

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年6月27日(27.06.2024)



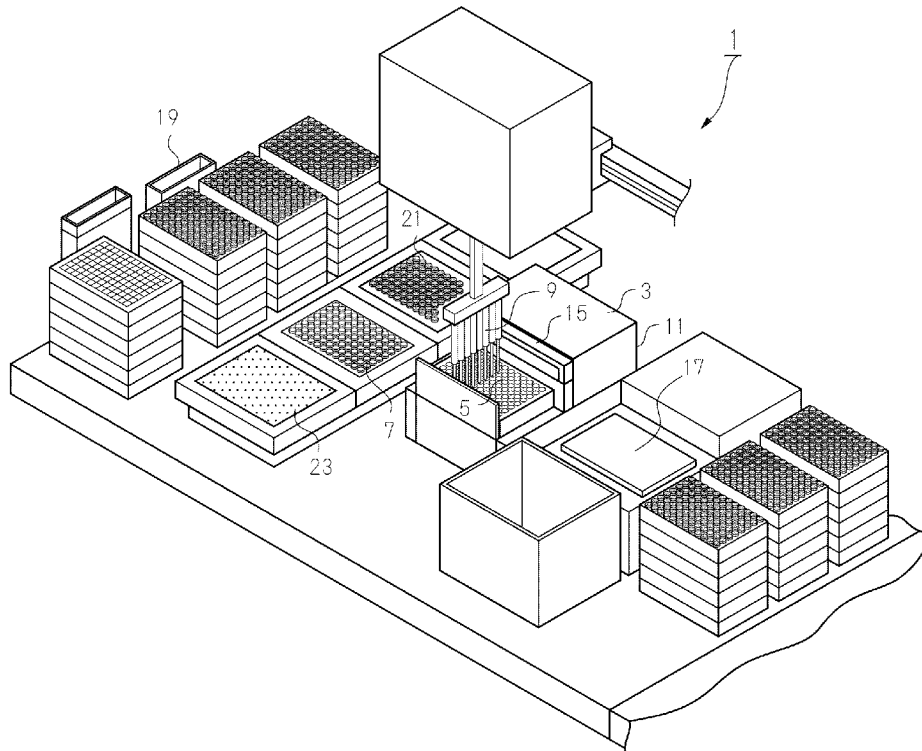
(10) 国際公開番号

WO 2024/135694 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/686 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/045552
- (22) 国際出願日: 2023年12月19日(19.12.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-206306 2022年12月23日(23.12.2022) JP
- (71) 出願人: ペプチドリーム株式会社
(PEPTIDREAM INC) [JP/JP]; 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-23 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 澤井 直己(SAWAI Naoki); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-23 ペプチドリーム株式会社内 Kanagawa (JP). 大内 政輝(OHUCHI Masaki); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-23 ペプチドリーム株式会社内 Kanagawa (JP). 中島 壘(NAKAJIMA Rui); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-23 ペプチドリーム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 廣瀬 隆行 (HIROSE Takayuki); 〒1040044 東京都中央区明石町8-1 聖路加タワー32階 廣瀬国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

(54) Title: DNA AMPLIFICATION METHOD USING PCR

(54) 発明の名称: PCRを用いたDNAの増幅方法



(57) Abstract: [Problem] To provide a method and a system for amplifying DNA using PCR that can maintain the DNA concentration of a plurality of DNA samples within a certain range. [Solution] The problem is solved by a DNA amplification method using PCR, the method comprising: a cycle number acquisition step in which the number of PCR cycles for each of DNA samples housed in individual wells of a first multiwell plate is acquired; a minimum PCR step in which PCR for the minimum number of cycles, which is the smallest number of cycles obtained in the cycle number acquisition



WO 2024/135694 A1

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

step, is performed; a first transfer step in which a sample that has been identified with the minimum number of cycles, which is the smallest number of cycles found in the cycle number acquisition step, and that has been subjected to PCR for the minimum cycles is transferred to a second multiwell plate; and a step for repeating additional PCR/transfer steps, in which, after the first transfer step, PCR is performed up to a maximum number of cycles, which is the greatest number of cycles acquired in the cycle number acquisition step, and the sample that has reached the number of cycles acquired in the cycle number acquisition step is transferred to the second multiwell plate.

(57) 要約: 【解決課題】 複数のDNA検体のDNAの濃度を一定の範囲とすることができるPCRを用いたDNAの増幅方法やシステムを提供する。【解決手段】 第1のマルチウエルの各ウエルに収容された各DNA検体についてPCRサイクル数を取得するサイクル数取得工程と、サイクル数取得工程で得られた最も少ないサイクル数である最少サイクル数分のPCRを行う最少PCR工程と、サイクル数取得工程で最少サイクル数である最少サイクル数とされた検体であって、最少サイクル数分のPCRを行った後の検体を、第2のマルチウエルに移送する第1の移送工程と、第1の移送工程の後に、サイクル数取得工程で取得された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、PCRをさらに行うとともに、サイクル数取得工程で取得されたサイクル数に到達した検体を、第2のマルチウエルに移送する追加PCR・移送工程を繰り返す工程を含む、PCRを用いたDNAの増幅方法。

明 細 書

発明の名称：PCRを用いたDNAの増幅方法

技術分野

[0001] この発明はPCRを用いたDNAの増幅方法やシステムなどに関する。

背景技術

[0002] WO2012/074130号パンフレットには、ペプチド翻訳合成におけるmRNAディスプレイ法やRAPIDディスプレイ法が記載されている。

[0003] 核酸タグを用いたランダムライブラリーを利用した各種*in vitro*ディスプレイ、例えばリボソームディスプレイ、mRNAディスプレイやRAPIDディスプレイといった技術では、例えば以下の工程が繰り返される。

工程1：核酸タグのついたランダムペプチドライブラリーを生成する工程

工程2：ランダムペプチドライブラリーから目的の機能を持つペプチドを選別する工程

工程3：選別する工程から回収された核酸を所定濃度まで増幅する工程（PCR工程）

上記の3工程を繰り返すことにより、ペプチドライブラリー中の目的の機能を持つペプチドの割合を増加・濃縮することができ、最終的に目的とするペプチドを取得することができる。

このような技術に使用できる、複数のDNAサンプルに対するPCR増幅プロセスを正規化するための方法やシステムが提案されている（WO2022/081934号パンフレット）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO2012/074130号パンフレット

特許文献2：WO2022/081934号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 核酸タグを用いたランダムライブラリーを利用した各種ディスプレイ、特に、ペプチド創薬開発プラットフォームシステムであるPDPS (Peptide Discovery Platform System) (WO2012/074130) におけるmRNAディスプレイやRAPIDディスプレイなどの*in vitro*ディスプレイでは、ランダムDNAライブラリーの種類のみならず、これにコドンテーブルの種類やペプチドライブラリーを供する対象(ターゲット)の種類が掛け合わされるため、多数の組み合わせが生じ得る。本発明者らは、PDPSにおける核酸タグを用いたディスプレイ技術において、より多くの検体を扱う大規模なスクリーニングを実施することを検討し、その際にPCR工程が問題になることを見出した。

通常、PCR工程後は再び上記の工程1に戻る。工程1での操作性を考えた場合、PCR工程後にすべてのサンプルがより近い濃度になっていることが望ましい。これを実現するには工程3のPCR工程で各サンプルに適切なサイクル数のPCRを実施することが望ましい。しかしながら、工程2の選別工程から回収された各サンプルの核酸タグ濃度には、通常大きなばらつきが生じる。そのため、多検体のサンプルの個々に対して適切なPCRサイクルをそれぞれ実施するのは困難である。

この課題に対処するためには、適切なサイクル数が同じ及び／又は類似のサンプルをグループ化して、それぞれのグループにおいてPCRを実施することが考えられる。しかし、少数のPCR装置でこのような作業を実施すると、PCRを繰り返し実施しなければならず効率が悪い。また、これを避けるために多数のPCR装置を準備すると、多額の費用と広い設置場所が必要になる。

この明細書は、複数のDNA検体のDNAの濃度を一定の範囲とすることができPCRを用いたDNAの、効率のよい増幅方法やシステムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 最初の発明は、PCRを用いたDNAの増幅方法に関する。

この方法は、サイクル数取得工程と、最少PCR工程と、第1の移送工程と、追加PCR・移送工程を繰り返す工程を含む。

サイクル数取得工程は、第1のマルチウエルの各ウェルに收容された各DNA検体についてPCRサイクル数を取得するための工程である。サイクル数取得工程の例は、ウェルに收容された各DNA検体のDNA濃度を用いて、増幅後のDNA濃度が一定範囲になるようなPCRサイクル数を取得する工程である。各ウェルにおける各DNA検体は、複数種類のDNAを含み、当該複数種類のDNAは5'末端及び3'末端がそれぞれ共通した塩基配列を有することが好ましい。

[0007] 最少PCR工程は、サイクル数取得工程で得られた最も少ないサイクル数である最少サイクル数分のPCRを行う工程である。最少PCR工程の前に、オイル供給部が、第1のマルチウエルの各ウェルにオイルを供給する工程と、反応液供給部が、第1のマルチウエルの各ウェルに反応液を供給する工程と、をさらに含むことが好ましい。最少PCR工程において、内蓋を被覆状態とするとともに、可動蓋を加熱可能状態とすることが好ましい。

[0008] 第1の移送工程は、サイクル数取得工程で最少サイクル数とされた検体であって、最少サイクル数分のPCRを行った後の検体を、第2のマルチウエルに移送するための工程である。第1の移送工程において、可動蓋を加熱不要状態とするとともに、内蓋を開放状態とすることが好ましい。第2のマルチウエルの各ウェルは、第1のマルチウエルの各ウェルと対応したウェルである。第1の移送工程において、第1の移送工程における移送対象である検体を、第1のマルチウエルのウェルから、当該第1のマルチウエルのウェルと対応する第2のマルチウエルのウェルに移送することが好ましい。

[0009] 追加PCR・移送工程を繰り返す工程は、第1の移送工程の後に、サイクル数取得工程で取得された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、PCRをさらに行うとともに、サイクル数取得工程で取得されたサイクル

数に到達した検体を、第2のマルチウェルに移送する追加PCR・移送工程を繰り返す工程である。

追加PCR・移送工程においてPCRを行う際に、内蓋を被覆状態とするとともに、可動蓋を加熱可能状態とし、追加PCR・移送工程において検体を第1のマルチウェルから第2のマルチウェルに移送する際に、可動蓋を加熱不要状態とするとともに、内蓋を開放状態とすることが好ましい。追加PCR・移送工程において検体を第1のマルチウェルから第2のマルチウェルに移送する際に、移送対象である検体を、第1のマルチウェルのウェルから、当該第1のマルチウェルのウェルと対応する第2のマルチウェルのウェルに移送することが好ましい。

[0010] 次の発明は、PCR装置を用いてDNAを増幅するためのプログラムに関する。このプログラムは、プロセッサに、上記した各種工程を実装するための指令を出させ、PCR装置に、各種工程を実行させる。

つまり、このプログラムは、プロセッサに、サイクル数入力工程を実行させ、

プロセッサを介してPCR装置に、最少PCR工程を実行させ、
プロセッサを介してPCR装置に、第1の移送工程を実行させ、
プロセッサを介してPCR装置に、追加PCR・移送工程を繰り返させる工程と、を実行させる。上記のPCR装置の例は、次に説明する装置である。

また、この発明は、上記したプログラムを記憶した非一時的情報記録媒体に関する。

[0011] 次の発明は、PCR装置を用いたDNAの増幅システムに関する。

このDNAの増幅システムは、PCR装置を含む。そして、PCR装置は、第1のマルチウェル、第2のマルチウェル、検体輸送部、サーマルサイクラー、及びプロセッサを含む。第2のマルチウェルの各ウェルは、好ましくは、第1のマルチウェルの各ウェルと対応したウェルである。この装置は、可動蓋と内蓋とをさらに有するものが好ましい。可動蓋は、第1のマルチウ

エルを覆って加熱することができる状態である加熱可能状態とすることができるとともに、加熱可能状態から移動することにより第1のマルチウエルを覆わない状態である加熱不要状態とすることができる。内蓋は、第1のマルチウエルを覆う状態である被覆状態とすることができるとともに、被覆状態から移動することにより第1のマルチウエルを覆わない状態である開放状態とすることができ、可動蓋が加熱可能状態のときであって、内蓋が被覆状態のときに、可動蓋と第1のマルチウエルとの間に存在することとなる。

この装置は、オイル供給部及び反応液供給部をさらに有するものが好ましい。

オイル供給部は、第1のマルチウエルの各ウエルにオイルを供給するための要素である。反応液供給部は、第1のマルチウエルの各ウエルに反応液を供給するための要素である。

[0012] PCR装置は、先に説明した方法を実装するものであり、例えば以下の様に動作する。

PCR装置の第1のマルチウエルの各ウエルに収容された各DNA検体についてPCRサイクル数が入力される。

すると、プロセッサが、第1のマルチウエルを搭載したサーマルサイクラーを駆動して、PCR装置にサイクル数入力工程で入力された最も少ないサイクル数である最少サイクル数分のPCRを行わせる。

プロセッサが、検体輸送部を用いて、サイクル数入力工程で最少サイクル数とされた検体であって、最少サイクル数分のPCRを行った後の検体を、第2のマルチウエルに移送させる。

プロセッサが、サイクル数入力工程で入力された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、第1のマルチウエルを搭載したサーマルサイクラーを駆動して、PCRをさらに行わせるとともに、検体輸送部を用いて、サイクル入力工程で入力されたサイクル数に到達した検体を、第2のマルチウエルに移送させる追加PCR・移送工程を繰り返させる。

本発明の方法は、一態様として上記の工程を含むため、サーマルサイクラー

一は、開放状態と閉鎖状態を繰り返すこととなる。

発明の効果

[0013] 異なる複数のDNA検体をPCRに供して得られる各検体のDNA濃度を一定の範囲内に収めることができる。これにより、これらの検体を使用した次工程に効率的に進むことができる。

また、本方法は、希釈する必要がないため、核酸タグを用いたランダムライブラリーを利用したmRNAディスプレイなどにおいて、検体中のDNAの多様性を維持したままDNAを増幅でき、次工程に持ち込むことが可能となる。

本方法は、核酸タグを用いたランダムライブラリーを利用した*in vitro*ディスプレイ法などにおいて、自動化への適用が容易である。

本方法は、多数のPCR装置を使用する必要がなく、かつ、より短時間に、多数の検体のDNA濃度を一定の範囲内に収めることができる。

さらに、本方法は、他の検体とのコンタミネーションリスクを減らしつつ、各検体の濃度に応じたPCRを効率よく実施することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1A]図1Aは、検体輸送部を稼働しているDNAの増幅システムを示す。

[図1B]図1Bは、内蓋を被覆状態としたDNAの増幅システムを示す。

[図1C]図1Cは、可動蓋を加熱可能状態としたDNAの増幅システムを示す。

[図2]図2は、プロセッサを説明するためのブロック図である。

[図3]図3は、PCRを用いたDNAの増幅方法を説明するためのフローチャートである。

[図4]図4は、第1のマルチウエルの各ウェルに收容された各DNA検体についてのPCRサイクル数を説明するための概念図である。

[図5A]図5Aは、内蓋を持ち上げた様子を示す概念図である。

[図5B]図5Bは、PCRサイクル後に対象となるDNA検体を回収する様子を示す概念図である。

[図5C]図5 Cは、回収されたDNA検体が第2のマルチウェルプレートの対応するウェルに移送される様子を示す概念図である。

[図5D]図5 Dは、サーマルサイクラー上に内蓋が移送される様子を示す概念図である。

[図5E]図5 Eは、サーマルサイクラー上に内蓋が移送された様子を示す概念図である。

[図5F]図5 Fは、可動蓋が加熱可能状態とされた様子を示す概念図である。

[図6]図6は、実施例2におけるマイクロ流路電気泳動画像を示す図面に代わる写真である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、図面を用いて本発明を実施するための形態について説明する。本発明は、以下に説明する形態に限定されるものではなく、以下の形態から当業者が自明な範囲で適宜修正したものも含む。

[0016] 図1は、DNAの増幅システムを説明するための図である。図1 Aは、検体輸送部を稼働している様子を示す。図1 Bは、内蓋を被覆状態とした様子を示す。図1 Cは、可動蓋を加熱可能状態とした様子を示す。このシステム1は、PCR装置3を用いたDNAの増幅システムに関する。このDNAの増幅システム1は、PCR装置3を含む。そして、PCR装置3は、第1のマルチウェル5、第2のマルチウェル7、検体輸送部9、サーマルサイクラー11、及びプロセッサ13を含む。第2のマルチウェル7の各ウェルは、好ましくは、第1のマルチウェル5の各ウェルと対応したウェルである。このシステム1は、可動蓋15と内蓋17とをさらに有するものが好ましい。このシステム1は、オイル供給部19及び反応液供給部21を含んでもよい。

[0017] このシステム1は、各DNA検体のPCRサイクル数を決定するPCRサイクル数決定装置と接続されていてもよい。PCRサイクル数決定装置は、検体の濃度を分析する濃度分析装置と接続されていてもよい。そして、PCRサイクル数決定装置の例は、検体の濃度を受け取って、各検体のPCRサ

イクル数を決定することができるものである。このシステム1は、例えば、PCRサイクル数決定装置から各DNA検体のPCRサイクル数などPCR情報を受け取ることができる。

[0018] PCR装置3

PCR装置は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いてDNAを増幅させるための装置である。PCR装置は、例えば特許7038221号公報に記載される通り、公知である。本発明のPCR装置3は、システム1を構成できる仕様を有していることが好ましい。本発明のPCR装置3は、本発明に係るDNAの増幅方法を実施するための装置であり、第1のマルチウェル、第2のマルチウェル、検体輸送部、サーマルサイクラー、及びプロセッサを含む。

