

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6316802号
(P6316802)

(45) 発行日 平成30年4月25日 (2018. 4. 25)

(24) 登録日 平成30年4月6日 (2018. 4. 6)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 32 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2015-514196 (P2015-514196)	(73) 特許権者	514298520
(86) (22) 出願日	平成25年5月23日 (2013. 5. 23)		ユニヴァーシティ・オヴ・ユタ・リサーチ・ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2015-520614 (P2015-520614A)		アメリカ合衆国ユタ州84108, ソルト・レイク・シティ, ワカラ・ウェイ 590
(43) 公表日	平成27年7月23日 (2015. 7. 23)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/042473	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開番号	W02013/177429		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開日	平成25年11月28日 (2013. 11. 28)	(74) 代理人	100096769
審査請求日	平成28年4月25日 (2016. 4. 25)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	61/651, 161	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成24年5月24日 (2012. 5. 24)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114591
(31) 優先権主張番号	61/811, 145		弁理士 河村 英文
(32) 優先日	平成25年4月12日 (2013. 4. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エクストリームPCR

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

増幅中の生体サンプル中の標的核酸配列を増幅する方法であって、

熱安定性ポリメラーゼおよび前記標的核酸配列を増幅するように構成されたプライマーを前記生体サンプルに添加する工程であって、前記ポリメラーゼが少なくとも $0.5 \mu\text{M}$ の濃度で提供され、前記プライマーがそれぞれ少なくとも $2 \mu\text{M}$ の濃度で提供される工程と、

エクストリーム温度サイクリングプロファイルを使用して、複数の増幅サイクルにわたり少なくとも変性温度と伸長温度との間で前記生体サンプルを熱的にサイクリングすることによるポリメラーゼ連鎖反応によって、前記標的核酸配列を増幅する工程であって、各サイクルが1サイクルあたり10秒未満のサイクル時間で完了する工程とを含む方法。

【請求項 2】

各サイクルが、1サイクルあたり2秒未満で完了する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

傾斜速度が、少なくとも $200^\circ\text{C}/\text{秒}$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記傾斜速度が、少なくとも $300^\circ\text{C}/\text{秒}$ である、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記傾斜速度が、少なくとも $400^\circ\text{C}/\text{秒}$ である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

プラトーが、C p の後の少なくとも 20 サイクルにある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

それぞれの前記プライマーの濃度が、 $2.5 \mu\text{M}$ より大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記伸長温度とは異なるアニーリング温度をさらに含み、

前記増幅する工程により 100 bp より大きいアンプリコンが生成し、

前記エクストリーム温度サイクリングプロファイルが、塩基対で表された伸長の長さ（アンプリコンの長さ－プライマーの長さ）を、塩基／秒で表された前記熱安定性ポリメラーゼの伸長速度で割った値にほぼ等しい時間の前記伸長温度での保持を包含する、請求項 1 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 9】

前記増幅する工程が、前記伸長温度と同じかまたはそれよりも低いアニーリング温度をさらに包含し、前記増幅する工程が、前記アニーリング温度での 0.05～0.9 秒間の保持を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 Mg^{++} 濃度が、少なくとも 4 mM である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ポリメラーゼおよび前記プライマーの濃度がある倍率で増加し、前記サイクル時間が前記倍率で割られる、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記エクストリーム温度プロファイルが、

アニーリング時間 = $k_1 / [\text{プライマー}]$

（式中、 k_1 は、定数であり、 $[\text{プライマー}]$ は、各プライマーの濃度である。）によって定義されるアニーリング時間を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

k_1 が、実験的に決定される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記温度サイクリングプロファイルが、

伸長時間 = $k_2 (\text{伸長の長さ}) / ([\text{ポリメラーゼ}] * (\text{ポリメラーゼ速度}))$

（式中、 k_2 は、比例定数であり、 $[\text{ポリメラーゼ}]$ は、前記ポリメラーゼの前記濃度であり、ポリメラーゼ速度は、ヌクレオチド／秒で表されたポリメラーゼの塩基を取り込む速度である。）

30

によって定義される前記伸長温度における時間を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

k_2 が、実験的に決定される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記標的核酸が、少なくとも 70 % の効率で増幅される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

増幅中の生体サンプル中の標的核酸配列を増幅する方法であって、

40

熱安定性ポリメラーゼおよび前記標的核酸配列を増幅するように構成されたプライマーを前記生体サンプルに添加する工程であって、前記ポリメラーゼとプライマーの比率が、（約 0.03～約 0.4 のポリメラーゼ）：（プライマーの総濃度）であり、前記ポリメラーゼの濃度が少なくとも $0.5 \mu\text{M}$ である工程と、

エクストリーム温度サイクリングプロファイルを使用して、複数の増幅サイクルにわたり少なくとも変性温度と伸長温度との間で前記生体サンプルを熱的にサイクリングすることによるポリメラーゼ連鎖反応によって、前記標的核酸配列を増幅する工程であって、各サイクルが 10 秒未満で完了する工程とを含む方法。

【請求項 18】

50

各サイクルが、5秒未満で完了する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

各サイクルが、2秒未満で完了する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記標的核酸が、ゲノムDNAである、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

前記生体サンプルが、真核生物のゲノムDNAを含有する、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

前記ポリメラーゼが、少なくとも1.0 μ Mの濃度で提供されるKlenTaq（登録商標）である、請求項17に記載の方法。

10

【請求項23】

非特異的増幅が、検出可能なレベル未満である、請求項17に記載の方法。

【請求項24】

プライマーの総濃度が、少なくとも5 μ Mである、請求項17に記載の方法。

【請求項25】

PCRを行うためのデバイスであって、

PCRサンプルを保持するためのサンプル容器と、ここで、前記サンプル容器が、標的核酸と、dNTPと、少なくとも0.5 μ Mの濃度で提供されるポリメラーゼと、少なくとも2 μ Mの濃度でそれぞれ提供される前記標的核酸を増幅するように構成された一対のプライマーとを含み、

20

前記サンプルを加熱する手段と、

前記サンプルを冷却する手段と、

前記サンプルを加熱する手段および前記サンプルを冷却する手段に前記サンプル容器を繰り返し晒して、前記サンプルを少なくとも200℃/秒の傾斜速度で熱的にサイクリングする制御手段とを含むデバイス。

【請求項26】

モニタリング位置で前記サンプルを光学的に励起して前記サンプルに蛍光を発生させる手段と、励起された増幅中の前記サンプルの前記蛍光を検出する手段とをさらに含む、請求項25に記載のデバイス。

30

【請求項27】

前記傾斜速度が、少なくとも300℃/秒である、請求項26に記載のデバイス。

【請求項28】

前記傾斜速度が、少なくとも400℃/秒である、請求項27に記載のデバイス。

【請求項29】

前記加熱手段が高温の水槽であり、前記冷却手段が低温の水槽である、請求項25に記載のデバイス。

【請求項30】

前記デバイスが、マイクロ流体システムである、請求項25に記載のデバイス。

【請求項31】

40

標的核酸に対して、各サイクルが1サイクルあたり10秒未満のサイクル時間で完了する温度サイクリングプロファイルを使用したPCRを行うためのキットであって、

dNTPと、

少なくとも0.5 μ Mの濃度で提供されるポリメラーゼと、

少なくとも2 μ Mの濃度でそれぞれ提供される、前記標的核酸を増幅するように構成された一対のプライマーと

を含む混合物を含むキット。

【請求項32】

温度サイクリングプロファイルを使用してPCRを行うための説明書をさらに含み、各サイクルが1サイクルあたり10秒未満のサイクル時間で完了する、請求項31に記載の

50

キット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、分子生物学において広く使用されている技術である。その名称は、その主要な構成要素の1つである、インビトロでの酵素的複製によってDNA断片を増幅するのに使用されるDNAポリメラーゼに由来する。PCRが進行するにつれて、生成したDNA（アンプリコン）はそれ自身、複製のためのテンプレートとして使用される。それにより連鎖反応が始まり、DNAテンプレートが指数関数的に増幅する。PCRを用いれば、DNA断片の単一のコピーまたは少数のコピーを数桁を越えて増幅して、数百万またはそれより多くのDNA断片のコピーを生成することが可能になる。PCRは、熱安定性ポリメラーゼ、dNTP、および一对のプライマーを用いる。

10

【0002】

PCRは概念的には3つの反応に分けられ、各反応は通常、それぞれ3つの温度で所定期間起こると考えられる。このようなPCRの「平衡パラダイム」は、サイクルごとに3つの温度で3つの期間にわたり起こる3つの反応（変性、アニーリング、および伸長）によって容易に理解される。しかし、この平衡パラダイムは、物理学的な実態とはあまりよく合致しない。即時の温度変化が起こらない、すなわちサンプルの温度を変化させるには時間がかかる。さらに、個々の反応速度が温度に応じて変動し、一度プライマーのアニーリングが起これば、それに続いてポリメラーゼ伸長が即座に起こる。特に迅速PCR（rapid PCR）の場合、反応速度と温度が常に変化するという動力学的パラダイムがより正確である。生成物が変性しプライマーがアニールしさえすれば、PCR中に温度を一定に保つことは必ずしも必要ではない。PCRの動力学的パラダイムのもとでは、生成物の変性、プライマーのアニーリング、およびポリメラーゼ伸長は、一時的に重複し、それらの速度は温度に応じて連続的に変動する場合がある。平衡パラダイムのもとでは、サイクルは、それぞれ所定期間保持される3つの温度によって定義されるが、それに対して動力学的パラダイムは、遷移速度と標的温度を必要とする。図15a～15bに、平衡パラダイムと動力学的パラダイムの例示的な時間／温度プロファイルを示す。しかし、これらの温度プロファイルは単に例示的なものであって、いくつかのPCRの実行においては、必要な温度が2つだけになるようにアニーリング工程と伸長工程とが一緒になっていることが理解される。

20

30

【0003】

パラダイムが正しいか間違っているかということではなく、これらは有用性の点で異なっている。平衡パラダイムは理解が簡単であり、工学的な見方および機器製造に向いている。動力学的パラダイムは、生化学、迅速サイクルPCR、および融解曲線分析により大きく関連する。

【0004】

1980年代後半にPCRが最初に広まったとき、そのプロセスは遅かった。典型的なプロトコールは、変性は94℃で1分、アニーリングは55℃で2分、および伸長は72℃で3分であった。温度間の遷移時間が含まれる場合、8分のサイクルが典型的であり、その結果、30サイクルが完了するのに4時間を要した。サイクル時間の25パーセントが温度遷移に費やされていた。サイクル速度が増加するにつれて、温度遷移に費やされる時間の比率も増加することから、動力学的パラダイムがますます重要となっていく。迅速サイクルPCR中、通常、温度は変化している。短い生成物（<100bp）の迅速サイクルPCRの場合、時間の100%が温度遷移に費やされる場合があり、保持時間は必要ではない。より長い生成物の迅速サイクルPCRの場合、温度を最適な伸長温度で保持することを含む場合がある。

40

【0005】

用語「迅速PCR」は、相対的な場合と曖昧な場合のそれぞれの意味がある。1時間の

50

PCRは、4時間と比べれば迅速であるが、15分と比べると遅い。さらに、より高いテンプレート濃度で開始したり、またはより少ないサイクルを使用したりすれば、PCRプロトコルをより短くできる。より具体的な尺度は、各サイクルに必要な時間である。したがって、1994年に、「迅速サイクルPCR」（または「迅速サイクリング」）は、10～30分で完了する30サイクルと定義され（1）、この場合、それぞれのサイクルは20～60秒になる。これらの各段階間で温度に傾斜をつけるのに時間を要するため、この各サイクルの実際の時間は、多くの場合、変性、アニーリング、および伸長に関してプログラムされた時間の合計よりも長い。1990年代初頭における初期の研究で、温度制御にキャピラリーチューブと熱風を使用した迅速サイクリングの実行可能性が確立された。長年かけて、システムはより速くなり、変性、アニーリング、および伸長の動力学的な必要条件がより明確になってきた。

10

【0006】

初期の迅速システムの1つにおいて、チャンバー内には、ヘッドライヤーからの加熱要素およびファン、熱電対、ならびにキャピラリーチューブ中のPCRサンプルが同梱されていた（2）。ファンは、熱電対およびキャピラリーを通過する加熱空気の迅速フローを生じさせた。熱電対の熱的応答をサンプルと合致させることにより、温度が変化している間でさえも熱電対の温度を厳密にサンプルの温度に合わせて変化させた。空気の熱伝導率は低い、キャピラリーによって晒された大きい表面積に対して空気を迅速に移動させることは、変性、アニーリング、および伸長温度間でサンプルをサイクリングさせるのに十分であった。電子制御器により温度をモニターし、加熱要素への出力を調節することにより求められるタイミングとサイクル数が達成された。冷却するために、制御器によりソレノイドを活性化することにより、入口を外気に向かって開いて、別の方法で閉じたチャンバーに冷却空気を導入した。

20

【0007】

キャピラリー／空気システムを使用すれば、温度を迅速に変化させることができる。低熱質量チャンバー、循環空気、およびガラスキャピラリー中のサンプルを使用して、わずか10分のPCR（各20秒の30サイクル）の後に、500bpより大きいPCR生成物をエチジウムブロマイドで染色したゲルで可視化した（3）。生成物の収量は、伸長時間とポリメラーゼ濃度の影響を受けた。30秒サイクル時間（伸長は、70℃から80℃の間で約10秒）の場合、ポリメラーゼ濃度を反応液10μlあたり0.1ユニットから0.8ユニットに増加させるにつれてバンドの強度も増加した。ポリメラーゼのユニットの定義は紛らわしいことがあることが知られている。天然型Taqポリメラーゼの場合、0.4U/10μlは、典型的な迅速サイクリング条件下では約1.5nMである（50）。

30

【0008】

迅速プロトコルで使用される変性温度およびアニーリング温度における保持時間は、瞬時または「0」秒である。すなわち、温度－時間プロファイルは、変性およびアニーリングの際の温度の急激な上昇は示すが最高温度および最低温度の保持は示さない。変性およびアニーリングは、極めて急速に起こる場合がある。

【0009】

迅速かつ正確な温度制御は、PCRに必要な温度および時間の分析的研究を可能にする。例示的なヒトゲノムDNAの536bpのフラグメント（β-グロビン）の場合、91℃から97℃の間の変性温度が、1秒未満から16秒までの変性時間と同等に有効であった。しかし、実際には16秒よりも長い変性時間は生成物の収量を減少させることが見出された。プライマーのアニーリングにかかる時間が制限される限りは、50～60℃のアニーリング温度で特異的生成物が優れた収量で得られた。すなわち、変性からアニーリングへの迅速な冷却と1秒未満のアニーリング時間によって最良の特異性が得られた。75～79℃の伸長温度で収量は最大になり、最大約40秒の伸長時間で増加した。

40

【0010】

この初期の研究の結論は以下の通りである。1）PCR生成物の変性は極めて迅速であ

50

るため、変性温度を保持する必要はない、2) プライマーのアニーリングは極めて急速に起こる場合があるため、アニーリング温度の保持は必要ではない場合がある、および3) 必要な伸長時間は、PCR生成物の長さとポリメラーゼ濃度によって決まる。また迅速サイクルPCRは、温度を正確に制御しさえすれば、より速いだけでなく、特異性および収量に関してもより優れている(4、5)。PCRの速度は、利用され得る生化学によって制限されないが、サンプルの温度を厳密にまたは迅速に制御しない機器によっては制限される。

【0011】

しかし、現行の実験室用PCR機器の多くは、瞬時の変性時間およびアニーリング時間に関する性能はあまり高くなく、多くは「0」秒の保持期間のプログラミングすら不可能である。コニカルチューブの壁を介して熱が移動することによる時間遅延、低い表面積対体積の比率、および大きいサンプルの加熱のために、ほとんどの機器は、サンプルが確実に望ましい温度に達するようにするために変性時間およびアニーリング時間の延長に頼らざるを得ない。これらの時間遅延により、時間経過に対する正確な温度が不確定になる。その結果、市販品における再現性は悪く、市販品間でのばらつきが大きい(6)。多くの機器は、温度遷移中に著しい温度の変動を示す(7、8)。温度のアンダーシュートおよび/またはオーバーシュートは、試みられたサンプル体積に依存するソフトウェアでの予測ではほとんど解決しない慢性的な問題である。このような難点は、経時的に変化する場合がある機器の熱的性質によってさらに悪化する。

【0012】

時間が経って、「薄壁」管における漸進的な改善、サンプル間のより高い伝導熱分布、低熱質量のブロック、および他の「速い」改変により、従来のヒートブロック機器はより速くなりつつある。それにもかかわらず、これらのシステムにとって、60秒未満でサイクルを完了させる程度に迅速にサイクリングすることはめったにない。ほんの少数のヒートブロックシステムが60秒未満のサイクルを達成できるが、通常は制限された温度範囲での2温度サイクリングに限定される。サンプル容器を平板化すれば、抵抗加熱と空気冷却によって(9)、または一定温度に維持された加熱ゾーン間をフレキシブルなチューブでサンプルを移動させることによって迅速サイクリングを達成できる(米国特許第6,706,617号)。

【0013】

PCR用の空気/キャピラリーシステムの商業用バージョンは1991年から利用でき(1)、リアルタイムPCR用のものは1996年から利用できるようになった(10、11)。他の機器の迅速サイクリング性能は、初めて20~60秒のサイクルを実証した空気/キャピラリーの標準品と比較されることが多い。不思議なことに、長年にわたりキャピラリー/空気システムをより遅く運用する傾向があるが、おそらくこれは、多くの使用者による「0」秒の変性時間およびアニーリング時間への不信感を反映しているであろう。また熱で活性化される酵素は長い活性化期間も必要とすることから、「速い」活性化酵素が使用されたとしても運転時間も二倍になることが多い。迅速サイクリングからの別の妥協点は、プラスチックキャピラリーの使用である。これらのキャピラリーは機器と熱的に適合していないため、標的溫度に達するまで変性およびアニーリング時の20秒の保持が必要になることが多い(12)。

【0014】

マイクロシステムにおいて、PCRのサイクル時間をさらに減少させるいくつかの進歩が起こっており、この場合、処理される体積は当然ながら小さい(13、14)。しかし、高い表面積対体積比を有するサンプルチャンバーを用いたとしても、加熱要素が高い熱質量を有し、チャンバーの外部にある場合、サイクルは長くなる場合がある(15)。サンプル近傍で薄膜の抵抗加熱器と温度センサーを用いることにより、10~30分の増幅が達成できる(16、17)。

【0015】

低熱質量システムの冷却は、通常、受動的な熱拡散および/または強制空気によってな

10

20

30

40

50

されるが、いくつかの興味深い加熱方法が開発されている。赤外線放射は、温度のモニタリングのための較正された赤外線高温測定（19）を用いて加熱に使用できる（18）。あるいは、ガラスキャピラリー上の薄い金属膜が、迅速サイクリングのための抵抗加熱要素と温度センサーの両方として役立つ場合がある（20）。最後に、電解質の抵抗によるPCR溶液の直接のジュール加熱と温度モニタリングが考えられ、キャピラリーで実施もされている（21）。上記の方法はいずれも、固定されたサンプルに熱を移動させたり、固定されたサンプルから熱を移動させたりするものである。

【0016】

静止サンプルへの熱伝達、および静止サンプルからの熱伝達の代わりに、異なる温度の槽へ、または固定された温度ゾーンを有するチャンネルを介してサンプルを物理的に移動させてもよい。PCRの流体がチャンネル内で変性温度、アニーリング温度、および伸長温度で維持された様々なセグメントを通過するマイクロ流体力学的方法が普及するようになってきた。連続流型PCRは、3つの温度ゾーンを行き来する蛇行チャンネル内（22）で、さらに半径が徐々に増加または減少する3つの温度セクターを通過するループ内で実証されている（23）。蛇行レイアウトを有する改変型は、PCRの動力学的パラダイムにより厳密に適合させるために、等温ゾーンの代わりに固定された熱勾配を使用している（24）。PCRに必要なマイクロチャンネルの長さを制限するために、いくつかのシステムは、二方向性の圧力駆動のフロー（25）、空気力学（26）、または動電学的な力（27）によって温度ゾーン間で前後にサンプルを往復させる。直線的なサンプル往復の代わりに、単一の円形のチャンネルを、強磁性流体として（28）、または対流によって（29）駆動するサンプルの動きと共に使用できる。連続流方式を包含するマイクロシステムPCRの考えられる利点の1つは、サイクル速度である。

