

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分  
 【発行日】平成 19 年 8 月 2 日 (2007.8.2)

【公開番号】特開 2007-125011 (P2007-125011A)  
 【公開日】平成 19 年 5 月 24 日 (2007.5.24)  
 【年通号数】公開・登録公報 2007-019  
 【出願番号】特願 2006-289339 (P2006-289339)  
 【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】  
 【提出日】平成 19 年 6 月 19 日 (2007.6.19)  
 【手続補正 1】  
 【補正対象書類名】特許請求の範囲  
 【補正対象項目名】全文  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項 1】

ハイブリダイゼーションプローブを使用する必要はないが、二次構造を形成せず、その構造の中に蛍光色素を持ち、互いに直接隣接しているか又はさらに若干重なり合っている標的にアニールするオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、それによりそれぞれ順方向及び逆方向のプライマーの構造に含まれるドナー色素及びアクセプター色素の間にエネルギーの蛍光共鳴移動を提供し、そして増幅の目的産物の蓄積の検出をアクセプター蛍光色素の発光の増加を記録することにより行うことを特徴とする、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応による DNA または RNA の特定のフラグメントの増幅方法。

【請求項 2】

前記順方向及び逆方向プライマーの構造が、それぞれ蛍光色素及び万能の消光基を含み、増幅の目的産物の前記蓄積の検出を、消光作用の効果により該蛍光色素の発光が減少するのを記録することにより行うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】ポリメラーゼ連鎖反応の助けにより DNA 又は RNA の特定のフラグメントを検出する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子生物学及び生物工学に関し、そして DNA 及び / または RNA 分子の分析に関する。本発明は、医学、獣医学、公衆衛生 - 疫学的研究、犯人捜査学、食品工業において、危険な感染症の病原体の検出、バイオテロ攻撃の可能性、犯罪者の鑑定、遺伝子組換え生物から作られた食品の検出、原材料の品質の決定などのために、DNA 診断を行う際に使用することができる。

【背景技術】

【0002】

現存するDNA診断の方法は、主にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びその変法の助けによりDNA又はRNAの特定のフラグメントを増幅することに基づいている。光学モジュールを装着した特別なDNAサーモサイクラーの助けにより増幅の際に目的とする産物の検出が直接行われる場合に、近時、いわゆるリアルタイムPCRは最も広範囲に使用されている方法である。この方法の重要な利点の一つは、反応産物の電気泳動による分離の段階を必要としないことであり、この段階では試験管を開け、その内容物を空気中で扱うことが想定されるので、その結果として部屋の作業区域はPCR産物 - 一般的に何十億個ものコピーとして提供されるアンプリコンで汚染される可能性がある。これにより、新しい反応混合物は、前の陽性反応の際に形成され、空気媒体中に循環している、アンプリコンを伴うエアロゾルで最初に汚染される可能性があり、続く分析において偽陽性の結果を得る可能性がある。これに加えて、電気泳動分析のない方法が可能になることにより、全手順に必要な時間を著しく減少させる。その他の重要な利点は、リアルタイムPCRの助けにより、一つ又はその他の標的のコピー数の正確な定量的測定、例えば原材料又は食品中の遺伝子組換え成分又はほかの混入物の含有量を得ることが可能になる点である。

#### 【0003】

現在のところ、リアルタイムPCRにより目的産物を検出する方法はかなり多数あり、それらは一般的に高特異性及び低特異性に分けることが出来る。低特異性の方法は、そのヌクレオチド配列に関係なく、DNAと複合して背景蛍光よりも有意に強い信号を発生する挿入色素、例えば臭化エチジウム [Higuchi et al., 1992; 1993], SYBR Green I [Wittwer et al., 1997], BEBO [Bengtsson et al., 2003], LC Green [Wittwer et al., 2003; Zhou et al., 2004] の発光により、反応混合物中における新しいDNAフラグメントの出現のみを検出することを可能にする方法が含まれる。これらの方法の利点は、それらが最も安いということであるが疑わしい。