[0019] 第1のマルチウェル5

マルチウェルは、2以上の複数のウェルを含む。マルチウェルは、2以上のウェルを含むプレート（マルチウェルプレート）であってもよい。マルチウェルプレートは、複数のサンプルの処理および分析のための標準形式になっており、様々な形式、サイズ、及び形状を取り得るが、通常、標準のサイズおよび形状で作製され、ウェルの標準的な配列を有する。ウェルの配列の例としては、6穴ウェルプレート（3×2アレイのウェル）、12穴ウェルプレート（4×3アレイのウェル）、24穴ウェルプレート（6×4アレイのウェル）、48穴ウェルプレート（8×6アレイのウェル）、96穴ウェルプレート（12×8アレイのウェル）、384穴ウェルプレート（24×16アレイのウェル）などが挙げられる。本発明におけるマルチウェルは、PCRに使用可能であれば特に制限はなく、上記のマルチウェルプレートに限定されるものではない。また、ウェルの数は2以上1000以下が好ましく、6以上500以下がより好ましい。限定するものではないが、48穴ウェルプレートや96穴ウェルプレートを好適に使用することができる。第1のマルチウェル5は、通常、検体を含んだ状態で、サーマルサイクラーを用いてPCR処理が行われる。第1のマルチウェル5の各ウェル5a、5b、5cは、それぞれDNA検体を収容できる。第1のマルチウェル5に含

まれる全てのウェルにDNA検体を収容した状態でPCR処理を行わなくてもよい。

[0020] 本発明に供するDNA検体は、少なくとも1種類以上のDNAを含み、好ましくは複数種類のDNAを含む。DNAの含有量は、PCRにより増幅可能な量であれば特に制限はない。

各ウェルには、同じDNA検体を分注した検体を収容してもよいが、それぞれ異なるDNA検体が収容されることが好ましい。但し、一部のウェルに同じDNA検体を分注した検体が収容された態様を排除するものではない。ここで「異なるDNA検体」とは、同じDNA検体を分注した検体ではないことを意味する。DNA検体の種類の下限値は、好ましくは2以上であり、10以上、20以上、30以上、40以上であってよい。また、DNA検体の種類の上限値は特に限定はなく、PCR装置が対応可能な数であればよく、1000以下、500以下、200以下、100以下であってよい。DNA検体の種類の数、選択されたマルチウェルプレートの有するウェル数以内であることが好ましい。本発明に供するDNA検体の液量は、PCRにより増幅可能な量であればよく、ウェルの容積に合わせて適宜決定できる。限定するものではないが、96ウェルのマルチウェルプレートの場合、20 μ l～100 μ lであってよい。

ところで、特定の標的に結合するペプチド性の分子を取得する際に、ランダムなペプチドライブラリーからスクリーニングを行う手法が広く使われている。特に無細胞翻訳系を利用した、リボソームディスプレイ法やmRNAディスプレイ法などの各種*in vitro*ディスプレイ法は、1本のチューブ内で短期間に高多様性のライブラリーを構築・スクリーニングできる点で優れている。*in vitro*ディスプレイ法とは、表現型(*phenotype*)とその配列をコードした遺伝子型(*genotype*)を非共有結合あるいは共有結合で連結することで表現型を遺伝子型にディスプレイし、試験管に再構築された複製システムを用いて活性種を濃縮、増幅(セクション)することを可能にするシステムを指す。*in vitro*ディス

レイ法には、リボソームディスプレイ法、mRNAディスプレイ法 (WO 98/31700)、cDNAディスプレイ法、光架橋型cDNAディスプレイ法 (WO2016/159211)、TRAP (transcription-translation coupled with association of puromycin linker) ディスプレイ法 (T. Ishizuka et al., Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14, 5433-5440)、cDNA TRAPディスプレイ法 (T. Kondo et al., Chem. Commun., 2021, 572416-2419)、RAPIDディスプレイ法 (WO2011/049157) 等がある。これらの *in vitro* ディスプレイ法では、ライブラリーから機能を有するペプチドやタンパク質の分子を選択した際に、それに対応する遺伝子が連結しているのでその配列を容易に読み取ることができ、特定の機能を有するペプチドの遺伝情報を選択する際に有用である。

これらのディスプレイ技術では、例えば以下の工程が繰り返される。

工程1：核酸タグのついたランダムペプチドライブラリーを生成する工程

工程2：ランダムペプチドライブラリーから、標的物質と相互作用するペプチドを選別する工程

工程3：選別する工程から回収された核酸を所定濃度まで増幅する工程 (PCR工程)

まず工程1では、基本的には、最初にDNA集団 (ランダムDNAライブラリー) を調製し、*in vitro* 転写産物としてRNA集団 (ランダムRNAライブラリー) を得て、*in vitro* 翻訳産物としてペプチド集団 (ランダムペプチドライブラリー) を得る。

次に工程2において、このペプチドライブラリーから、所望の機能や性質を持つものを何らかのスクリーニング系で選択する。特定のタンパク質に結合するペプチド分子を得たい場合は、例えば、標的タンパク質を固相化した磁性担体とペプチド集団とを接触させ、回収用マグネットにより担体に結合

したペプチド分子の混合物を回収することができる。また、標的タンパク質を固相化したカラムにペプチド集団を流し込み、カラムに結合したペプチド分子の混合物を回収することもできる。このとき、*in vitro*ディスプレイ技術により、各ペプチド分子には、その鋳型である核酸分子がタグのように付加されている。例えば、mRNAディスプレイライブラリーであれば、各ペプチド分子にはmRNAが付加されている。そこで、回収したペプチド-mRNA複合体の集団から逆転写酵素でDNAに戻し、工程3に供する。あるいは、核酸部分を二本鎖（DNA/RNAハイブリッド）にする目的で、選択前に逆転写反応を行うこともできる。

工程3では、このようにして回収されたDNAをPCRで増幅して、狙った表現型を有するクローンが多く含まれるバイアスのかかったライブラリーを得る。

上記の3工程を繰り返すことにより、ペプチドライブラリー中の目的の機能を持つペプチドの割合を増加・濃縮することができ、最終的に目的とするペプチドを取得することができる。

ここで、上記異なるDNA検体は、上記工程3の「選別する工程から回収された核酸」を含む検体であってよい。すなわち、上記異なるDNA検体は、工程2において選別されたペプチド、言い換えると、ランダムペプチドライブラリーから標的物質と相互作用するとして選別されたペプチド、をコードするDNAを含む検体であってよい。

上記核酸タグとしてmRNAを使用した場合は、これを逆転写して得られるDNAを、DNA検体として用いることができる。すなわち、DNA検体の例は、mRNAディスプレイ法の選別工程において回収されたペプチドをコードするDNAである。DNA検体の別の例は、DNAタグを有するペプチドから回収されたDNA検体である。このようなDNA検体の例は、各種*in vitro*ディスプレイ法の選別工程において、回収されたDNA検体である。上記の方法で回収されたDNAタグを含有するDNA検体は、通常それぞれ濃度が異なっている。この明細書に記載された方法を用いれば、こ

のような複数種類のDNA検体を同程度の濃度に増幅できる。

[0021] DNA検体は、DNAのセンス鎖の5'末端の核酸と3'末端の核酸がそれぞれ固定された塩基配列を含むことが好ましい。これは、換言すると、アンチセンス鎖の5'末端の核酸と3'末端の核酸もそれぞれ固定された塩基配列を含むことを意味する。つまり、第1のマルチウェル5の各ウェル5a, 5b, 5cのそれぞれには、複数種類のDNA検体が含まれており、それらの5'末端の塩基配列が共通しており、かつ、それらの3'末端の塩基配列が共通したものであることが好ましい。特に、核酸タグを用いたランダムライブラリーを利用した*in vitro*ディスプレイにより得られたDNA検体は、使用されるDNAライブラリーを構成する各DNAが、ひとつのウェルに含まれるDNA検体ごとに5'末端の核酸と3'末端の核酸とが共通したものであることが好ましい。つまり、複数のDNA検体の5'末端の核酸が同じであり、複数のDNA検体の3'末端の核酸が同じであることが好ましい。その場合、ひとつのウェルに含まれるDNA検体が複数種類存在し、5'末端の塩基と3'末端の塩基に挟まれた領域における中間領域の核酸は、DNA検体によって異なるようランダム化された核酸を有するものが好ましい。この場合でも、ウェルが異なれば、5'末端の塩基配列や3'末端の塩基配列は異なってもよい。

[0022] DNAのセンス鎖の5'末端の核酸の例は、限定するものではないが、転写用のプロモーター配列、例えばT7プロモーター配列を有する核酸である。この態様により、PCR後の次工程において、DNAの転写を行うことができる。DNAのセンス鎖の3'末端の核酸の例は、ピューロマイシンと、選別対象のペプチドとをつなぐリンカーをコードする核酸である。なお、ピューロマイシンの代替として、ピューロマイシンと同様に、翻訳のプロセスを阻害し、核酸とペプチドを結合できる物質を用いてもよい。

[0023] ランダム化とは、核酸のセグメントを、原則として所定の長さにわたって任意の可能な配列を有する核酸のセグメントを記述するために使用される用語である。ランダム化配列は、限定するものではないが、3~60個のヌク

レオチドの範囲の様々な長さであってよい。ランダム配列セグメントが作られる化学反応または酵素反応は、存在する可能性のある未知のバイアスまたはヌクレオチド選択により数学的にランダムな配列を生じさせないものでもよい。ランダム化された塩基配列がコードする多様なペプチドにより、ランダムペプチドライブラリーが構成され、これらと標的タンパク質とを結合させることで、目的となるペプチドを選抜するシステムが、核酸タグを用いたランダムペプチドライブラリーを利用した、各種の *in vitro* ディスプレイである。従って、核酸タグを用いたランダムライブラリーを利用した *in vitro* ディスプレイにおいて本発明の方法を使用する態様では、DNA検体の中に、上記構成を有する多種多様なDNAが含まれることが好ましい。

[0024] さらに、こういった各種の *in vitro* ディスプレイ法を利用したペプチド創薬開発プラットフォームシステムPDPS (Peptide Discovery Platform System) (WO2012/074130) では、上記工程1において、フレキシザイム (Flexizyme) (WO2007/066627) が用いられる。これにより、各検体に含まれるDNAの各コドンと非天然アミノ酸が紐づけられたコドンテーブルに基づき翻訳されたペプチドを含む、ランダムペプチドライブラリーが構成される。このランダムペプチドライブラリーを使用した選別工程を経て、回収されたDNAタグを含有するDNA検体は、ランダムDNAライブラリーの種類のみならず、これにコドンテーブルの種類やペプチドライブラリーを供する対象 (ターゲット) の種類が掛け合わされるため、多数の組み合わせが生じ得る。このようなDNA検体も、本発明の方法に好ましく使用することができる。ペプチドライブラリーから標的タンパク質と結合するペプチドを選抜する工程と本発明のPCR工程とは、マルチウェルプレートにおける同じ位置のウェルにおいて、好ましく実施することができる。また、後述するように、回収した検体は、PCRに供されたマルチウェルプレートと同型の新たなマルチウェルプレートにおいて、回収前のウェルに対応する位置の

ウェルに吐出することが好ましい。すなわち、DNAタグを用いたランダムライブラリーを利用したmRNAディスプレイ、特にPDPSにおける一連の工程において、常にマルチウェルプレートの同じ位置のウェルでアッセイを行うことが、コンタミネーションの防止とアッセイの管理の観点から好ましく、本発明の好ましい一態様である。

[0025] 第1のマルチウェル5は、異なる複数のDNA検体を含むものが好ましい。異なる複数のDNA検体は、それぞれのDNA検体の濃度を揃える処理がなされていないものであってもよい。

[0026] 第2のマルチウェル7

第2のマルチウェル7は、第1のマルチウェル5と同様のものである。また、第2のマルチウェル7の各ウェル7a, 7b, 7cは、第1のマルチウェルの各ウェル5a, 5b, 5cと対応したウェルである。例えば、各ウェル5a, 5b, 5cの第1のマルチウェル5における位置がA1, A2, B2である場合、それぞれに対応する第2のマルチウェル7の各ウェル7a, 7b, 7cは、第2のマルチウェル7における位置がA1, A2, B2であればよい。なお、この位置は、ウェルの位置を格子点とした場合の格子点(x, y)の位置に対応している。

[0027] 第2のマルチウェル7は、第2のマルチウェルを搭載する回収検体搭載部に搭載されていることが好ましい。回収検体搭載部は、プレートである第2のマルチウェル7を冷却するための冷却要素を有していることが好ましい。冷却要素は、プロセッサと接続されていることが好ましい。そして、冷却要素は、プロセッサからの指令に基づいて、温度を調整することで、回収検体搭載部に搭載されている第2のマルチウェル7を冷却できる。このような冷却要素の例として、サーキュレーターやペルチェ素子などを用いた冷却機構が挙げられる。第2のマルチウェル7を冷却することで、回収した検体の蒸発を抑えることができる。

[0028] 検体輸送部9

検体輸送部9は、ウェル内に検体を注入し、ウェル内の検体を回収するた

めに用いられる。検体輸送部 9 は、ピペット（マイクロピペット）などの管と、管を移送する移送機構と、管内の空気を調整して吸引及び吐出するための吸引及び吐出機構とを含む。検体輸送部 9 の移送機構は、プロセッサからの指令を受けて、管の位置（平面位置及び高さ）を変化させる。吸引及び吐出機構は、プロセッサからの指令を受けて、所定の位置において、検体を吸引し、検体を吐出する。検体を吸引する量や検体を吐出する量は、プロセッサからの指令に応じて調整できることが好ましい。検体輸送部 9 は、複数のマイクロピペットを有するものが好ましい。ウェル内に検体を注入する検体輸送部と、ウェル内の検体を回収するための検体輸送部は、同一でもよいし、異なるものでもよい。また、検体輸送部のマイクロピペットは、自動的にチップを交換できる仕様のものが好ましい。

[0029] サーマルサイクラー 1 1

サーマルサイクラー 1 1 は、PCR の温度制御機構である。PCR 工程において、第 1 のマルチウェル 5 が、サーマルサイクラー 1 1 のプレート搭載部に搭載される。サーマルサイクラー 1 1 は、プロセッサの指令に基づいて温度制御部の温度を調整し、第 1 のマルチウェル 5 の温度を制御できる。

[0030] プロセッサ 1 3

プロセッサ 1 3 は、PCR 装置 3 において各種要素に指令を出すための要素である。図 2 は、プロセッサを説明するためのブロック図である。プロセッサ 1 3 は、入力部 3 1、出力部 3 3、制御部 3 5、演算部 3 7 及び記憶部 3 9 を有しており、各要素は、バス 4 1 などによって接続され、情報の授受を行うことができるようにされている。例えば、記憶部には、プログラムが記憶されていてもよいし、各種情報が記憶されていてもよい。プロセッサ 1 3 は、プログラムを読み出して、各種演算や処理を行う。つまり、プロセッサ 1 3 の行う処理は、プログラムに基づくものであってもよい。また、プロセッサ 1 3 は、演算回路などの各種回路を含むものであってもよい。入力部から所定の情報が入力された場合、制御部は、記憶部に記憶されるプログラムを読み出す。そして、制御部は、適宜記憶部に記憶された情報を読み出し

、演算部へ伝える。また、制御部は、適宜入力された情報を演算部へ伝える。演算部は、受け取った各種情報を用いて演算処理を行い、記憶部に記憶する。制御部は、記憶部に記憶された演算結果を読み出して、出力部から出力する。このようにして、各種処理や各工程が実行される。この各種処理を実行するものが、各部や各手段である。コンピュータが、各種機能や各種工程を実現するものであってもよい。コンピュータは、スタンドアロンであってもよい。コンピュータは、機能の一部がサーバと端末に分散されていてもよい。その場合サーバと端末とは、インターネットやイントラネットなどのネットワークにより、情報の授受を行うことができるようにされていることが好ましい。プロセッサは、各種機械学習を行った学習済みモデルを含んでもよい。この場合、所定の教師データを学習済みモデルに入力することで、学習済みモデルや機械学習の精度を向上させることができる。そして、学習済みモデルに各種データを入力することで、所定の出力を得ることができる。各種データの例は、PCR処理情報や、DNA濃度を求めるために必要な各種情報である。

[0031] プロセッサ13には、PCR処理情報が入力される。PCR処理情報は、第1のマルチウェル5の各ウェル5a, 5b, 5cに収容された各DNA検体についてのPCRサイクル数に関する情報を含む。PCR処理情報は、各ウェル5a, 5b, 5cの位置情報も含まれることが好ましい。入力されたPCR処理情報は、適宜記憶部に記憶され、PCR工程において利用される。プロセッサ13には、後述するDNA濃度を求めるために必要な各種情報が入力されてもよい。

[0032] 可動蓋15

可動蓋15は、第1のマルチウェル5を覆って加熱することができる状態である加熱可能状態とすることができるとともに、加熱可能状態から移動することにより第1のマルチウェル5を覆わない状態である加熱不要状態とすることができる。可動蓋15は、サーマルサイクラー11の一要素であり、第1のマルチウェル5を加熱できるように加熱要素を含むものが好ましい。

また、可動蓋 15 は、加熱要素を含む可動蓋本体と、可動蓋本体を移動させるアクチュエータなどの駆動部とを含むものが好ましい。加熱要素や駆動部は、プロセッサ 13 と接続されていることが好ましい。そして、加熱要素はプロセッサ 13 からの指令に基づいて、温度を調整できる。駆動部は、プロセッサ 13 からの指令に基づいて、可動蓋 15 の位置を変化させることができる。なお、この例では、可動蓋 15 が加熱要素を含むものについて説明した。もっとも、第 1 のマルチウエル 5 を搭載する搭載部がサーマルサイクラー 11 の加熱要素を有しているものであってもよい。