【0017】

いくつかのマイクロシステムはそれでもなお60秒より長いサイクルを必要とするが、多くは、迅速サイクルPCRの20～60秒のサイクル範囲で稼働する（13、30）。赤外線加熱の場合、16～37秒の範囲の最小のサイクル時間が報告されている（18、19）。金属でコーティングされたキャピラリーは、40秒のPCRサイクルを達成しており（20）、一方で直接の電解質加熱は、21秒のサイクルで増幅した（20）。閉ループ対流型PCRの場合、24～42秒の範囲の最小のサイクル時間が報告されている（29、31）。いくつかのグループは、PCRサイクル時間を、1990年に最初に実証された迅速サイクルPCRの元の定義よりも速い20秒未満に短くすることに注目してきた。静止サンプルの薄膜抵抗加熱は、25 μ lのサンプルではサイクル時間を17秒に短くし（32）、100 nlのサンプルでは8.5秒に短くした（17）。連続流システムは、熱勾配PCR（24）とサンプル往復（26）を用いて12～14秒のサイクルを達成したが、強磁性流体ループにより9秒のサイクルでのPCRが成功したことが主張されている（28）。ガラス基板およびプラスチック基板による連続流システムは、様々なサイズのPCR生成物で6.9秒（22）および5.2秒（23）のサイクル時間を達成している。アルミニウム基板を介した交互の熱水および冷水の伝導により、油の下で1 μ lの液滴を5.25秒のサイクルで増幅した（33）。同様に、多孔質の銅ブロックを介した水の伝導により、5 μ lのサンプルを4.6秒のサイクルで増幅した（34）。蒸気圧によって増大した1 μ lの反応プラグの連続流デバイスは、3秒のサイクルを達成した（35）。加えて、ペルチェ素子の間に挟まれたガリウムにキャピラリーを浸漬することによって、キャピラリー中で大腸菌のStxバクテリオファージの85 bpのフラグメントを2.7秒のサイクルで増幅することを主張する報告がなされている（36）。あるいは、加圧した熱いガスおよび冷たいガスでサイクリングしたキャピラリーでのPCR増幅により、2.6秒のサイクルが達成された（48）。

【0018】

表1に、最初に「迅速PCR」を定義した20秒のサイクルより短い時間にPCRサイクル時間を最小化するための研究を要約する。過去20年にわたり、サイクル速度をさらに向上させた新しいプロトタイプ機器が開発されてきた。しかし、実用的なPCR性能（

10

20

30

40

50

効率および収量)が不十分であることが多い。一般的な原則として、サイクルが短くなればなるほど、PCRの成功に求められることは、より高い開始濃度で使用する標的(細菌、ファージ、多コピープラスミド、またはさらにはPCR生成物)の複雑度がどれだけ低いかに関わってくる(例えば、初発サンプルとして5 ngのアンプリコンが使用された米国特許第6,210,882号を参照)。実際に、表1で列挙した研究のうち、20秒未満のサイクルで例えばヒトDNAなどの複雑な真核DNAを使用したものは皆無である。成功が求められる前にほとんど増幅しなくてもいいように、初発のテンプレート分子のコピー数が極めて高いことが多い(例えば、1 µlあたり180,000,000のλファージのコピー)。さらに、多くの研究において、特に高いテンプレート濃度を用いた環境での肯定的な結果の有効性に関して、テンプレート非含有対照がないことが疑問視されることもない。ある機器に注目した報告は、熱的サイクリングデバイスの設計およびモデリングについて広範に調べており、最後の短時間PCRの実証では、高濃度の複雑度が低い標的を使用している。PCRサンプル非存在下でのモデリングおよび測定に基づいて、加熱速度および冷却速度(最大175°C/秒)が報告されている(17)。

【表 1】

表 1	最も速い サイクル 時間(秒)	[テンプレート] (コピー/μl)	テンプレート の形態	総 [プライマ ー](nM)	ポリメラーゼ	[ポリメラーゼ] (nM)	生成物の 長さ(bp)	定量化	傾向	方法	テンプレート 非含有対照	参考 文献
	20	1,600	ヒト DNA	1000	0.08 U/μl Taq	3	536	弱いゲルのバンド	[ポリメラーゼ]に伴う増 加	キャピラリー/空気 によるサイクリング IR 加熱、加圧空気冷 却	なし	3
	12	40,000	ラムダファージ 230bp の PCR 生 成物	400	0.2 U/μl Taq	7.5	500	キャピラリー電気泳動	?	連続流	なし	56
	12	1,000,000 4,700-	18S rDNA (ヒトゲノム)	1000	0.5 U/μl Taq	19	230	優れたゲルのバンド	サイクル数とコピー数に 依存	連続流	あり	55
	9.25	470,000		1800	Taq Gold	?	187	?	?	油中の液滴の IR 加熱 第一鉄粒子のプラグ を用いた連続流	なし	54
	9	18,000,000	ラムダファージ	2000	0.025 U/μl Taq	0.94	500	許容できるゲルのバン ド	サイクル時間に伴う強 度増加	連続流	なし	28
	8.5	?	gDNA	1800	?	?	82	80%の効率	より速いサイクルで効率 減少	微細加工カンチレバー	?	17
	7.0	10,000,000	1KB の PCR 生 成物	2000	0.25 U/μl Taq	9.4	176	対照の 7%	15 秒のサイクルで 50%	連続流	あり	22
	6.3	10,000	プラスミド (炭疽菌)	1200	0.05 U/μl Ex Taq HS	?	134	対照の 55%	?	プラグを用いた連続流	あり	53
	5.2/9.7	180,000,000	ラムダファージ	400	0.07 U/μl Taq	2.6	500/997	弱いゲルのバンド	サイクル時間に依存	連続流	なし	23
	5.25	1,400,000	枯草菌 (細菌 DNA)	500	0.025 U/μl KOD plus	?	72	90%の効率(SYBR)	1 回の試行 サイクル数に伴う収量 増加	アルミニウムプレート へのポンプ送水 多孔質の銅への ポンプ送水	あり	33
	4.6	34,000	E.ヘルピココーラ (細菌 DNA)	800	0.04 U/μl KAPA2G	4	58/160	弱いゲルのバンド	より高いコピー数で Cq 低下	?	なし	31
	4.2	50 ¹	(細菌 DNA) プラスミド	?	KOD plus 0.05 U/μl Ex	?	72	Cq = 33 (SYBR)	?	IR レーザー	?	51
	3.0	10,000	(炭疽菌)	1200	Taq HS	?	134	対照の 15%	7.5 秒のサイクルで 80%	蒸気圧を用いた一定流 ペルチエ素子からキャ ピラリーへのガリウムの 移動	あり(5%のシグ ナル)	35
	2.7	?	stx ファージ (大腸菌)	?	KOD	?	85	ほとんど目に見えない バンド	3.06 秒から 2.69 秒の サイクルで収量減少	?	なし	36
	2.6	?	stx ファージ (大腸菌)	?	0.5 U/μl Taq	19	85	かなり薄いバンド	2.8 秒から 2.6 秒のサイ クルで一定	加圧ガスおよび キャピラリー	なし	48

¹ SYBR グリッペンでのモニター下で 33 の Cq を有する 20nl の液滴中の単一コピーと推定されるが、PCR 生成物の同一性を確認するためのゲルまたは融解分析は行われていない。

² 「ブランキング」 サンプルが泳動されているが、これがテンプレート非含有対照であるかどうかは不明確である。

³ 論文では「プライマー」は 0.5mmol であると述べられており、特許出願(US2009/0275014A1)では「プライマー」は 0.01~0.5μM であると述べられている。

⁴ 2pg/μl の大腸菌 DNA であるが、DNA 調製物中のファージのコピー数は不明である。

⁵ 学位論文では 0.5μmol/10μl(50nmM)と述べられており、特許(US6,472,186)では 50pmol/10μl(5μM)と述べられている。

サイクル時間を短くする方法の1つは、温度サイクリングの必要条件を簡易化するためにPCRプロトコールにバリエーションを導入することである。より長いプライマーはより高い T_m を有するため、アニーリング温度が高くなる場合がある。生成物の長さとその T_m を制限することによって、生成物の T_m をわずかに超えた温度まで変性温度を低くできる。より高いアニーリング温度とより低い変性温度とを組み合わせることにより、増幅の成功に必要な温度範囲を減少させる。また3工程サイクリング（変性、アニーリング、および伸長）を2工程（変性および併合されたアニール／伸長工程）に減らすことも、温度サイクリングの必要条件を簡易化する。温度範囲の減少と2工程サイクリングはいずれも、表1に記載された20秒未満のサイクル時間を用いた研究において典型的である。しかし、併合されたアニール／伸長工程が、70℃よりも低い温度から、ポリメラーゼが最も活性化する最適な80℃までの温度で行われる場合、2工程サイクリングはポリメラーゼ伸長速度を遅くする場合がある。ポリメラーゼ伸長速度は、約70～80℃までの温度では対数線形を示し、60～120 bp／秒の最大値が報告されている（50）。

10

【0020】

プロトコールのバリエーションを用いたとしても、サイクル時間が20秒未満である場合、対照反応と比較して、増幅効率および収量は不十分であることが多い（22、23）。これらのより速いPCRに向けられた努力は工学面に偏りすぎているようであり、生化学面はほとんど注目されていない。サイクル時間が20秒から2秒に短くなるにつれて、PCR収量は減少し、最終的には収量ゼロになるが、これは、単純な標的を高コピー数で用いた場合でさえもロバスト性が欠如することを反映している。

20

【0021】

表1で開示された様々な参考文献に記載の機器は、反応条件が合えば極めて速いPCRに適している場合がある。本明細書において開示されたように、プライマー、ポリメラーゼ、およびMg⁺⁺の濃度を高めることに注目することにより、反応ロバスト性と収量を保持しつつ「エクストリームPCR（extreme PCR）」（20秒未満のサイクル（10分未満で30サイクル）のPCR）が実現化される。

【発明の概要】

【0022】

本発明の一態様において、増幅中の生体サンプル中の標的核酸配列を増幅する方法が提供され、本方法は、熱安定性ポリメラーゼおよび標的核酸配列を増幅するように構成されたプライマーを生体サンプルに添加する工程であって、該ポリメラーゼが少なくとも0.5 μMの濃度で提供され、該プライマーがそれぞれ、少なくとも2 μMの濃度で提供される工程と、エクストリーム温度サイクリングプロファイルを使用して、複数の増幅サイクルにわたり少なくとも変性温度と伸長温度との間で生体サンプルを熱的にサイクリングすることによるポリメラーゼ連鎖反応によって、標的核酸配列を増幅する工程であって、各サイクルが1サイクルあたり20秒未満で完了する工程とを含む。

30

【0023】

本発明の他の態様において、増幅中の生体サンプル中の標的核酸配列を増幅する方法が提供され、該方法は、熱安定性ポリメラーゼおよび標的核酸配列を増幅するように構成されたプライマーを生体サンプルに添加する工程であって、該ポリメラーゼとプライマーの比率は、（約0.03～約0.4のポリメラーゼ）：（プライマーの総濃度）であり、該ポリメラーゼの濃度が少なくとも0.5 μMである工程と、エクストリーム温度サイクリングプロファイルを使用して、複数の増幅サイクルにわたり少なくとも変性温度と伸長温度との間で生体サンプルを熱的にサイクリングすることによるポリメラーゼ連鎖反応によって、標的核酸配列を増幅する工程であって、各サイクルが20秒未満で完了する工程とを含む。

40

【0024】

本発明のさらに他の態様において、PCRを行うためのデバイスが提供され、該デバイスは、PCRサンプルを保持するためのサンプル容器と、サンプルを加熱する手段と、サンプルを冷却する手段と、サンプルを加熱する手段およびサンプルを冷却する手段にサン

50

プル容器を繰り返し晒して、サンプルを少なくとも200℃/秒の傾斜速度で熱的にサイクリングするための制御手段とを含む。

【0025】

さらなる一実施形態において、標的核酸でPCRを行うためのキットが提供され、該キットは、dNTPと、少なくとも0.5μMの濃度で提供されるポリメラーゼと、少なくとも2μMの濃度でそれぞれ提供される、標的核酸を増幅するように構成された一对のプライマーとを含む。

【0026】

以下に記載された、現在認識される本発明を実行するにあたり最良の形態を例示した好ましい実施形態の詳細な説明を考察すれば、本発明の追加の特徴が当業者に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1a】エクストリームPCRを行うための略図である。

【図1b】水槽中の1つのサンプルチューブをモニタリングするためのリアルタイム機能を有するエクストリームPCRを行うための例示的なデバイスを示す図である。

【図1c】3温度サイクリングを用いた例示的なエクストリームPCRを行うためのデバイスを示す図である。

【図1d】温度参照キャピラリーを共に示した図1bにおけるデバイスの光学素子の拡大図である。

【図2a】図1bのサンプルホルダーの位置（点線）にサンプル温度（直線）を重ね合わせたグラフである。

【図2b】図1bに示したデバイスを使用したエクストリームPCRの温度を示したグラフである。

【図2c】図2bとの比較のために示された回転式のLightCyclerを使用した迅速サイクルPCRの温度を示したグラフである。

【図3a】図2bの温度プロファイルを使用して増幅した、エクストリームPCR生成物（点線）および迅速サイクルPCR生成物（二点鎖線）の微分融解曲線をエクストリームサイクリングの陰性対照（直線）および迅速サイクリングの陰性対照（一点鎖線）と共に示すグラフである。

【図3b】図3aの同じサンプルの2% SeaKem LEアガロースゲルの写真であり、レーン1および8はサイズマーカーであり、レーン2および3は30秒のエクストリームPCRの結果得られた生成物であり、レーン4は30秒のエクストリームPCRのテンプレート非含有対照であり、レーン5および6は12分のPCRの結果得られた生成物であり、レーン7は12分のPCRのテンプレート非含有対照である。

【図3c】図3aおよび3bで示されたのと同じ生成物を増幅したエクストリームPCRの温度の軌跡（点線）を、同じ反応のリアルタイムモニタリング（直線）と共に示すグラフである。

【図4a】温度制御により伸長速度を増加させたエクストリームPCRの温度の軌跡を示すグラフである。

【図4b】図1bのサンプルホルダーの位置（直線）にサンプル温度（点線）を重ね合わせた、図4aの部分拡大図である。

【図4c】IRL10RBの58bpのアンプリコンの負の微分融解曲線（ $-dF/dT$ ）を示すグラフであり、AA（直線）、AG（一点鎖線）、およびGG（点線）の遺伝子型が示される。

【図5a】エクストリームPCRを使用して、ポリメラーゼ濃度対プライマー濃度対PCR生成物濃度をプロットした3次元グラフである。

【図5b】図5aで使用されたエクストリームPCRの温度の軌跡を示すグラフである。

【図5c】図5aからの4μMのKlentakポリメラーゼ（KT POL）生成物の負の微分融解曲線を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図5d】図5aに基づき10 μ Mのプライマー濃度で様々なポリメラーゼ濃度を使用したエクストリームPCRの結果を示すアガロースゲルの写真である。

【図6a】19ゲージのステンレス鋼チューブ中で行われたエクストリームPCRの温度の軌跡を示すグラフである。

【図6b】図6aのエクストリーム温度サイクルによって生産されたPCR生成物のゲルの写真である。

【図7a】長い（1秒の）併合されたアニール／伸長工程を用いたエクストリームPCRの温度の軌跡を示すグラフである。

【図7b】102bpの生成物にエクストリームPCRを使用して、ポリメラーゼ濃度対プライマー濃度対PCR生成物濃度をプロットした3次元グラフである。

【図8a】1秒の併合されたアニール／伸長工程を使用して226bpの生成物を増幅するのに使用されるエクストリームPCRの温度プロファイルを示すグラフである。

【図8b】4秒の併合されたアニール／伸長工程を使用して428bpの生成物を増幅するのに使用されるエクストリームPCRの温度プロファイルを示すグラフである。

【図8c】図8aから得られたリアルタイムの結果と、2秒のアニール／伸長工程を使用した類似の温度の軌跡を示すグラフであり、それぞれテンプレート非含有対照を包含する。

【図8d】図8bから得られたリアルタイムの結果と、5秒のアニール／伸長工程を使用した類似の温度の軌跡を示すグラフであり、それぞれテンプレート非含有対照を包含する。

【図9a】異なる開始濃度でのKCNE1の45bpのフラグメントの増幅曲線を示すグラフである。

【図9b】図9aからのデータのCq対log₁₀（最初のテンプレートのコピー数）のプロットである。反応は5連で行われた。

【図9c－9d】NQO1の102bpのフラグメントの増幅が示されていることを除いては図9a～9bと同様のグラフである。

【図10a】300bpの生成物にエクストリームPCRを使用して（20サイクル、1サイクルあたり4.9秒）、ポリメラーゼ濃度対プライマー濃度対PCR生成物濃度をプロットした3次元グラフである。

【図10b】KAPA2G FASTポリメラーゼおよび1～5秒の伸長時間を使用した500bpの合成テンプレートのPCR増幅に関する蛍光対サイクル数のプロットである。

【図10c】数種のKlenTaqポリメラーゼ濃度およびKAPA2G FASTポリメラーゼに関する伸長した長さ対最小の伸長時間のプロットである。

【図11a】100bpのサイズを有する生成物のPCR増幅に関する蛍光対サイクル数のプロットである。

【図11b】200bpのサイズを有する生成物のPCR増幅に関する蛍光対サイクル数のプロットである。

【図11c】300bpのサイズを有する生成物のPCR増幅に関する蛍光対サイクル数のプロットである。

【図11d】400bpのサイズを有する生成物のPCR増幅に関する蛍光対サイクル数のプロットである。

【図11e】500bpのサイズを有する生成物のPCR増幅に関する蛍光対サイクル数のプロットである。

【図12a】様々なマグネシウム濃度を使用したエクストリームPCRの35サイクル後における、AKAP10の60bpのフラグメントの負の微分融解曲線を示すグラフである。

【図12b】図12aの負の微分融解曲線で示されたPCR生成物のゲルの写真である。

【図13a】5mMのMg⁺⁺と共に様々なサイクル時間を使用した35サイクル後における、AKAP10の60bpのフラグメントの負の微分融解曲線を示すグラフである。

10

20

30

40

50

サイクル時間は、0.32秒（直線）、0.42秒（二点鎖線）、0.52秒（一点鎖線）、および0.62秒（点線）であった。サイクル時間には、60°の槽中での0.1～0.4秒の保持時間が包含される。

【図13b】図13aの負の微分融解曲線で示されたPCR生成物のゲルの写真である。

【図14a】3種の異なる機器：（1）エクストリームPCR、（2）LightCycler（Roche）、および（3）CFX96（BioRad）で増幅した場合の、AKAP10の60bpのフラグメントの負の微分融解曲線を示すグラフである。

【図14b】図14aの負の微分融解曲線で示されたPCR生成物のゲルの写真である。

【図15a－15b】PCRの平衡パラダイム（図15a）および動力学的パラダイム（図15b）に関する例示的なプロファイルを示すグラフである。黒く塗り潰された部分は、熱的サイクリング中の核酸の変性を示し、斜線部分はアニーリングを示し、白一色の部分は伸長を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本明細書で使用される場合、用語「a」、「an」、および「the」は、1つまたは複数を意味し、状況が不適切でない限り複数形を包含するものと定義される。範囲は、本明細書では、「およその」1つの特定の値から、および／または「およその」別の特定の値までと表される場合がある。用語「約」は、本明細書では、およそ、ほぼ、だいたい、または概ねを意味するものとして使用される。用語「約」が数値範囲と共に使用される場合、「約」は、明示された数値よりも上および下に境界を広げることによりその範囲を修正する。一般的に、用語「約」は、本明細書では、述べられている値よりも5%の偏差で上および下に数値を修正するために使用される。このような範囲が示される場合、他の実施形態は、1つの特定の値から、および／または他の特定の値までを包含する。同様に、接頭語「約」の使用によって値が近似値として示される場合、特定の値により他の実施形態が形成されるものと理解されよう。さらに、それぞれの範囲の端点は、他方の端点と関連して、かつ他方の端点とは独立してどちらも有意であることが理解されよう。

