA配列のみが以前から知られている何千ものタンパク質の機能を平行に調べることが可能である。

30

【0006】

タンパク質アレイの既知の使用例には、抗体の同定、抗体特異性の分析、包括的タンパク質発現プロファイリングの測定、バイオマーカーの同定と定量、リガンド-レセプター相互作用の同定、タンパク質修飾およびタンパク質-タンパク質相互作用の検出、およびライブラリーからのタンパク質またはリガンドのスクリーニングおよび選択などがある(Michaud, G. A. and Snyder, M. (2002) *BioTechniques* 33, 1308-13161)。

40

【0007】

従って、タンパク質アレイは大規模な平行したタンパク質分析のための強力なプロテオミクス手段であり、タンパク質活性および相互作用のハイスループットスクリーニングに適用できる。タンパク質アレイは様々な起源のタンパク質を利用できるという利点があり、細菌、酵母、バキュロウイルスまたは無細胞系から発現される組換えタンパク質を固定化してしばしば作製される。それでもやはり、特にヒトなどの種におけるタンパク質の入手の難易度によって、しばしば生産が大いに妨げられる。さらに、DNAアレイとは異なり、タンパク質アレイはタンパク質が変質するため機能的に完全な状態で長期間保存するのは困難である。

【0008】

50

国際公開第02/14860号パンフレット(Discerna Limited)には、「タンパク質インサイチュアレイ」(PISA)法が記載されており、そこでは遊離または固定化PCR DNAを含むアレイ表面をテンプレートとして用いてウサギ網状赤血球抽出物のような無細胞系によるタンパク質合成を行い、そのタンパク質はタグ配列を通して、アレイ表面に予めコーティングされている捕獲試薬と結合し同時固定化される。

【0009】

国際公開第02/059601号パンフレット(Harvard大学の教授と研究者ら)には、DNAアレイテンプレートからタンパク質アレイを作製するための核酸プログラマブルタンパク質アレイ(NAPPA)が記載されており、そこではタンパク質捕獲抗体をコーティングしたガラススライド上にクローンプラスミドDNAが固定されている。無細胞転写/翻訳ライセートをその表面にアプライし、合成されたタンパク質を抗体によって捕獲する。これにより、そのタンパク質をコードするDNAの近傍にタンパク質が固定されるインサイチュアレイが創出される。

10

【0010】

NAPPA法のアレイのスポットまたは位置には、プラスミドDNA、抗体および捕獲したタンパク質の混合物が含まれる。この配置には、アレイとされたタンパク質と共に局在化するDNAとの間に干渉が生じ得るという潜在的に不利な点がある。このような干渉は検出過程で邪魔なシグナルを引き起こす可能性が高く、その結果擬陽性が生じ得る。さらに、NAPPA法は単一のDNAアレイ変換しかできないため、1回使用しただけで貴重なDNAアレイを廃棄しなければならない。

20

【発明の開示】

【0011】

従って、本発明の第1の局面によって、タンパク質アレイを作製する方法であって、第1の担体表面上の核酸アレイを、転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系に曝すことを含み、その核酸アレイから発現されたタンパク質が第2の担体表面上に対応するアレイとして固定化される方法を提供する。

【0012】

本発明の第2の局面によって、タンパク質アレイを作製する方法であって、第1の担体表面上の核酸アレイを、転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系に曝すことを含み、その核酸アレイから発現されたタンパク質が第2の担体表面上に対応するアレイとして固定化される方法であって、第2の担体表面が直接または間接的に第1の担体表面と接触することを特徴とする方法を提供する。

30

【0013】

タンパク質アレイを作製する既知の方法(例えばPISAやNAPPA)に対する本発明の利点の1つは、同じ核酸アレイテンプレートから複数コピーのタンパク質アレイを作製できることである。例えば、第1の担体表面上の核酸アレイは保存可能であり(DNAは安定な分子であり乾燥形態で無期限に保存可能であるため)、同じ核酸アレイの転写および翻訳を繰り返し行うことによってタンパク質アレイを必要に応じて「オン・デマンド」で作製できる。この配列により、種々のプローブを用いて繰り返しスクリーニングを行うことが容易になり、また保存中に起こり得る劣化および機能低下を避けることができる。この方法で必要に応じて作製したタンパク質は、その生来の立体構造および機能性を保持している可能性が高く、アレイ表面上で乾燥せずよく水分を含んでいる。従って、本発明は安定に配列タンパク質を調製する繰り返し可能な方法を提供する。

40

【0014】

PISAおよびNAPPA法に対する本発明のさらなる利点は、タンパク質アレイが核酸アレイとは別の表面に作製されることである。従って、単に第2の担体表面を取り外すだけで、タンパク質アレイは核酸アレイから簡単に取り去ることができる。こうして、「純粋な」タンパク質アレイが作製でき、共に局在化した核酸から起こり得るあらゆる干渉が回避される。