加熱要素の例は、電熱線（抵抗線）であり、可動蓋 15 のうちウエルを覆うこととなる領域に広がるように電熱線が敷設されていてもよい。

[0033] 内蓋 17

内蓋 17 は、第 1 のマルチウエル 5 を覆う状態である被覆状態とすることができる。内蓋 17 は、サーマルサイクラー 11 から独立しており、自由に移動させることができるものが好ましい。内蓋 17 は、被覆状態から内蓋 17 が移動することにより、第 1 のマルチウエル 5 を覆わない状態である開放状態とすることができる。内蓋 17 は、可動蓋 15 が加熱可能状態のときであって、内蓋 17 が被覆状態のときに、可動蓋 15 と第 1 のマルチウエル 5 との間に存在することとなる。内蓋 17 が被覆状態のときに、第 1 のマルチウエル 5 を密封できるものが好ましい。内蓋 17 は、例えば、内蓋移送機構（ハンドリング部ともいう）などのアクチュエータにより位置を変化させることができる。内蓋移送機構は、例えばプロセッサと接続される。内蓋移送機構の例は、把持部を有するロボットアームである。内蓋移送機構は、プロセッサ 13 からの指令を受けて、把持部を用いて内蓋 17 を把持し、把持した状態の内蓋 17 の位置を変化させ、把持部を開放することで、内蓋 17 を所定の場所に設置できる。内蓋 17 が存在し、第 1 のマルチウエル 5 を覆う状態である被覆状態とすることができるので、PCR 処理工程において、各ウエル内の液体が蒸発する事態を防止できる。また、内蓋 17 を用いることで、各ウエル間のコンタミネーションを防止できる。

[0034] 内蓋 17 は、熱伝導性が高いものが好ましい。内蓋 17 の素材の例は、シリコン製、ゴム製、及びポリスチレン製である。内蓋 17 は、プロセッサの制御により自動的に第 1 のマルチウェル 5 を密封し、PCR 処理中にも密封状態を維持できるものであり、特に樹脂製のもの（オートシーリングポリマー蓋）が好ましい。オートシーリングポリマー蓋は、長時間のインキュベーション中に試薬の蒸発を最小限に抑えるのに役立つ。内蓋 17 は、マルチウェルプレートに貼付可能なシールであってもよい。シールは、シーラーで貼付でき、ピーラーで剥離可能なものが好ましい。

[0035] オイル供給部 19

オイル供給部 19 は、第 1 のマルチウェル 5 の各ウェルにオイルを供給するための要素である。オイル供給部 19 は、ピペットなどの管と、管を移送する移送機構と、管内の空気を調整して吸引及び吐出するための吸引及び吐出機構と、オイル源を含む。移送機構は、プロセッサからの指令を受けて、管の位置を変化させる。吸引及び吐出機構は、プロセッサ 13 からの指令を受けて、所定の位置において、オイル源からオイルを吸引し、オイルを吐出する。オイルを吸引する量やオイルを吐出する量は、プロセッサからの指令に応じて調整できることが好ましい。吸引されるオイルは、例えば、PCR 反応のためのオイルを保持できる容器（オイル源）に保持されていればよく、このような容器は、ピペットなどで採取できるよう上部が開口していることが好ましい。オイルを用いることで、PCR 工程により DNA 検体を含む液が加熱されたときに、液の蒸発を防ぐことができる。オイルは、高温で安定であり、PCR 反応に影響を与えない物質で、かつ PCR 反応液よりも比重の低い不揮発性液体が好ましい。このようなオイルは、PCR のために通常使用されるオイルであってよい。オイルの例は、ミネラルオイル（鉱油）、植物油、動物油、フッ素系オイル、シリコーン系オイル、及び炭化水素系オイルである。これらの中では、ミネラルオイルが好ましい。また、添加するオイルの量は、PCR 反応液の蒸発を抑制できる量であれば、特に限定はない。例えば、96 ウェルマイクロプレートの場合、 $5\ \mu\text{l}$ ~ $100\ \mu\text{l}$ であ

ってよい。この発明では、PCR処理時に、内蓋17が第1のマルチウェル5を覆うとともに、各ウェルにオイルが添加されるので、追加PCR・移送工程を繰り返しても、各ウェル内の液体（検体やPCR反応液）の蒸発を効果的に防止できる。

また、オイル供給部のマイクロピペットは、自動的にチップを交換できる仕様のもので好ましい。

本発明は、好ましい一態様として、加熱要素を有する上記可動蓋15と、上記オイル供給部19とを有する。PCRにおいて、検体を入れたチューブにオイルを添加することにより、反応液が蒸発し濃縮することを防ぐ手法は、広く知られている。しかし、この手法には、オイルの覆いは取扱いが不便である、オイルのキャリーオーバーを防ぐために検体の一部を残さなければならない、といった課題があった。そして、この課題を解決するために、加熱要素を有する蓋（ヒートリッド）が開発された。これにより、加熱蓋を有するサーマルサイクラーを使用する際には、オイルの使用は不要となり、上記の課題は解決された。通常、この加熱蓋を有するサーマルサイクラーの使用にあたり、DNA増幅プロセスの途中で加熱蓋を開閉することは想定されていない。

しかしながら、本発明の方法では、DNA増幅プロセスにおいて上記可動蓋15の開放状態と閉鎖状態が繰り返されることに特徴がある。本発明者らは、本明細書に記載の方法において、サーマルサイクラー11の可動蓋を繰り返し開放状態にしても、好ましくはオイル又は内蓋17を、より好ましくはオイル及び内蓋17を、上記可動蓋15と併用することにより、本発明のPCR工程を実施できることを見出した。

[0036] 反応液供給部21

反応液供給部21は、第1のマルチウェル5の各ウェルに反応液を供給するための要素である。反応液供給部21は、ピペットなどの管と、管を移送する移送機構と、管内の空気を調整して吸引及び吐出するための吸引及び吐出機構、反応液源とを含む。移送機構は、プロセッサからの指令を受けて、

管の位置を変化させる。吸引及び吐出機構は、プロセッサからの指令を受けて、所定の位置において、反応液源から反応液を吸引し、反応液を吐出する。反応液を吸引する量や反応液を吐出する量は、プロセッサ13からの指令に応じて調整できることが好ましい。吸引される反応液は、例えば、反応液を保持できる容器（反応液源）に保持されていればよく、このような容器は、ピペットなどで採取できるよう上部が開口していることが好ましい。反応液は、例えば、PCR処理により増やしたい配列のプライマー、ATGCの基質となるdNTP（デオキシヌクレオシド三リン酸）及びPCRバッファーを含むことが好ましい。反応液は、MgCl₂、及びKCl等の塩類などを含むことが好ましい。もっとも、PCR反応に使用される成分を予めDNA検体に含ませ、反応液に含ませないようにしてもよい。PCRのためのフォワードプライマーとリバースプライマーは、それぞれ5'末端の塩基配列、3'末端の塩基配列とアニーリングすることが好ましい。また、プライマーの長さは、通常PCRに使用される長さであってよく、例えば20~60塩基である。このようなプライマーを当業者は適宜設計することができる。このように設計されたプライマーを用いることにより、異なる複数のDNA検体の中に含まれる多様なDNAをすべて、PCR増幅の対象とすることができる。反応液は少なくとも耐熱性DNAポリメラーゼを含んでいることが好ましい。耐熱性DNAポリメラーゼは、TaqポリメラーゼなどPCRに使用される公知のものを好ましく使用することができる。

以上の反応液の供給にあたっては、サーマルサイクラー11により、DNA検体をプレインキュベーションし、その後、反応液を供給することが好ましい。これらの反応液の液量は、通常のPCRに使用する量であってよい。また、反応液供給部のマイクロピペットは、自動的にチップを交換できる仕様のものが好ましい。

[0037] 磁性ビーズ回収用マグネット23

選別された核酸を、磁性ビーズと回収用マグネットを用いた方法などにより精製し、適切な溶媒に溶出させた後に、本発明の方法に供する態様であつ

てよい。さらにこの一連のプロセスは、同一のウェルで継続して行う態様が好ましい。

[0038] 次の発明は、PCR装置3を用いてDNAを増幅するためのプログラムに関する。このプログラムは、プロセッサ13に、各種工程を実装するための指令を出させ、PCR装置3に、各種工程を実行させる。つまり、このプログラムは、プロセッサ13に、サイクル数入力工程を実行させる。また、このプログラムは、プロセッサ13を介してPCR装置3に、最少PCR工程、第1の移送工程、及び追加PCR・移送工程を繰り返させる工程、を実行させる。また、この発明は、上記したプログラムを記憶した非一時的情報記録媒体に関する。非一時的情報記録媒体の例は、CD-ROM、DVD、SDカード及びUSBメモリである。

[0039] PCR装置3は、例えば以下の様に動作する。

PCR装置3の第1のマルチウェル5の各ウェルに収容された各DNA検体についてPCRサイクル数が入力される。

すると、プロセッサ13が、第1のマルチウェル5を搭載したサーマルサイクラー11を駆動して、PCR装置にサイクル数入力工程で入力された最も少ないサイクル数である最少サイクル数分のPCRを行わせる。

プロセッサ13が、検体輸送部9を用いて、サイクル数入力工程で最少サイクル数とされた検体であって、最少サイクル数分のPCRを行った後の検体を、第2のマルチウェル7に移送させる。

プロセッサ13が、サイクル数入力工程で入力された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、第1のマルチウェル5を搭載したサーマルサイクラー11を駆動して、PCRをさらに行わせるとともに、検体輸送部9を用いて、サイクル入力工程で入力されたサイクル数に到達した検体を、第2のマルチウェル7に移送させる追加PCR・移送工程を繰り返させる。この動作は、以下のPCRを用いたDNAの増幅方法において詳細に説明する。

[0040] PCRを用いたDNAの増幅方法

図3は、PCRを用いたDNAの増幅方法を説明するためのフローチャートである。図3(a)は全体のフローを示し、図3(b)は最少PCR工程(S102)を示す。図2に示される通り、PCRを用いたDNAの増幅方法は、サイクル数取得工程(S101)と、最少PCR工程(S102)と、第1の移送工程(S103)と、追加PCR・移送工程を繰り返す工程(S104)とを含む。

[0041] サイクル数取得工程(S101)

サイクル数取得工程は、第1のマルチウェル5の各ウェルに収容された各DNA検体についてPCRサイクル数を取得するための工程である。システム1に、第1のマルチウェル5の各ウェルに収容された各DNA検体についてPCRサイクル数が入力される。このようにして、システム1は、第1のマルチウェル5の各ウェルに収容された各DNA検体についてのPCRサイクル数を得ることができる。この工程は、PCRサイクル数決定工程を含んでもよい。

[0042] PCRサイクル数決定工程

PCRサイクル数決定工程は、第1のマルチウェル5の各ウェルに収容された各DNA検体についてPCRサイクル数を求めるための工程である。換言すると、この工程は、第1のマルチウェル5のすべてのウェルに含まれるDNA検体の濃度が一定範囲となるように、それぞれのウェルに関して、PCRを行うサイクル数を決定するための工程である。

[0043] 例えば、PCRサイクル数決定装置が、第1のマルチウェル5の各ウェルに収容された各DNA検体についてPCRサイクル数を求める。サイクル数取得工程の例は、ウェルに収容された各DNA検体のDNA濃度を用いて、増幅後のDNA濃度が一定範囲になるようなPCRサイクル数を取得するものである。DNAの濃度の求め方は公知の方法を適宜用いればよい。例えば、定量PCR法(qPCR法)を用いることで、DNAの濃度を求めることができる。PCRサイクル数決定装置は、例えば、プロセッサの指令に基づき、マイクロピペットなどの液運搬装置を稼働して、第1のマルチウェル5

の各ウェルに收容された各DNA検体の一部を取り出す。そして、PCRサイクル数決定装置は、例えば、プロセッサの指令に基づき、定量PCR法（qPCR法）に基づく濃度測定装置に取り出したDNA検体の一部を吐出し、定量PCR法（qPCR法）に基づいてDNA濃度を求める。次に、PCRサイクル数決定装置は、プログラムの指令に基づき、プロセッサに、記憶部に記憶されたPCRサイクル数を決定するために必要な情報を読み出して、DNAの濃度を用いて、PCRサイクル数を決定する演算を行わせる。PCRサイクル数を決定するために必要な情報の例は、DNAの濃度の数値範囲と、PCRサイクル数との関係を記憶した情報である。例えば、DNAの濃度が所定の濃度範囲の場合、PCRサイクル数が所定のものとなる。このようにして求められた第1のマルチウェル5の各ウェルに收容された各DNA検体についてのPCRサイクル数は適宜記憶部に記憶される。プロセッサは、PCRサイクル数決定装置が記憶したPCRサイクル数に関する情報をシステム1又はシステム1のPCR装置3に出力してもよい。また、システム1とPCRサイクル数決定装置とはプロセッサを共有してもよい。この方法は、DNAタグを用いたランダムペプチドライブラリーを利用した、mRNAディスプレイやRAPIDディスプレイに好ましく用いることができる。定量PCR法（qPCR法）を用いることで、DNA検体の濃度が薄い場合であっても、DNAの濃度を求めることができる。サイクル数取得工程（S101）と、最少PCR工程（S102）と、第1の移送工程（S103）と、追加PCR・移送工程を繰り返す工程（S104）を行うPCR装置3と、定量PCR法を行うためのPCR装置とは同一であってもよいし、異なるPCR装置であってもよい。これらの装置が異なる場合、定量PCR法を行うためのPCR装置の制御部やプロセッサから、PCR装置3やシステム1の制御部やプロセッサにPCR情報や各検体のDNAの濃度が出力されるようにすればよい。

[0044] 各ウェルのPCRサイクル数は、増幅後の目標とするDNA濃度を定め、各ウェルに收容されたDNA検体のDNAの濃度から、PCRの増幅効率を

用いて算出することにより、決定してもよい。この場合、プロセッサの記憶部にはPCRの増幅効率や目標とするDNA濃度（又は目標とするDNA濃度の数値範囲）が記憶されている。PCRサイクル数決定装置（のプロセッサ）は、例えば、プログラムの指令に基づき、各ウェルに収容されたDNA検体のDNAの濃度、PCRの増幅効率、及びDNA濃度（又は目標とするDNA濃度の数値範囲）を読み出して、演算部にPCRサイクル数を求める演算を行わせる。このようにして、PCRサイクル数決定装置は、各ウェルのPCRサイクル数を求めることができる。もっとも、PCRサイクル数は、PCR生成物量がプラトーに達する前となるように定めることが好ましい。このため、プロセッサは、プログラムの指令に基づいて、PCR生成物量を求め、記憶部からプラトーに達するPCR生成物量を読み出してこれらと比較し、PCR生成物量がプラトーに達する量を超える場合は、PCRサイクル数を1回除算する演算を行わせてもよい。

[0045] 目標とするDNA濃度は、濃度の異なる複数のDNA検体について、同じ値であることが好ましい。また、目標とするDNA濃度は、増幅後のDNA検体の使用目的により適宜調整すればよく、例えば $3.0 \times 10^8 \sim 1.6 \times 10^{13} \text{ molecules/uL}$ の間であり、 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{12} \text{ molecules/uL}$ でもよく、 $1.0 \times 10^{11} \sim 1.6 \times 10^{11} \text{ molecules/uL}$ であってもよい。

[0046] PCRサイクル数は、検体のDNA濃度をqPCR法で測定した場合、得られたC_q (quantification cycle) 値（あるいはC_t (threshold cycle) 値ともいう）に、適切な値を加える、又は、減ずることによって得られる数値であってよい。適切な値は、目標とするDNA濃度、定量PCRを行うPCR装置と増幅工程に使用するPCR装置を用いた予備実験等の結果を踏まえ、適宜決定することができる。適切な値の例は、-2, -1, 0, 1, 2, 3, 4のいずれかであってよい。PCRサイクル数決定装置（のプロセッサ）は、例えば、プログラムの指令に基づき、C_q 値又はC_t 値を求める演算を行うとともに、記憶部から補正

値（上記した適切な値）を読み出して、 C_q 値又は C_t 値に補正值を加算する（又は減算する）演算を行い、それぞれの検体の PCR サイクル数として記憶部に記憶してもよい。

[0047] また、特に、DNA 検体の DNA の濃度が十分な場合は、分光光度計を使って吸光度を測定することで DNA の濃度を求めることができる。PCR サイクル数決定装置は、例えば、プロセッサの指令に基づき、マイクロピペットなどの液運搬装置を稼働して、第 1 のマルチウェル 5 の各ウェルに収容された各 DNA 検体の一部を取り出す。そして、PCR サイクル数決定装置は、例えば、プロセッサの指令に基づき、取り出した DNA 検体の一部を分光光度計の測定部に吐出する。PCR サイクル数決定装置は、例えば、プロセッサの指令に基づき、分光光度計を稼働し、測定部に収容された各 DNA 検体について、吸光度を測定する。測定された吸光度は、プロセッサの記憶部に記憶される。PCR サイクル数決定装置は、例えば、プログラムの指令に基づき、記憶部から DNA の濃度を求めるために必要な情報を読み出して、吸光度を用いて、プロセッサの演算部に、DNA の濃度を求める演算を行わせる。求めた DNA の濃度は、記憶部に記憶される。このようにして、PCR サイクル数決定装置は、第 1 のマルチウェル 5 の各ウェルに収容された各 DNA 検体について DNA の濃度を求めることができる。DNA の濃度を求めた後は先に説明したと同様にして、PCR サイクル数を求め、出力することができる。

[0048] PCR サイクル数入力工程

PCR サイクル数決定工程により、第 1 のマルチウェル 5 の各ウェルに収容された各 DNA 検体について PCR サイクル数が求められる。プロセッサは、求めた各 DNA 検体についての PCR サイクル数（したがって、ウェルごとの PCR サイクル数）を、記憶部に記憶してもよいし、PCR 装置のプロセッサに出力してもよい。このようにして、各 DNA 検体について PCR サイクル数が、システム 1 に入力される。