【0029】

単語「または」は、本明細書で使用される場合、具体的に列挙されたもののうちいずれか1つのものを意味し、さらにその列挙されたもののいずれかの組み合わせも包含する。

【0030】

「サンプル」は、動物；動物からの組織または臓器；細胞（対象内の細胞、対象から直接採取した細胞、または培養物中で維持された細胞もしくは培養細胞株からの細胞のいずれか）；細胞溶解産物（または溶解産物画分）または細胞抽出物；細胞、細胞材料、またはウイルス材料から誘導された1種または複数の分子（例えばポリペプチドまたは核酸）を含有する溶液；または本明細書で説明されているようなアッセイされる天然に存在する核酸もしくは天然に存在しない核酸を含有する溶液を意味する。またサンプルは、細胞、細胞成分、または核酸を含有する任意の体液または排出物（例えば、これらに限定されないが、血液、尿、便、唾液、涙、胆汁など）であってもよい。

【0031】

語句「核酸」は、本明細書で使用される場合、天然に存在する、または合成のオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを指し、これらは、DNAまたはRNAまたはDNA-RNAハイブリッド、一本鎖または二本鎖、センスまたはアンチセンスかどうかにかかわらず、ワトソン-クリック塩基対形成によって相補的核酸にハイブリダイズ可能なものである。また本発明の核酸は、ヌクレオチド類似体（例えば、BrdU、dUTP、7-デアザ-dGTP）、およびヌクレオシド間の非ホスホジエステル結合（例えば、ペプチド核酸（PNA）またはチオジエステル結合）を包含していてもよい。特に、核酸としては、これらに限定されないが、DNA、RNA、cDNA、gDNA、ssDNA、dsDNA、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0032】

「プローブ」、「プライマー」、または「オリゴヌクレオチド」は、相補配列を含有す

10

20

30

40

50

る第二のDNA分子またはRNA分子（「標的」）と塩基対を形成できる限定された配列の一本鎖のDNA分子またはRNA分子を意味する。その結果得られたハイブリッドの安定性は、長さ、GC含量、最隣接のスタッキングエネルギー、および発生する塩基対形成の程度によって決まる。塩基対形成の程度は、例えばプローブと標的分子との相補性の程度などのパラメーター、およびハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーの程度の影響を受ける。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの程度は、例えば温度、塩濃度、および例えばホルムアミドなどの有機分子の濃度といったパラメーターの影響を受け、当業者に公知の方法によって決定される。プローブ、プライマー、およびオリゴヌクレオチドは、当業者に周知の方法で、放射性標識、蛍光標識、または非放射性標識のいずれかによって検出できるように標識されていてもよい。dsDNA結合色素（二本鎖DNAに結合すると、一本鎖DNAに結合するかまたは溶液中で遊離状態である場合よりも強い蛍光を発する色素）を使用して、dsDNAを検出することができる。「プライマー」は、ポリメラーゼによって伸長するように特異的に構成されるが、それに対して「プローブ」または「オリゴヌクレオチド」は、そのように構成されていてもよいし、または構成されなくてもよいことが理解されている。

10

【0033】

「特異的にハイブリダイズする」は、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドが、高いストリンジェンシー条件下で実質的に相補的な核酸（例えばサンプル核酸）を認識し物理的に相互作用して（すなわち塩基対を形成して）、他の核酸とは実質的に塩基対を形成しないことを意味する。

20

【0034】

「高いストリンジェンシー条件」は、65℃の温度で、0.5MのNaHPO₄、pH 7.2、7% SDS、1mMのEDTA、および1% BSA（Fraction V）を含有する緩衝液中で、または42℃の温度で、48%ホルムアミド、4.8×SSC、0.2Mのトリス-Cl、pH 7.6、1×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、および0.1% SDSを含有する緩衝液中で、長さが少なくとも40ヌクレオチドのDNAプローブを使用した結果起こるハイブリダイゼーションと同等のハイブリダイゼーションが起こる条件を意味する。例えばPCR、ノーザン、サザン、またはインサイチュハイブリダイゼーション、DNA配列決定などの高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションのための他の条件は、分子生物学分野の当業者にとって周知である（47）。

30

【0035】

例示的な実施形態において、20秒未満のサイクル時間を用いたPCR、いくつかの実施形態では10秒未満、5秒未満、2秒未満、1秒未満、および0.5秒未満のサイクル時間を使用したPCRのための方法およびキットが提供される。これらのサイクル時間を用いれば、30サイクルのPCRは、それぞれ10分未満、5分未満、2.5分未満、1分未満、30秒未満、および15秒未満で完了する。PCR速度が速くなればなるほど、プライマー濃度とポリメラーゼ濃度とが増加することによりPCR効率および収量が維持される。

【0036】

PCRの3要素反応（プライマーのアニーリング、ポリメラーゼ伸長、およびテンプレート変性）のどれが不十分になっても、PCRの効率および収量が制限される場合がある。例えば、プライマーがテンプレートの95%にしかアニールしない場合、たとえそのテンプレートの100%が変性してプライマーが結合したテンプレートの100%が伸長して全長生成物になったとしても、PCR効率が95%よりも大きくなることはできない。同様に、伸長効率がわずか95%である場合も、可能な最大のPCR効率は95%でしかない。PCR生成物濃度をサイクルごとに2倍にするためには、全ての要素が、100%の達成率を得なければならない。以降の段落で、変性、アニーリング、および伸長を順次考察する。

40

【0037】

遅いPCR（60秒未満のサイクル）、迅速PCR（20～60秒のサイクル）、およ

50

びエクストリームPCR（20秒未満のサイクル）の温度サイクリングにおいて、PCRの失敗に関する一般的な原因は、不十分な変性である。目標は、各サイクルでの変性を完全に行い、プライマーのアニーリングで定量的なテンプレートが利用できるようにすることである。PCR前の最初のテンプレートの変性、特にゲノムDNAの変性は通常、PCR中の増幅生成物の変性よりもより厳しい条件を必要とする。元の迅速サイクルPCRの最適化（4）は、テンプレートを沸騰させた後に行われているが、これは、最初のゲノムDNAを確実に変性させる優れた方法である。不完全な最初の変性は、高い T_m を有する標的、特に高い安定性のフランキング領域を有する標的の場合に起こる場合がある（37）。そのために、特に、変性中のわずかな温度差がPCR効率に影響を与える場合、例えばゲノムの挿入または欠失に関して、定量的PCRの性能が損なわれる場合がある（37～39）。先に行われた沸騰または制限消化（37）が望ましくなく、より高い変性温度がポリメラーゼ性能を損なう場合、生成物の T_m を下げるアジュバントを使用して変性を補助してもよい。

10

【0038】

変性のための初期設定の標的溫度として94℃が使用されることが多いが、それが最適であることはめったにない。PCR生成物は、主にGC含量と長さに応じて40℃より高い温度範囲で融解する（43）。PCR生成物が、より低い変性温度が使用できるように十分低い温度で融解する場合、低い変性標的溫度は、速度の利点と特異性の利点の両方を有する。変性温度が低ければ低いほど、サンプルはより速く変性温度に到達でき、より速くPCRを行うことができる。より高い変性温度で発生し得る生成物は二本鎖のままであり、プライマーのアニーリングに利用できないと予想されるため、これらの発生し得る全ての生成物を排除することによりさらに特異性が高められる。高い T_m の生成物を増幅するために、標的溫度を94℃より高くする必要がある場合がある。しかし、現行の熱安定性ポリメラーゼのほとんどは97℃より高温で変性し始め、PCR溶液は標高に応じて95℃から100℃の間で沸騰する場合があるため、溫度を高める余地がさほどない。1価の塩および Mg^{++} 濃度を低くすると、生成物の T_m が下がる。同様に、dUTPおよび／または7-デアザ-dGTPを取り込むことによっても生成物の T_m は下がるが、ポリメラーゼ伸長速度を減少させる場合がある。ほとんどの独自のPCRの「エンハンサー」は、生成物の T_m を下げて高い T_m の生成物の変性（および増幅）を可能にする単純な有機物質である。これらのなかでも最も一般的に普及しているものは、DMSO、ベタイン、グリセロール、エチレングリコール、およびホルムアミドである。 T_m を下げることに加えて、これらの添加剤のうちいくつかは、PCR混合物の沸点も上昇させる（特に高い標高で有用である）。エンハンサー濃度が増加するにつれ、生成物の T_m は下がるが、ポリメラーゼ阻害が増加する場合がある。

20

30

【0039】

しかし、エクストリームサイクリング条件下であっても変性が律速である必要はない。なぜなら、溫度が生成物の T_m からわずかに上回っていても、DNAの巻き戻しが最初に極めて速く起こる（10～100ミリ秒）ためである。変性は、増幅生成物の T_m よりも測定が困難な2～3℃高い溫度で迅速に起こるが、アンプリコンの完全な変性はおそらく0.1秒未満で起こる。複数のドメインで生成物が融解する場合、標的の変性溫度は、最も高い融解ドメインよりも2～3℃高いと予想される。サンプルがこの溫度に到達する限りは、長い生成物であったとしても変性は極めて速い。キャピラリーおよび水槽を使用すれば（40）、20k Bを超えるPCR生成物の完全な変性が1秒未満で起こる（52）。生成物の T_m および融解ドメインは、例示的には、DNA色素および高解像度融解を用いて実験的に決定される（41）。 T_m の推測はソフトウェアでの予測により達成できるが（42）、その精度は限定的である。さらに、観察された T_m は、例えば塩濃度および任意の色素やアジュバントの存在などの局所的な反応条件に強く依存する。したがって、観察された T_m は通常、より反応条件に適合されている。

40

【0040】

効率への影響がなければ、変性への接近速度は、可能な限り速くてもよく、例えば図2

50

aおよび図6aで示されるように200～400℃/秒であってもよい。これらの速度では、変性温度に到達するのに約0.1～0.2秒しか要さない。しかし、標的温度に接近するときのより遅い速度は、標的温度を上回る危険を減少させ、起こり得るポリメラーゼの不活性化または溶液の沸騰を回避する。より遅い接近温度を達成する例示的な方法の1つは、標的温度よりも5～10℃高い温度の高温槽にサンプルを浸すことである。標的と槽温度との温度差により指数関数的な接近曲線が定められ、差が小さくなるにつれてこの接近曲線は自動的に遅くなる。温度を連続的にモニタリングすることによって、変性の目標が達成されたら次の相（アニーリングまで冷却すること）が始動する。まとめると、PCRにおける完全な生成物の変性は、生成物の最も高い融解ドメイン温度よりも2～3℃高い温度で0.2秒未満を必要とし、可能な限り迅速に、例示的には40～400℃/秒で変性温度に接近し得る。変性は最初に起こるため、その速度は生成物の濃度にも依存し、効率（または変性される生成物のパーセンテージ）は生成物の濃度とは無関係である。

10

【0041】

低品質のPCRでは、不完全なかつ／または間違ったプライマーのアニーリングが生じる場合がある。全てのテンプレート部位にプライマーが結合しない場合に、効率が低くなる。さらに、望ましくない部位でプライマー結合が起こる場合、別の生成物が生産される場合がある。目標は、実質的に、各サイクルで望ましい部位でのみ完全なプライマーのアニーリングを達成し、ポリメラーゼ伸長のために定量的なプライマーが結合したテンプレートを提供することである。

20

【0042】

20～60秒のサイクルを用いた迅速PCRプロトコールは、500nMのプライマーのT_mよりも5℃低い温度で1秒未満のアニーリング時間を提唱している（52）。20秒未満のサイクルを試みた機器の場合のプライマー濃度は、それぞれ200～1,000nMの範囲である（表1）。これらの濃度は、長いアニーリング時間が使用される従来のPCR（60秒未満のサイクル）で使用される濃度に類似している。プライマー濃度を低くすることは、特異性を向上させるために使用されることが多く、プライマー濃度を増加させることは、非特異的増幅に関する懸念のために考慮されることはまれである。しかし、迅速サイクリングを用いる場合、特異性の向上はより短いアニーリング時間に起因している（5）。この傾向が継続すれば、エクストリームPCRの極めて短いアニーリング時間は、高いプライマー濃度を容認するものと想像できる。アニーリングを促進するために、20～60秒のサイクルの場合、プライマーのT_mよりも5℃低いアニーリング温度が推奨される。T_mは、増幅で使用されるのと同じ緩衝液条件下で飽和させたDNA色素およびオリゴヌクレオチドを使用した融解分析によって最もよく実験的に測定される。プライマーを、ダングリング末端（dangling end）として5'伸長部分を有するその相補標的と組み合わせることにより、そのテンプレートにアニールしたプライマーの安定性を最適に概算し、融解分析が行われる。

30

【0043】

変性と対照的に、アニーリング効率はプライマー濃度に依存する。プライマーのアニーリングは、極めて速いサイクル速度で制限的になる場合がある。プライマーのアニーリングは、2番目に起こる反応であり、プライマー濃度と標的濃度の両方に依存する。しかし、多くのPCRにおいて、プライマー濃度は標的濃度よりもかなり高く、実際的にはアニーリングは擬似的に最初に起こり、プライマー濃度にも依存する。このケースにおいて、プライマーが結合した生成物の比率（アニーリング効率）は、プライマー濃度にも依存して生成物濃度には依存しないことから、より高いプライマー濃度は、より短いアニーリング時間を可能にすると予想される。さらに、理論にとらわれずにいえば、その関係は直線的であると考えられる。アニーリング時間がより短くなればなるほど、PCRの効率および収量を維持するためにはプライマー濃度の増加が必要になる。例えば、迅速サイクリングは、プライマーのT_mよりも5℃低い温度で約1～3秒のアニーリングを可能にする（3）。エクストリームPCRにおいて、このアニーリング時間（T_m－5℃、または

40

50

それより低い温度で)を10倍短くする場合、プライマー濃度を10倍増加させれば類似のプライマー結合効率が期待される。有効なアニーリング時間が次第に短くなるにつれて、プライマー濃度もほぼ同じ倍率で次第に高くなるべきである。典型的な迅速PCRプロトコルは、500 nMの各プライマーを使用する。エクストリームPCRにおいてアニーリング時間が3倍から40倍短くなると、同じプライマー結合効率を得るのに必要なプライマー濃度は、各プライマーで1, 500~20, 000 nMである。これは、プライマーの合計で3, 000~40, 000 nMと同等であり、表1に記載されたいずれのプライマー濃度よりも高い。これは、先に行われた試みで20秒未満のサイクリングでの効率が不十分であることの理由の1つは、不十分なプライマー濃度の後に起こる不十分なアニーリング効率であることを示唆している。エクストリームPCRでは、プライマー濃度をそれぞれ1.5~20 μ Mに増加させることにより、0.05~0.3秒のアニーリング時間にもかかわらず優れたアニーリング効率を達成している。増加させたプライマー濃度を使用すれば、アニーリング時間の短縮を相殺して同じアニーリング効率を達成することが可能なため、さらにより短いアニーリング時間でさらにより高いプライマー濃度を考慮できる。市販されているほとんどの機器は少なくとも1秒の保持時間を必要とし、わずかな機器が「0」秒の保持時間を許容することが知られているが、わずかな秒の保持時間を許容する市販の機器はない。エクストリームPCRのいくつかの実例について、0.1秒または0.01秒きざみの保持時間が望ましい場合がある。

10

【0044】

効率を犠牲にすることなくアニーリング速度を増加させアニーリング時間を短くする別の方法は、 Mg^{++} 濃度を増加させることである。アニーリング速度は、イオン強度の増加に伴い増加し、プライマーのアニーリングを包含するハイブリダイゼーション速度を増加させるには2価カチオンが特に有効であることが当分野において知られている。

20

【0045】

例示的には、アニーリングの標的溫度への接近速度は、可能な限り速くてもよい。例えば、200~800℃/秒で(図2aおよび図6a)、0.05~0.2秒でアニーリング溫度に到達することが可能である。また迅速な冷却も、全長生成物の再ハイブリダイゼーションを最小化する。冷却中に二重鎖増幅生成物が形成される程度になると、プライマーは二重鎖生成物にアニールできないため、PCR効率は低下する。これはPCR初期ではめったに起こらないが、生成物濃度が増加するにつれて、冷却中に二重鎖がますます形成されるようになる。SYBR(登録商標)グリーンIを用いた連続的なモニタリングから、このような生成物の再アニーリングが、PCRがプラトーになる主な原因である場合があることが示唆される(44)。

30

【0046】

ポリメラーゼ伸長も時間を必要とし、伸長時間が短い場合にPCR効率を限定する場合がある。より長い生成物は、PCR中により長い伸長時間を必要とすることが知られており、推定上全ての生成物の伸長を完了させるために、PCRの最後に数分の最終的な伸長が付け足されることが多い。長い生成物のための通常のアプローチは、伸長にかかる時間を長くすることである。プライマーのアニーリングおよびポリメラーゼ伸長が同じ温度で行われる2工程サイクリングのいくつかのケースと同様に、より低い伸長温度を使用することにより必要な時間がさらに長くなる。

40

【0047】

最適なPCR効率のためには、各サイクルにおけるプライマーが結合したテンプレートの実質的に完全な伸長が必要である。ほとんどのポリメラーゼ伸長速度は、温度に伴い所定の最大値まで増加する。Taqポリメラーゼの場合、最大値は75~80℃で約100ヌクレオチド/秒であり、温度が10℃低下するごとに約4倍減少する(50)。536bpのベータグロビン生成物の場合、迅速サイクルPCRでは76℃が最適であることが見出された(4)。近年、商業的な要求に応じて、全体のPCR時間を短くできるより速いポリメラーゼが導入されつつあり、これは、このようなポリメラーゼが、より長い生成物のための伸長保持時間を不要にするかまたは短くできることを示唆している。

50

【0048】

より速いポリメラーゼ伸長速度の代替策またはそれを補強する策として、ポリメラーゼ濃度を増加させると必要な伸長時間が短くなることが発見された。500 nMの各プライマーと共に、PCRにおいて標準的なTaqポリメラーゼ濃度(0.04 U/μl)または1.5 nM(49)を使用すると仮定すれば、各プライマーがテンプレートに結合する場合、一度にテンプレートの0.15%が伸長する程度のポリメラーゼしか存在していないため、新しいプライマーが結合したテンプレート全てを伸長させるためにはポリメラーゼをそれらに何度も再利用することが必要となる。ポリメラーゼ濃度を増加させることにより、プライマーが結合した有効なテンプレートのより多くが一度に伸長され、テンプレート全てを伸長させるのに必要な時間を短くするが、これはおそらく、より速い伸長速度

10

【0049】

一次近似によれば、小さいPCR生成物の場合(100 bp未満)、必要な重合時間は、酵素の重合速度(それ自身が温度の関数である)およびポリメラーゼ濃度に正比例するようである。また必要な時間は、伸長させようとするテンプレートの長さ(生成物の長さからプライマーの長さを引いた長さ)に反比例する。ポリメラーゼ活性を、PCRにおいて標準的な活性である0.04 U/μlの20~300倍に増加させることにより、20秒未満のサイクルを用いたエクストリームPCRは、特異的な生成物の高い収量を達成できる。すなわち、0.8~1.2 U/μl(1~16 μMのKlenTaq)の活性は、0.1~1.0秒の併合されたアニール/伸長時間を用いた2工程のエクストリームPCRを可能にする。これまでに使用された最大のポリメラーゼ活性は、0.5 U/μlであった(表1)。エクストリームPCRの実例で使用される2工程PCRの場合、70~75℃での併合されたアニール/伸長工程がより速い重合速度にとって有利である。さらに、2工程PCRは温度サイクリングを簡易化するため、エクストリームサイクリング(20秒未満のサイクル)の実例では典型的には2工程PCRが使用され、迅速なアニーリングと迅速な伸長の両方が、併合されたアニール/伸長工程の間に起こらなければならない。それゆえに、実例では増加させたプライマー濃度と増加させたポリメラーゼ濃度の両方が使用され、その結果として、エクストリーム2温度サイクリング下でロバストなPCRがもたらされる。例示的には、以下に記載される実施例で例示されるように、50~75℃で