【0015】

50

PISA法に対する本発明のさらなる別の利点には、核酸アレイが高密度でプリントできアレイの型式内に密に平行にタンパク質を作製することが可能となるために、かなり小型化できることが含まれる。本発明はまた、直接または間接的に第1の担体表面と接触する核酸/抽出物の混合物を液体にて操作する必要がない。

【0016】

本発明の一態様において、タンパク質を捕獲する第2の担体表面は、核酸を担持する第1の担体表面と直接または間接的に接触している。直接に接触する方法は本明細書において表面接触法と記載する。これには、第1の担体表面(例えば膜)を第2の担体表面(例えばガラスまたは第2の膜)と接触させる前に、第1の担体表面に転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系をアプライすることが必要である。

10

【0017】

もう1つの方法である間接的接触は、タンパク質浸透性物質(膜など)を第1と第2の担体表面の間に置くことによって為し得る。この方法は本明細書においてサンドイッチ法と記載する。

【0018】

サンドイッチ法は本発明の特定の一態様を構成する。

【0019】

タンパク質浸透性物質は、第1および第2の担体表面の間に置くことができ、かつ第1および第2の担体表面の間のタンパク質の自由な拡散を許容する、あらゆる剛性または半剛性物質であり得ると解されたい。一態様において、タンパク質浸透性物質は側方拡散を制限する空間またはチャネルを含む膜または他の物質である。さらなる態様において、その物質は、第1および第2のアレイ担体表面上の核酸およびタンパク質それぞれのスポットの位置に対応する開口部(例えば空間、穴またはチャネル)を含む。

20

【0020】

サンドイッチ法の利点の1つは、タンパク質浸透性物質が、転写または翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を含むことができることである。その無細胞系をタンパク質浸透性物質にアプライすると、そこでタンパク質合成が起こり、次いでタンパク質が拡散し、第2の担体表面上に固定化される。このように、無細胞系をアプライする工程を別に踏むのではなく、タンパク質浸透性物質を第1の担体表面上に置くことにより無細胞系をアプライする。

30

【0021】

一態様において、無細胞系は、原核もしくは真核系(大腸菌(*E. coli*)、ウサギ網状赤血球およびコムギ胚芽など)またはインビトロタンパク質合成が可能な人工構築系から選択される無細胞ライセートである。

【0022】

一態様において、第1および第2の担体表面は、ガラス、プラスチック、ナイロン、または他のタイプの膜であり、核酸の固定化を増強するために適用する別の被膜および/またはタンパク質固定剤を任意に有していてもよい。

【0023】

本明細書において核酸と記載する時は、転写および翻訳因子を含む無細胞系に曝した場合にインビトロタンパク質合成のテンプレートとなることが出来るあらゆる核酸部分を意味すると解されたい。一態様において、核酸アレイは、ゲノムDNA、クローニングDNAフラグメント、プラスミドDNA、cDNAライブラリー、PCR産物、合成オリゴヌクレオチドまたはmRNAを含む。インビトロ転写/翻訳のための核酸コンストラクトは、あらゆる既知のDNA配列(データベースやゲノムプロジェクトからのものなど)について設計されたプライマーを用いてPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)またはRT(逆転写)-PCR増幅によって得ることが出来る。核酸アレイがmRNAアレイを含む一態様において、タンパク質合成に用いる無細胞系は、翻訳のみのための非共役(uncoupled)無細胞系が適切である。

40

【0024】

本発明における核酸は、1以上の転写プロモーター、転写調節配列、非翻訳リーダー配

50

列、切断部位をコードする配列、組換え部分、転写ターミネーターまたはリボソーム侵入部位をさらに含み得る。本発明における核酸は、複数のシストロン（またはオープンリーディングフレーム）または、その存在量が定量化でき第2の担体表面上に固定化されたタンパク質の測定が可能となるレポータータンパク質をコードする配列をさらに含み得る。

【0025】

本発明のさらなる態様において、第2の担体表面は、発現されたタンパク質または発現されたタンパク質上に存在する固定化タグと結合（例えば共有結合または非共有結合的）するように構成されたタンパク質固定剤によって予めコーティングされている。

【0026】

一態様において、固定化タグはヘキサヒスチジンのようなポリヒスチジン配列であり、タンパク質固定剤はNi-NTAなどのキレート化剤である。さらなる一態様において、固定化タグはペプチド、ドメインまたはタンパク質であり、タンパク質固定剤はそのタグに特異的な抗体である。さらなる別の態様において、固定化タグはビオチンであり、タンパク質固定剤はビオチン結合分子（アビジンなど）である。

【0027】

本発明の一態様において、第2の担体表面は、発現されたタンパク質と結合（例えば共有結合または非共有結合的）するように構成されたタンパク質固定剤（例えば抗体）によって予めコーティングされている。