[0049] 図 4 は、第 1 のマルチウェルの各ウェルに収容された各 DNA 検体につい

でのPCRサイクル数を説明するための概念図である。ウェルごとに、PCRのサイクル数が割り振られている。図4の例では、サイクル数が5、6及び7回のもものが描画されている。各DNA検体の濃度が求められると、PCRサイクル数決定工程により各DNA検体（したがって各ウェル）のPCRサイクル数が決定される。決定されたPCRサイクル数は各検体の位置情報とともに、PCRサイクル数入力工程にてシステム1に入力される。その各DNA検体とPCRサイクル数の概念図は図4（a）に示される通りである。

[0050] 最少PCR工程（S102）

最少PCR工程は、サイクル数取得工程で得られた最も少ないサイクル数である最少サイクル数分（ n_{min} ）のPCRを行う工程である。各PCRサイクルの各工程は図4に示される通りである。

[0051] 例えば、mRNAディスプレイ法を用いたペプチドのスクリーニングのプロセスにおいて、この明細書におけるDNAの増幅方法を用いる場合、第1のマルチウェル5の各ウェルについて、ランダムペプチドライブラリーから目的の機能を持つ、核酸タグ付きのペプチドを選別した後、選別された核酸を、磁性ビーズを用いた方法などにより精製し、適切な溶媒に溶出させた後に、PCR処理を行ってもよい。また、この場合、精製工程の後に、上記したサイクル数取得工程（S101）を行ってもよい。

[0052] 最少PCR工程の前に、オイル供給部19が、第1のマルチウェル5の各ウェルにオイルを供給することが好ましい（オイル供給工程）。オイル供給部19は、プロセッサ13からの指令に基づいて、移送機構をオイル源まで移動させ、吸引及び吐出機構を用いてオイルを管内に吸引する。オイル供給部19は、プロセッサ13からの指令に基づいて、管を各ウェル上部に移動させるか、管を各ウェル内に挿入し、吸引及び吐出機構を用いてオイルを各ウェル内に吐出する。このようにして、オイル供給部19が、第1のマルチウェル5の各ウェルにオイルを供給できる。

[0053] 最少PCR工程の前に、反応液供給部21が、第1のマルチウェル5の各

ウェルに反応液を供給することが好ましい（反応液供給工程）。この反応液の供給にあたっては、サーマルサイクラー11により、DNA検体をプレインキュベーションし、その後、反応液を供給することが好ましい。反応液供給部21は、プロセッサ13からの指令に基づいて、移送機構を反応液源まで移動させ、吸引及び吐出機構を用いて反応液を管内に吸引する。反応液供給部21は、プロセッサ13からの指令に基づいて、管を各ウェル上部に移動させるか、管を各ウェル内に挿入し、吸引及び吐出機構を用いて反応液を各ウェル内に吐出する。このようにして、反応液供給部21が、第1のマルチウェル5の各ウェルに反応液を供給できる。DNA検体が反応液を含んでいる場合、反応液供給工程はなくても構わない。

[0054] オイル供給工程及び反応液供給工程は任意の工程である。オイル供給工程及び反応液供給工程が行われる場合、いずれが先に行われてもよい。もっとも、オイル供給工程及び反応液供給工程が行われる場合、オイル供給工程を先に行った方がよい。

[0055] オイル供給工程及び反応液供給工程のいずれかの後に、第1のマルチウェル5をサーマルサイクラー11の所定の位置に移送してもよい。

[0056] 内蓋被覆工程

最少PCR工程において、内蓋17を被覆状態とすることが好ましい（内蓋被覆工程）。内蓋移送機構は、プロセッサからの指令を受けて、把持部を用いて内蓋17を把持し、把持した状態の内蓋17の位置を変化させ、把持部を開放することで、内蓋17を第1のマルチウェル5の上部に設置する。内蓋17が第1のマルチウェル5を覆う状態とすることができるので、PCR処理工程において、各ウェル内の液体が蒸発する事態を防止できる。

[0057] 可動蓋被覆工程

最少PCR工程において、内蓋17を被覆状態とした後に、サーマルサイクラー11の可動蓋15を加熱可能状態とすることが好ましい（可動蓋被覆工程）。駆動部は、プロセッサ13からの指令に基づいて、可動蓋15の位置を第1のマルチウェル5の上部（したがって、内蓋17が存在する場合は

、内蓋17の上)に変化させる。このようにして、サーマルサイクラー11は、PCRを行う準備を整えることができる。加熱要素は、プロセッサ13からの指令に基づいて、温度を制御し、これにより第1のマルチウェル5の各ウェル内の検体の温度を変化させることができる。また、加熱要素の温度処理時間も、プロセッサの記憶部に記憶されたPCR情報を読み出して、加熱要素を処理することにより制御できる。

[0058] 最少PCR工程は、サイクル数取得工程で得られた最も少ないサイクル数である最少サイクル数分 (n_{min}) のPCRを行う工程である。つまりこの工程では、PCRサイクルを n_{min} 回行う。PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) サイクルは、通常行われるPCRサイクルと同様であってもよい。各PCRサイクルは、通常、以下の3ステップを含む (PCR工程)。このサイクルを繰り返すことで、試料中の目的とする核酸を増幅できる。

[0059] (1) ステップ1

熱処理によるDNA変性 (2本鎖DNAから1本鎖DNAへの解離反応)
通常試料を95℃程度に加熱する。

(2) ステップ2

鋳型1本鎖DNAへのプライマーのアニーリング
通常試料を55~65℃程度とする。

(3) ステップ3

DNAポリメラーゼを用いた前記プライマーの伸長
通常試料を72℃程度とする。

上記の各ステップの温度や処理時間は公知の方法を用いて適宜調整すればよい。また、PCR工程は、上記の3ステップによるPCR法に限定されるものではなく、2ステップPCR法など公知のPCR手法を使用してもよい。

[0060] PCRサイクルを n_{min} 回行うことにより、最少PCR工程が終了する。例えば n_{min} が5の場合、PCR工程を5サイクル行うこととなる。

[0061] サイクル数取得工程で最少サイクル数である最少サイクル数とされたDN

A検体を収容したウェルに、PCRを停止させる試薬を添加してもよい。この点は、以下も同様である。PCRを停止させる試薬は、公知のPCR阻害剤（例えばEDTA）を用いればよい。PCRを停止させる試薬を添加する工程は、反応液を添加する工程と同様にして行うことができる。

[0062] 第1の移送工程（S103）

第1の移送工程は、サイクル数取得工程で最少サイクル数とされた検体であって、最少サイクル数分のPCRを行った後のDNA検体を、第2のマルチウェル7に移送するための工程である。この際、移送対象となったDNA検体は、第1のマルチウェル5のウェルと対応する第2のマルチウェル7のウェルに検体が移送されることが好ましい。先に説明した通り、第2のマルチウェル7は、冷却下に静置されることが好ましい。

[0063] PCR工程において、可動蓋15や内蓋17が用いられている場合は、第1の移送工程において、可動蓋15を加熱不要状態とするとともに、内蓋17を開放状態とすることが好ましい。

[0064] 可動蓋の初期位置化工程

PCR工程において、可動蓋15を用いる場合、駆動部は、プロセッサからの指令に基づいて、可動蓋15の位置を第1のマルチウェル5の上部から、初期位置に変化させる。初期位置の例は、サーマルサイクラー11の内部である。このときサーマルサイクラー11の上部は開放状態となる。このようにして、サーマルサイクラーは、可動蓋15を加熱不要状態とすることができる（可動蓋の初期位置化工程）。先に説明した通り、可動蓋15は加熱要素を有するものが好ましい。

[0065] 内蓋の開放工程

内蓋17を用いてPCRを行う場合、内蓋移送機構は、プロセッサ13からの指令を受けて、把持部を用いて第1のマイクロウェル5の上部にある内蓋17を把持し、把持した状態の内蓋17の位置を内蓋初期位置まで変化させ、把持部を開放することで、内蓋17を内蓋初期位置に設置できる。このようにして、内蓋移送機構は、内蓋17を開放状態とすることができる。

[0066] 第1の移送工程において、第1の移送工程における移送対象である検体を、第1のマルチウェル5のウェルから、第1のマルチウェル5のウェルと対応する第2のマルチウェル7のウェルに移送することが好ましい。

第1の移送工程における、検体輸送部9の移送機構の一態様として、自動分注機を使用することができるが、通常、自動分注機の機能として、各ウェルに対して異なる液量を添加する、もしくは異なる液量を吸って別のマルチウェルプレートに回収していくといった作業が想定されており、単一のプレート上から配置に規則性のない一部の検体を抜き出し回収し、その後別の動作を挟んで、さらに回収を実行する、といった工程を繰り返すことは想定されていない。

ここで、プロセッサ13は、第1のマルチウェル5の複数のウェルのうち、最少サイクル数分 (n_{min}) のPCRを行うウェルの位置情報と、それに対応する第2のマルチウェル7のウェルの位置情報を記憶している。検体輸送部9の移送機構は、プロセッサからの指令を受けて、第1のマルチウェル5の複数のウェルのうち、最少サイクル数分 (n_{min}) のPCRを行ったウェルへ、管の位置を移動する。そして、検体輸送部9の吸引及び吐出機構は、プロセッサ13からの指令を受けて、最少サイクル数分 (n_{min}) のPCRを行ったウェル内の検体を吸引する。検体輸送部9の移送機構は、プロセッサ13からの指令を受けて、最少サイクル数分 (n_{min}) のPCRを行ったウェルと対応する第2のマルチウェル7のウェル上に管の位置を移動する。なお、検体輸送部9の移送機構は、ウェル内部に管を挿入するようにしてもよい。検体輸送部9の吸引及び吐出機構は、プロセッサ13からの指令を受けて、第2のマルチウェル7のウェル内に、検体を吐出する。このようにして、システム1は、第1の移送工程における移送対象である検体を、第1のマルチウェル5のウェルから、第1のマルチウェル5のウェルと対応する第2のマルチウェル7のウェルに移送することができる。なお、ウェル内にオイルが含まれている場合、検体輸送部9の吸引及び吐出機構は、プロセッサ13からの指令を受けて、オイルを吸引せずに、ウェル内のDNA検体を含む液を

吸引する程度の吸引力で、ウェル内の液を吸引するように制御することが好ましい。このようにすれば、オイル以外の成分を吸引できることとなる。この場合、検体輸送部9の移送機構は、プロセッサ13からの指令を受けて、第1のマルチウェル5の複数のウェルのうち、最少サイクル数分 (n_{min}) のPCRを行うウェルの内部の所定位置 (所定高度位置) に管の位置を移動することが好ましい。

[0067] 図4の例では、PCRサイクルを5回行った後に、PCRサイクル数が5であるウェルに含まれるDNA検体を、第2のマルチウェルの対応するウェルに移送する。図4(b)には、サイクル数5の箇所には、PCRサイクル数が5であるウェルに含まれるDNA検体が第2のマルチウェルの対応するウェルに移送された様子が示されている。

[0068] 追加PCR・移送工程を繰り返す工程 (S104)

追加PCR・移送工程を繰り返す工程は、第1の移送工程の後に、サイクル数取得工程で取得された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、PCRをさらに行うとともに、サイクル数取得工程で取得されたサイクル数に到達した検体を、第2のマルチウェル7に移送する工程を繰り返す工程である。PCRサイクルの各ステップの温度や処理時間は、公知の方法に基づいて適宜調整できるが、最少PCR工程と同じ条件が好ましい。

[0069] 例えば、($n_{min} + 1$) 回目のPCRを行う場合、システム1は、第1の移送工程の後、そのままPCR工程を一度行ってもよい。また、システム1は、内蓋被覆工程及び可動蓋被覆工程を行って、その後に、PCR工程を一度行ってもよい。

[0070] 第1のマルチウェル5の各ウェルに収容された各DNA検体についてのPCRサイクル数として、($n_{min} + 1$) のものがない場合、プロセッサ13は、システム1に、($n_{min} + 2$) 回目のPCRを行わせる。この場合、プロセッサ13は、記憶部から、PCR情報を読み出して、PCRサイクル数として、($n_{min} + 1$) のものがあるか判断する演算を行い、($n_{min} + 1$) のものがない場合は、システム1に、($n_{min} + 2$) 回目のPCRを行わせるため

の指令を出力する。

[0071] 第1のマルチウェル5の各ウェルに收容された各DNA検体についてのPCRサイクル数として、 $(n_{min} + 1)$ のものがある場合、第2の移送工程を行う。この際に、システム1は、可動蓋15の初期位置化工程、及び内蓋17の開放工程を行った後に、第2の移送工程を行ってもよい。プロセッサ13は、第1のマルチウェル5の複数のウェルのうち、 $(n_{min} + 1)$ サイクルのPCRを行うウェルの位置情報と、それに対応する第2のマルチウェル7のウェルの位置情報を記憶している。このため、プロセッサ13は、システム1を用いて、第1のマルチウェル5の複数のウェルのうち、 $(n_{min} + 1)$ サイクルのPCRを行ったウェルに含まれるDNA検体をと、それに対応する第2のマルチウェル7のウェルに移送することができる。この際の処理は、第1の移送工程と同様である。

[0072] サイクル数取得工程で取得された最も多いサイクル数である最多サイクル数を (n_{max}) とする。追加PCR・移送工程を繰り返す工程は、 $(n_{min} + 1)$ 回目のPCR工程の後、 (n_{max}) 回目のPCR工程まで上記の工程を繰り返す。このようにして、第2のマルチウェル7の各ウェルには、DNAの濃度が所定範囲とされたDNA検体が收容されることとなる。

[0073] 図4の例では、5サイクルPCRを行い、PCRサイクル数が5であるウェルに含まれるDNA検体を、第2のマルチウェルの対応するウェルに移送した後、内蓋被覆工程及び可動蓋被覆工程を行い、PCRサイクルを行う。すると、PCRサイクル数が一つ増え、6となる。図4の例では、PCRサイクル数が6であるウェルが存在する。このため、6サイクル目のPCRを行った後に、可動蓋の初期位置化工程及び内蓋の開放工程を行う。そして、PCRサイクル数が6であるウェルについて、第2の移送工程を行う。次に、図4の例では、内蓋被覆工程及び可動蓋被覆工程を行い、PCRサイクルを行う。すると、PCRサイクル数が一つ増え、7となる。図4の例では、PCRサイクル数が7であるウェルが存在する。このため、7サイクル目のPCRを行った後に、可動蓋15の初期位置化工程及び内蓋17の開放工程

を行う。そして、PCRサイクル数が7であるウェルについて、第3の移送工程を行う。以上の結果、第1のマルチウェル5の各ウェルに対応する、第2のマルチウェル7の各ウェルに、DNAの濃度が所定範囲とされたDNA検体が収容される。

本発明の方法は、上記の追加PCR・移送工程を繰り返す工程を含むため、サーマルサイクラーは、開放状態と閉鎖状態を繰り返すこととなる。

[0074] 上記の検体輸送部、オイル供給部、反応液供給部は、すべて異なる装置であってもよく、いずれか2つ、あるいは、すべてが同じ装置であってもよい。これらはいずれも、ピペット（マイクロピペット）などの管と、管を移送する移送機構と、管内の空気を調整して吸引及び吐出するための吸引及び吐出機構とを含むため、ピペットのチップを交換することにより、同じ装置で、検体輸送工程、オイル供給工程、反応液供給工程を実施することができる。それぞれの工程の切り替えは、プロセッサの指示に基づき、適切に行うことができる。

[0075] システム1は、異なる複数のDNA検体を希釈することなく、各検体のDNA濃度を一定の範囲内に増幅することができるため、mRNAディスプレイやRAPIDディスプレイなどの*in vitro*ディスプレイにおいて回収されるDNA検体の増幅に、好適に使用できる。これは、DNAの多様性を維持したまま増幅できるため、その後の選別工程において、より多くの候補ペプチドを選別に供することができるからである。

実施例 1

[0076] コンピュータ、交換用チップ、自動分注機、マイクロピペット（検体輸送部）、回収用マルチウェルプレート、マグネットプレート、サーマルサイクラー（温度調整部）、PCR用マルチウェルプレート、内蓋置き場、ロボットアーム、内蓋、サーマルサイクラーの可動蓋、オイル源及び反応液源を有する。

[0077] 本発明のDNA増幅システムの構成例は、以下のとおりである。

第1、第2のマルチウェルとして、96ウェルのマルチウェルプレート（

Thermo fisher scientific社)を使用する。

検体輸送部として、自動分注機とロボットアームを有するTECAN社Fluent (登録商標) Automation WORKSTATIONを用いる。このWORKSTATIONに組み込まれる自動分注機は、8つの独立した分注チャンネルを持ち、分注操作とピペット搬送操作が可能である。

さらに、このWORKSTATIONを、オイル供給部および反応液供給部としても使用する。上記チップを適宜交換することにより、それぞれの機能を実施することができる。このWORKSTATIONは、96の固定された分注チャンネルも持つが、この分注チャンネルはすべてのウェルに同時に分注するような、反応液供給に好適に使用できる。なお、TECAN社のWORKSTATIONの代わりに、同社のFreedom Evoシリーズ、Hamilton社製のVantageシリーズ、Beckman Coulter社製のBiomekシリーズのWORKSTATIONなどを使用することもできる。

サーマルサイクラーとして、Inheco社のオンデッキサーマルサイクラー(ODTC)を用いる。このサーマルサイクラーは、可動式の加熱蓋を有しており、蓋の加熱や開閉を自動で制御できる。なお、Jena社のT Robot、Thermo fisher scientific社のATCなども使用することができる。