20

30

【0050】

また、エクストリーム3温度サイクリングも想定され、その場合、アニーリング工程および伸長工程は異なる温度で別々に維持される。このケースにおいて、アニーリング工程および伸長工程に配分される時間を個々に制御して、具体的な要求に合わせることが可能である。例えば、アニーリング時間のみが短く(0.05~0.2秒)伸長時間が比較的長く維持される場合(例示的には1、2、5、10または15秒)、効率的なPCRのためにはプライマー濃度だけを増加させればよい。あるいは、伸長時間は短い(70~80℃の範囲内で1秒未満)、アニーリング時間は長い場合、効率的なPCRを達成するためにはポリメラーゼ濃度だけを増加させればよいと考えられる。効率的なPCRとは、例示的には少なくとも70%の効率、より例示的には少なくとも80%の効率、さらには少なくとも90%の効率を有するものと理解される。

40

【0051】

100 bpよりも長い生成物の場合、エクストリームPCRを使用した効率的な伸長は、高いポリメラーゼ濃度と増加させた伸長時間との組み合わせを必要とする場合がある。

50

ポリメラーゼが過量に存在する場合、例示的には、最小の時間は、塩基の伸長の長さ（生成物の長さからプライマーの長さを引いた長さとして定義される）を塩基／秒単位のポリメラーゼ伸長速度で割った値であるはずである。しかし、これまで述べてきたように、ポリメラーゼが飽和しているのは通常、テンプレート濃度がポリメラーゼ濃度よりも大きくなる前、PCRの開始時のみである。サイクル時間を短くする方法の1つは、ポリメラーゼの最大温度近傍、典型的には70～80℃で、2温度PCRを使用することである。必要な伸長時間は、リアルタイムPCRを使用して定量サイクル、すなわちC_qをモニタリングすることによって実験的に決定できる。例えば、75℃で100塩基／秒のポリメラーゼ伸長速度では、ポリメラーゼ濃度が過量である場合、200bpの生成物は、約2秒を要すると予想される。同様に、400bpの生成物は、これと同じポリメラーゼを使用した場合、その濃度が、伸長されるテンプレートの濃度よりも高い限りは約4秒を要すると予想される。ポリメラーゼが過量ではない場合、より多くのポリメラーゼを添加することによって、より多くのテンプレートが同時に伸長されて、ポリメラーゼ濃度に比例して必要な伸長時間を短くすることが可能になる。

10

【0052】

任意のDNA分析方法の有用性は、どれだけ速く行うことができるか、どれだけ多くの情報が得られるか、およびどの程度難しいかによって決まる。従来のクローニング技術と比較して、PCRは速くかつ簡単である。迅速サイクルPCRおよびエクストリームPCRは、必要な時間の連続的な短縮に重点を置いている。リアルタイムPCRは、各サイクルでデータを得ることにより情報量を増加させる。PCR中またはPCR後に融解分析を行って、温度を増加させながらDNAハイブリダイゼーションを連続的にモニターできる。

20

【0053】

PCRの平衡パラダイムおよび動力学的パラダイムに戻って考えると（図15a～15b）、100bp未満の生成物のエクストリームPCRは、動力学的モデルがよく当てはまることが実証されている。温度は常に変化しており、変性、アニーリング、および伸長の速度は温度依存性であることから、PCRの適切な評価は、温度全域にわたる各要素の反応速度を統合することでしか得られない。100bpより大きい生成物の場合、より長い伸長時間を要する場合があります、反応速度論モデルと平衡モデルのどちらの要素でも適切である。

30

【0054】

本明細書に記載の少なくとも1つの実施形態に従って反応条件が構成される場合、いくつかの実施形態に関して例示すれば、2秒未満のサイクル時間を用いて、完全な増幅のために1分未満で、極めて速い速度でPCRを行うことができることが発見された。例示的には、このエクストリームPCRに、増加させたポリメラーゼ濃度とプライマー濃度との様々な組み合わせが使用される。いずれの特定の理論にとらわれずにいえば、過剰な濃度のプライマーは、概して完全なプライマーのアニーリングを可能にし、それによってPCR効率を増加させると考えられる。同様にいずれの特定の理論にとらわれずにいえば、ポリメラーゼ濃度を増加させることによって、より完全な伸長がもたらされるためにPCR効率が向上すると考えられる。ポリメラーゼ濃度を増加させることにより、アニールしたプライマーへの結合が促進され、さらに完全な伸長の前にポリメラーゼが離れた場合でも再結合が促進される。以下に記載の実施例で、複雑な真核生物ゲノムDNAを用いて開始した場合でもエクストリームPCRが成功したことを示す。

40

【0055】

以下に記載される実施例ではKlenTaqを使用したが、類似の活性を有する任意の熱安定性ポリメラーゼが、ポリメラーゼ伸長速度を考慮した類似の方式でエクストリームPCRで性能を発揮すると考えられる。本明細書で提示されたように、例示的には酵素の活性化率（activity rate）の差で調節することにより濃度を増加させて使用した場合、エクストリームPCRを可能にすると予想されるポリメラーゼの市販の調製物としては、例えば、Herculase、Kapa2G FAST、KOD Phus

50

ion、天然のまたはクローニングしたサーマス・アクアティカス (Thermus aquaticus) のポリメラーゼ、Platinum Taq、GoTaq、およびFast Startが挙げられる。

【0056】

2秒のサイクル時間を可能にする現行の市販のPCR機器はないため、システム4を組み立てて、エクストリームPCRの構想の証明試験を行った。しかし、システム4は例示的なものであり、迅速に熱サイクリング可能な他のシステムも本開示の範囲内であることが理解される。図1aで示されるように、95.5℃（本発明の実施例が行われた場所であるユタ州ソルトレイクシティでの沸騰水の温度）の高温の水槽10、および30~60℃の低温の水槽14を使用して、サンプル容器20中に入れられた1~5μlのサンプルの温度を変化させる。例示的な水槽10、14は4.5クォートのステンレス鋼製ドレッシング用ジャー (Lab Safety Supply、番号41634) であるが、いくつかの実施例では500mlのガラスビーカーを使用して、磁気攪拌しながら電気ホットプレート12、16 (Fisher Scientific Isotempデジタルホットプレート (番号11-300-49SHP) で加熱が行われる。しかし、他の実施形態が、サンプルを加熱したり冷却したりするのに使用され得ることが理解される。図1aに示される実施形態において、サンプル容器20は、ガラス/プラスチック複合材の反応チューブ (BioFire Diagnostics、番号1720、内径0.8mm および外径1.0mm) である。しかし、他の実施例では、サンプル容器20として、皮下注射針 (Becton Dickinson、番号305187、内径0.042インチ、外径0.075インチ) と、ステンレス鋼管材料で構成されBioFireチューブのプラスチックの頂上部に適合させたステンレス鋼/プラスチック複合材の反応チューブ (Small Parts、内径0.042インチ/外径0.075インチ、内径0.035インチ/外径0.042インチ、または内径0.0265インチ/外径0.035インチ) とを使用した。その他のサンプル容器も本発明の範囲内であるが、大きい表面積対体積比を有し、速い熱伝達速度を有するサンプル容器が望ましい。所定の実施形態に関して、金属管材料の開放端をガス炎を使用して赤色から白色に加熱し、万力で圧縮することによって密封した。リアルタイムPCRの場合、光学的に透明であるか、または光学的に透明な部分を有するチューブが望ましい。短時間の遠心分離によりサンプルを各チューブの底部に沈降させた。

【0057】

サンプル容器20は、アーム21によりステッピングモーターのシャフト26に取り付けられたチューブホルダー22によって保持される。反応溶液が6.5~7.5cmの半径で保持されるように2~5個のサンプル容器20を保持するためのチューブホルダー22を、黒いデルリン (Delrin) プラスチックから機械製作した (図1aでは1つのサンプル容器20のみを図示したが、このようなサンプル容器20の列が存在してもよい)。図1aでは図示されていないが、熱電対 (Omega type T precision細線熱電対、番号5SRTC-TT-T-40-36、36インチのリード線、0.003インチの直径、テフロン (登録商標) 製絶縁材を有する) を使用して、温度を測定できる。図1bと類似したチューブホルダーおよびアームを示す図1dを参照すれば (同様の数値は類似の構成要素を示す)、2つのサンプル容器を保持するように設計されたチューブホルダー222が存在しており、チューブホルダー222における一方の場所は熱電対228によって占められている。本明細書で説明される実施形態のいずれにおいても、図1dで示されるように、任意の数のサンプル容器20または220を熱電対と共に使用してもよいし、熱電対熱電対なしで使用してもよいことが理解される。熱電対による増幅および線状化は、Analog Devices AD595チップ (示さず) を用いて行われる。まず、T型電圧 = (AD595の出力 / 247.3) - 11μVに従って、AD595の出力から熱電対の電圧を計算した。次いで、T型熱電対の電圧/温度相関に関するアメリカ国立標準技術研究所の係数を使用して熱電対の電圧を温度に変換した。アナログシグナルをデジタル化し (PCIe-6363収集ボード)、CPU40にイン

ストールされたLabViewソフトウェア（バージョン2010、National Instruments）で処理し、ユーザーインターフェース42に表示した。例示的には、ステッパーの動きを87～92℃および60～75℃で動的に引き起こすか、またはコンピュータで制御された期間にわたり各水槽中にステッパーを保持してもよい。典型的には30～50サイクルが行われる。

【0058】

チューブホルダー22中の全てのサンプル容器20が水槽10と水槽14との間を素早く移動して、サンプルが入っている各サンプル容器20の一部が完全に浸されるように、ステッピングモーター24（Applied Motion Products、番号HT23-401、3V、3A）が水槽10と水槽14との間に配置される。ステッピングモーター24は、例示的には4SX-411nuDrive（National Instruments、示さず）で作動し、PCI-7344運動制御器とCPU40にインストールされたNI-Motionソフトウェア（バージョン8.2、National Instruments）とで制御される。ステッピングモーター24は、水槽10と水槽14との間を約0.1秒で回転する。図2aは、90℃および50℃でステッパーの動きが引き起こされた運転に関して、サンプル容器20の位置の軌跡（点線）の上にサンプルの温度の軌跡（直線）を重ねて示す。図2からわかるように、50℃よりも低い温度にいくつかのオーバーシュートがあるが、これは水槽14からサンプル容器20に移動させるのに必要な時間によるものと推定される。したがって、上記で論じられたように、いくらかより高い温度でステッピングモーター24を始動させることが望ましい場合がある。以下の実施例において、示された温度は、到達したサンプルの温度であって、トリガー温度ではない。図2aから計算された最大の加熱速度は385℃/秒であり、最大の冷却速度は333℃/秒である。例示的には、エクストリームPCRは、少なくとも200℃/秒の傾斜速度で行ってもよい。他の実施形態において、傾斜速度は、300℃/秒であってもよいし、またはそれよりも大きくてもよい。

【0059】

いくつかの実施例では、システム4はまた、リアルタイムモニタリングのために構成される。図1aで示されるように、リアルタイムモニタリングの場合、サンプル容器20がステッピングモーター24により高温の水槽10から低温の水槽に移動したとき、このモニタリング位置を保ちながら、または保たずにサンプル容器20が光ファイバーチップ50を通過するように、光学素子ブロック25の光ファイバーチップ50がサンプル容器20上に取り付けられる。この例示的な実施形態において、光ファイバーチップは、水槽の上の空气中に提供される。熱的サイクリングデバイス4をCPU40によって制御してユーザーインターフェース42に表示してもよい。

【0060】

図1bは、図1aに類似した実施形態を示す。ホットプレート212および216は、高温の水槽210および低温の水槽214の温度を制御するために備えられている。ステッピングモーター224は、例示的にはアルミニウムで作製されたアーム221とチューブホルダー222を動かしてサンプル容器220と熱電対228（図1dに示される）を動かすために備えられている。しかし、この実施形態において、ブロック254を配置させることにより、光ファイバーケーブル252のチップ250は水槽214中に保持される。光ファイバーケーブル252は、ポート248を介して水槽214に入り、光学素子ブロック225にシグナルを与える。熱的サイクリングデバイス204をCPU240によって制御してユーザーインターフェース242に表示してもよい。

【0061】

Ocean OpticsのLLS-455LED光源256からの光を、光ファイバーケーブル252（Ocean OpticsのP600-2-UV-VIS、ファイバーコア直径600μm）によって440+/-20nmの励起干渉フィルター、ビーム分割のための458nmのダイクロイックフィルターおよび490+/-5nmの放出フィルター（全てSemrockより、示さず）を備えたHamamatsu Optics

の光学素子ブロック258に導いた。より低温の水槽中に配置されたときに、1つのサンプルのキャピラリーからおよそ1~2mmの距離で一列に置かれた別の光ファイバーケーブル（示さず）を用いて、キャピラリーの落射蛍光照明が達成された。放出検出は、HamamatsuのPMT62を用いて行われた。

【0062】

図1cは、3温度PCRのための例示的なシステム304を示す。95.5℃の高温の水槽310、30~60℃の低温の水槽314、および70~80℃の中程度の温度の水槽313を使用して、サンプル容器320中に入れられている1~5μlのサンプルの温度を変化させ、磁気攪拌しながら3つの電気ホットプレート312、316、および318で加熱する。サンプル容器320は、アーム321でステッピングモーター324に取り付けられたチューブホルダー322によって保持される。また熱電対328も、チューブホルダー322によって保持される。ステッピングモーター324が回転するとき、アーム321を持ち上げることができる。光ファイバーチップ350は、例示的には、中程度の温度の水槽313中に提供されるが、図1aの場合のように空気中に置かれていてもよいことが理解される。この例示的な実施形態の構成のために、3つの水槽310、313、および314を互いに等距離で設けることは不可能であった。したがって、サンプルの冷却は高温の水槽310と低温の水槽314との間でなされることが望ましく、それに対してサンプルの加熱は、サンプルがその他の水槽間を移動することによってなされるために、高温の水槽310と低温の水槽314との間に最も大きいスペースを設けた。しかし、この構成は単なる例示であり、他の構成も本開示の本質の範囲内であることが理解される。2つのステッピングモーターが同時に使用されるために（一方はキャピラリーを水から持ち上げるためであり、もう一方は水槽間を移動させるためである）、それぞれの角運動を最小化することにより、槽間の運動時間を短くできる。2つの水槽によるシステムでは、槽間でサンプルを移動させるのに必要なステッパーの角運動は、270度よりも大きい。しかし、3つの水槽によるシステムでは、サンプルを持ち上げるステッピングモーターは45度未満で横断する必要がある、一方でサンプルを水槽間で移動させるステッパーは、わずか90度またはそれ未満で移動する必要がある。また水槽は、必要な角運動をさらに制限するために円形のセクター（扇形のくさび）として構成されてもよい。角運動を最小化することにより、水槽間の移動時間が短くなる。100ミリ秒未満の移動時間、または50ミリ秒未満もの移動時間が想定される。このシステム304の他の構成要素は図1a~bに示されるシステム4、204と類似しており、図1cでは示されていない。

【実施例1】

【0063】

特に他の指定がない限り、50mMのトリス（25℃でpH8.3）、3mMのMgCl₂、200μMの各dNTP（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）、500μg/mlの非アセチル化ウシ血清アルブミン（Sigma）、2%（v/v）グリセロール（Sigma）、50ngの精製ヒトゲノムDNA、および1×LCGreen（登録商標）プラス（BioFire Diagnostics）を含有する5μlの反応体積でPCRを行った。プライマー濃度およびポリメラーゼ濃度は、具体的な実験プロトコルに従って変更した。KlenTaq1（商標）DNAポリメラーゼをAB Peptides、St. Louis、MOまたはワシントン大学（St. Louis）のWayne Barnesのいずれかから得た。KlenTaqの分子量は62.1kDであり、280nmにおける吸光係数は、配列から計算した場合、69,130M⁻¹cm⁻¹である（米国特許第5,436,149号）。質量分析法で、優勢な分子量は62kDであることが確認され、変性ポリアクリルアミドゲルで、主要なバンドは合計で80%より高い純度を有することが示された。吸光度および純度を使用して濃度を計算したところ、10%グリセロール中、80μMのストックであることが示された。最終的なポリメラーゼ濃度は、典型的には0.25~16μMであった。1μMのKlenTaqは、0.75U/μlに等しく、この場合の1ユニットは、活性化サケ精子DNAを用いて72℃で3

0分で合成された生成物10nmolと定義される。ユタ大学のコア施設でプライマーを合成し、脱塩し、濃度を A_{260} によって決定した。各プライマーの最終濃度は、典型的には2.5~20 μ Mの間で様々であった。

【0064】

プライマーCCCATTTCAACGTCTACATCGAGTC（配列番号1）およびTCCTTCTCTTGCCAGGCAT（配列番号2）を使用して、ヒトゲノムDNAからKCNE1の45bpのフラグメントを増幅した。これらのプライマーは変異体rs番号1805128（c. 253G>A）を間に挟み、配列：CCCATTTCAACGTCTACATCGAGTCC（G/A）ATGCCGTGGCAAGAGAAAGGA（配列番号3）を増幅した。

10

【0065】

図3aには、図1aに示されるデバイスを使用したエクストリームPCRによって生成したPCR生成物の融解曲線が示され、この場合、0.64 μ MのKlenTaqおよび10 μ Mの各プライマーを使用して、図2bで示されるように91℃から50℃の間で、35サイクルおよび28秒の総増幅時間でサイクリングされた。各サイクルは0.8秒を要した。さらに図3aには、LightCyclerでの迅速サイクリングによって生成した同ジャンプリコンの融解曲線も示され、この場合、0.064 μ MのKlenTaqおよび0.5 μ Mの各プライマーを使用して、35サイクルおよび12分の総増幅時間で、90℃から50℃の間でサイクリングされた（図2c）。各サイクルは10.3秒を要した。図2bおよび2cでは時間の尺度が異なるため、図2bの全体のエクストリームPCRプロトコールは、それに対応する迅速サイクルの2サイクル未満で完了することに留意されたい。両方の反応により、類似の T_m を有しゲル電気泳動で強いバンドを示すジャンプリコンが生産されたのに対し（図3b）、陰性対照は融解分析またはゲル電気泳動のどちらによっても増幅は示されなかった。この実例において、エクストリームPCR条件は、ゲルで分析したところ（図3b）、迅速サイクルPCR条件よりも高い収量を示した。融解曲線における T_m の0.5℃の差は、ポリメラーゼ貯蔵緩衝液中のグリセロール含量から生じる、各反応液におけるグリセロールの量の違いに起因すると考えられる（PCRにおけるグリセロールの最終濃度は、エクストリーム条件下では1.3%であり、迅速条件下では0.1%であった）。また、図3bからも、ジャンプリコンのサイズが類似しており、予測通りであったことが確認される。加えて、ポリメラーゼ濃度とプライマー濃度と

20

30

【0066】

1 μ Mのポリメラーゼ、10 μ Mの各プライマー、および1.3%グリセロールを使用して、45bpのKCNE1の反応をリアルタイムでモニタリングした。図1aのデバイスを使用して、2つの水槽間の空気中のサンプルを各サイクルでモニターした。密封されたチャンバーの空気の温度を70℃に保持し、各サイクル0.2秒でサンプルを調査した。温度参照キャピラリーで測定しながら、サンプルを図3cで示されるように60℃から90℃の間でサイクリングした。位置決めと測定の時間が追加されたために、サイクル時間が0.8秒から1.12秒に増加した。したがって、50サイクルは56秒で完了した。約30サイクルでの、すなわち約34秒後の蛍光の増加から、増幅が認められた（図3c）。測定のためにサンプルが空気中にあり、ポリメラーゼの伸長速度が制限される間も、温度はほぼ60℃に保たれた。

40

【0067】

図3cで観察されるように、この反応は、約25サイクルの定量サイクル（ C_q ）を有するが、少なくとも50サイクルまではプラトーにはならないようである。またこの反応は64サイクル後に停止したため、ジャンプリコンの量が増加し続け、かなり後にならないとプラトーに達しない場合もある。理論にとらわれずにいえば、プライマー濃度を増加さ

50

せることにより、収量を向上させ、さらに、プラトローを例示的にはC q 後に20サイクル、より例示的にはC q 後に25サイクルまたはそれより多くのサイクル遅延させることができると考えられる。