【0028】

本発明の第3の局面によって、タンパク質アレイを作製する、以下を含む方法を提供する：

(i) 無細胞系による転写および翻訳が可能なタンパク質コードDNA分子を、第1の担体表面上に固定化する；および

(ii) 転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を担持するタンパク質浸透性物質を、第1の担体表面とタンパク質固定剤を担持する第2の担体表面との間に配置する；ことにより

(iii) そのDNA分子から発現されたタンパク質がそれらが形成されると第2のタンパク質固定担体表面上に固定化されるようにして、対応するタンパク質アレイを作製する。

【0029】

本発明のさらなる局面によって、タンパク質アレイを作製する、以下を含む方法を提供する：

(i) 無細胞系による転写および翻訳が可能なタンパク質コードDNA分子を、第1の担体表面上に固定化する；

(ii) 転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を、第1の担体表面にアプラインする；および

(iii) 第1の担体表面をタンパク質固定剤を担持する第2の担体表面に接触するように配置する；ことにより

(iv) そのDNA分子から発現されたタンパク質がそれらが形成されると第2のタンパク質固定担体表面上に固定化されるようにして、対応するタンパク質アレイを作製する。

【0030】

無細胞系を使用することの利点は、外来性生体分子または分子によってタンパク質合成のコンディションを調整および制御できる環境が得られることである。これにより、翻訳時または翻訳後修飾を有するタンパク質、非天然または化学修飾アミノ酸（蛍光基など）のような修飾タンパク質の作製が可能となる。

【0031】

従って、本発明の一態様において、無細胞系は追加物質を含有する。

【0032】

一態様において、その追加物質は、アレイとされたタンパク質と相互作用する、またはその相互作用する追加物質をコードする（例えば無細胞系による転写および/またはタンパク質への翻訳が可能な核酸）。

10

20

30

40

50

【0033】

さらなる態様において、追加物質は、翻訳時または翻訳後修飾、非天然または化学修飾アミノ酸（蛍光基など）のような修飾を行うのに必要な生体分子または分子である。さらなる別の態様において、追加物質は、レポータータンパク質（酵素など。例えばガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、グルクロニダーゼまたは同種のもの）または蛍光タンパク質（例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼまたは同種のもの）である。追加物質を無細胞ライセートへ適切に加え、生じる配列タンパク質が翻訳時または固定化後に修飾されてそのタンパク質が素早く検出できるようにする。一態様において、追加物質は1以上のタンパク質折り畳み促進剤を含む。これらの促進剤によって、確実にアレイが正しく折り畳まれたタンパク質から構成されるという効果が得られる。

10

【0034】

本発明はまた、タンパク質と他の分子（タンパク質またはより小さな要素など）との相互作用を検出するのに用いることが出来る。そのような相互作用は、リン酸化、メチル化またはタンパク質分解を通して起こり得る。相互作用する可能性のある可溶性タンパク質をコードする核酸を無細胞系内に取り入れ、合成されアレイ上に固定化されたタンパク質と無細胞系により同時に合成された可溶性タンパク質との間で相互作用が起こるようにしてもよい。

【0035】

従って、本発明のさらなる局面によって、アレイとされたタンパク質と1以上の分子との間の相互作用を同定するための、以下を含む方法を提供する：

20

(i) 無細胞系による転写および翻訳が可能なタンパク質コードDNA分子を、第1の担体表面上に固定化する；

(ii) 転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系を担持し、かつ前記の1以上の分子を含有するタンパク質浸透性物質を、第1の担体表面とタンパク質固定剤を担持する第2の担体表面との間に配置する；ことにより

(iii) そのDNA分子から発現されたタンパク質がそれらが形成されると第2のタンパク質固定担体表面上に固定化されるようにして、対応するタンパク質アレイを作製する；および

(iv) アレイとされたタンパク質と前記の1以上の分子との相互作用をタンパク質アレイ上で検出し得る。

30

【0036】

本発明のこの態様は、タンパク質複合体をタンパク質アレイ上に局在化させてそこから相互作用パートナーを同定することができ、これによりタンパク質相互作用ネットワークの特性解析が可能となるという利点を有する。本発明のこの態様はまた、アレイとされたタンパク質との相互作用を抑制または増強する分子の同定にも用いることが出来ると理解されたい。

【0037】

本発明の一態様において、前記の1以上の分子は抗体、他のタンパク質もしくはドメイン、ペプチド、低分子量要素もしくはリガンド、細胞抽出物または核酸から選択される。

40

【0038】

一態様において、前記1以上の分子は、翻訳時または翻訳後にタンパク質アレイと相互作用するための1以上の可溶性タンパク質の合成を導くことができる、遊離のDNAまたはmRNAを含む。