内蓋として、Auto-Sealing PCR Plate Lid (AZENTA LIFE SCIENCES製)を使用する。なお、アーチ型Auto-Sealing Lid #MSL2022 (BIO-RAD製)などを使用することもできる。

オイル源および反応液源として、100ml Trough (TECAN製)を使用する。

以上の各要素を、図1Aのように配置する。

上記のWORKSTATIONとサーマルサイクラーとをコンピュータに

接続し、コンピュータに格納したソフトウェア（Fluent Control™）により、自動分注機とロボットアーム、サーマルサイクラーを連動して制御できるように構成する。上記コンピュータには、本発明の方法を実施できるプログラムを格納し、上記各要素が、これに従い稼働できるようにする。

また、定量PCRのためのサーマルサイクラーとして、Light Cycler（登録商標）96（Roche Diagnostics製）を使用する。

[0078] 上記のとおり構成されたDNA増幅システムを使用して、以下のとおり、DNAの増幅を行うことができる。

DNAのセンス鎖の、5'末端にT7プロモーター配列を、3'末端にピューロマイシンと選別対象のペプチドとをつなぐリンカーのアニーリングサイトをコードする核酸を、その間にランダム化された30～45個のヌクレオチドを有するDNA配列を有するランダムDNAライブラリーを作製する。これを用いて、TRAPディスプレイ法（WO2014/119600）に従い、各ペプチドがDNA/RNAのヘテロ二重鎖核酸タグを有するランダムペプチドライブラリーを作製する。作製した各ランダムペプチドライブラリーは、所望の標的タンパク質を固相化した磁性ビーズが各ウェルに入ったマルチウェルプレートに流し込み、磁性ビーズに結合した核酸タグ付きのペプチドをマグネットで回収する。

[0079] 標的タンパク質に結合したペプチドの配列をコードする核酸は、PCR反応液を50μl添加した後、94℃で処理して新しいマルチウェルプレート（第一のマルチウェル）に回収し、本特許に記載のPCR工程に供する各DNA検体とする。この時使用するPCR反応液は、終濃度で0.25μMのプライマー、0.25mMのATGCの基質となるdNTP（デオキシヌクレオシド三リン酸）、1×PCRバッファー、2mMのMgCl₂及びKCl等の塩類などを含む。なお、プライマーは、フォワードプライマーは、DNAの5'末端のT7プロモーター配列にアニーリングする52塩基長の核酸

を、リバープライマーは、DNAの3'末端のピューロマイシンとペプチドとをつなぐリンカーをコードする核酸にアニーリングする44塩基長の核酸を、それぞれ使用する。

マルチウェルプレートの各ウェルに収容された各DNA検体から1 μ lを取り出し、定量PCR法（qPCR法）を用いて、各DNA検体の濃度を分析し、得られたCt値に2を加算した値を、各DNA検体のPCRサイクル数とする。なお、上記加算値は、定量PCRに用いるPCR装置と増幅に用いるPCR装置とを用いた予備検討で得られる値である。以下、今回の検体から得られたPCRサイクル数は、5、6、7であるとする。

PCRサイクル数を上記システムのコンピュータに入力し、本発明のプログラムを実行する。

[0080] 上記の自動分注機により、オイル源に貯めたミネラルオイルを各ウェルに、反応液の蒸発が抑制できるよう適量供給する。次に、各DNA検体の入ったマルチウェルプレート（第1のマルチウェル）をサーマルサイクラー上にロボットアームを用いて移送し、内蓋置き場に置かれた内蓋を、上記ロボットアームにより移送し、サーマルサイクラーに載置されたマルチウェルプレート（第1のマルチウェル）の上に置いて、被覆状態とする。次に可動蓋を、第1のマルチウェルを覆って加熱することができる加熱可能状態とした後、94 $^{\circ}$ Cでプレインキュベーションする。プレインキュベーションの後、反応液源に貯めたTaqポリメラーゼ（本発明における反応液）を、終濃度を25Units/mlとなるように、上記の自動分注機により、各ウェルに供給する。

各DNA検体のPCRサイクル数の中で最も少ないサイクル数である5サイクルのPCRを行う。PCR条件は、適宜選択できるが、例えば、94 $^{\circ}$ C40秒、61 $^{\circ}$ C40秒、72 $^{\circ}$ C40秒とする。

5サイクルPCR終了後、まず可動蓋の位置を第1のマルチウェルの上部から、初期位置に移動させ、加熱不要状態とする。次に内蓋を、上記ロボットアームを用いて移送し、内蓋置き場（内蓋初期位置）に載置する。次に、

PCRサイクル数が5回のDNA検体（図4（b）のサイクル数5）を、自動分注機で回収し、サーキュレーターを用いた冷却機構を有する回収検体搭載部に搭載されたマルチウェルプレート（第2のマルチウェル）を、第1のマルチウェルのウェルと対応するウェルに移送する。

5サイクルのDNA検体の移送後、内蓋置き場に置かれた内蓋を、上記ロボットアームにより移送し、サーマルサイクラーに載置されたマルチウェルプレート（第1のマルチウェル）の上に置いて、被覆状態とする。次に可動蓋を、第1のマルチウェルを覆って加熱することができる加熱可能状態とする。そして6サイクル目のPCRを行う。PCR条件は、適宜選択できるが、例えば、5サイクルの条件と同じでよい。

[0081] 6サイクル目のPCR終了後、可動蓋の位置を第1のマルチウェルの上部から、初期位置に移動させ、加熱不要状態とする。次に内蓋を、上記ロボットアームを用いて吸引、移送し、内蓋置き場に載置する。次に、PCRサイクル数が6回のDNA検体を、自動分注機で回収し、マルチウェルプレート（第2のマルチウェル）の、第1のマルチウェルのウェルと対応するウェルに移送する。

6サイクルのDNA検体の移送後、内蓋置き場に置かれた内蓋を、上記ロボットアームにより移送し、サーマルサイクラーに載置されたマルチウェルプレート（第1のマルチウェル）の上に置いて、被覆状態とする。次に可動蓋を、第1のマルチウェルを覆って加熱することができる加熱可能状態とする。そして7サイクル目のPCRを行う。PCR条件は、適宜選択できるが、例えば、5サイクルの条件と同じでよい。

7サイクル目のPCR終了後、可動蓋の位置を第1のマルチウェルの上部から、初期位置に移動させ、加熱不要状態とする。次に内蓋を、上記ロボットアームを用いて吸引、移送し、内蓋置き場に載置する。次に、PCRサイクル数が7回のDNA検体を、自動分注機で回収し、マルチウェルプレート（第2のマルチウェル）の、第1のマルチウェルのウェルと対応するウェルに移送する。

以上の工程により、第1のマルチウェルから、第2のマルチウェルの対応するウェルにすべてのDNA検体が移送され、増幅工程が終了する。

この増幅工程により、対象のDNA検体について、DNAの多様性を喪失することなく、PCR増幅後の各検体のDNA濃度を一定の範囲内に収めることができる。

[0082] 図5は、実施例におけるPCR装置の動作を説明するための図である。

図5Aは、内蓋を持ち上げた様子を示す概念図である。図5Aに示されるように、サーマルサイクラーの可動蓋がスライドする。そののち、ロボットアームが内蓋を持ち上げ、内蓋を内蓋置き場に運ぶ。

図5Bは、PCRサイクル後に対象となるDNA検体を回収の様子を示す概念図である。図5Bに示されるように、自動分注機が、サーマルサイクラーに載置されたマルチウェルプレートのウェル上にある、対象の検体（目的のサイクル数に到達した検体）を回収する。図5Bの例では一度に複数の検体を回収している。

図5Cは、回収されたDNA検体が第2の第2のマルチウェルプレートの対応するウェルに移送される様子を示す概念図である。図5Cに示されるように、第2のマルチウェルプレートの対応するウェルに、回収した検体を吐出する。

図5Dは、サーマルサイクラー上に内蓋が移送される様子を示す概念図である。図5Dに示されるように、対象の検体を回収した後、ロボットアームが内蓋置き場からサーマルサイクラー上のマルチウェルプレートへ内蓋を移動させる。

図5Eは、サーマルサイクラー上に内蓋が移送された様子を示す概念図である。図5Eに示されるように、サーマルサイクラーに載置されたマルチウェルプレートの上に内蓋を置く。

図5Fは、可動蓋が加熱可能状態とされた様子を示す概念図である。図5Fに示されるように、サーマルサイクラーの加熱機能を有する可動蓋がスライドし、完全に閉まった後に次のPCRサイクルが開始される。

実施例 2

[0083] 本実施例では、濃度の異なる複数のDNA検体を作製し、これらのDNA検体をモデル検体として、本発明の増幅方法により、各検体のDNAの濃度を一定の範囲とすることができるか、検討を行った。

[0084] DNA増幅システムの構成

DNA検体を供するDNA増幅システムの構成を、以下のとおりとした。第1、第2のマルチウェルとして、96ウェルのマルチウェルプレート（Thermo fisher scientific社）を使用した。検体輸送部として、自動分注機とロボットアームを有するTECAN社Fluent（登録商標）Automation WORKSTATIONを用いた。

さらに、このWORKSTATIONを、オイル供給部および反応液供給部としても使用した。オイル供給用として8チャンネルの自動分注機を、反応液供給用として96チャンネルの自動分注機をそれぞれ使用した。

サーマルサイクラーとして、Inheco社のオンデッキサーマルサイクラー（ODTC）を用いた。

内蓋として、Auto-Sealing PCR Plate Lid（AZENTA LIFE SCIENCES製）を使用した。

オイル源および反応液源として、100ml Trough（TECAN製）を使用した。

[0085] 以上の各要素を、図1Aのように配置した。

上記のWORKSTATIONとサーマルサイクラーとをコンピュータに接続し、コンピュータに格納したソフトウェア（Fluent Control™）により、自動分注機とロボットアーム、サーマルサイクラーを連動して制御できるように構成した。上記コンピュータには、本発明の方法を実施できるプログラムを格納し、上記各要素が、これに従い稼働できるようにした。

また、定量PCRのためのサーマルサイクラーとして、LightCyc

ier (登録商標) 96 (Roche Diagnostics製) を使用した。

[0086] DNA検体の増幅

上記のとおり構成されたDNA増幅システムを使用して、以下のとおり、DNA検体の増幅を行った。

配列番号1に記載のDNAをPCRで増幅するテンプレートとして使用した。約 3×10^{10} molecular/ulの濃度のテンプレートDNA (配列番号1) をPCR反応液で一度6倍希釈した後、2倍公比で8段階に希釈した8種類の異なる濃度のサンプルを用意した。これらを96ウェルのマルチウェルプレート (第1のマルチウェル) にランダムに配置し、PCR工程に供する各DNA検体とした。以下の定量PCR及び増幅のためのPCRにおいて使用したPCR反応液は、終濃度で0.25 μ Mのプライマー、0.25 mMのATGCの基質となるdNTP (デオキシヌクレオシド三リン酸)、1 \times PCRバッファー、2 mMのMgCl₂を含む。またプライマーについては、フォワードプライマーとして、DNAの5'末端にアニーリングする塩基長の核酸 (配列番号2) を、リバープライマーとして、DNAの3'末端にアニーリングする塩基長の核酸 (配列番号3) を、それぞれ使用した。

[0087] テンプレートDNA (5' - 3') GGCGTAATACGACTCAC
TATAGGTGGGGTTCCCGAGCGGCCAAAGGGAGCA
GACTGTAAATCTGCCGTCACAGACTTCGAAGGTT
CGAATCCTTCCCCCACCACCA (配列番号1)

フォワードプライマー (5' - 3') CCGCGTAATACGACTC
ACTATAG (配列番号2)

リバープライマー (5' - 3') TG (M) GTGGTGGGGGAA
GGATTCG (配列番号3)

(M) は直前の核酸の2' メトキシ化修飾を表す。

[0088] マルチウェルプレート (第1のマルチウェル) の各ウェルに収容された各

DNA検体から1 μ lを取り出し、定量PCR法（qPCR法）を用いて、各DNA検体の濃度を分析し、得られたCt値を四捨五入した後に2を加算した値を、各DNA検体のPCRサイクル数とした。その結果、PCRサイクル数の最小が6、最大は20であった。各DNA検体のPCRサイクル数を表1に示す。なお、上記加算値は、定量PCRに用いるPCR装置と増幅に用いるPCR装置とを用いた予備検討で決定した値である。

[0089] [表1]

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | 9 | 14 | 12 | 12 | 19 | 10 | 10 | 16 | 15 | 13 | 11 | 7 |
| B | 13 | 19 | 16 | 16 | 8 | 10 | 14 | 18 | 8 | 14 | 11 | 9 |
| C | 9 | 7 | 6 | 18 | 16 | 17 | 16 | 14 | 6 | 15 | 12 | 18 |
| D | 14 | 8 | 17 | 9 | 18 | 6 | 6 | 13 | 11 | 8 | 17 | 16 |
| E | 17 | 17 | 11 | 11 | 18 | 6 | 11 | 18 | 13 | 9 | 11 | 16 |
| F | 6 | 11 | 8 | 8 | 13 | 6 | 15 | 14 | 6 | 8 | 17 | 14 |
| G | 14 | 11 | 8 | 13 | 6 | 11 | 19 | 14 | 11 | 10 | 15 | 8 |
| H | 14 | 19 | 11 | 18 | 7 | 16 | 16 | 19 | 19 | 20 | 20 | 17 |

[0090] このようにして得られたPCRサイクル数と、これに対応する検体が収容されたウェルの位置情報とを、上記システムのコンピュータに入力し、本発明のプログラムを実行した。

上記の自動分注機により、オイル源に貯めたミネラルオイルを各ウェルに、反応液の蒸発が抑制できるよう適量供給した。次に、各DNA検体の入ったマルチウェルプレート（第1のマルチウェル）をサーマルサイクラー上にロボットアームを用いて移送し、内蓋置き場に置かれた内蓋を、上記ロボットアームにより移送し、サーマルサイクラーに載置されたマルチウェルプレート（第1のマルチウェル）の上に置いて、被覆状態とした。次に可動蓋を、第1のマルチウェルを覆って加熱することができる加熱可能状態とした後、94℃でプレインキュベーションした。プレインキュベーションの後、反応液源に貯めたTaqポリメラーゼ（本発明における反応液）を、終濃度を25 Units/mlとなるように、上記の自動分注機により、各ウェルに供給した。各DNA検体のPCRサイクル数の中で最も少ないサイクル数である6サイクルのPCRを行った。PCR条件は、94℃40秒、61℃40秒、72℃40秒とした。

6サイクルのPCR終了後、まず可動蓋の位置を第1のマルチウエルの上
部から、初期位置に移動させ、加熱不要状態とした。次に内蓋を、上記ロボ
ットアームを用いて移送し、内蓋置き場（内蓋初期位置）に載置した。次に
、PCRサイクル数が6回のDNA検体を、自動分注機で回収し、サーキュ
レーターを用いた冷却機構を有する回収検体搭載部に搭載されたマルチウ
エルプレート（第2のマルチウエル）を、第1のマルチウエルのウェルと対応
するウェルに移送した。

[0091] 6サイクルのDNA検体の移送後、内蓋置き場に置かれた内蓋を、上記ロ
ボットアームにより移送し、サーマルサイクラーに載置されたマルチウエル
プレート（第1のマルチウエル）の上に置いて、被覆状態とした。次に可動
蓋を、第1のマルチウエルを覆って加熱することができる加熱可能状態とし
た。そして7サイクル目のPCRを行った。PCR条件は、6サイクルと同じ
条件とした。

7サイクル目以降は6サイクル目と同様の手順で、各サイクルのPCRを
行ったサンプルをマルチウエルプレート（第1のマルチウエル）からマルチ
ウエルプレート（第2のマルチウエル）へ移送していき、これを最大サイク
ル数である20サイクル目まで繰り返した。

[0092] 以上の工程により、第1のマルチウエルから、第2のマルチウエルの対応
するウェルにすべてのDNA検体が移送され、増幅工程が終了した。上記の
増幅工程が終了したDNA検体について、各検体のDNAの増幅をマイクロ
流路電気泳動装置（MultiNA、島津）によって確認した（図6）。図
6は、実施例2におけるマイクロ流路電気泳動画像を示す図面に代わる写真
である。図6のA～H、1～12は、表1のA～H、1～12に、それぞれ
対応している。PCRの増幅対象となるDNAは約106bpであるが、画
像上で約106bpの位置に当該DNAのバンドが確認された。そして、す
べての検体のいずれも、その濃度が $8.86 \times 10^9 \sim 5.27 \times 10^{10}$ molecules/
uLの範囲に収まっていた。

以上から、本発明の増幅工程により、濃度の異なる複数のDNA検体につ

いて、PCR増幅後の各検体のDNA濃度が一定の範囲内に収まることが確認された。

産業上の利用可能性

[0093] この発明は、医薬・バイオ関連産業において利用されうる。

符号の説明

- [0094] 1 DNAの増幅システム
3 PCR装置
5 第1のマルチウエル
7 第2のマルチウエル
9 検体輸送部
11 サーマルサイクラー
13 プロセッサ
15 可動蓋
17 内蓋
19 オイル供給部
21 反応液供給部
23 磁性ビーズ回収用マグネット
31 入力部
33 出力部
35 制御部
37 演算部
39 記憶部
41 バス