#### 【0004】

低特異性の方法のグループには、二本鎖DNAフラグメントの増幅及び操作の際に生じる、プライマーの一つの蛍光の変化に基づくリアルタイムPCRの変法も含まれる。その方法の低い、又は少なくとも低下した特異性の理由は、この場合の発光の変化はいかなる方法によっても第二のプライマー、より正確には、それがアニールされる場所に依存しないことにある。すなわち、二箇所直ちに「順方向」及び「逆方向」のプライマーとして両プライマー又は唯一の標識プライマーの（新しいDNAフラグメントの形成がまだ可能であるような互いの距離における）非特異的アニーリングを生じる結果として、いずれにせよ、この場合に元々非特異的なDNAフラグメントの増幅が起こる。但し、蛍光の増減の過程においては、それが特異的でないということを測定することはできないであろう。したがって、例えば、最初は熱安定制限エンドヌクレアーゼの認識部位がプライマー配列の中に存在するために、増幅の過程においてこの酵素の作用により空間的に分離される色素及び消光基をプライマーの一つに置くリアルタイムPCRの変法 [Cairns et al., 2004]、又はプライマーの構造の中に蛍光色素及びそれに近い位置に非天然含窒素塩基 isoc が存在し、増幅の過程においてそれに対して相補的な isog を導入し、万能の消光基を他のDNA鎖に移入するリアルタイムPCRの変法 [Johnson et al., 2004] は、制限部位を持つ修飾プライマーが関与したリアルタイムPCRの最初の例においては蛍光の増加を生じ、二番目の例ではその減少を生じた事実はあるが、高特異性の方法と見なすことは出来ない。さらに、一部の低特異性の方法のその他の欠点は、Sunrise [Nazarenko et al., 1997], Scorpion [Thelwell et al., 2000; Solinas et al., 2001; Huang et al., 2004], Cyclicon [Kandimala, Agrawal, 2000] 及び他のタイプのプライマー構造の極端な複雑さである。目的とする配列にアニールする領域に加えて追加のヌクレオチド配列がそのプライマーの中に存在することもネガティブな要素であり、これは、アニーリングの特異性に有意な影響を与える可能性がある。

## 【 0 0 0 5 】

万能のハイブリダイゼーションUTプローブを用いて使用するために設計された提案のリアルタイムPCR法 [ Zhang et al. , 2003 ] は、このプローブは殆ど全ての場合に事実上1つのタイプだけでよく、このことはリアルタイムPCRに関係する費用を有意に減少させるという利点があるが、そのプローブをアニーリングするための場所はこの目的のために特別に伸長されたプライマーの一つの上に存在しており、この観点からのみでこの簡単な方法は低特異性であると認識されなければならない。プライマー上に色素の一つを置き、他の色素をハイブリダイゼーションプローブ上に置くことを提案する中間の変法もあった [ Rasmussen et al. , 2003 ]。この著者らは彼らの非標準的方法をPriProETと呼んだが、ドナー色素とアクセプター色素を互いの間に大きな距離を開けて置き、アンプリコンの大きさを不当に大きくしたために、簡単な高特異性の方法の利点を生じなかった。

## 【 0 0 0 6 】

ハイブリダイゼーションプローブの使用に基づいてリアルタイムPCRによって目的産物を検出する方法は、このシステムが、二つの特異的なアニーリングプライマーに加えて、調和する方法で標識され、アンプリコンとのハイブリダイゼーションによりその産物と予想産物との一致を確認するプローブも有しているという点から、高特異性であると考えられなければならない。このようなプローブの中で最も普及しているのはいわゆる TaqMan 検出の方法であり、それは Taq ポリメラーゼの 5' - エキソヌクレアーゼ活性の使用に基づいており、その作用の下にアンプリコン上にアニールしたハイブリダイゼーションプローブの分解及び発光を開始する蛍光色素の脱離を生じるが、一方プローブの構造の中に消光基が存在する間はその発光が消されている [ Lee et al. , 1993 ; Livak et al. , 1995 ]。その他の高特異性リアルタイムPCR法は、いわゆる Molecular Beacon の使用に基づいており、これは 5' - 及び 3' - 末端に位置する色素と消光基を持つオリゴヌクレオチドヘアピンを含む [ Tyagi , Kramer , 1996 ; Tyagi et al. , 2000 , Horejs et al. , 2005 ]。このプローブに相補的である1本鎖DNAの領域が増幅の過程において形成されたとき、ヘアピンの開裂とそのアニーリングが消光基と色素の空間的な隔離を伴い、蛍光の増加を生じさせる。