【0039】

タンパク質 - タンパク質相互作用を調べるためのもう一つの態様では、複数の（例えば1より多い）異なる核酸分子を共にスポットし、それらのコードタンパク質の1つがタンパク質捕獲表面に固定化されるような核酸アレイを作製する。

【0040】

この態様では、各スポットからインサイチュ合成されたタンパク質を互いに相互作用さ

50

せることができる。それらが相互作用パートナーである場合、それらは捕獲表面上でタンパク質複合体として検出され、核酸アレイに基づいて同定することができる。

【0041】

アレイとされたタンパク質と分子（標識化したリガンド、タンパク質または核酸など）との間の相互作用を同定するためのさらなるもう一つの態様において、前記分子をタンパク質アレイに直接曝し、酵素結合反応、蛍光、オートラジオグラフィーまたは質量分析によって個々のアレイ位置への結合を検出することも可能である。このようにして、そのアレイを用いて、抗体、リガンドまたはタンパク質などとの相互作用を直接スクリーニングすることができる。本発明によって単一核酸アレイの同一コピーを多数作製できるため、そのようなスクリーニングは数回繰り返すことができる。さらに、そのアレイの型式を維持しつつ、そのタンパク質アレイ表面を抗原などの標的分子で予めコーティングしたフィルターまたはプレートに移し、標識化した第2の試薬によって結合を検出することもできる。

10

【0042】

本発明のさらなる局面によって、担体表面上に位置する核酸アレイテンプレートから無細胞タンパク質合成によって別の担体表面上に作製された対応するタンパク質アレイを提供する。一態様において、その担体表面はその別の担体表面と直接または間接的に接触している。

【0043】

本発明のさらなる局面によって、担体表面上に位置する核酸アレイテンプレートから無細胞タンパク質合成によって別の担体表面上に作製された対応するタンパク質アレイであって、その第2の担体表面が直接または間接的にその第1の担体表面と接触していることを特徴とするアレイを提供する。

20

【0044】

本発明のさらなる局面によって、抗体、他のタンパク質もしくはドメイン、ペプチド、低分子量要素もしくはリガンド、細胞抽出物または核酸から選択される1以上の分子とアレイとされたタンパク質との相互作用を同定するための、本明細書に記載のようなタンパク質アレイの使用を提供する。

【0045】

本発明のさらなる局面において、ライブラリー（ファージディスプレイまたはリボソームディスプレイライブラリーなど）に掲示された他の分子とアレイとされたタンパク質との相互作用を同定し、個々のタンパク質をコードDNAまたはmRNAと関連づけるための、本明細書に記載のようなタンパク質アレイの使用を提供する。一態様において、リボソームディスプレイライブラリーは、アレイとされたタンパク質の合成に用いた無細胞系内に取り入れたDNAから生成される。アレイへの結合の後、例えばクローニングファージを用いて、またはPCR、RT-PCR、ハイブリダイゼーションもしくは他の方法を用いて、関連するDNAまたはmRNAを増幅および同定することにより、相互作用分子を同定する。

30

【0046】

本発明のさらなる局面によって、細胞発現プロファイルを研究するための、本明細書に記載のようなタンパク質アレイの使用を提供する。

40

【0047】

本発明のさらなる局面によって、細胞タンパク質の翻訳後修飾を研究するための、本明細書に記載のようなタンパク質アレイの使用を提供する。

【0048】

本発明のさらなる局面によって、タンパク質アレイを作製するための以下を含むキットを提供する：

(i) タンパク質をコードするDNA分子をその上に固定化するのに適している、第1の担体表面；および

(ii) タンパク質固定剤をその上に固定化するのに適している、第2の担体表面。

【0049】

50

本発明のさらなる局面によって、タンパク質アレイを作製するための、以下を含むキットを提供する：

(i) タンパク質をコードするDNA分子をその上に固定化するのに適している、第1の担体表面；および

(ii) タンパク質固定剤をその上に固定化するのに適している、第2の担体表面、ここで、第1と第2の担体表面は互いが直接または間接的に接触できるように構成されている。