請求の範囲

- [請求項1] 第1のマルチウェルの各ウェルに收容された各DNA検体についてPCRサイクル数を取得するサイクル数取得工程と、
前記サイクル数取得工程で得られた最も少ないサイクル数である最少サイクル数分のPCRを行う最少PCR工程と、
前記サイクル数取得工程で最少サイクル数である最少サイクル数とされた検体であって、前記最少サイクル数分のPCRを行った後の検体を、第2のマルチウェルに移送する第1の移送工程と、
第1の移送工程の後に、前記サイクル数取得工程で取得された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、PCRをさらに行うとともに、前記サイクル数取得工程で取得されたサイクル数に到達した検体を、第2のマルチウェルに移送する追加PCR・移送工程を繰り返す工程を含む、
PCRを用いたDNAの増幅方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の方法であって、
前記サイクル数取得工程は、前記ウェルに收容された前記各DNA検体のDNA濃度を用いて、増幅後のDNA濃度が一定範囲になるようなPCRサイクル数を取得する工程である、
方法。
- [請求項3] 請求項1に記載の方法であって、
前記各ウェルにおける前記各DNA検体は、複数種類のDNAを含み、当該複数種類のDNAは5'末端及び3'末端がそれぞれ共通した塩基配列を有する、方法。
- [請求項4] 請求項1に記載の方法であって、可動蓋と内蓋とを用い、
前記可動蓋は、第1のマルチウェルを覆って加熱することができる状態である加熱可能状態とすることができるとともに、前記加熱可能状態から移動することにより第1のマルチウェルを覆わない状態である加熱不要状態とすることができ、

前記内蓋は、第1のマルチウエルを覆う状態である被覆状態とすることができるとともに、前記被覆状態から移動することにより第1のマルチウエルを覆わない状態である開放状態とすることができ、前記可動蓋が前記加熱可能状態のときであって、前記内蓋が前記被覆状態のときに、前記可動蓋と第1のマルチウエルとの間に存在することとなり、

前記最少PCR工程において、前記内蓋を前記被覆状態とするとともに、前記可動蓋を前記加熱可能状態とし、

第1の移送工程において、前記可動蓋を前記加熱不要状態とするとともに、前記内蓋を前記開放状態とし、

前記追加PCR・移送工程においてPCRを行う際に、前記内蓋を前記被覆状態とするとともに、前記可動蓋を前記加熱可能状態とし、

前記追加PCR・移送工程において前記検体を第1のマルチウエルから第2のマルチウエルに移送する際に、前記可動蓋を前記加熱不要状態とするとともに、前記内蓋を前記開放状態とする、

方法。

[請求項5]

請求項1に記載の方法であって、

第2のマルチウエルの各ウエルは、第1のマルチウエルの各ウエルと対応したウエルであり、

第1の移送工程において、

第1の移送工程における移送対象である前記検体を、第1のマルチウエルのウエルから、当該第1のマルチウエルのウエルと対応する第2のマルチウエルのウエルに移送し、

前記追加PCR・移送工程において前記検体を第1のマルチウエルから第2のマルチウエルに移送する際に、移送対象である検体を、第1のマルチウエルのウエルから、当該第1のマルチウエルのウエルと対応する第2のマルチウエルのウエルに移送する、

方法。

[請求項6]

請求項1に記載の方法であって、

前記最少PCR工程の前に、オイル供給部が、第1のマルチウエルの各ウェルにオイルを供給する工程と、

前記最少PCR工程の前に、反応液供給部が、第1のマルチウエルの各ウェルに反応液を供給する工程と、をさらに含む、方法。

[請求項7]

プロセッサを含むPCR装置を用いてDNAを増幅するためのプログラムであって、

前記プログラムは、前記プロセッサに、

前記PCR装置の第1のマルチウエルの各ウェルに收容された各DNA検体についてPCRサイクル数が入力されるサイクル数入力工程と、

前記PCR装置に、前記サイクル数入力工程で入力された最も少ないサイクル数である最少サイクル数分のPCRを行わせる最少PCR工程と、

前記PCR装置に、前記サイクル数入力工程で最少サイクル数とされた検体であって、前記最少サイクル数分のPCRを行った後の検体を、第2のマルチウエルに移送させる第1の移送工程と、

前記PCR装置に、第1の移送工程の後に、前記サイクル数入力工程で入力された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、PCRをさらに行わせるとともに、前記サイクル数入力工程で決定されたサイクル数に到達した検体を、第2のマルチウエルに移送させる追加PCR・移送工程を繰り返させる工程と、を実行させる、

プログラム。

[請求項8]

請求項7に記載のプログラムを記憶した非一時的情報記録媒体。

[請求項9]

第1のマルチウエル、第2のマルチウエル、検体輸送部、サーマルサイクラー、及びプロセッサを含む、PCR装置を用いたDNAの増幅システムであって、

前記プロセッサに、前記PCR装置の第1のマルチウェルの各ウェルに收容された各DNA検体についてPCRサイクル数が入力されるサイクル数入力工程と、

前記プロセッサが、第1のマルチウェルを搭載した前記サーマルサイクラーを駆動して、前記PCR装置に前記サイクル数入力工程で入力された最も少ないサイクル数である最少サイクル数分のPCRを行わせる最少PCR工程と、

前記プロセッサが、前記検体輸送部を用いて、前記サイクル数入力工程で最少サイクル数とされた検体であって、前記最少サイクル数分のPCRを行った後の検体を、第2のマルチウェルに移送させる第1の移送工程と、

第1の移送工程の後に、前記プロセッサが、前記サイクル数入力工程で入力された最も多いサイクル数である最多サイクル数分まで、第1のマルチウェルを搭載した前記サーマルサイクラーを駆動して、PCRをさらに行わせるとともに、前記検体輸送部を用いて、前記サイクル数入力工程で入力されたサイクル数に到達した検体を、第2のマルチウェルに移送させる追加PCR・移送工程を繰り返させる、システム。

[請求項10]

請求項9に記載のシステムであって、可動蓋と内蓋とをさらに有し、

前記可動蓋は、第1のマルチウェルを覆って加熱することができる状態である加熱可能状態とすることができるとともに、前記加熱可能状態から移動することにより第1のマルチウェルを覆わない状態である加熱不要状態とすることができ、

前記内蓋は、第1のマルチウェルを覆う状態である被覆状態とすることができるとともに、前記被覆状態から移動することにより第1のマルチウェルを覆わない状態である開放状態とすることができ、前記可動蓋が前記加熱可能状態のときであって、前記内蓋が前記被覆状態

のときに、前記可動蓋と第1のマルチウエルとの間に存在することとなり、

前記最少PCR工程において、前記プロセッサが、前記内蓋を前記被覆状態とするとともに、前記可動蓋を前記加熱可能状態とし、

第1の移送工程において、前記プロセッサが、前記可動蓋を前記加熱不要状態とするとともに、前記内蓋を前記開放状態とし、

前記追加PCR・移送工程においてPCRを行う際に、前記プロセッサが、前記内蓋を前記被覆状態とするとともに、前記可動蓋を前記加熱可能状態とし、

前記追加PCR・移送工程において前記検体を第1のマルチウエルから第2のマルチウエルに移送する際に、前記プロセッサが、前記可動蓋を前記加熱不要状態とするとともに、前記内蓋を前記開放状態とする、

システム。

[請求項11]

請求項9に記載のシステムであって、

第2のマルチウエルの各ウエルは、第1のマルチウエルの各ウエルと対応したウエルであり、

第1の移送工程において、前記プロセッサが、第1の移送工程における移送対象である前記検体を、第1のマルチウエルのウエルから、当該第1のマルチウエルのウエルと対応する第2のマルチウエルのウエルに移送させ、

前記追加PCR・移送工程において前記検体を第1のマルチウエルから第2のマルチウエルに移送する際に、前記プロセッサが、移送対象である検体を、第1のマルチウエルのウエルから、当該第1のマルチウエルのウエルと対応する第2のマルチウエルのウエルに移送させる、

システム。

[請求項12]

請求項9に記載のシステムであって、

第1のマルチウエルの各ウエルにオイルを供給するオイル供給部、及び

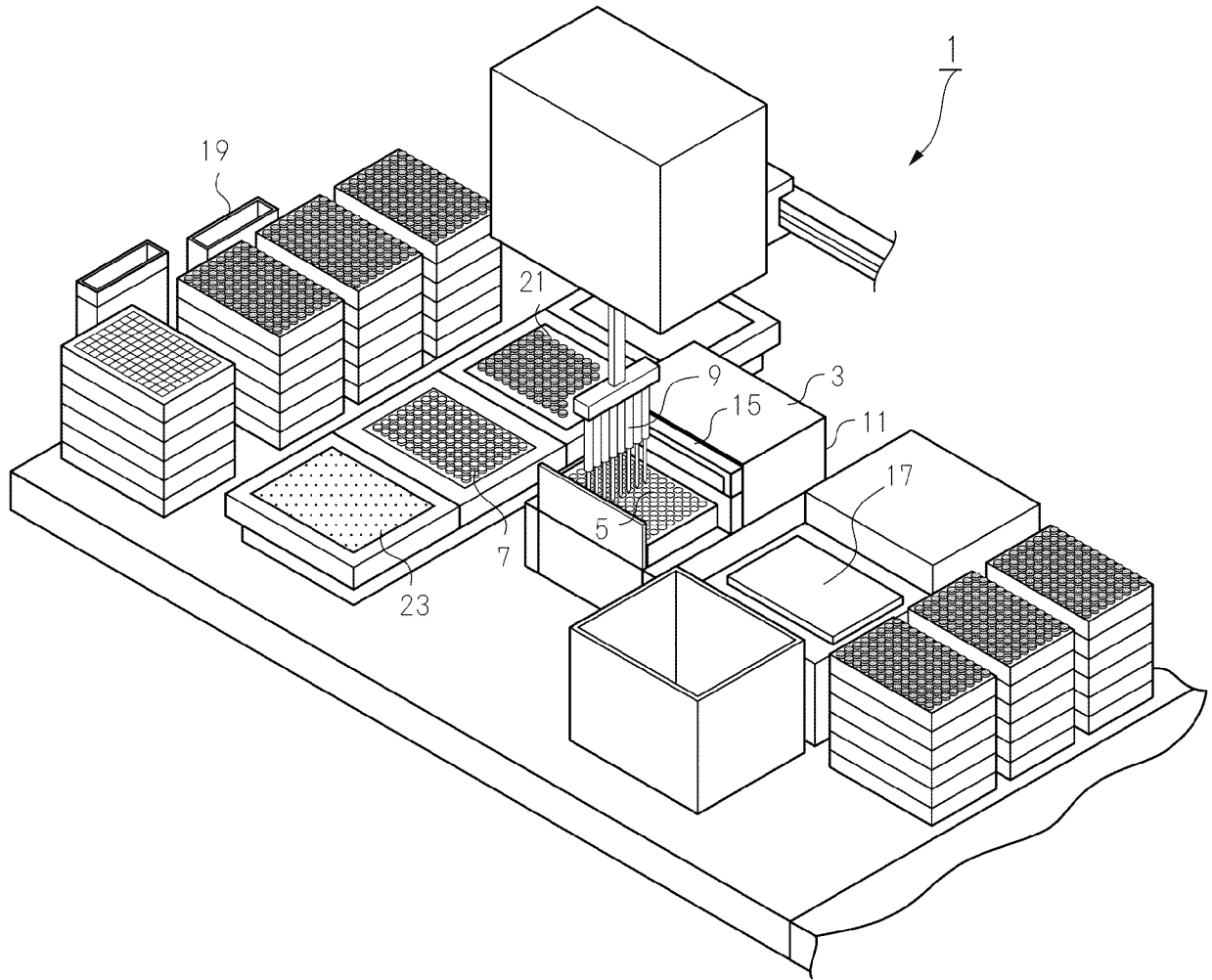
第1のマルチウエルの各ウエルに反応液を供給する反応液供給部をさらに有し、

前記最少PCR工程の前に、前記プロセッサが、前記オイル供給部に、第1のマルチウエルの各ウエルにオイルを供給させ、

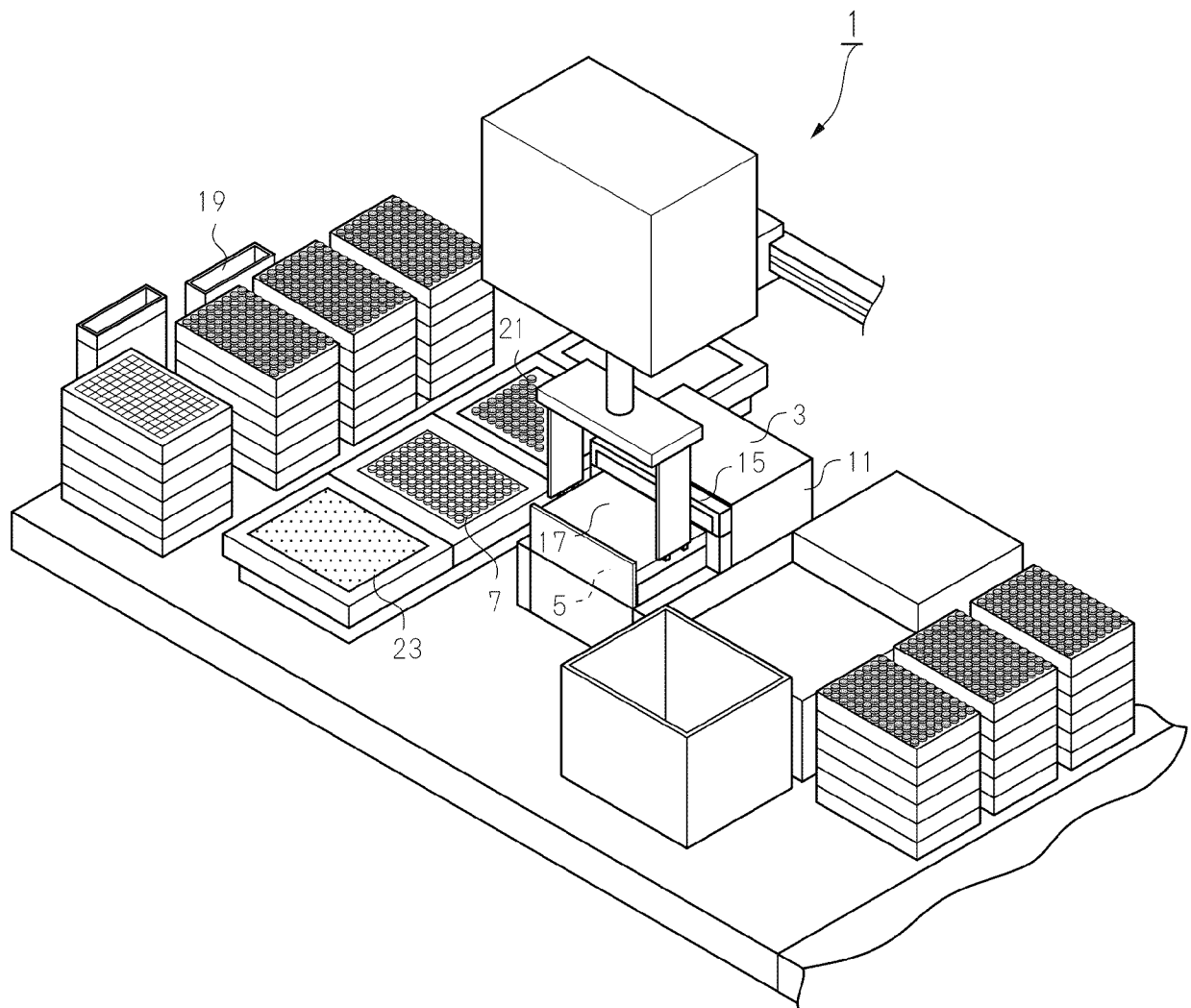
前記最少PCR工程の前に、前記プロセッサが、前記反応液供給部に、第1のマルチウエルの各ウエルに反応液を供給させる、

システム。

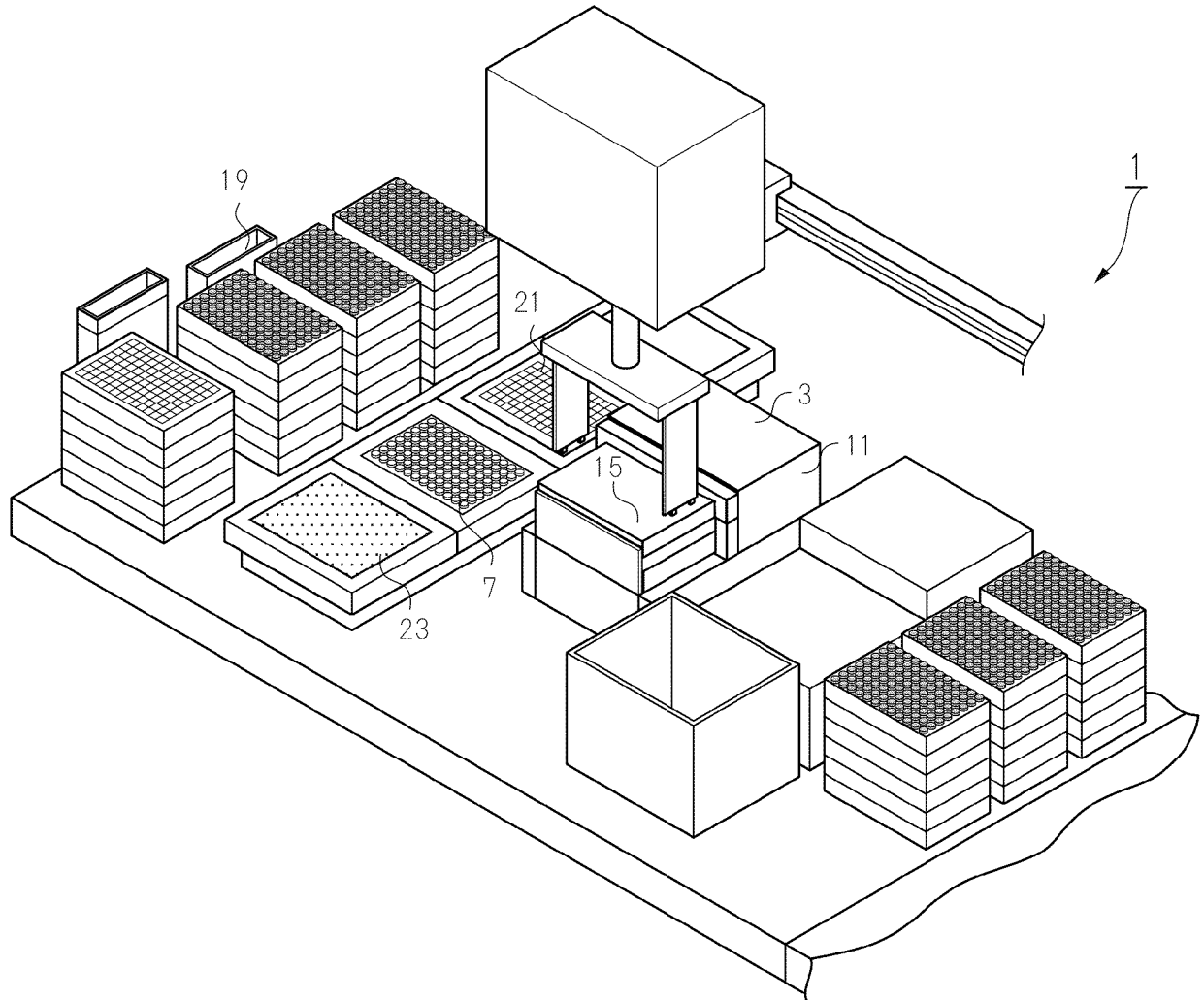
[図1A]