## 【 0 0 0 7 】

これらのリアルタイムPCRシステムの全ての主要な欠点は、その複雑さと、診断の目的にはイニシャルDNA、DNAポリメラーゼ及びデオキシヌクレオチド三リン酸に加えて通常は二つのプライマーのみで充分である通常のPCRに存在する成分より多数の成分を使用する必要があることである。その中に（そのコストを著しく増加させる）2つ、時には3つの修飾を持つハイブリダイゼーションプローブの使用はまた、プライマーをアニーリングする場所の間にそのプローブのターゲットとして役立つ特別な領域の存在を前提としており、それはアンプリコンのサイズの増加を生じることは避けられず、通常 60 ~ 70 bp 又はそれ以上をも超える。

## 【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、反応の高い特異性を維持しながら、著しく単純化し、促進し、そしてリアルタイムPCRの結果を得るためのコストを減少させることである。

## 【 0 0 0 9 】

本発明の本質は、PCRの目的産物の特異性の高い検出が、光学モジュールを装着した特別なDNAサーモサイクラー中で行われ、増幅過程自体の中で、ドナー色素からアクセプター色素へ蛍光共鳴エネルギーが伝達された後のアクセプター色素の発光強度の増加によって目的産物の増加が検出されるか、或いは別の変法においては、（蛍光色素の形態における修飾を考慮に入れない）全く通常の構造の中に別個に含まれ、二次構造、順方向及び逆方向プライマーを無にする消光基の作用の結果として蛍光色素の発光が減少することによって目的産物の増加が検出される。一方この目的のために現時点で使用されているリアルタイムPCRには、TaqMan 若しくは Beacon 又はその他のタイプ、又

は複雑な二次構造又は非常に低い特異性が特徴である挿入色素を持つ *Sunrise*、*Scorpion* 又は *Cyclicon* タイプの複雑なプライマー構築のいずれかのハイブリダイゼーションプローブが使用されている。

#### 【0010】

特色のある方法の主な相違点は、ハイブリダイゼーションプローブの形態において、この操作を著しくより高価なものにし、さらに幾分速度を低下させる追加の構造を必要としないことである。われわれの変法では、順方向及び逆方向プライマーをアニーリングするための場所として選択される DNA 又は RNA の検出フラグメントのヌクレオチド配列の領域は互いに隣接しているか部分的に重なりあっていることすらあり得るが、そのような重複は1つ以下のヌクレオチドであることから分るように、アンプリコンのサイズはわずか約 35 ~ 50 bp であるので、標準的 25 サイクルが 25 分未満で終了する。“UFA” (Universal Fluorescent Amplification) と呼ばれる本明細書で開示するリアルタイム PCR 法の高特異性は、ドナー色素及びアクセプター色素、又は別の変法では色素と消光基が異なる (順方向及び逆方向) プライマーの構造に含まれることにより提供される。一方では、これにより一つのプライマーのみの非特異的増幅 (もっと正確には、その検出) の可能性は除かれ、そして他方では、これは、検出領域として選択されない領域では確率論によると事実上起こりそうも無い互いの直近における両プライマーのアニーリングを必要とする。

#### 【0011】

この本願で請求する解決方法をプロトタイプから差別化している特徴に類似する特徴を持つ既知の技術的解決方法 (類似方法) は発見されなかった。著者らの見解としては、この請求の解決方法は「本質的相違」基準 (“essential distinctions” criterion) に該当する。

#### 【0012】

DNA 又は RNA の特定のフラグメントのポリメラーゼ連鎖反応の助けをかりて、リアルタイム方式におけるその検出と共に増幅 UFA を行う提案方法を以下の実施例により説明する。