【0050】

本発明のこの局面の一態様において、そのキットは、転写および翻訳によるタンパク質合成が可能な無細胞系をさらに含む。

10

【0051】

本発明のこの局面のさらなる態様において、そのキットは、前記の無細胞系を第1の担体表面に輸送するためのマイクロ流体チャネリング系をさらに含む。

【0052】

本発明のこの局面のさらなる別の態様において、そのキットは、第1の担体表面と第2の担体表面とが確実に接触し続けるようにするための固定手段をさらに含む。

【0053】

本発明のこの局面のさらなる別の態様において、そのキットは、第1と第2の担体表面の間に配置するべき、本明細書に記載のようなタンパク質浸透性物質をさらに含む。

【0054】

本発明のこの局面のさらなる別の態様において、そのキットは、本明細書に記載のような方法に従ってキットを使用するための説明書をさらに含む。

20

【0055】

まず図1について言及すると、本発明の「サンドイッチ」態様には、第1と第2の担体表面（例えばガラススライド）の間に配置したタンパク質浸透性物質（例えばメンブランフィルター）内で起こる無細胞タンパク質合成が含まれる。第1の担体表面（DNAアレイ表面）1は、固定化DNA分子のアレイを担持し、一方、第2の担体表面3はタンパク質捕獲試薬でコーティングされている（タンパク質捕獲表面）。メンブランフィルター2は、無細胞抽出物を保持することに加え、タンパク質の側方拡散を制限するように機能し得る。そのフィルターはタンパク質合成のための共役(coupled)無細胞ライセートに予め浸され；これらはインビトロタンパク質合成に標準的に用いられる大腸菌、ウサギ網状赤血球またはコムギ胚芽抽出物であり得る。工程(a)は、DNAアレイ表面1、メンブランフィルター2およびタンパク質捕獲表面3を集合させ組み合わせることを含む。工程(b)は、無細胞タンパク質発現および固定化（一般的に1 - 2時間かかり得る）を含む。個々のDNA分子はタンパク質4の合成を導き、次いでそのタンパク質はフィルターを通して第2の担体表面3に拡散し、そこで捕獲試薬との相互反応を通じてインサイチュに固定化される。膜平面内でのタンパク質の拡散は記載の条件下で制限されるので、タンパク質アレイ5上のタンパク質スポットの位置はDNAアレイ上の位置と相補的であり、これによりタンパク質の同定の準備が整う。

30

【0056】

図2は、本発明の「表面接触」態様を図解しており、第1の担体表面6（例えば、核酸検出用に設計されたハイブリダイゼーション膜などの膜表面）上にアレイとして固定化されたDNA分子を含む。このDNAアレイはタンパク質合成成分7を含有する無細胞抽出物に浸され、工程(a)は、第1の担体表面6を、タンパク質捕獲試薬で予めコーティングした第2のタンパク質固定化担体表面3（例えばガラススライドまたは膜）に直接接触させることを含む。工程(b)は、無細胞タンパク質合成および固定化（一般に1 - 2時間）を含み、これは膜とタンパク質固定化表面の間の境界で起こるもので、タンパク質4は上記サンドイッチ法に記載のようにタンパク質アレイ5として固定化される。

40

【実施例】

【0057】

50

材料と方法

1. 材料

オリゴヌクレオチドプライマー (RTST7/B: 5' -GATCTCGATCCCGCG-3'、Cy5結合RTST7/B: 5' Cy5-GATCTCGATCCCGCG-3' およびNH₂結合ターミネーター/F: 5' NH₂-AAAACCCCTCAAGACCCG-3') をSigma-Genosys (UK) から入手した。GFPをコードするプラスミドをRoche(UK) から入手した。Nexterion (商標) スライドH (ハイドロゲルコーティング) およびNexterion (商標) スライドE (エポキシシランコーティング) をSCHOTT Nexterionから入手した。ポリヒスチジン結合のためにニッケルキレートでコーティングしたスライドをXENOPOREから入手した。ウサギ網状赤血球ライセートTNTをPromegaから入手し、大腸菌(E. coli) S30抽出物は周知の方法によって合成するか、またはRoche (UK) から購入した。タンパク質コーティングのためのMaxisorp (商標) スライドはNunc (UK) から入手した。

10

【 0 0 5 8 】

2. 方法

2.1 DNA固定化のためのPCRコンストラクト

標準的PCR法を用いて無細胞タンパク質合成のためのPCRコンストラクトを作製した。タンパク質の固定化のために、標的タンパク質のC末端に二重(His)₆タグを融合させた(国際公開第02/14860号パンフレット)。DNAフラグメントの標識化は、必要な化学基を有する修飾プライマーを用いてPCRにより行った。DNA固定化のために、5'末端をアミノ(NH₂)基で標識化した3'プライマー(NH₂結合ターミネーター/F、材料を参照)を用いた。DNA検出および固定化の両方のために、Cy5結合プライマーRTST7/BおよびNH₂結合ターミネーター/Fを用いた。30サイクル後、アガロースゲル電気泳動によって標識化PCR産物を分析し、Gene-Elute PCRクリーンアップキット(Sigma)を用いて過剰な3'プライマーを除去して精製した。Duraporeメンブランフィルター(0.22 μm)はMillipore (UK) から入手した。