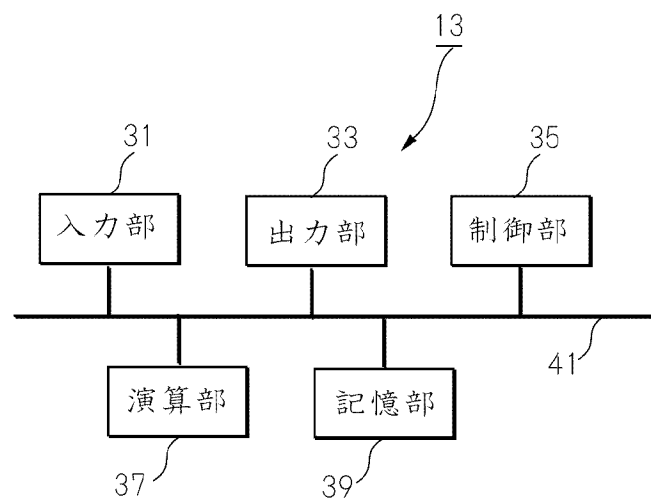
[図1B]



[図1C]

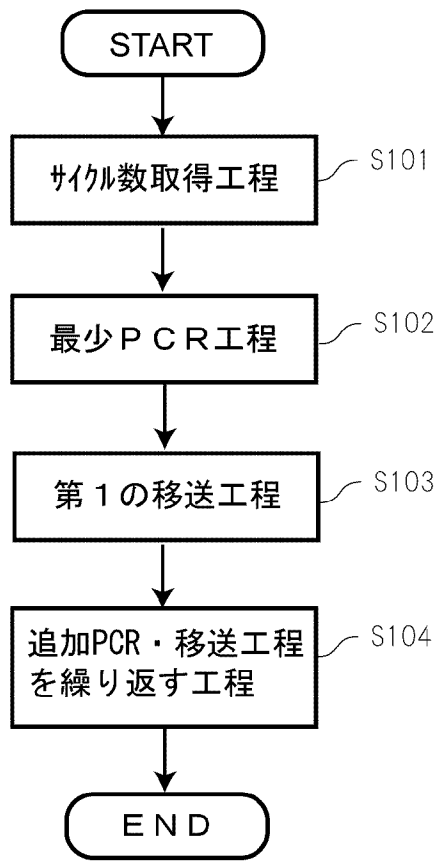


[図2]

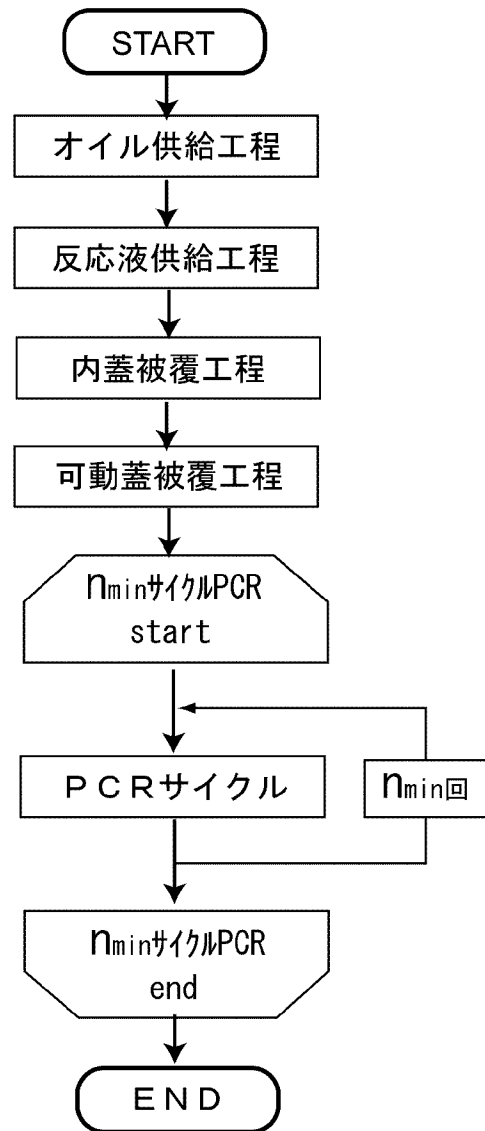


[図3]

(a)

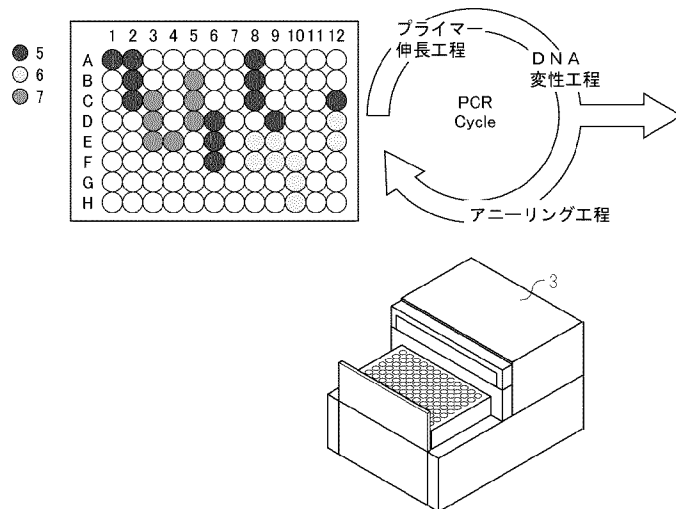


(b)

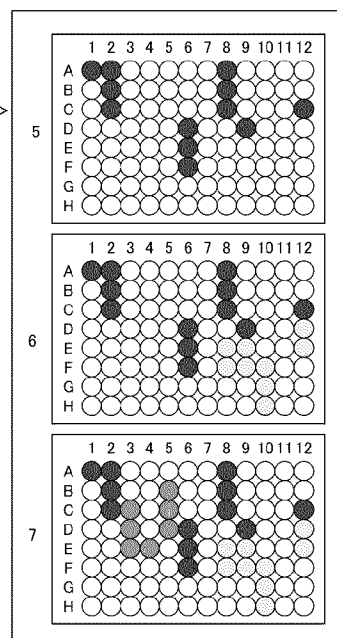


[図4]

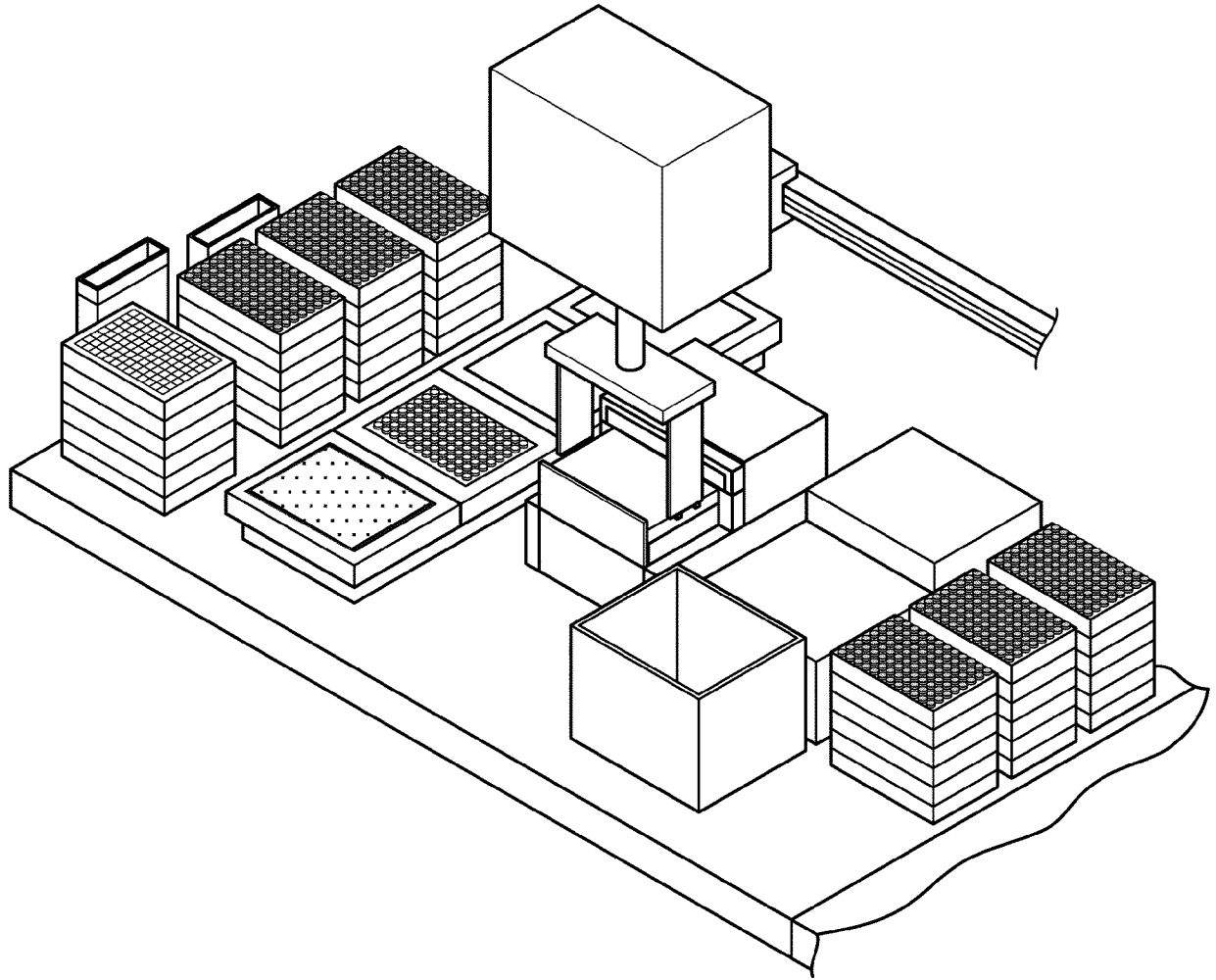
(a)



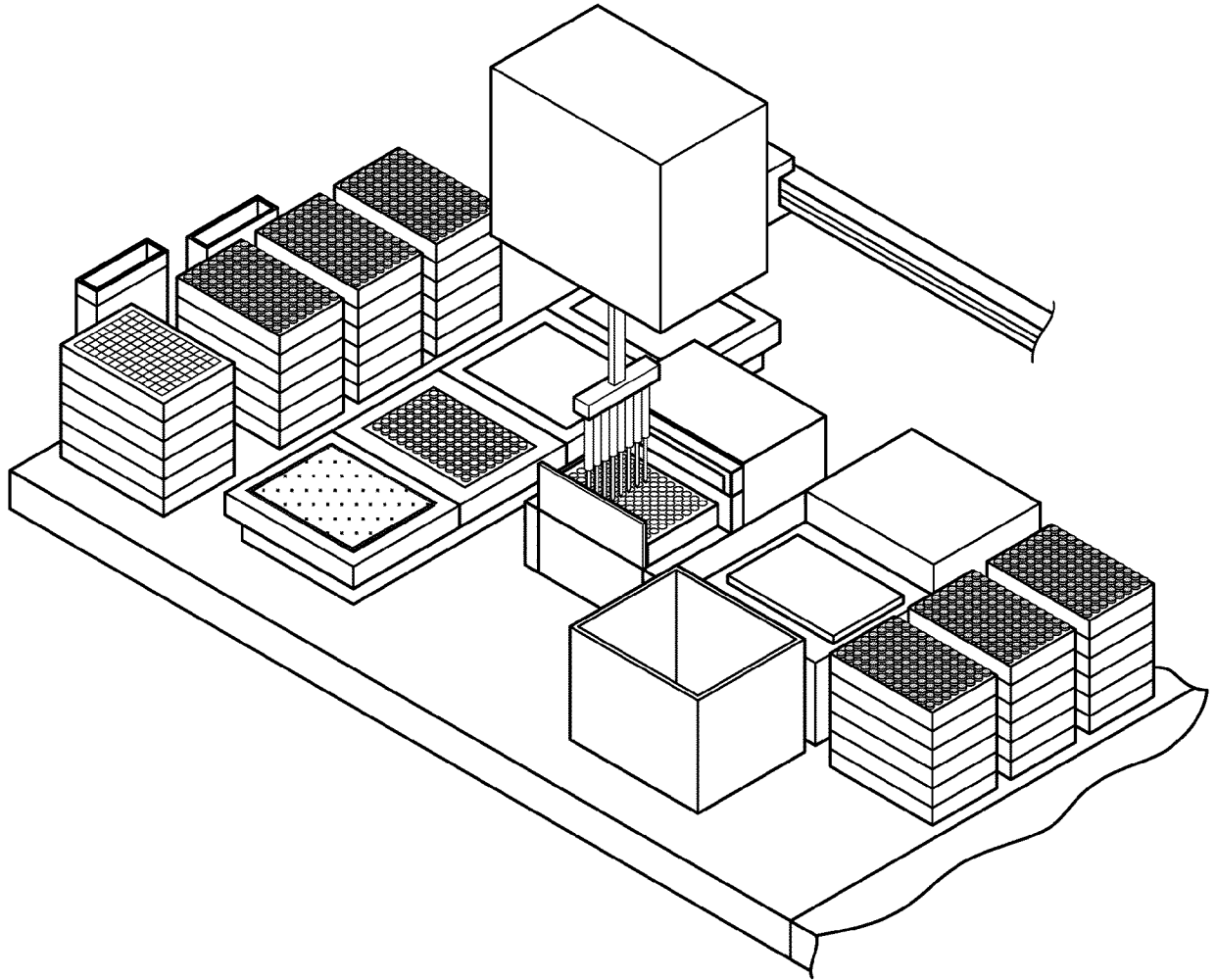
(b)



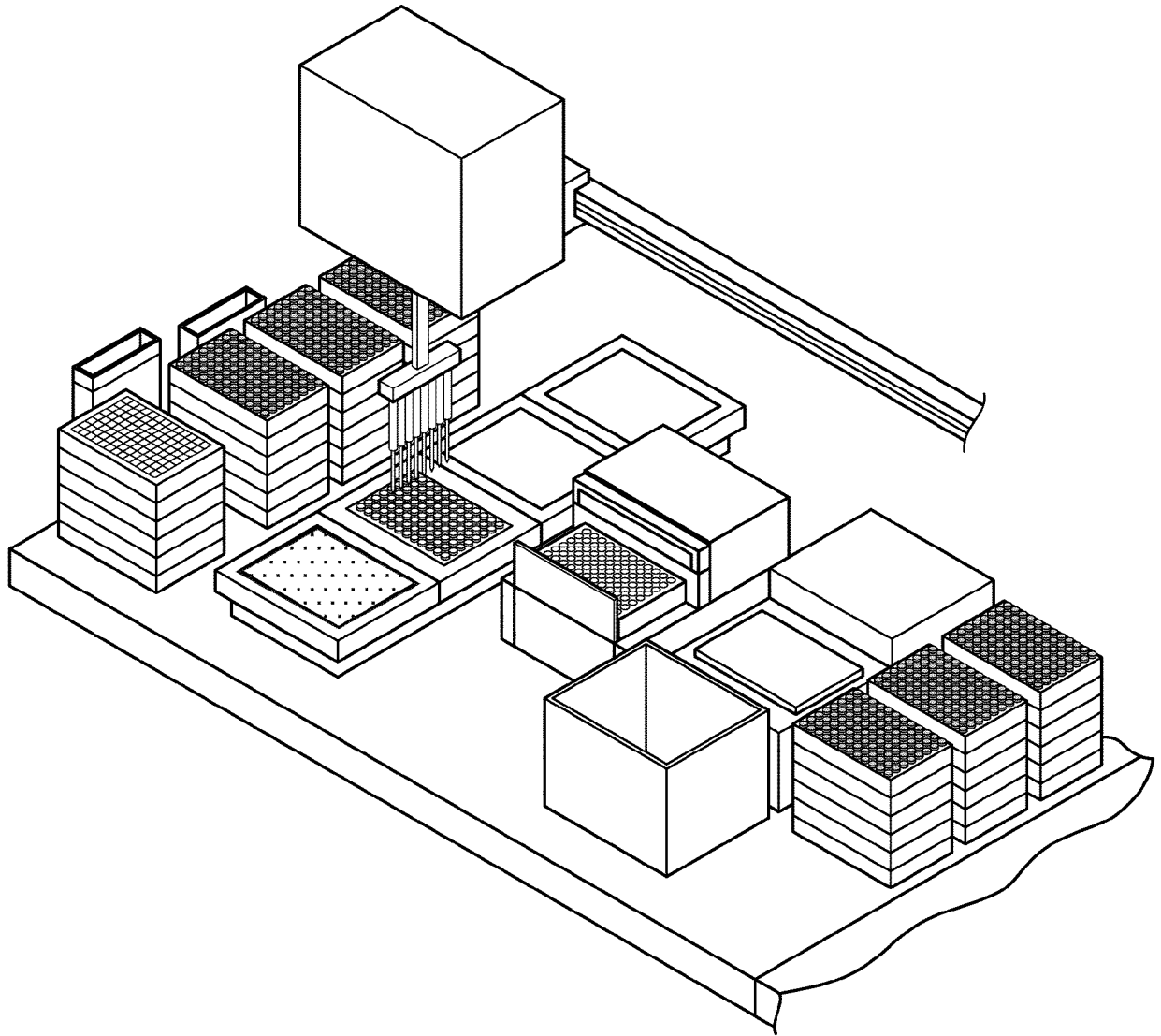
[図5A]