#### 【0013】

##### 実施例 1 . オリゴヌクレオチドプライマーの選択

オリゴヌクレオチドプライマーの選択は、それぞれそれらが反応の特異性を提供し、DNA (又は RNA) のヌクレオチド配列のフラグメントを 35 ~ 50 ペアのサイズのヌクレオチド (又はヌクレオチド) に限定することを期待して行われる。プライマーの選択の際に、以下の環境が考慮されなければならない - オリゴヌクレオチドプライマーの合成の過程において (又は合成後)、励起及び発光の適当な波長を持ち、ドナー / アクセプター (図 1) 或いは色素 / 消光基 (図 2) のいずれかを構成し、そして増幅の結果として目的の二本鎖産物の中に、蛍光共鳴エネルギーの移転 (図 3 A 及び 図 3 B) 又は消光 (図 4 A 及び 図 4 B) が効果的に検出される距離に互いに存在することを特徴とする対応する蛍光色素及び消光基でそれらを標識することができる。陰性 - 陽性対照のプライマーは、ドナー色素とアクセプター色素又は色素と消光基の間の距離が、第一の場合には蛍光共鳴エネルギーの移転を行うことを可能にせず、第二の場合には消光作用が存在しないが、いずれの場合にも対応するリアルタイム PCR 産物は生産されることを考慮して選択される。

#### 【0014】

##### 実施例 2 . 目的産物の融解温度を決定するための予備的 DNA 増幅の実施

25  $\mu$ l の体積の反応混合物は、緩衝液 (40 mM Tris - HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 20 fMol DNA; 1 活性単位の Taq DNA ポリメラーゼ; それぞれ (ドナー及びアクセプター又は色素及び消光基をもつ) 蛍光色素で標識された二つのプライマーのそれぞれ 0.5 pMol 及び相当する量の蒸留水からなる。リアルタイム PCR は以下の条件の下に iCycler iQ model (Bio-Rad Laboratories, US) の DNA サーマサイクラー中で行った: 最初のサイクルにおいて二本鎖 DNA の変性を 95 で 30 秒間行い、次いで

プライマーをアニールし、伸長を45℃で10秒間行い、この段階の終わりに蛍光を記録し、そして目的産物の変性を90℃で10秒間行い、サイクル数は25であった。二本鎖分子の形態で目的産物が存在する場合に、この段階において存在するドナー色素の蛍光共鳴エネルギーで励起された後のアクセプター色素の発光の増加を、また別の変法では消光作用の結果としての色素の発光の減少を記録することにより目的産物の生産の管理を行った。プライマーのアニーリング温度は、種々の実験において、使用したオリゴヌクレオチドのGC-構造によって若干変動した。DNA増幅の目的産物の融解温度の決定は、装置に付属するプログラムの対応するプロトコルにより規定されているように同じDNAサーモサイクラーの中で行われた。増幅ステップの終了後、二本鎖の状態から一本鎖へアンプリコンが移行する温度の検出は、温度に対する蛍光の一次導関数の負数の関係を確認し、それにより融解の微分曲線を得て、目的産物の融解温度を実験的に決定した。この情報は、古典的な95℃の代わりにアンプリコンの確実な変性のために十分な温度を選択のために必要である。何故なら、この場合には他の利点に加えて全体の増幅過程の時間が減少するからである、様々なモデルのDNAサーモサイクラーにおける反応ブロックを加熱冷却する平均速度が通常1秒当たり2~3℃変化することを考慮すると、各サイクルにおいて12~15秒は節約できる可能性がある。このため、最適より上の温度で存在する時間の短縮を考慮すると、多数のサイクルでは酵素の作業能力は延長し、したがって総じてより信頼性の高い増幅が行われる。

【0015】

#### 実施例3. cDNAの調製

逆転写酵素の酵素を使用するリアルタイムPCR(リアルタイムRT-PCR)の助けにより材料に含まれるRNAを増幅するために、この酵素の助けによりRNAマトリックスに従って相補的DNAを構築する段階が必要である。予備的に、0.5µgのRNA及びここではプライマーとして働く0.001A<sub>260</sub>単位のオリゴヌクレオチド2をマイクロ遠心分離試験管中で混合した。混合物を85℃に加熱し、徐々に30℃に冷却させた。逆転写反応を以下の成分を含む20µlの反応容量において42℃で10分間行った。50mM Tris-HCl pH8.3, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.5mM スペルミジン, 0.5mMの各dNTP及び5活性単位のAMV-逆転写酵素。