20

【 0 0 5 9 】

2.2 DNAの固定化

DNAのガラススライド上への固定化は、Nexterion (商標) スライドHまたはNexterion (商標) スライドEのいずれかを用い、メーカーの説明書に若干の変更を加えて行った。簡潔に説明すると、Nexterion (商標) スライドHにおいては、NH₂標識化PCRフラグメント(100-200ng/μl)を6xプリンティングバッファー(300mMリン酸ナトリウムpH 8.5)と5:1 (PCRフラグメント:6xプリンティングバッファー)の割合で混合した。次いで混合物をガラススライド上にスポットし、箱形加湿室で室温で一晩インキュベートした。Nexterion (商標) スライドHにおいては、スライドをブロッキング溶液(0.1M Tris-HCl、50mMエタノールアミン、pH9.0)に室温で1時間浸してブロックした。滅菌水で3回洗浄した後、スライドを200xgで5分間遠心分離して乾燥させ、4℃で保存した。Nexterion (商標) スライドEにおいては、上記のようにDNAをプリントした後、スライドを60℃で30分間インキュベートし、0.1%Triton X-100による5分間の洗浄を1回、1mM HClによる2分間の洗浄を2回、100mM KClによる10分間の洗浄を1回そして水による1分間の洗浄を1回行った。スライドをブロッキング溶液によって50℃で15分間ブロックし、水で1分間洗浄し、上記のように乾燥させ、4℃で保存した。

30

【 0 0 6 0 】

Hybond (商標) N+膜上にDNAを固定化するために、NH₂標識化または非標識化プラスミドDNAまたはPCRフラグメントをHybond (商標) N+膜の表面上にスポットした。短時間乾燥させた後、その膜を80℃で2時間インキュベートした;あるいは、UV架橋(自動架橋設定、120mJ/cm²、UV Stratalinker 3600)によって処理した。次いでその膜を乾燥させ4℃で保存した。

40

【 0 0 6 1 】

2.3 サンドイッチアレイ法

MilliporeのDuraporeメンブランフィルターを初めに大腸菌無細胞ライセートに浸した(1cm²につき25μlライセート)。次いで、それを2つの表面(DNAアレイスライドとタンパク質捕獲スライド)の間に配置し、その表面の間をしっかりと接触させた。30℃で(用

50

いた無細胞系に応じて) 1-4時間インキュベートした後、スライドを分離し、タンパク質捕獲表面を0.05% Tweenを含有するPBSで3回洗浄した。

【0062】

2.4 表面接触アレイ法

固定化DNAを担持するHybond (商標) N+膜(Amersham, UK)を、タンパク質捕獲試薬で予めコーティングした表面(例えば膜またはガラススライド)に接触するように配置した。そのDNAアレイを担持する膜の、DNAを被覆していない側の上に、共役無細胞ライセートを広げることによって、無細胞タンパク質合成を開始させた。密着させるために、Hybond (商標) 膜にガラススライドをかぶせ、第2の表面に押しつけた。無細胞タンパク質合成および固定化の条件は上記2.3の項目に記載した通りである。

10

【0063】

2.5 スライドのスキャンニング

Cy5およびCy3の検出はAffymetrix 428アレイスキャナーを用いて行った。画像解析はImage (商標) 4.0 (BioDiscovery, Inc.)で行った。

【0064】

実施例1: サンドイッチ法によるGFPアレイの作製

二重(His)₆タグを付加した野生型緑色蛍光タンパク質GFP (Roche)をコードするPCRフラグメントをNexterion (商標) スライドH上に固定化した。対照として、一本鎖V_H/K抗体フラグメントをコードするPCRフラグメントを同じスライド上に固定化した。Ni-NTAをコーティングしたスライドをタンパク質捕獲表面として用いた。大腸菌無細胞抽出物(Roche, UK)に予め浸しておいたメンブランフィルター(Millipore Durapore)をその2つの表面の間に挿入した。30℃で1.5時間インキュベートした後、Ni-NTAコーティングスライドを0.1% Tween 20を含有するPBSで3回洗浄した。スライドを、ビオチン化抗GFP抗体(Abcam, Cambridge, UK)(1:4000)、次いで西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)結合ストレプトアビジン(1:4000)を用いてプローブ探索した。チラミド(tyramide)-Cy3基質(PerkinElmer Life Science, UK)を用いて蛍光に基づく検出によりHRPを現像した。図3は抗GFPによるプローブ探索に次いで蛍光に基づく検出(Cy3)を行ったGFPアレイの結果を示す。レーンAは、固定化DNAパターンに対応するアレイとしてGFPが検出されたことを示すが、一方、対照のレーンBの一本鎖抗体フラグメント(V_H/K)は抗GFPについて陰性であった。