【実施例2】

【0068】

この実施例では、インターロイキン10ベータ受容体中のA>G変異体（rs番号2834167）を間に挟む58bpのフラグメントを、プライマーCTACAGTGGGAGTCACTGC（配列番号4）およびGGTACTGAGCTGTGAAAGTCAAGGTT（配列番号5）を用いて増幅し、以下のアンプリコン：CTACAGTGGGAGTCACTGCCTTTTGGC（A/G）AAGGGAACCTGACTTTTCACAGCTCAGTACC（配列番号6）を生成した。実施例1で説明したようにして、図1aに示される機器を使用してエクストリームPCRを行った。1μMのポリメラーゼ、10μMの各プライマー、および1.3%グリセロールを使用した（全プライマーに対するポリメラーゼのパーセンテージは5%）。ポリメラーゼがより高い伸長速度を有する場合、ポリメラーゼ伸長のために温度を70~80℃に増加させるために、様々な位置決定プロトコルを使用した。アニーリング温度に達した後、モニターするために空気中で即座に位置決定する代わりに、伸長温度に達するまでサンプルを高温の水槽に移した。次いでサンプルを高温の水槽の真上の空気中に配置させて、図4aおよび4bに示した温度サイクルを生じさせることにより、70℃から77℃の間の最適な温度でより速いポリメラーゼ伸長を可能にした。3種の異なる遺伝子型をそれぞれ、0.97秒のサイクルを使用して39サイクルを38秒で完了させるエクストリームPCRによって増幅した。エクストリームPCRの後、LC24キャピラリーが適合するように改変されたHR-1機器で各遺伝子型の高解像度融解曲線を得た。図4cから明らかなように、3種の遺伝子型全てが予想通りに増幅され、区別された。

【実施例3】

【0069】

実施例1における反応混合物はエクストリームPCRおよび迅速サイクルPCRの両方で同じであるが、見たところ図3aで観察されるTmのシフトの原因と思われるポリメラーゼおよびプライマーの量、ならびにグリセロール濃度のわずかな差が認められた。この実施例およびこの先全ての実施例において、グリセロール濃度は、必要に応じてその濃度を均一化することにより2%に保持された。エクストリームPCRの場合、1μMのポリメラーゼおよび10μMの各プライマーを使用し、迅速サイクルPCRの場合、0.064μMのポリメラーゼおよび0.5μMの各プライマーを使用した。上記で論じられたように、より速いアニーリング時間は、プライマー特異性の向上をもたらすと考えられる。この特異性の向上に伴い、増加させたプライマー濃度を使用してもよく、それにより、プライマーの結合が促進されてアニーリング時間が短くなると考えられる。同様に、増加させたポリメラーゼ濃度によりアニールしたプライマーへの結合も促進されて、完全な伸長の前にポリメラーゼが離れた場合に、不完全なアンプリコンへの再結合も促進される。加えて、ポリメラーゼ濃度が高ければ高いほど、PCRの後半でさえもより大量のプライマーが結合したテンプレートが一度に伸長でき、1つのポリメラーゼが伸長させなければならないテンプレート数が少なくなるため、全体の伸長時間が短くなる。

【0070】

図5aに、様々なポリメラーゼ濃度およびプライマー濃度を用いたエクストリームPCRサイクリングの結果を要約する。この実施例において、インターロイキン10ベータ受容体の49bpのフラグメントを、プライマーGGGAGTCACTGCCTTTTGGC（配列番号7）およびTACTGAGCTGTGAAAGTCAAGGTTCC（配列番号8）、ならびに3mMのMgCl₂を用いて増幅して、GGGAGTCACTGCCTTTTGGCAAAGGGAACCTGACTTTTCACAGCTCAGTA（配列番号9）を生成した。各エクストリームPCR反応で、図1bに示されるデバイスを、リアルタイムでモニタリングせずに使用した。図5bで示されるように、26秒より少し短い総

反応時間（0.73秒のサイクル）で、90℃から63℃の間で35サイクルで温度をサイクリングした。図5aで示されるようにポリメラーゼおよびプライマーの量を変更したこと以外は、実施例1で論じられた通りの反応条件を用いた。図5aの縦軸は、HR-1機器で正規化しないで得られた融解曲線の負の微分プロットのピークとして数値化したものである。0.5μMのポリメラーゼでは、いずれのレベルのプライマー濃度でも実質的に増幅は観察されなかった。しかし、1.0μMのポリメラーゼでは、5μMおよびそれを超えるプライマー濃度で認識できるレベルの増幅が観察された。ポリメラーゼレベルが増加するにつれて、アンプリコンの量も最大約4μMのレベルまで増加する。8μMのポリメラーゼでは、アンプリコンの量はプライマー濃度に応じてプラトーになるかまたは低下し、より低いプライマー濃度では16μMで有意な低下がみられた。これらの49bpの生成物の場合のエクストリーム温度サイクリング条件下では、ポリメラーゼの好ましい濃度範囲は、プライマー濃度に応じて、約1μMから8μMの間であり、より具体的には2μMから8μMの間であると考えられる。

【0071】

同様に、2.5μMのプライマー濃度ではほとんど増幅が観察されなかった。しかし、5μMのプライマーでは、2~8μMのKlenTaq濃度を用いたところ増幅が成功し、増幅は濃度の増加に伴い向上し続けた。約10~20μMのプライマー濃度を用いたところ優れた増幅が達成された。図5cは、4μMのKlenTaqで様々なプライマー濃度を用いた場合の融解曲線を示し、一方で図5dは、プライマー濃度を10μMに保持しながらポリメラーゼ濃度を変更したときの生成物のサイズを実証している。高濃度のポリメラーゼおよびプライマーにもかかわらず、非特異的増幅は観察されていない。

【0072】

理論にとらわれずにいえば、酵素の量もプライマーの量も閾値を超えているのであれば、酵素の量とプライマーの量との比率が、エクストリームPCRサイクリングにとって重要であると考えられる。上記の量は、各プライマーをベースにして示されることに留意されたい。ポリメラーゼが二重鎖になったプライマーのそれぞれに結合することを考えれば、プライマーの総濃度が最も重要である場合がある。KlenTaqの場合、好適な比率は0.03~0.4（プライマーの総濃度に対して3~40%の酵素）であり、例示的には最小で約0.5μMのKlenTaq濃度であり、より例示的には、エクストリームPCRの場合、約1.0μMである。プライマーは、等モル量で提供されてもよいし、または非対称PCRの場合のように一方が過量に提供されてもよい。最適なポリメラーゼ：プライマーのパーセンテージはまた、温度サイクリング条件と生成物のサイズにも依存し得る。例えば、標準的な（遅い）温度サイクリングは、かなり低いプライマーに対するポリメラーゼのパーセンテージを使用することが多く、典型的には、1.5nM（0.04U/μl）のポリメラーゼ（49）および0.15%のパーセンテージの1,000nMのプライマーの総濃度が使用され、これは、エクストリームPCRに関して有効であると見出されたパーセンテージよりも10倍以上低い。

【実施例4】

【0073】

熱の移動とサイクル速度を増加させるために、19ゲージの鋼の皮下注射針で8μMのポリメラーゼおよび20μMの各プライマーを用いて、実施例3におけるのと同じPCR標的を増幅した。全プライマーに対するポリメラーゼのパーセンテージは20%であった。図1bの機器で増幅を行ったところ、各0.46秒で35サイクル（図6a）、91℃から59~63℃の間のサイクリングを使用して、16秒で増幅が完了した。サイクリング中の最大の加熱速度は407℃/秒であり、最大の冷却速度は815℃/秒であったことから、保持を行わずに400℃/秒より速い傾斜速度でPCRを実行できることが実証された。4%NuSieveの3:1アガロースゲルでの生成物分析により、正しいサイズの強い特異的なバンドが現れた（図6b）。テンプレート非含有対照は、49bpで生成物を示さなかったが、陽性サンプルに類似した顕著な量のプライマーバンドを示した。

【実施例5】

20

40

50

35 bp の BBS2 フラグメントからは 226 bp の生成物が得られ、（プライマーに応じて）176 塩基または 185 塩基の伸長を必要としたが、337 bp の BBS2 フラグメントからは 428 bp の PCR 生成物が得られ、378 塩基または 387 塩基の伸長を必要とした。アガロースゲルで、さらに融解分析によって特異的増幅を検証した。図 8 a に、226 bp の生成物に使用された、75℃の 1 秒の併合されたアニール／伸長および 87℃の変性を含むエクストリーム PCR の温度プロファイルを示す。さらに同じ温度で 2 秒のアニール／伸長期も行った（軌跡示さず）。図 8 c に示されたこれらの増幅に関するリアルタイム PCR の結果から、1 秒の伸長を用いた場合、2 秒の伸長と比較して C_q が約 5 サイクル高くシフトしたことが明らかになったが、これはおそらく伸長時間が短くなるにつれて効率も減少したことを反映しているものと思われる。図 8 b に、75℃の 4 秒の併合されたアニール／伸長および 87℃の変性を示し、これは、428 bp の生成物に使用されたエクストリーム PCR の温度プロファイルを示す。さらに同じ温度で 5 秒のアニール／伸長期も行った（軌跡示さず）。図 8 d に示されたこれらの増幅に関するリアルタイム PCR の結果から、4 秒の伸長を用いた場合、5 秒の伸長と比較して C_q が約 2 サイクル高くシフトしたことが明らかになったが、これはおそらく伸長時間が短くなるにつれて効率も減少したことを反映しているものと思われる。

【実施例 7】

【0077】

実施例 5 の NQO1 の 102 bp のフラグメントおよび実施例 1 の KCNE1 の 45 bp のフラグメントに関して、ヒトゲノム DNA の希釈系列を使用して、NQO1 には 2 μM の KlenTaq および 8 μM の各プライマー、ならびに KCNE1 には 8 μM の KlenTaq および 20 μM の各プライマーを使用して、図 1 b のリアルタイム機器を使用して PCR の定量性能を評価した。図 9 a および図 9 b でみられるように、少なくとも 40 のダイナミックレンジを用いたところ、標準曲線から計算された増幅効率は、NQO1 では 95.8% であり、KCNE1 では 91.7% であった。テンプレート不使用の対照反応では、50 サイクル後に増幅は起こらず、単一コピーの複製物（平均コピー数は、1 反応あたり 1.5 コピー）は、増幅曲線の形状および強度においてより高い濃度と類似していた（図 9 A および図 9 C）。0.15 コピー／反応の平均コピー数では、二項展開により計算された 0.13 コピー／反応の期待値を用いたところ、（NQO1 の試験と KCNE1 の試験の両方を合わせた）17 の反応のうち 2 つの反応が陽性であった。

【実施例 8】

【0078】

リアルタイム PCR を使用する際、様々な生成物の長さに応じた伸長時間が必要である（図 10 a～c）。様々なプライマーの起こり得る交絡的影響を調整するため、100～500 bp の合成テンプレートと共に以下の共通の高い T_m（77℃）を有するプライマーを使用した。

ACTCGCAGAACTCACC GCACTCC（配列番号 18）および GCTCTCACTCGCACTCTCAGCACA（配列番号 19）

【0079】

合成テンプレート配列は以下の通りである。

100 bp のテンプレート：

ACTCGCAGAACTCACC GCACTCCGATGGATTGTGAAGAGGCCCAAGATACTGGTCATATTATCCTTTGATCTAGCTCTCACTCGCACTCTCAGCACA（配列番号 20）

【0080】

200 bp のテンプレート：

ACTCGCAGAACTCACC GCACTCCTCAATGCTGACAAATCGAAAGAATAGGAATAGCGTAATTACTAGAGGACTCCAATATAGTATATTACCCTGGTGACCGCCTGTACTGTAGGAACACTACCGCGTTATATTGACAGCTTAGCAATCTACCTGTGGATCTGTTAAGTGGCTCTCACTCGCACTCTCAGCACA（配列番号 21）

【0081】

300 bp のテンプレート：

ACTCGCACGAACTCACC GCACTCCCCTTCGAATATAAAGTACGACATTACTAGCAATGACAGTTCCAGGATTTAAGAAAG
TAGTGTTCCACATCAATGCATATCCAGTGAAAGCATAACGTCAAAAAAGCCTGGCACCGTTTCGCGATCTGGACTTACTT
AGATTTGTTGTAGTCAAGCCGGCTATCAGCGATTTATCCCGGAAACACATACTAGTGAGTTATTTGTATGTTACCTAGAA
TAGCTGTCACGAATCACTAATACATTACCCACCAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (配列番号 2 2)

【0082】

400bpのテンプレート：

ACTCGCACGAACTCACC GCACTCCTGAATACAAGACGACAGTCCTGATTATATTTTCATTTAATTACGCCAATTTAATTA
TGATGAATATTAACGGAATTAATATGTATTGATAAGTACTAAGTAATGGTTTACCCACGGCGATCTATATGCAAGGGAA
ACATTAACAAATTTAAACATCTGATGTGGACAAAACCTTGTAAATGTGGTATAGTTAAAAATATAGGTTTCAGGGACACGTA
AGTATCTATCTTGAATGTTTAAAGTAGGTCCTGTCTACCATTCTGAAATTTAGAAAATCGCGTTCATCGGGCTGTCGGCTA
CACCTCAGAAAACCATTTTCGTGTTGCACAGGAGGAACCTTCGAGGGTTCGTATGAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA
(配列番号 2 3)

10

【0083】

500bpのテンプレート：

ACTCGCACGAACTCACC GCACTCCACCGCTTGACGACGTAGGGTATTTGGTATCTGAATCTACTCATTTACCTACATACT
GAAGATTTTGCGATCGTCTAATATATTGGACTAATGCCCGATTCTGATCAATTACTCTAGGCGATACTTCATCGCTGGC
CTTATTTGGATTTTGCTCAAGTGCTAAACTCTCTGCGCGTCAATACTAGTCTGACATCAGTCAAGACCTGCTATCTGAAA
ACTACTAGAGAGATATACCTAACAACTTTAGTGGATAAATCAGGTCTGGAGATTGTCATATAATGCCACTAGGGTCAGAA
GGCTGTGTCAAAGTTAGTGGTTAGTAGGTCTCCGCTCTGCGGTACTATTCTTATATTCTTTACTATGCATCAAAACAAA
TAGAATGCATAGACAAACCGCCTGCCAAGTTTACAAGATAACTTGCGTATAGGTTTATAAGGGTTCTTCTGTATCGCTCT
CACTCGCACTCTCACGCACA (配列番号 2 4)

20

【0084】

まず、中程度の長さの300bpの生成物に関して、4秒の併合されたアニール／伸長
セグメントを1サイクルあたり4.9秒で使用して、プライマーおよびポリメラーゼの最
適な濃度を決定した(図10a)。次いで全ての生成物の長さに関して、同一のプライ
マー濃度(4μM)およびポリメラーゼ濃度(2μM)を使用して、最小の伸長時間を決定
した(図11a～e)。生成物の長さに応じて、伸長時間が増加すると、さらなる変化が
観察されなくなるまでの定量サイクル(Cq)がわずかに減少したことから、効率的なP
CRに必要な最小の伸長時間が示された。例えば、図10Bに、KAPA2G(商標)F
ASTポリメラーゼ(Kapa Biosystems)を使用した500bpの生成物
に関する増幅曲線を示す。KAPA2G FASTポリメラーゼを使用した場合の最小の
伸長時間は3秒であり、これに対してKlenTaq1(Taqポリメラーゼの欠失突然
変異体、AB Peptides)を使用した場合は7秒であった。ポリメラーゼの同一
性が一定に維持される場合、より長い生成物はより長い伸長時間を必要とした(図10c)。
KlenTaq1ポリメラーゼの場合、60bpごとに約1秒を要し、一方でKAP
A2G FASTポリメラーゼの場合、158bpごとに1秒を要する。これらの2種の
ポリメラーゼは十分な濃度で市販されているが、その他ほとんどのポリメラーゼはこのよ
うな高濃度では市販されていないために、これらのポリメラーゼが選ばれたことに留意され
たい。伸長に必要な時間は、伸長させようとする長さに直接的かつ直線的に依存してお
り、ポリメラーゼ濃度およびポリメラーゼ速度とは反比例することが理解される。これら
の3種のパラメーターを関連付ける比例定数(k2)は、以下のように定義することができ
る。

30

40

必要な伸長時間 = $k_2 * (\text{伸長の長さ}) / ([\text{ポリメラーゼ}] * (\text{ポリメラーゼ速度}))$

【実施例9】

【0085】

エクストリームPCR時間は、高いMg⁺⁺濃度を用いて短くすることもできる。プラ
イマー：GCTTGGAAGATTGCTAAATGATAGTCAGTG(配列番号
25)およびTTGATCACTGAGCCTGCTGCATAA(配列番号26)

50

を用いてAKAP10の60bpのフラグメントを増幅し、アンプリコンGCTTGGAAGATTGCTAAATGATAGTCAGTGAC (A/G) TTATGCAGCAGGCTCAGTATGATCAA (配列番号27) を生成した。

【0086】

各反応は、体積1 μ lで、35サイクルを時間ベースで制御して(94℃の水槽中で0.07秒、60℃の水槽中で0.1~0.4秒)、2~7mMのMgCl₂を使用して行われた。サンプル体積は1 μ lであり、5ngのヒトゲノムDNA、20 μ Mのプライマー、および8 μ Mのポリメラーゼを含んでいた。1サイクルあたり0.42秒のプロトコールを使用したところ、MgCl₂が2~3mMのときに、融解曲線(図12a)およびゲル(図12b)で生成物は観察されなかった。4mMで最低限の生成物が存在したが、5~7mMのMgCl₂で増幅した後に大量の生成物が観察された。5mMのMgCl₂では、0.32秒のサイクル時間を用いた場合、融解曲線(図13a)およびゲル(図13b)で生成物は観察されなかったが、0.42秒、0.52秒、および0.62秒のサイクル時間では大量の生成物が示され、このことは、15秒(14.7秒で35サイクル)で行われたPCRにおいて特異的な高収量の60bpの生成物が得られることを実証している。したがって、例示的なMg++濃度は、少なくとも4mM、少なくとも5mM、少なくとも6mM、少なくとも7mM、またはそれより高く、これらの例示的なMg++濃度は、本明細書で説明される実施形態のいずれかと共に使用できることが理解される。

【実施例10】

【0087】

エクストリームPCRで使用される高濃度のプライマーおよびポリメラーゼは、より遅いサイクル速度で使用すると有害作用を有する場合がある。それぞれ32倍または106倍遅い迅速サイクルまたはブロックベースの機器では、非特異的生成物が生じた。図14a~bは、実施例9で使用されたAKAP10の60bpの生成物の増幅を比較した結果を示すが、この場合、増幅は、20 μ Mの各プライマー、8 μ MのKlenTaq、および10ngのヒトゲノムDNAを使用して、(1)およそ17秒の総時間をもたらす94℃で0.5秒および60℃で0.2秒の設定時間を用いたエクストリームPCR、(2)およそ9分の総時間をもたらす94℃で10秒の最初の変性、続いて0秒で85℃および0秒で60℃のサイクルの設定時間を使用した迅速サイクルPCR(Roche LightCycler)、および(3)およそ30分の総時間をもたらす94℃で10秒の最初の変性、続いて85℃で0秒および60℃で5秒の温度サイクリングを用いた旧来の(ブロック)温度サイクリング(BioRad CFX96)を40サイクルで使用して行われた。示されたように、LightCyclerの迅速サイクリングでさえもかなりの非特異的増幅を生じたが、エクストリームサイクリング条件では単一の融解ピークと、ゲルにおける最小の非特異的増幅が達成された。

【0088】

また注目すべきことに、エクストリームPCRでは、高いプライマー濃度およびポリメラーゼ濃度によっても収量が強化される。比較のために定量的PCRを使用したところ、エクストリームPCRは迅速サイクルPCRと比較して30倍を超える量の生成物を生産した(データ示さず)。

【0089】

実施例1~10は全て、図1a~1dで説明されている1つまたは複数のデバイス、またはこれらの構成にわずかな改変を施したものを使用して行われた。しかし、本明細書で説明される方法および反応は、様々な機器で起こることが理解される。これらの実施例で使用される水槽およびチューブは、濃度を高めたプライマーおよびポリメラーゼの作用を研究するのに十分な迅速な温度変化をもたらす。しかし、他の実施形態が商業的により好適である場合がある。低容量および高い表面積対体積比のマイクロ流体システムが、エクストリームPCRによく適している場合がある。このようなシステムは、エクストリームPCRで使用される高濃度のプライマーおよびポリメラーゼで求められる迅速な温度変化を可能にする。マイクロ流体システムは、サンプルを変性ゾーン、アニーリン