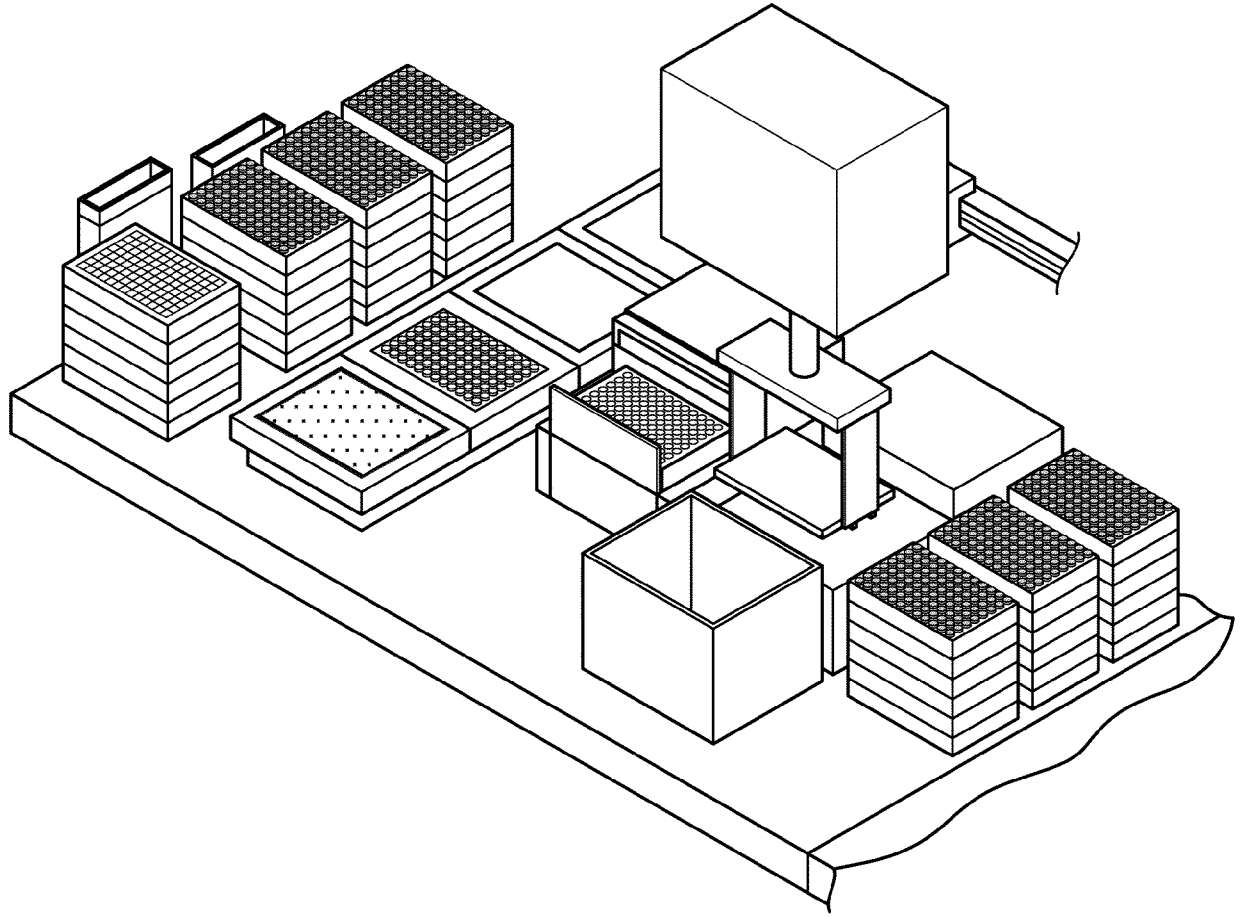
[図5B]



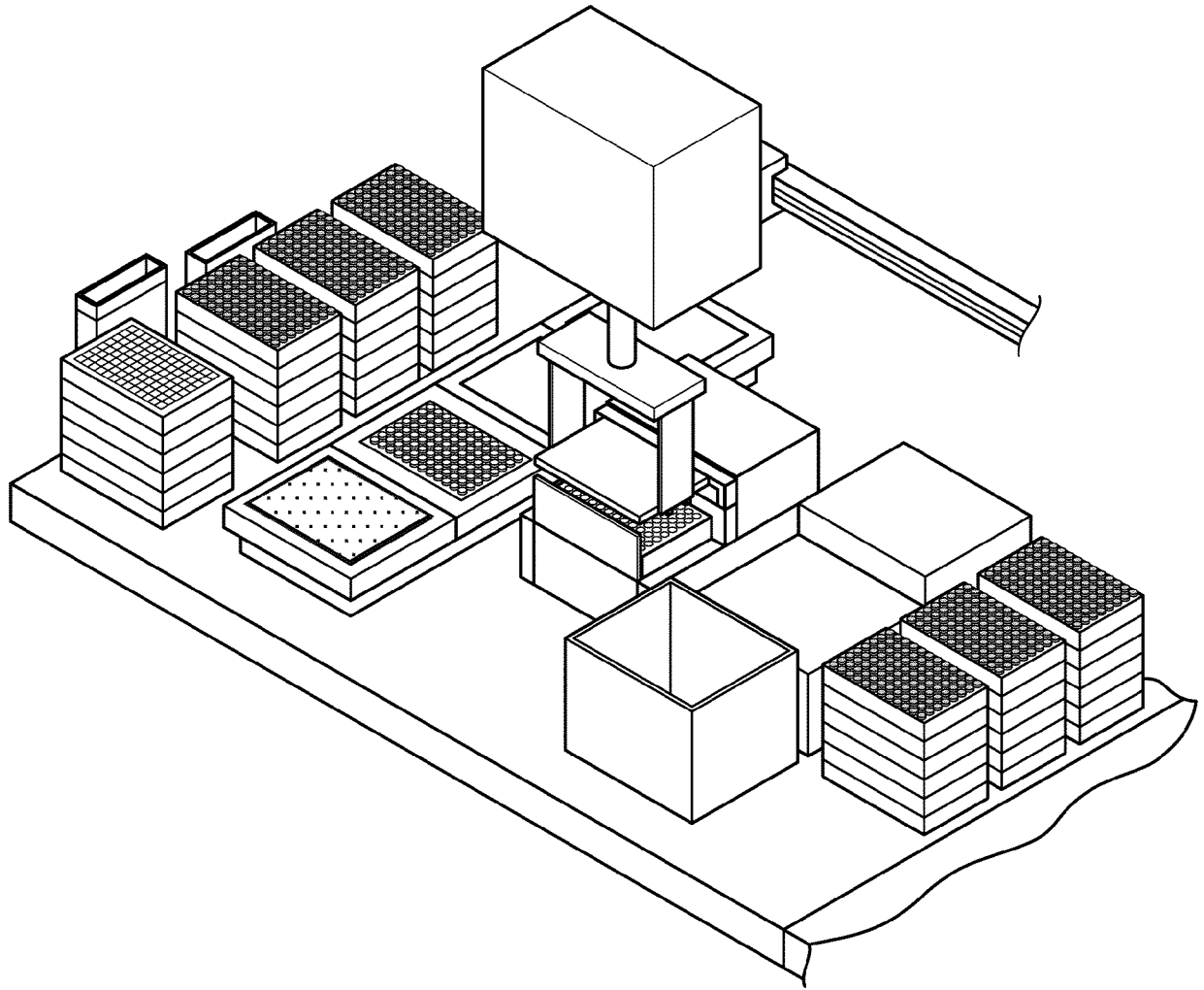
[図5C]



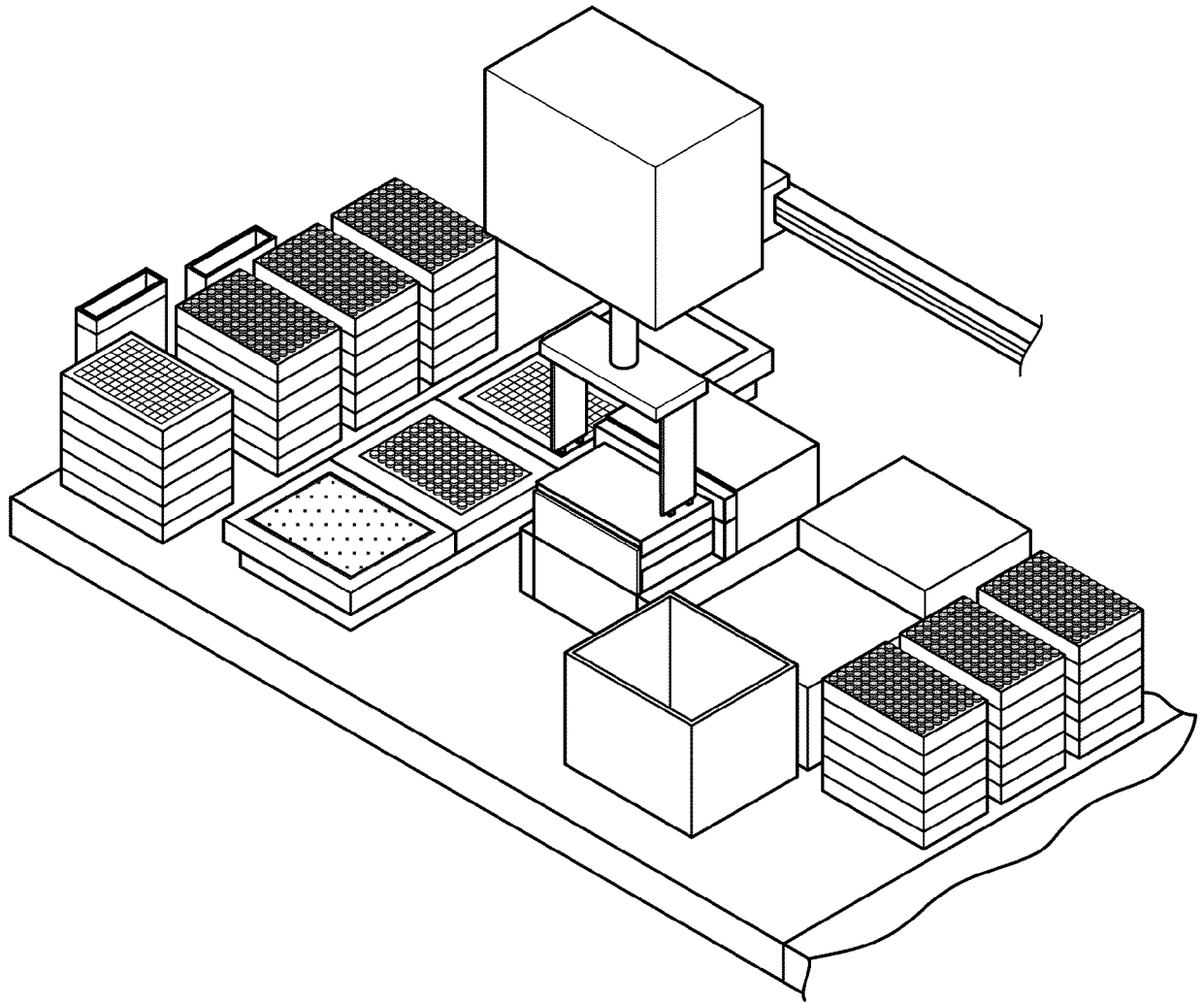
[図5D]



[図5E]



[図5F]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/045552

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|--|---|--|
| C12Q 1/686(2018.01) FI: C12Q1/686 Z ZNA | | |
| 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) C12Q1/686 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2021/150426 A1 (MICROSOFT TECHNOLOGY LICENSING, LLC) 29 July 2021 (2021-07-29) claims, paragraphs [0005]-[0006], [0011], [0036], [0040]-[0042], [0057]-[0058], [0062], [0073]-[0074], [0087], fig. 1, 3-4 | 1-12 |
| Y | WO 2022/081934 A1 (GENENTECH, INC.) 21 April 2022 (2022-04-21) claims, paragraphs [0107]-[0109], fig. 3B | 1-12 |
| Y | JP 2014-534497 A (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 18 December 2014 (2014-12-18) claims, paragraph [0050], fig. 3 | 1-12 |
| A | JP 2021-532802 A (ROBERT BOSCH GMBH) 02 December 2021 (2021-12-02) claims | 1-12 |
| A | JP 2019-531730 A (GENERAL AUTOMATION LAB TECHNOLOGIES, INC.) 07 November 2019 (2019-11-07) paragraphs [0154], [0159] | 1-12 |
| <input 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 29 February 2024 | | Date of mailing of the international search report 26 March 2024 |
| Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/045552

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/045552

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|-------------|----|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| WO | 2021/150426 | A1 | 29 July 2021 | US 2021/0222160 EP 4093885 | A1 A1 |
| WO | 2022/081934 | A1 | 21 April 2022 | JP 2023-545506 US 2022/0119860 EP 4229196 CN 116438318 KR 10-2023-0085149 | A A1 A1 A A |
| JP | 2014-534497 | A | 18 December 2014 | US 2014/0236496 claims, paragraph [0060], fig. 3 WO 2013/049443 EP 2761027 KR 10-2014-0078713 CN 104093853 | A1 A1 A1 A A |
| JP | 2021-532802 | A | 02 December 2021 | US 2021/0301323 claims WO 2020/025387 EP 3830292 CN 112513290 KR 10-2021-0041560 | A1 A1 A1 A A |
| JP | 2019-531730 | A | 07 November 2019 | US 2018/0024096 paragraphs [0166], [0171] WO 2018/064385 EP 3519096 CN 109843435 | A1 A1 A1 A |

| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/686(2018.01)i FI: C12Q1/686 Z ZNA | | |
|---|---|----------------|
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/686 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年 | | |
| 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| Y | WO 2021/150426 A1 (MICROSOFT TECHNOLOGY LICENSING, LLC) 29.07.2021 (2021 - 07 - 29) 特許請求の範囲、 [0005] - [0006]、 [0011]、 [0036]、 [0040] - [0042]、 [0057] - [0058]、 [0062]、 [0073] - [0074]、 [0087]、 図1、 3-4 | 1-12 |
| Y | WO 2022/081934 A1 (GENENTECH, INC.) 21.04.2022 (2022 - 04 - 21) 特許請求の範囲、 [0107] - [0109]、 図3B | 1-12 |
| Y | JP 2014-534497 A (ライフ テクノロジーズ コーポレーション) 18.12.2014 (2014 - 12 - 18) 特許請求の範囲、 [0050]、 図3 | 1-12 |
| A | JP 2021-532802 A (ローベルト ボツシュ ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング) 02.12.2021 (2021 - 12 - 02) 特許請求の範囲 | 1-12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 29.02.2024 | 国際調査報告の発送日 26.03.2024 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 権限のある職員（特許庁審査官） 坂崎 恵美子 4N 2564 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | |

| C. 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------|--|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| A | JP 2019-531730 A (ジェネラル オートメーション ラボ テクノロジーズ インコーポ レイテッド) 07.11.2019 (2019 - 11 - 07) [0154]、[0159] | 1-12 |
| ----- | | |

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/045552

| 引用文献 | | | 公表日 | パテントファミリー文献 | | | 公表日 |
|-------|-------------|----|------------|-------------------|-----------------|----|-----|
| WO | 2021/150426 | A1 | 29.07.2021 | US | 2021/0222160 | A1 | |
| | | | | EP | 4093885 | A1 | |
| ----- | | | | | | | |
| WO | 2022/081934 | A1 | 21.04.2022 | JP | 2023-545506 | A | |
| | | | | US | 2022/0119860 | A1 | |
| | | | | EP | 4229196 | A1 | |
| | | | | CN | 116438318 | A | |
| | | | | KR | 10-2023-0085149 | A | |
| ----- | | | | | | | |
| JP | 2014-534497 | A | 18.12.2014 | US | 2014/0236496 | A1 | |
| | | | | 特許請求の範囲、[0060]、図3 | | | |
| | | | | WO | 2013/049443 | A1 | |
| | | | | EP | 2761027 | A1 | |
| | | | | KR | 10-2014-0078713 | A | |
| | | | | CN | 104093853 | A | |
| ----- | | | | | | | |
| JP | 2021-532802 | A | 02.12.2021 | US | 2021/0301323 | A1 | |
| | | | | 特許請求の範囲 | | | |
| | | | | WO | 2020/025387 | A1 | |
| | | | | EP | 3830292 | A1 | |
| | | | | CN | 112513290 | A | |
| | | | | KR | 10-2021-0041560 | A | |
| ----- | | | | | | | |
| JP | 2019-531730 | A | 07.11.2019 | US | 2018/0024096 | A1 | |
| | | | | [0166]、[0171] | | | |
| | | | | WO | 2018/064385 | A1 | |
| | | | | EP | 3519096 | A1 | |
| | | | | CN | 109843435 | A | |
| ----- | | | | | | | |