20

【0065】

実施例2: 同一DNAアレイを繰り返し用いてタンパク質アレイを作製することの実証

GFPプラスミドをテンプレートとし修飾プライマー(NH₂結合ターミネーター/FおよびCy5結合RTST7/B、材料を参照)を用いてPCRを行った。これにより一方の末端にNH₂基、もう一方の末端にCy5を有する標識化PCRフラグメントが生成された。実施例1に記載の方法を用いて、結合したNH₂基によってPCRフラグメントをNexterion (商標) スライドH上に固定化した。固定化したPCRフラグメントはCy5基を含有するので、スライド上でスキャンして検出することができ、その結果配列したDNAスポット(図4に特徴10として示す)が明らかになった。次いでDNAアレイを担持するスライドからサンドイッチ法を行ってGFPタンパク質アレイを作製し、実施例1のように抗GFP抗体を用いて検出した。図4は、得られたGFPアレイを示し(アレイAとして示す)、そのパターンはDNAアレイのパターンと非常によく似ている。DNAアレイの再利用を実証するために、同一DNAアレイをテンプレートとして用いてサンドイッチ法を繰り返した。これによりGFPアレイの第2および第3のコピーが作製され(それぞれ図4のアレイBおよびC)、この方法によって単一のDNAアレイテンプレートを繰り返し用いてタンパク質アレイが作製できることが確認された。

40

【0066】

実施例3: サンドイッチ法によるTIMP-1アレイの作製

二重(His)₆タグが付加されたTIMP-1(メタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤)をコードするPCRフラグメントをGFPについて記載したように作製した。実施例1に記載のようにDNAの固定化を行い、Ni-NTAでコーティングしたスライドを用いてタンパク質を捕獲した。サンドイッチアレイ法を30℃で4時間インキュベートして行った後、Ni-NTAスライドを抗H

50

is抗体(1:4000)(Sigma, UK)でプローブ探索した。その結果は、TIMP-1がDNAアレイと同じアレイパターンで検出されたことを示している(図5のアレイ11を参照)。

【0067】

実施例4: サンドイッチ法による、リガンド(MMP-2)コーティングスライド上へのタンパク質アレイの作製。

TIMP-1のリガンドであるマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP-2)を用いて、Nunc Maxisorp(商標)スライド(3 μ g/ml)をメーカーの説明書に従いコーティングした。このリガンドコーティング表面を用いて、DNAアレイから合成されたTIMP-1を捕獲した。この方法において、その特異的リガンド結合活性を有するタンパク質のみが検出され、機能的結合活性および特異性の直接スクリーニングが可能となる。二重(His)₆タグ付加GFPを陰性対照として用いた。サンドイッチアレイ法を4時間インキュベートして行った後、MMP-2コーティングスライドを抗His抗体によってプローブ探索した。図6は、抗His抗体によるプローブ探索に次いで蛍光の基づく検出(Cy3)を行ったTIMP-1アレイの結果を示す。レーンBはTIMP-1が固定化DNAのパターンに対応するアレイとして強く検出されたことを示すが、一方、レーンAの二重(His)₆タグ付加GFP対照は結合を示さなかった。

10

【0068】

実施例5: 表面接触法によるGFPアレイの作製

二重(His)₆タグ付加GFPをコードするプラスミドをHybond N+膜上に固定化し、そのDNA表面を、モノクローナル抗His抗体(5 μ g/ml)を予めコンジュゲートしたニトロセルロース表面にかぶせた。Rocheの大腸菌無細胞ライセートをアプライし、その2つの膜を2つのガラススライドの間に配置し、クリップで互いをしっかりと挟んだ。30 \times 30で3時間インキュベートしたあと、ニトロセルロース膜を、ビオチン化抗GFP次いでHRP結合ストレプトアビジンでプローブ探索した。HRPを化学発光により現像し、DNAスポットに対応する位置にGFPを検出した(図7に特徴12として示す)。

20

【図面の簡単な説明】

【0069】

ここで、単なる例示のために以下に解説する添付の図面を参照して本発明を説明する。

【0070】

【図1】図1は、本発明のサンドイッチ法を行うことができる方法の模式図を示す。

【図2】図2は、本発明の表面接触法を行うことができる方法の模式図を示す。

30

【図3】図3は、サンドイッチ法を用いて単一の核酸アレイから単一のタンパク質アレイを作製した後の、タンパク質検出アッセイの結果を示す。

【図4】図4は、サンドイッチ法を用いて単一の核酸アレイから3コピーのタンパク質アレイを作製した後の、タンパク質検出アッセイの結果を示す。

【図5】図5は、サンドイッチ法を用いて単一の核酸アレイから単一のタンパク質アレイを作製した後の、タンパク質検出アッセイの結果を示す。

【図6】図6は、サンドイッチ法を用いて単一の核酸アレイからリガンドコーティングスライド上に単一のタンパク質アレイを作製した後の、タンパク質検出アッセイの結果を示す。