グゾーン、および伸長温度ゾーンに繰り返し通す小型化されたチャネルを取り入れたマイクロフローシステム（35、53）を包含する。これらのシステムのいくつかは、複雑度がより低い標的で3秒もの速いサイクル時間の有効なPCRであることがすでに実証されている。ポリメラーゼが少なくとも0.5 μ Mの濃度で提供され、プライマーはそれぞれ少なくとも2 μ Mの濃度で提供される場合、このようなシステムでより複雑な標的を増幅できることが期待される。また定置式のPCRチップおよびPCR液滴形成システム（54）は、1 n lまたはそれ未満もの小さい体積が可能であり、さらに極めて迅速なサイクリングを許容するほど十分に低くできることから、プライマーおよびプローブの濃度の増加によって利益を得る場合もある。より遅いサイクル速度でより高いプライマー濃度を用いるに伴う特異性を損なうことなく増加させたプライマー濃度およびポリメラーゼ濃度を利用できるほど十分速く機器の温度がサイクリングするのであれば、本発明にとって正確な機器は重要ではないことが理解される。

10

【0090】

上記の実施例はいずれもPCRを用いたが、PCRは単なる例示であり、PCR以外の核酸増幅方法にも増加したプライマー濃度および酵素濃度とより短い増幅時間との組み合わせが想定されることが理解される。規模を増加させることができる例示的な酵素活性としては、重合（DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素）、ライゲーション、ヘリックスの巻き戻し（ヘリカーゼ）、またはエキソヌクレアーゼ活性（5'から3'または3'から5'）、鎖の置換および／もしくは切断、エンドヌクレアーゼ活性、ならびにDNA/RNAハイブリッドのRNA消化（RNAアーゼH）が挙げられる。増幅反応としては、これらに限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、転写介在増幅（例えば転写ベースの増幅システム、自家持続配列複製法、および核酸配列ベースの増幅など）、鎖置換増幅、全ゲノム増幅、多置換増幅、アンチセンスRNA増幅、ループ介在増幅、線形結合増幅（linear-linked amplification）、ローリングサークル増幅、分岐増幅（ramification amplification）、等温オリゴヌクレオチド増幅、ヘリカーゼ連鎖反応、および連続侵入シグナル増幅（serial invasive signal amplification）などが挙げられる。

20

【0091】

一般的には、酵素活性が変化すると、同じ倍率で増幅時間は反比例して変化する。プライマーを包含する反応の場合、プライマー濃度が変化すると、同じ倍率で増幅時間は反比例して変化する。プライマーと酵素の両方が増幅に必要な場合、反応速度を最大化するためには酵素濃度とプライマー濃度の両方を変化させるべきである。増幅サイクルの固有のセグメント（例えば、3温度PCR中の固有の温度）でプライマーのアニーリングが起こる場合、そのセグメントにおいてプライマーのアニーリングが十分に完了するのに必要な時間は、プライマー濃度と反比例すると予想される。同様に、増幅サイクルの固有のセグメント（例えば、3温度PCR中の固有の温度）で酵素活性が必要な場合、そのセグメントにおいて酵素的なプロセスが十分に完了するのに必要な時間は、所定の範囲内で酵素濃度に反比例すると予想される。プライマー濃度または酵素濃度の変更は、それら個々のセグメントに要する時間を変化させるのに使用でき、または同じ条件下で（例えば2温度PCRにおいて、または等温反応プロセス中に）その両方が起こる場合、1つの反応が反応速度を制限しないように両方の濃度の変更が必要であることが予想される。増幅プロセスをさらに加速するために、Mg⁺⁺濃度の増加を酵素濃度およびプライマー濃度の増加と組み合わせて使用してもよい。より高いMg⁺⁺濃度は、プライマーのアニーリングの速度を増加させ、かつ核酸増幅で使用される多くの酵素反応にかかる時間を短くする。

30

40

【0092】

より高いMg⁺⁺、酵素、およびプライマーの濃度は、より短い増幅時間またはセグメントと共に使用される場合、特に有用である。時間を短くしないでより高い濃度を使用すると、いくつかのケースにおいて、反応の「ストリンジェンシー」が低下するために非特異的な増幅生成物が生じる場合がある。増幅時間またはセグメント時間（秒）を短くする

50

ことは、増加した反応物濃度によるストリンジェンシーの損失を埋め合わせるように見えるより高いストリンジェンシーを導入する。逆に言えば、増幅時間またはセグメント時間を増加させることによりこれらのより低い濃度を相殺すれば、反応物濃度を低下させることによって試薬のコストを最小化できる。

【0093】

ポリメラーゼ濃度を増加させることにより、長時間のPCR、例示的には標的が5～50 kbである場合のPCRに必要な時間を短くできる。大きい標的を増幅するには、典型的には10分～30分の伸長期間が使用されるが、これはなぜなら、1) ポリメラーゼが単一の標的の伸長を完了させるため、および2) 再利用された酵素が、追加のプライマーが結合したテンプレートを重合させるためにそのような時間が必要になるほど大きい標的が長いためである。PCRの開始時には、利用可能な酵素のほうがプライマーが結合したテンプレート分子よりも多く存在するため、このようなポリメラーゼの再利用は必要ない。しかし、対数期が終わる前でも、ポリメラーゼ分子の数が限界になることがしばしばあり、酵素の再利用が必要である。ポリメラーゼ濃度を増加させることによって、高いプライマー濃度に起因する収量増加を維持しつつ必要な伸長期間を5分未満まで、場合によっては2分未満まで短くできる。実際の酵素の速度は増加しないが、それほど再利用は必要ではなく、必要な最小の時間は、ほぼ直線的に酵素濃度の影響を受ける。

10

【0094】

プライマー濃度とポリメラーゼ濃度とを増加させることによりサイクルシーケンシング時間も短くできる。典型的には、標準的なサイクルシーケンシングにおいて、プライマー濃度は0.16 μ Mであり、併合されたアニール／伸長期間は50～60℃で10分である。プライマー濃度とポリメラーゼ濃度とを10倍増加させることによって、アニール／伸長に必要な時間をおよそ10倍短くできる。長いPCRとサイクルシーケンシングの両方において、予想される必要な時間は、ポリメラーゼまたはプライマー濃度のどちらか限定的なように反比例する。

20

【0095】

エクストリーム温度サイクリングとより高い濃度のプライマー、ポリメラーゼ、および／またはMg++とを組み合わせることによって、大規模並列配列決定のための調製においてプライマーとして使用されるリンカーがライゲーションしたフラグメントのPCRを、現行のものよりもかなり短い時間で完了させることができる。

30

【0096】

上記した全ての用途において、より短い増幅時間で反応特異性が維持されるものと予想される。当業者であれば、高いプライマー濃度およびポリメラーゼ濃度は非特異的増幅による問題を引き起こすことを想像するであろうが、全体のサイクル時間および／または個々のセグメント時間を最小化することにより、PCRの高い特異性および効率がもたらされる。

【表 2】

表 2

標的	KCNE1	KCNE1	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	AKAP10	合成	合成	合成	合成	合成
アンブリコンのサイズ(bp)	45	45	49	49	49	58	102	60	100	200	300	400	500	500	500
ポリメラーゼ	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KlenTaqI	KAPA2G FAST
[ポリメラーゼ]	1	8	4	8	2	2	2	8	2	2	2	2	2	2	2
[プライマー]	10	20	10	20	10	10	8	20	4	4	4	4	4	4	4
サイクル数	35	RT	35	35	35	39	30	35	RT	RT	20	RT	RT	RT	RT
サイクル時間(秒)	0.8	0.91	0.73	0.45	0.97	0.97	1.93	0.42	1.9	3.9	4.9	5.9	7.9	7.9	3.9
PCR 時間(秒)	28	RT	26	16	38	58	58	14.7	RT	RT	98	RT	RT	RT	RT
熱水の温度(℃)	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5
冷水の温度(℃)	20	58	30	30	30	30	72	59	76	76	76	76	76	76	76
熱いトリガー温度(℃)	90	85	90	90	90	90	90	時間	92	92	92	92	92	92	92
冷たいトリガー温度(℃)	70	62	70	70	70	70	時間	時間	時間	時間	時間	時間	時間	時間	時間
変性(℃)	90	85	90	90	90	90	90	(82-85) w/ TC	92	92	92	92	92	92	92
アニール/伸長(℃)	60	60	65	65	65	65	72	60	76	76	76	76	76	76	76
アニール/伸長時間(秒)	0	0	0	0	0	0	1	0.1-0.4	0.5-3	1-5	4	1-7	3-9	3-11	1-5
図	9a	9a	5a	5a	4c	7a	7a	12a,	11a	11b	10a, 11c	11c	11d	11e	10b
時間	81	81	80	80	83	85	85	79	85	85	85	85	81/87 (2ドメイン)	84	84
Mg++	3	3	3	3	3	3	3	2-7	3	3	3	3	3	3	3

時間=時間ベースのセグメントの制御は温度トリガーを有さない

RT=リアルタイムの収集

【表 3】

表 3

	[プライマー](μM)	[ポリメラゼ] (μM)	ポリメラゼ速度 (nt/秒)	伸長の長さ(bp)	サイクル時間(秒)	アニール/伸長時間 (秒)	[Mg ⁺⁺]
標準	0.05 - 0.5	0.0026 - 0.026	10 - 45	20 - 980	120 - 480	15 - 60	1.5
迅速サイクル	0.2 - 1.0	0.063	55 - 90	20 - 480	20 - 60	1 - 10	3
エクストリーム	1 - 16	0.5 - 8	50 - 100	20 - 280	0.5 - 5	<0.1 - 5	3 - 7
任意選択のエクストリーム番号 1	10	2.50	60	29	0.73	<0.1	3
任意選択のエクストリーム番号 2	4	0.50	60	82	1.93	1	3
任意選択のエクストリーム番号 3	4	0.75	60	280	4.9	4	3

必要に応じて、アニール時間=1/[プライマー]

	[プライマー](μM)	アニール/伸長時間 (秒)	k1(秒* μM)	k1 の範囲(秒* μM)
最小の標準	0.05	15	0.75	標準
最大の標準	0.5	60	30	迅速サイクル
最小の迅速サイクル	0.2	1	0.2	エクストリーム
最大の迅速サイクル	1	10	10	1 - 20
任意選択のエクストリーム番号 1	10	0.1	1	
任意選択のエクストリーム番号 2	4	1	4	
任意選択のエクストリーム番号 3	4	5	20	

必要に応じて、伸長時間=k2*生成物の長さ/(ポリメラゼ速度*[ポリメラゼ])

	[ポリメラゼ] (μM)	ポリメラゼ速度 (nt/秒)	伸長の長さ(bp)	アニール/伸長時間 (秒)	k2 (1/ μM)
任意選択のエクストリーム番号 1	2.5	60	29	0.1	0.52
任意選択のエクストリーム番号 2	0.5	60	82	1	0.37
任意選択のエクストリーム番号 3	0.75	60	280	4	0.64

【0097】

表 2 に、エクストリーム PCR の具体的な条件を示す。同時に行われた標的のうち 3 種

10

20

30

40

50

に関するポリメラーゼおよびプライマー濃度の最適化実験以外の全てのデータが示される。表3に、変数間の定量的な関係が詳述されている。必要なアニーリング時間をプライマー濃度に関連付ける反比例関係はほぼ一定 (k_1) であり、方程式 (必要なアニーリング時間) = $k_1 / [\text{プライマー}]$ によって定義される。旧来の (標準) PCR、迅速サイクルPCR、およびエクストリームPCRの条件下でこれらの変数の典型的な値の範囲を使用することにより反比例定数の範囲が得られ、その大部分は重複している (旧来のPCRは0.75~30、迅速サイクルPCRは0.2~10、およびエクストリームPCRは1~20である)。この反比例定数によって、現行のものの範囲から外れる望ましいアニーリング時間は、望ましい時間に必要なプライマー濃度を予測するのに使用できる。例えば、0.01秒のアニーリング時間で5 (秒 * μM) の定数を使用すれば、500 μM のプライマー濃度の計算が可能である。逆に言えば、0.01 μM のプライマー濃度が望ましい場合、必要なアニーリング時間は500秒と予想される。これらの条件は旧来のPCRおよびエクストリームPCR両方の範囲の外側であるが、これらの条件によりPCRの成功に有用なプライマー濃度とアニーリング時間との関係が予測される。旧来のPCR、迅速サイクルPCR、およびエクストリームPCR全てにおいて適切な k_1 の範囲は、0.5~20 (秒 * μM) であり、より好ましくは1~10 (秒 * μM) であり、最も好ましくは3~6 (秒 * μM) である。

【0098】

また類似の計算を行うことによって、望ましい伸長時間と、ポリメラーゼ濃度、ポリメラーゼ速度、および増幅させようとする生成物の長さとを関連付けることができる。しかし、長期にわたり様々な実験室で行われてきた旧来のPCR、迅速サイクルPCR、およびエクストリームPCRに影響を与える多くの追加の変数 (ポリメラーゼ、 Mg^{++} 、緩衝液) については、本明細書において変数間の反比例関係を確立するために示されたよく制御されたエクストリームPCR条件を調べることが最善である場合がある。それにより、エクストリームPCR条件下でのポリメラーゼ濃度、ポリメラーゼ速度、生成物の長さ、および必要な伸長時間を定量的に表すことができる。定義方程式は、(必要な伸長時間) = k_2 (生成物の長さ) / ($[\text{ポリメラーゼ}] * (\text{ポリメラーゼ速度})$) である。実験的に決定された k_2 は、上記の方程式において、温度、 Mg^{++} 、ポリメラーゼのタイプ、緩衝液、添加剤、およびdsDNA色素濃度を一定にした条件下での比例定数と定義される。 $[\text{ポリメラーゼ}]$ および $[\text{プライマー}]$ の二次元最適化がなされた3種のエクストリームPCR標的に関して、プライマー濃度全体にわたり成功した増幅の境界線にある $[\text{ポリメラーゼ}]$ を見極めて、他の3つの変数と関連付けることができる。表3で示されるように、これらの3種の異なる標的に関する k_2 値は2未満の倍率で変化していることから、 k_2 は定数であり、他方がわかっているときにある変数を予測するのに使用できると推測される。必要な伸長時間は、伸長の長さ (生成物の長さからプライマーの長さを引いた長さ) に比例し、ポリメラーゼ速度とポリメラーゼ濃度に反比例する。 k_2 は ($1 / \mu\text{M}$) の単位で示され、本明細書において使用されるエクストリームPCR条件にとって最適な値は、0.3~0.7 ($1 / \mu\text{M}$) の範囲のうち0.5 ($1 / \mu\text{M}$) である。ポリメラーゼのタイプ、 Mg^{++} 濃度、または異なる緩衝液もしくは色素の状態の点で異なる他の反応条件でも、類似の k_2 値が誘導される場合がある。

【0099】

サンプル温度を急速に変化させることができるのであればどのような種類の容器でもエクストリームPCRを行うことができる。標準的なチューブおよびキャピラリーに加えて、油のストリーム中に懸濁した水性反応物の微小液滴または薄い2次元ウェーハが、優れた熱的接触をもたらす。エクストリームPCRの速さに必要な温度制御のための優れた方法は、空間的なセグメントを様々な温度で通過するサンプルストリームの連続流PCR (液滴として分散する、気泡で分離する、または他の手段で混合を防ぐことのいずれか) である。

【0100】

参考文献

10

20

30

40

50

【表 4 A】

References

1. Wittwer CT, Reed GB, Ririe KM. Rapid cycle DNA amplification. In: Mullis IK, Ferre F, Gibbs R, eds. The polymerase chain reaction, Vol. Deerfield Beach, FL: 174-181, 1994.
2. Wittwer CT, Fillmore GC, Hillyard DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Res* 1989;17:4353-7. 10
3. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem* 1990;186:328-31.
4. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques* 1991;10:76-83.
5. Wittwer CT, Marshall BC, Reed GH, Cherry JL. Rapid cycle allele-specific amplification: studies with the cystic fibrosis delta F508 locus. *Clin Chem* 1993;39:804-9. 20
6. Schoder D, Schmalwieser A, Schauburger G, Hoorfar J, Kuhn M, Wagner M. Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. *J Clin Microbiol* 2005;43:2724-8.
7. Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 2007;53:1544-8.
8. Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 2006;52:494-503. 30
9. Raja S, El-Hefnawy T, Kelly LA, Chestney ML, Luketich JD, Godfrey TE. Temperature-controlled primer limit for multiplexing of rapid, quantitative reverse transcription-PCR assays: application to intraoperative cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002;48:1329-37.
10. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997;22:176-81. 40
11. Wittwer CT, Ririe KM, Rasmussen RP. Fluorescence monitoring of rapid cycle PCR for quantification. In: Ferre F, ed. *Gene Quantification*, New York: Birkhauser, 1998:129-44.

【表 4 B】

12. Elenitoba-Johnson O, David D, Crews N, Wittwer CT. Plastic vs glass capillaries for rapid-cycle PCR. *Biotechniques* 2008;44:487-8,490,492.
13. Roper MG, Easley CJ, Landers JP. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. *Anal Chem* 2005;77:3887-93.
14. Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res* 2007;35:4223-37. 10
15. Cheng J, Shoffner MA, Hvichia GE, Kricka LJ, Wilding P. Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. *Nucleic Acids Res* 1996;24:380-5.
16. Woolley AT, Hadley D, Landre P, deMello AJ, Mathies RA, Northrup MA. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal Chem* 1996;68:4081-6.
17. Neuzil P, Zhang C, Pipper J, Oh S, Zhuo L. Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e77. 20
18. Oda RP, Strausbauch MA, Huhmer AF, Borson N, Jurens SR, Craighead J, et al. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. *Anal Chem* 1998;70:4361-8.
19. Roper MG, Easley CJ, Legendre LA, Humphrey JA, Landers JP. Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. *Anal Chem* 2007;79:1294-300.
20. Friedman NA, Meldrum DR. Capillary tube resistive thermal cycling. *Anal Chem* 1998;70:2997-3002. 30
21. Heap DM, Herrmann MG, Wittwer CT. PCR amplification using electrolytic resistance for heating and temperature monitoring. *Biotechniques* 2000;29:1006-12.
22. Kopp MU, Mello AJ, Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science* 1998;280:1046-8.
23. Hashimoto M, Chen PC, Mitchell MW, Nikitopoulos DE, Soper SA, Murphy MC. Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab Chip* 2004;4:638-45. 40
24. Crews N, Wittwer C, Gale B. Continuous-flow thermal gradient PCR. *Biomed Microdevices* 2008;10:187-95.
25. Chiou JT, Matsudaira PT, Ehrlich DJ. Thirty-cycle temperature optimization of a closed-cycle capillary PCR machine. *Biotechniques* 2002;33:557-8, 60, 62.

【表 4 C】

26. Frey O, Bonneick S, Hierlemann A, Lichtenberg J. Autonomous microfluidic multi-channel chip for real-time PCR with integrated liquid handling. *Biomed Microdevices* 2007;9:711-8.
27. Chen J, Wabuyele M, Chen H, Patterson D, Hupert M, Shadpour H, et al. Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate. *Anal Chem* 2005;77:658-66.
28. Sun Y, Kwok YC, Nguyen NT. A circular ferrofluid driven microchip for rapid polymerase chain reaction. *Lab Chip* 2007;7:1012-7. 10
29. Agrawal N, Hassan YA, Ugaz VM. A pocket-sized convective PCR thermocycler. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007;46:4316-9.
30. Zhang C, Xu J, Ma W, Zheng W. PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnol Adv* 2006;24:243-84.
31. Wheeler EK, Benett W, Stratton P, Richards J, Chen A, Christian A, et al. Convectively driven polymerase chain reaction thermal cycler. *Anal Chem* 2004;76:4011-6. 20
32. Belgrader P, Benett W, Hadley D, Long G, Mariella R, Jr., Milanovich F, et al. Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clin Chem* 1998;44:2191-4.
33. Terazona H, Takei, H, Hattori A, Yasuda K. Development of a high-speed real-time polymerase chain reaction system using a circulating water-based rapid heat exchange. *Jap J Appl Phys* 2010;49:06GM05. 30
34. Wheeler EK, Hara CA, Frank J, Deotte J, Hall SB, Benett W, Spadaccini C, Beer NR. Under-three minute PCR: Probing the limits of fast amplification. *Analyst* 2011;:.
35. Fuchiwaki Y, Nagai H, Saito M, Tamiya E. Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure. *Biosens Bioelect* 2011;27:88-94.
36. Maltezos G, Johnston M, Taganov K, Srichantaratsamee C, Gorman J, Baltimore D, Chantratita W and Scherer A, *Appl. Phys. Lett.*, 2010, 97, 264101. 40
37. Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem* 2000;46:1738-43.
38. Zuna J, Muzikova K, Madzo J, Krejci O, Trka J. Temperature non-homogeneity in rapid airflow-based cycler significantly affects real-time PCR. *Biotechniques* 2002;33:508, 10, 12.