【0016】

#### 実施例4. リアルタイムPCR又はリアルタイムRT-PCRの実施

緩衝液(40mM Tris-HCl pH8.0, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM KCl); 20fmol DNA; 1活性単位のTaq DNAポリメラーゼ; それぞれ自身の蛍光色素(ドナー及びアクセプター色素又は色素及び消光基)で標識された二つのプライマーのそれぞれ0.5pmol及び対応量の蒸留水を含む25µlの反応混合物中でPCRを行った。リアルタイムPCRはiCycler iQモデルのDNAサーモサイクラー中において以下の条件の下に行った: 最初のサイクルにおける二本鎖DNAの変性は95℃で30秒間行い、次いでプライマーのアニーリング及び伸長を45℃、10秒間で行い、この段階の終わりに蛍光を記録し、目的産物の変性は80℃、10秒間で行った。サイクル数は25とした。

【0017】

実施例2において測定されたように、より低い温度(75℃)において目的産物は変性するので、目的産物を95℃に加熱する必要がないことから、低下した温度(80℃)において短時間(10秒間)で目的産物を変性させることにより、反応時間を短縮し、DNAポリメラーゼが臨界温度帯に存在する時間を短縮することを可能にした。プライマーのアニーリング温度及び目的産物の融解温度も、使用したオリゴヌクレオチドのGC成分によって、種々の実験において若干変更した。一方ではドナー色素で、他方では消光基で標識したプライマーを使用するリアルタイムPCRの第二の変法も同様に実施した。対照として、試験DNA(又はcDNA)を加えずに使用したオリゴヌクレオチドに相補的な領域を含まないDNAを加えてPCRを実施した。追加の陰性-陽性対照については、蛍光共鳴エネルギーが伝達されず、消光作用も生じないような相当の距離でプライマー2

のアニール位置から離してプライマー 3 をアニールする場所として意図したヌクレオチド配列の領域を選択した (図 1 ~ 4 )。目的産物の蛍光の増加曲線はプライマー 1 及び 2 に限定され、ドナー及びアクセプター色素の変法においてプライマー 3 及び 2 のペアによる同様の増加がないことは図 5 に示されている。

【 0 0 1 8 】

実施例 5 . リアルタイム P C R 産物の電気泳動による管理 ( 任意 )

リアルタイム P C R 産物の電気泳動コントロール ( 任意 ) は目的産物を視覚的に検出することを目的に行われた。リアルタイム P C R 産物の分離はトリス - 酢酸緩衝液 p H 7 . 8 中 8 % ポリアクリルアミドゲルにおいて非変性条件化においてゲルの長さの c m 当たり 4 V の電圧勾配で垂直タイプの装置において 4 時間行われた。電気泳動終了後、ゲルを臭化エチジウムにより染色し、写真記録システム - G e l C a m e r a S y s t e m ( U V P , I n c . , U S ) 中で写真を撮影した。図 6 に示すように、リアルタイム P C R 中に記録された目的産物は予想サイズの 4 2 b p を示し、一方 1 1 0 b p のサイズの フラグメントの形態の陰性 - 陽性対照は リアルタイム P C R の間蛍光シグナルの変化を示さなかったが、臭化エチジウムで染色されたか否かは極めて明白である。二つの蛍光色素がアンプリコンの組成中に存在することから、その移動度は同じサイズの D N A の非修飾フラグメントの場合よりも若干少ない。

[ 参考文献 ]