【図7】図7は、表面接触法を用いて単一の核酸アレイから単一のタンパク質アレイを作製した後の、タンパク質検出アッセイの結果を示す。

40

【 図 1 】

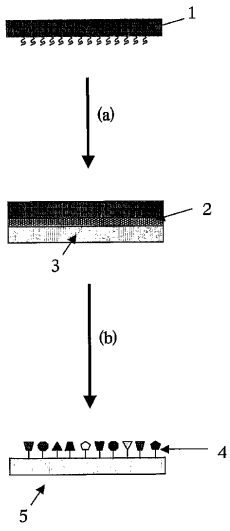


FIGURE 1

【 図 2 】

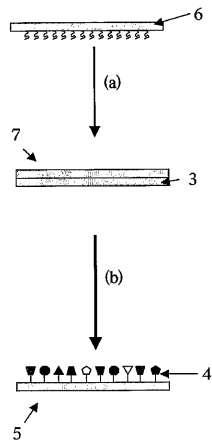


FIGURE 2

【 図 3 】

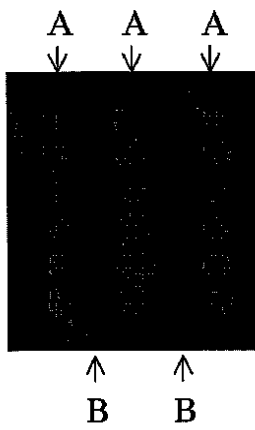


FIGURE 3

【 図 4 】

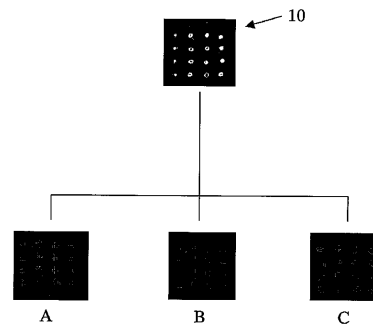


FIGURE 4

【 図 5 】

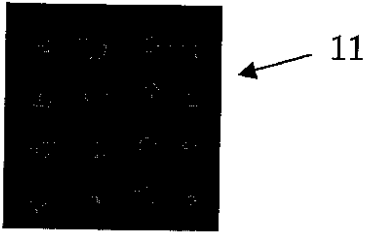


FIGURE 5

【 図 6 】

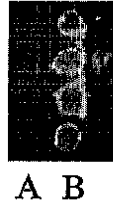


FIGURE 6

【 図 7 】



FIGURE 7

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2006/001550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K1/04		
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) C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HE M ET AL: "Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 29, no. 15, 1 August 2001 (2001-08-01), page E73, XP002182708 ISSN: 0305-1048 the whole document ----- -/--	1-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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
28 August 2006		06/09/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayrak, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2006/001550

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HE M ET AL: "DiscernArray@? technology: a cell-free method for the generation of protein arrays from PCR DNA" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 274, no. 1-2, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 265-270, XP004411946 ISSN: 0022-1759 page 268	1-37
A	KATZEN F ET AL: "The past, present and future of cell-free protein synthesis" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 23, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 150-156, XP004761519 ISSN: 0167-7799 page 154, column 2, paragraph 2	1-37
A	US 2004/161748 A1 (HE MINGYUE ET AL) 19 August 2004 (2004-08-19) examples 2,10	1-37
A	WO 03/012451 A (UNIVERSITE DE NANTES; SAKANYAN, VEHARY; SNAPYAN, MARINA; GHOCHIKYAN, A) 13 February 2003 (2003-02-13) examples 1,6,7,12	1-37
A	WO 01/81924 A (BIOTRACES, INC; DRUKIER, ANDRZEJ, K) 1 November 2001 (2001-11-01) the whole document	1-37
A	US 2003/082560 A1 (WANG YINGJIAN) 1 May 2003 (2003-05-01) example 8	1-37
A	US 2002/094533 A1 (HESS ROBERT A ET AL) 18 July 2002 (2002-07-18) the whole document	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2006/001550

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004161748 A1	19-08-2004	AT 330224 T	15-07-2006
		AU 7861301 A	25-02-2002
		CA 2419490 A1	21-02-2002
		EP 1309861 A1	14-05-2003
		WO 0214860 A1	21-02-2002
		JP 2004506898 T	04-03-2004
WO 03012451 A	13-02-2003	EP 1279963 A1	29-01-2003
WO 0181924 A	01-11-2001	AU 5558201 A	07-11-2001
US 2003082560 A1	01-05-2003	NONE	
US 2002094533 A1	18-07-2002	US 2003180807 A1	25-09-2003
		US 2003124716 A1	03-07-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 M 1/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, JP, 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

(74) 代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74) 代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72) 発明者 マイケル・ジョン・タウシグ

英国シービー 1・6 ビーユー、ケンブリッジ、ヒルダーシャム、エックスムア・コテージ

(72) 発明者 ミンギュ・ヘ

英国シービー 2・4 イービー、ケンブリッジシャー、ソーストン、ブロードメドウ 1 4 番

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 BA80 CA04 CA09 CA12 HA11 HA20

4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB20 CC03 FA15

4B063 QA08 QA20 QQ79 QR32 QR36 QR42 QR55 QR82 QS32 QS39