【表 4 D】

39. von Kanel T, Adolf F, Schneider M, Sanz J, Gallati S. Sample number and denaturation time are crucial for the accuracy of capillary-based LightCyclers. *Clin Chem* 2007;53:1392-4.
40. Wittwer CT, Herrmann MG. Rapid thermal cycling and PCR kinetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, eds. *PCR Methods Manual*, Vol. San Diego: Academic Press, 1999:211-29. 10
41. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003;49:853-60.
42. von Ahsen N, Wittwer CT, Schutz E. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg(2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin Chem* 2001;47:1956-61. 20
43. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-60.
44. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-1, 4-8.
45. Weis JH, Tan SS, Martin BK, Wittwer CT. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet* 1992;8:263-4. 30
46. Brown RA, Lay MJ, Wittwer CT. Rapid cycle amplification for construction of competitive templates. In: Horton RM, Tait RC, eds. *Genetic Engineering with PCR*, Vol. Norfolk: Horizon Scientific Press, 1998:57-70.
47. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998
48. Whitney SE, "Analysis of rapid thermocycling for the polymerase chain reaction," Ph.D. thesis, University of Nebraska, 2004. 40
49. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient of 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Meth Appl*. 1993;2:275-287.

【表 4 E】

50. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1988;85:9436-40.
51. Terazono H, Hattori A, Takei H, Takeda K, Yasuda K. Development of 1480 nm photothermal high-speed real-time polymerase chain reaction system for rapid nucleotide recognition. *Jpn J Appl Phys.* 2008;47:5212-6. 10
52. Wittwer CT, Rasmussen RP, Ririe KM. Rapid PCR and melting curve analysis. In: *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*, Bustin SA, ed. Cambridge Univ Press, New York, 48-69, 2010.
53. Fuchiwaki Y, Saito M, Wakida S, Tamiya E, Nagai H. A practical liquid plug flow-through polymerase chain-reaction system based on a heat-resistant resin chip. *Anal Sci.* 2011;27:225-30.
54. Kim H, Dixit S, Green CJ, Faris GW. Nanodroplet real-time PCR system with laser assisted heating. *Optics Express* 2009;17:218-27. 20
55. Obeid PJ, Christopoulos TK, Crabtree HJ, Backhouse CJ. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection. *Anal Chem* 2003;75:288-95.
56. Giordano BC, Ferrance J, Swedberg S, Huhmer AFR, Landers JP. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. *Anal Biochem* 2001;291:124-132. 30

【 0 1 0 1 】

好ましい実施形態を参照しながら本発明を詳細に説明したが、以下の特許請求の範囲で記載および定義された本発明の範囲および趣旨内にある変更形態および改変形態が存在する。

【図 1 a】

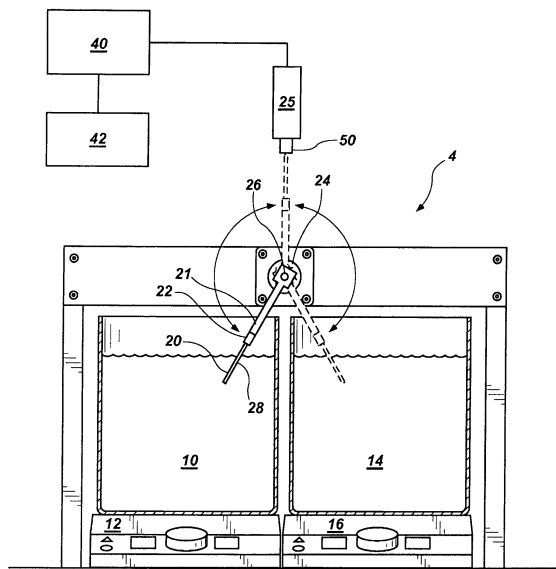


図 1a

【図 1 b】

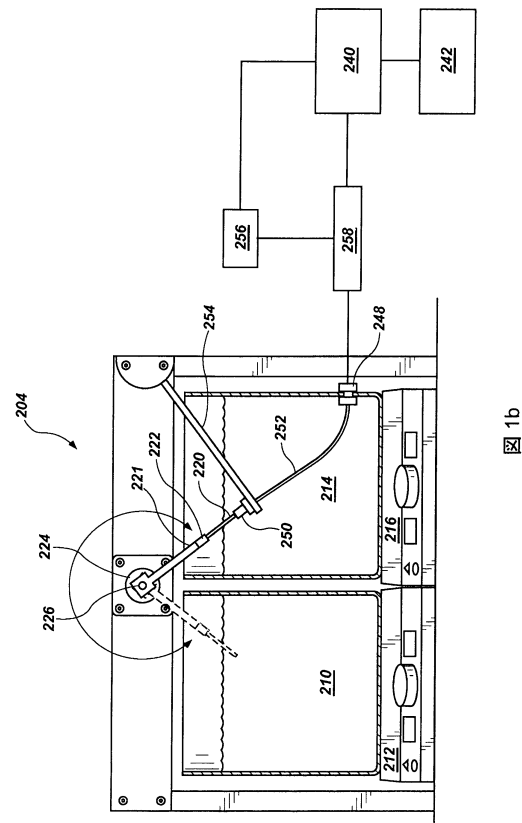


図 1b

【図 1 c】

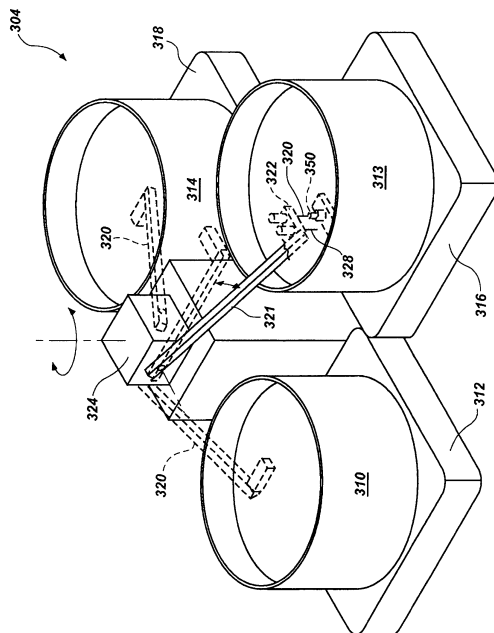


図 1c

【図 1 d】

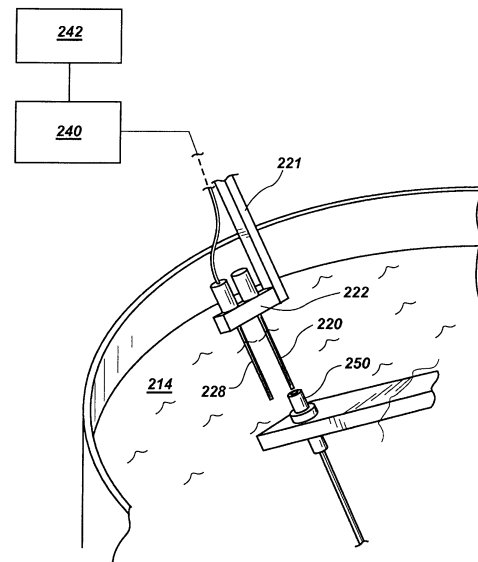


図 1d

【図 2 a】

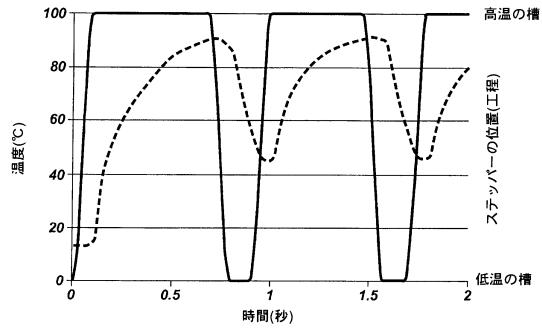


図 2a

【図 2 b】

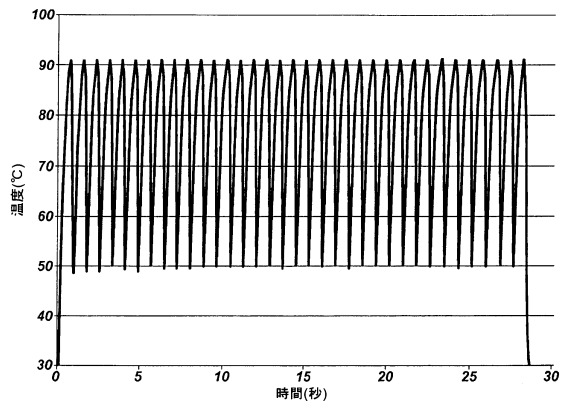


図 2b

【図 2 c】

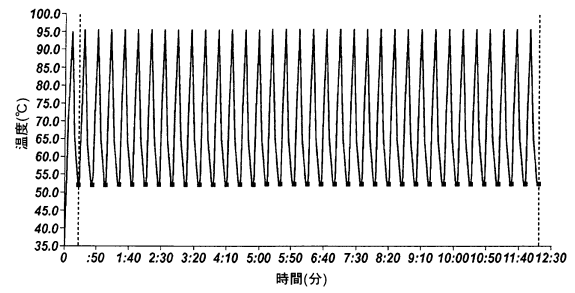


図 2c

【図 3 a】

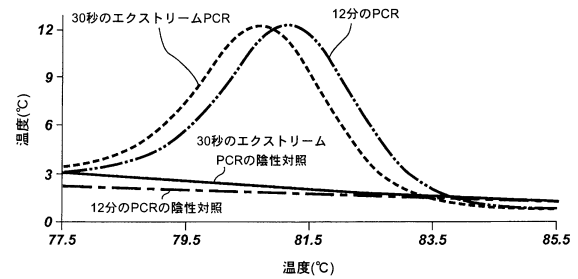


図 3a

【図 3 b】

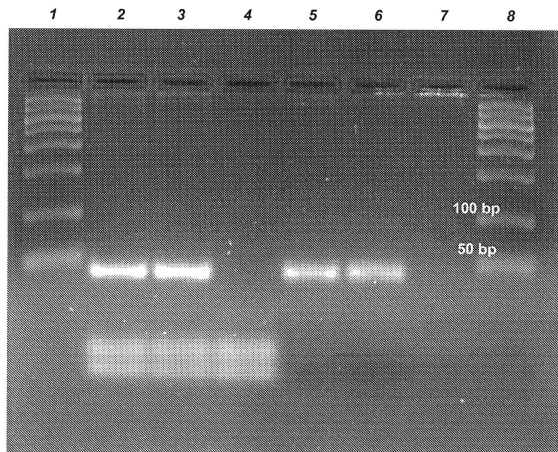


図 3b

【図 3 c】

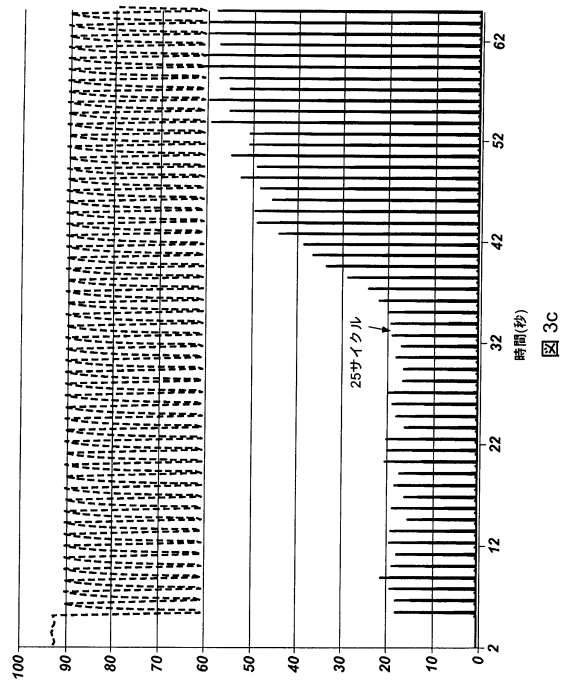
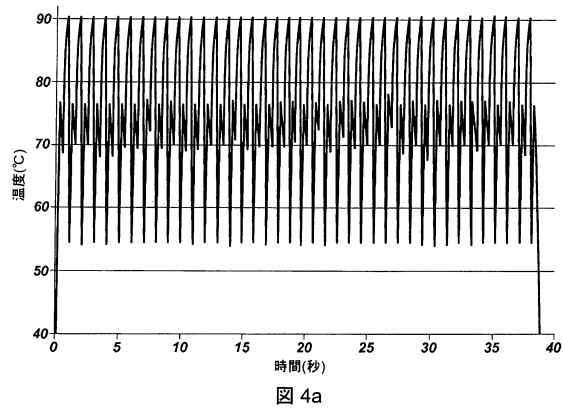
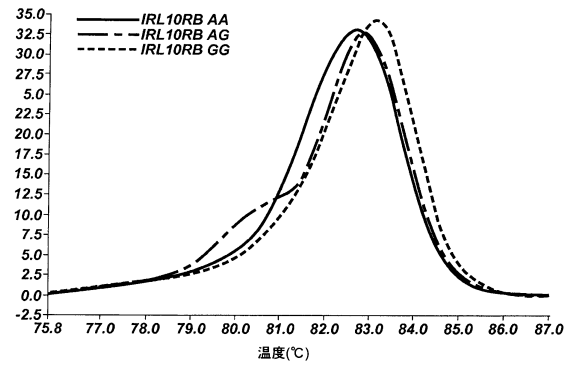


図 3c

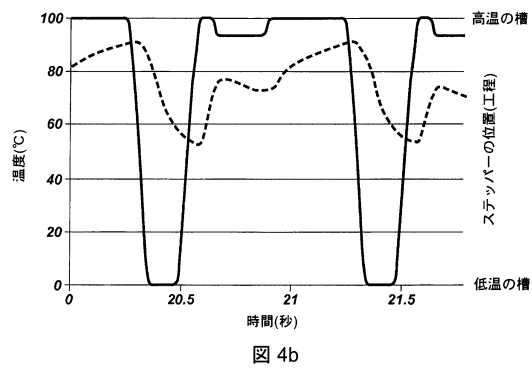
【図 4 a】



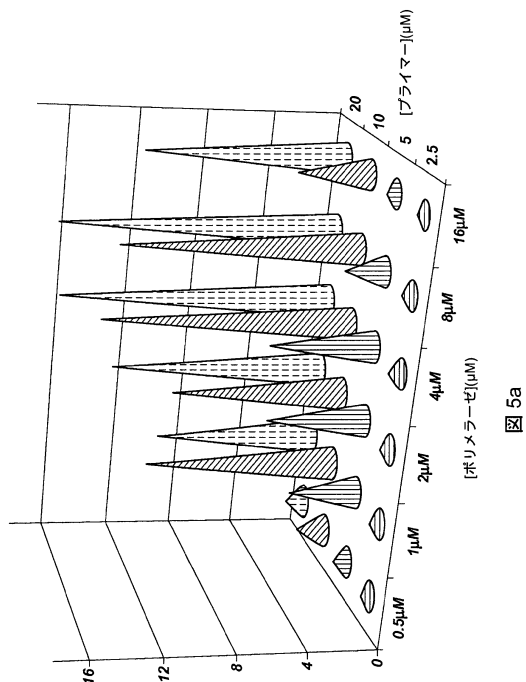
【図 4 c】



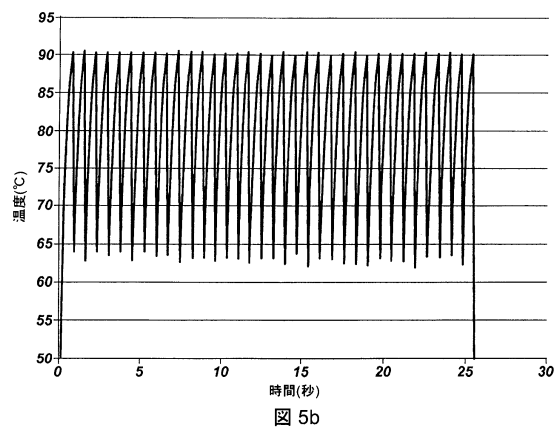
【図 4 b】



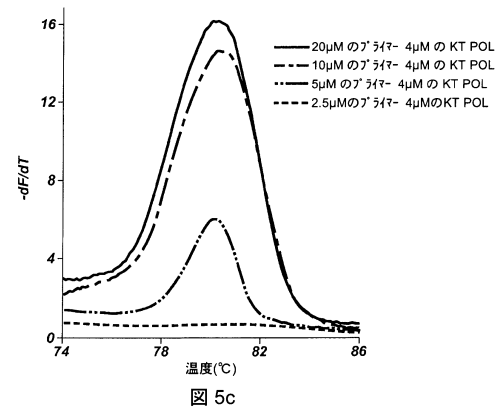
【図 5 a】



【図 5 b】



【図 5 c】



【図 5 d】

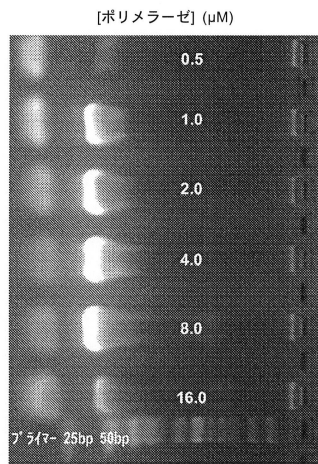
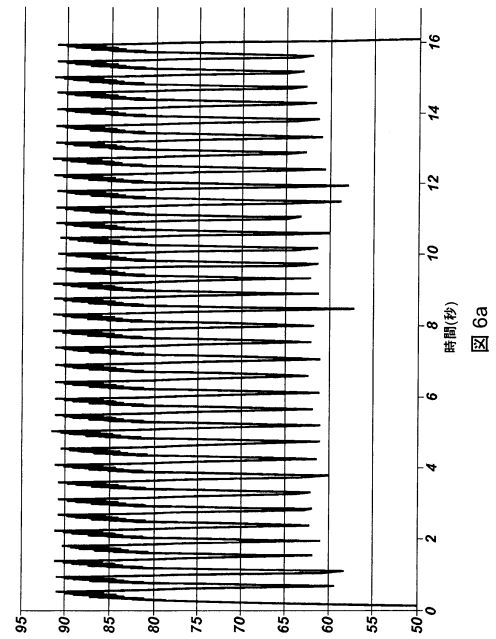


図 5d

【図 6 a】



【図 6 b】

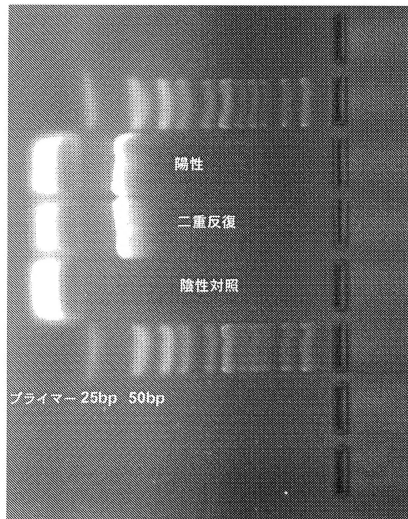
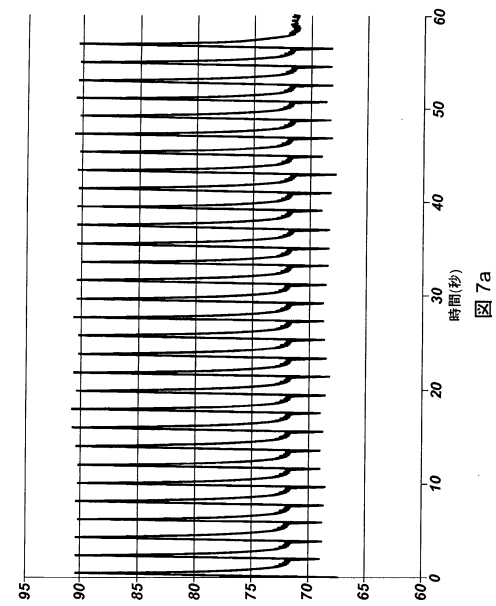
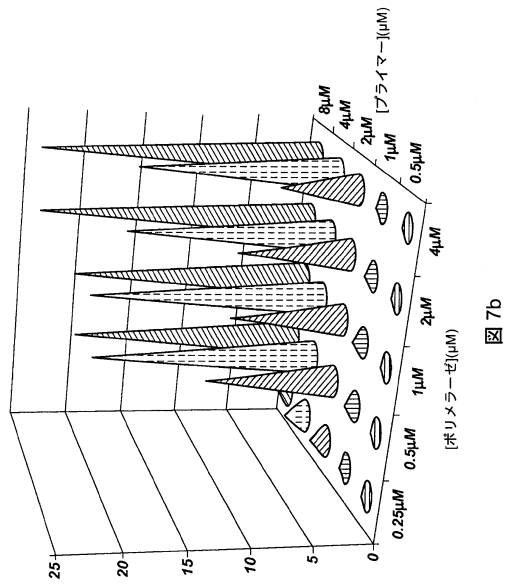