1. Bengtsson M., Karlsson H.J., Westman G., Kubista M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR // Nucl. Acids Res. 2003. V.31. e45.
2. Cairns M.J., Turner R., Sun L.Q. Homogeneous real-time detection and quantification of nucleic acid amplification using restriction enzyme digestion // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004. V.318. P. 684-690.
3. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // Biotechnology. 1992. V.10. P.413-417.
4. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. V.11. P.1026-1030.
5. Horejsh D., Martini F., Poccia F., Ippolito G., Di Caro A., Capobianchi M.R. A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry // Nucleic Acids Res. 2005. V.33. e13.
6. Huang Y., Kong D., Yang Y., Niu R., Shen H., Mi H. Real-time quantitative assay of telomerase activity using the duplex scorpion primer // Biotechnol. Lett. 2004. V.26. P. 891-895.
7. Johnson S.C., Sherrill C.B., Marshall D.J., Moser M.J., Prudent J.R. A third base pair for the polymerase chain reaction: inserting isoC and isoG // Nucleic Acids Res. 2004. V.32. P. 1937-1941.
8. Kandimalla E.R., Agrawal S. "Cylicons" as hybridization-based fluorescent primer-probes: Synthesis, properties and application in real-time PCR // Bioorg. Med. Chem. 2000. V.8, P.1911-1916.
9. Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes // Nucl. Acids Res. 1993. V.21. P.3761-6.
10. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization // PCR Methods Appl. 1995. V.4. P.357-362.
11. Nazarenko I.A., Bhatnagar S.K., Hohman R.J. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer // Nucleic Acids Res. 1997. V.25. P.2516-2521.
12. Rasmussen R.B., Uttenthal A., de Stricker K., Belak S., Storgaard T. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus // Arch. Virol. 2003. V.148. P.2005-2021.
13. Solinas A., Brown L.J., McKeen C., Mellor J.M., Nicol J., Thelwell N., Brown T. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications // Nucleic Acids Res. 2001. V.29. E96.
14. Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T. Mode of action and

application of Scorpion primers to mutation detection // Nucleic Acids Res. 2000. V.28. P.3752-3761.

15. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization // Nat. Biotechnol. 1996. V.14. P.303-308.

16. Tyagi S., Marras S.A., Kramer F.R. Wavelength-shifting molecular beacons // Nat. Biotechnol. 2000. V.18. P. 1191-1196.

17. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification // Biotechniques. 1997. V.22. P.130-131, 134-138.

18. Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G., Pryor R.J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen // Clin. Chem. 2003. V.49. P.853-860.

19. Zhang Y., Zhang D., Li W., Chen J., Peng Y., Cao W. A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe // Nucleic Acids Res. 2003. V.31. e123.

20. Zhou L., Myers A.N., Vandersteen J.G., Wang L., Wittwer C.T. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye // Clin. Chem. 2004. V.50. P.1328-1335.

#### 【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 9 】

【図 1】ドナー（F）及びアクセプター（R）色素の間の蛍光共鳴エネルギーの移動のあるリアルタイムPCRの変法における順方向（1及び3）及び逆（2）プライマーの位置を示す図。

【図 2】万能消光基（Q）により蛍光色素（F）の発光の消光のあるリアルタイムPCRの変法における順方向（1及び3）及び逆方向（2）プライマーの位置を示す図。

【図 3】ドナー（F）及びアクセプター（R）色素の間の蛍光共鳴エネルギーの移動のあるリアルタイムPCRの経過を示す図。エネルギーの移動は波線の矢印で示されている。

【図 4】万能消光基（Q）による蛍光色素（F）の発光の消光があるリアルタイムPCRの経過を示す図。

【図 5】ドナー及びアクセプター色素の間の蛍光共鳴エネルギーの移動のあるリアルタイムPCRの変法における蛍光の増加の推移。曲線 1 はプライマー 1 及び 2 による；曲線 2 はプライマー 3 及び 2 による；曲線 3 は陰性対照（マトリックスDNA無し）

【図 6】ドナー及びアクセプター色素の間の蛍光共鳴エネルギーの移動のあるリアルタイムPCR産物の電気泳動分析。M はマーカーDNA；レーン 1 はプライマー 1 及び 2 による産物；レーン 2 はプライマー 3 及び 2 による産物；レーン 3 は陰性対照（マトリックスDNAなし、遊離プライマーは明らか）。