図 6b

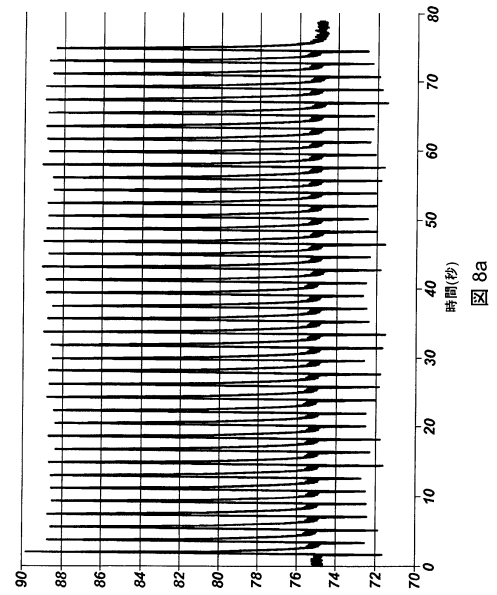
【図 7 a】



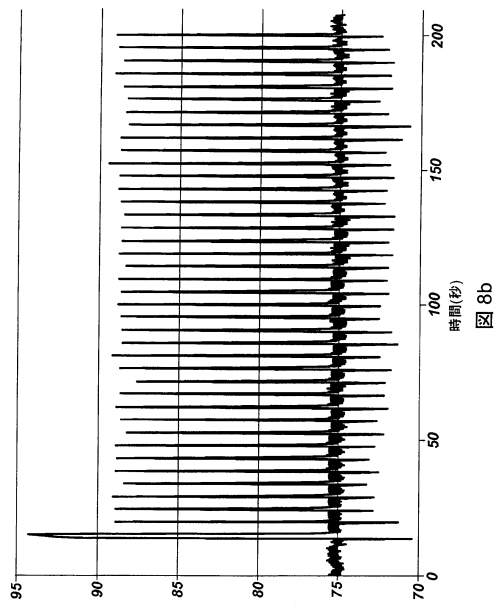
【図 7 b】



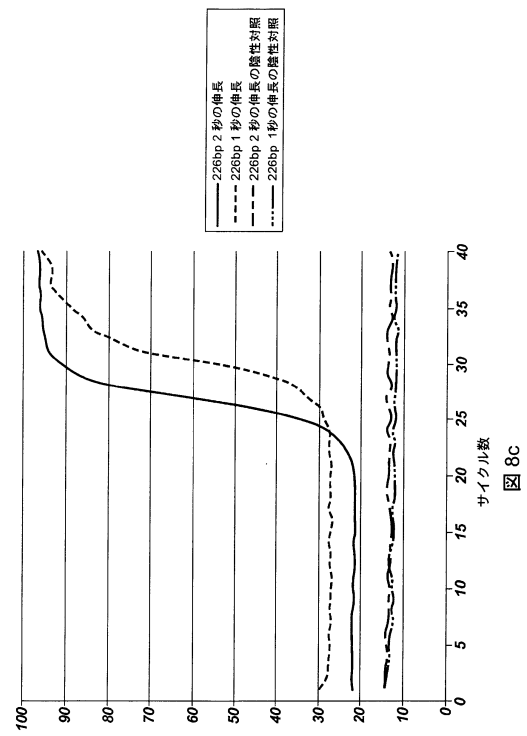
【図 8 a】



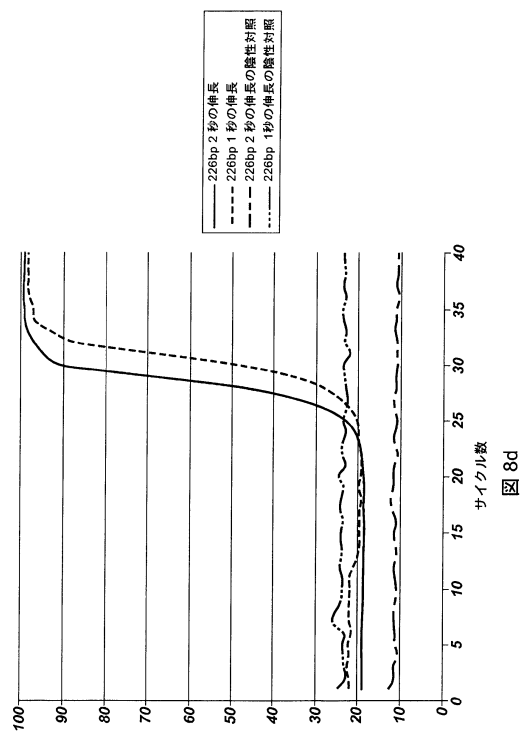
【図 8 b】



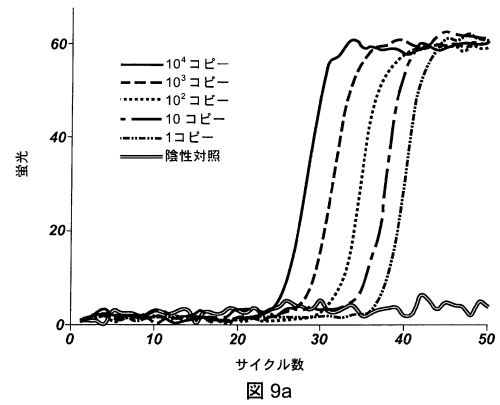
【図 8 c】



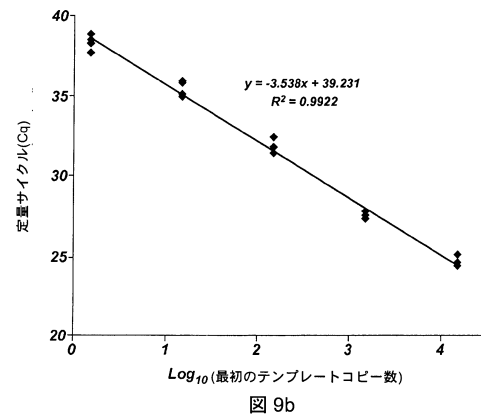
【図 8 d】



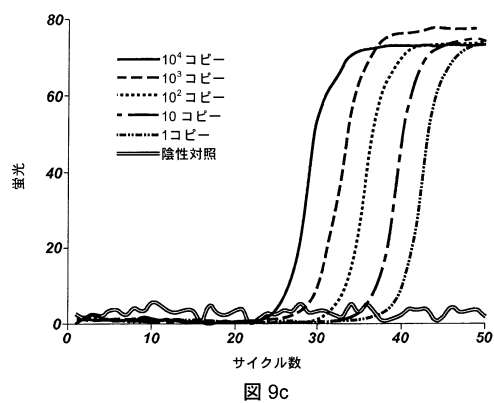
【図 9 a】



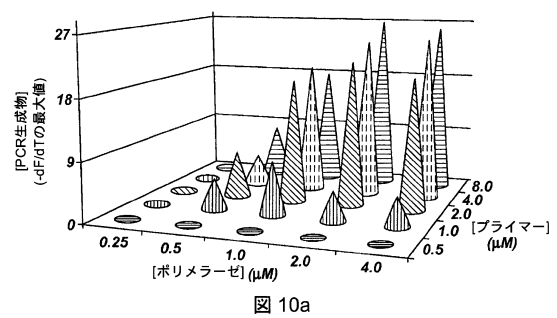
【図 9 b】



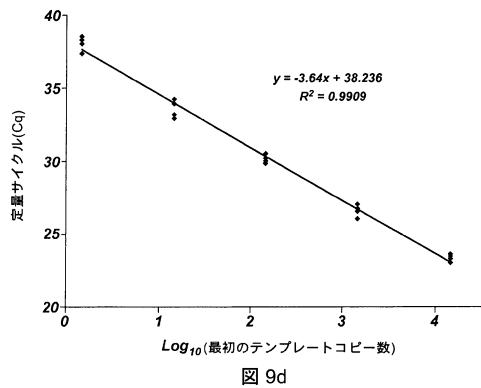
【図 9 c】



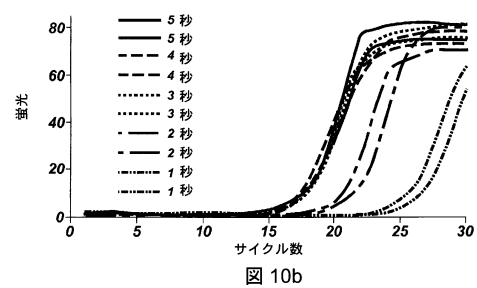
【図 10 a】



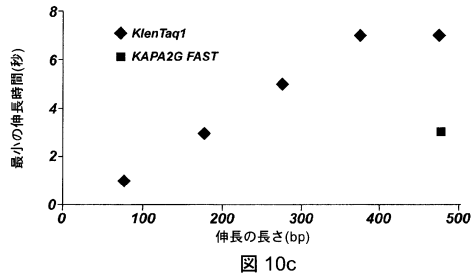
【図 9 d】



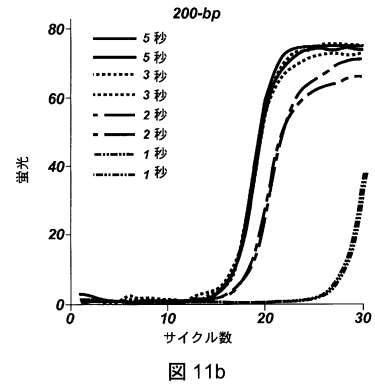
【図 10 b】



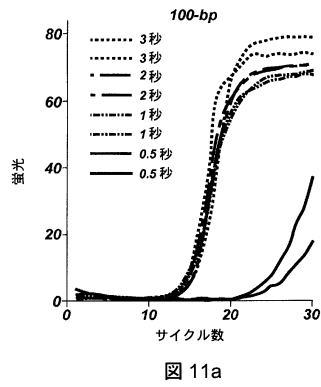
【図 10 c】



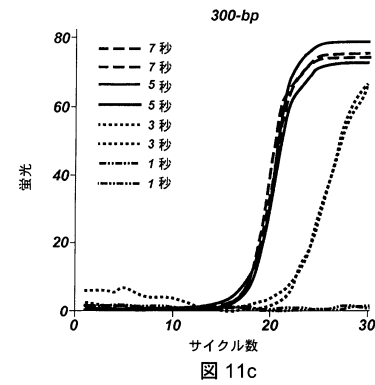
【図 11 b】



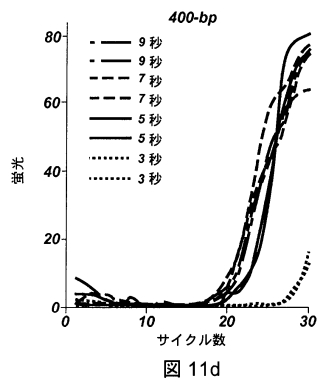
【図 11 a】



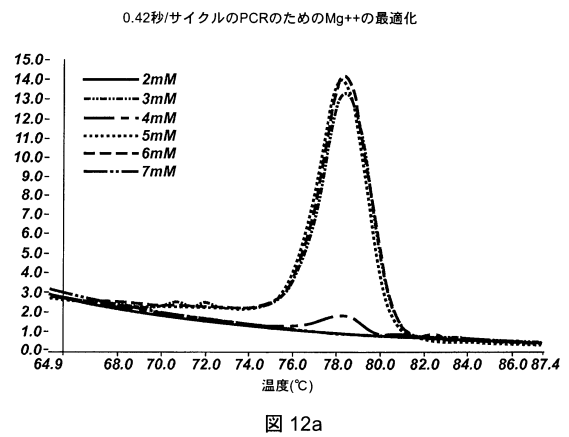
【図 11 c】



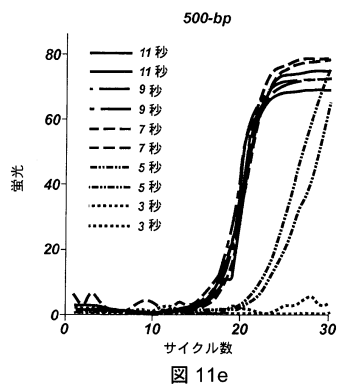
【図 11 d】



【図 12 a】



【図 11 e】



【図 1 2 b】

0.42秒/サイクルのPCRのためのMg++の最適化を示すゲル

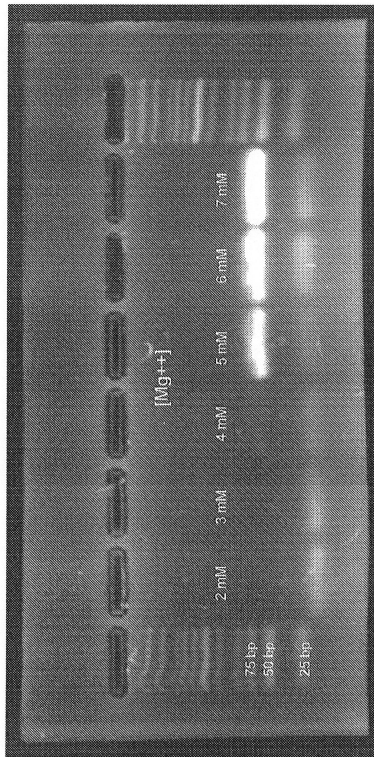


図 12b

【図 1 3 a】

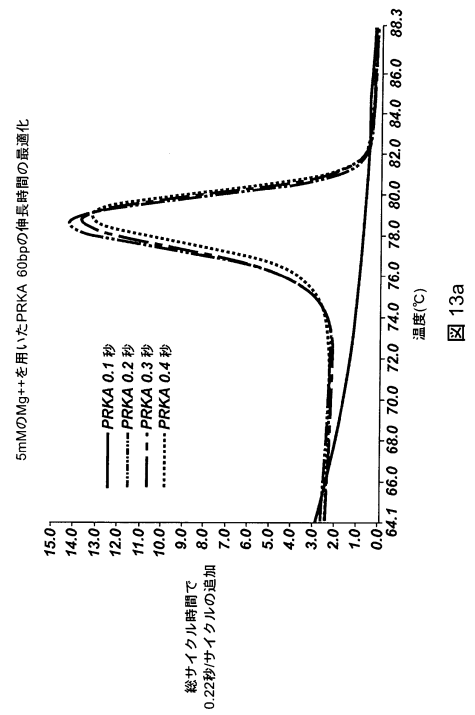


図 13a

【図 1 3 b】

5mMのMg++を用いた伸長時間の最適化を示すゲル

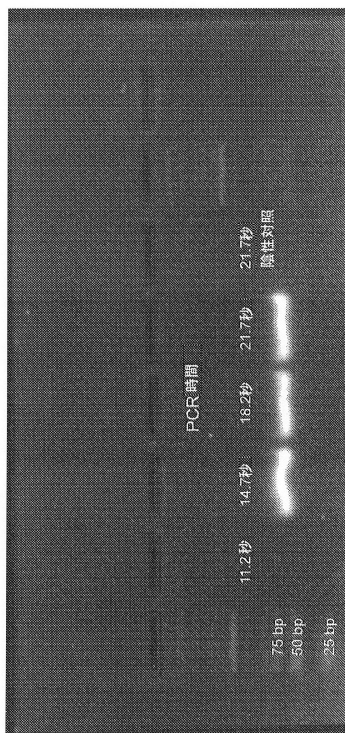


図 13b

【図 1 4 a】

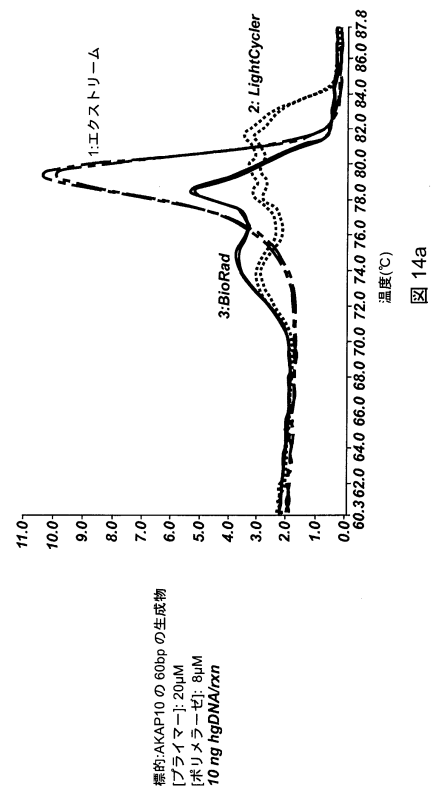


図 14a

【図 1 4 b】



図 14b

【配列表】

0006316802000001.app

【図 1 5 a】

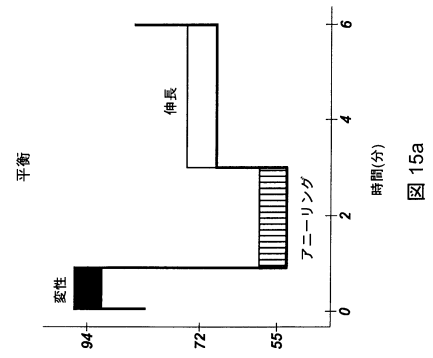


図 15a

【図 1 5 b】

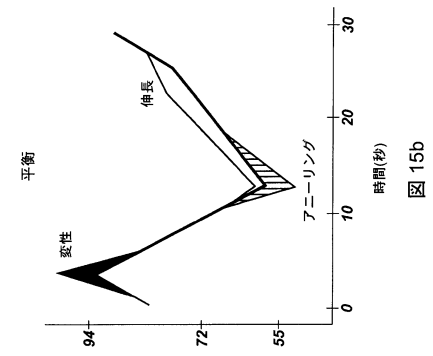


図 15b

フロントページの続き

- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100154298
弁理士 角田 恭子
- (74)代理人 100166268
弁理士 田中 祐
- (74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一
- (74)代理人 100161001
弁理士 渡辺 篤司
- (74)代理人 100179154
弁理士 児玉 真衣
- (74)代理人 100180231
弁理士 水島 亜希子
- (74)代理人 100184424
弁理士 増屋 徹
- (72)発明者 ウィットワース, カール・ティー
アメリカ合衆国ユタ州84109, ソルト・レイク・シティ, クレストウッド・ドライブ 3479
- (72)発明者 ファラー, ジャレッド・スティーヴン
アメリカ合衆国ユタ州84104, ソルト・レイク・シティ, ウェスト・50・サウス 88, イー1

審査官 松岡 徹

- (56)参考文献 特開平05-304960 (JP, A)
TawMan(R) EZ RT-PCR Kit Protocol, Applied Biosystems, 2002年 4月, 1-6
WITTWER, C. T. et al., Minimizing the Time Required for DNA Amplification by Efficient Heat Transfer to Small Samples, Analytical Biochemistry, 1990年, Vol.186, Pages 328-331
FUCHIWAKI, Yusuke et al., Study of DNA Amplification Efficiency Based on Temperature Analyses of the Moving Fluid in a Liquid-Plug Flow PCR System, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2011年10月15日, Vol.84, No.10, Pages 1075-1081
藤本嗣人, 高速PCRシステムによるアデノウイルス診断, 臨床と微生物, 2009年, Vol.36, No.3, Pages 257-262
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)