(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4217318号
(P4217318)

(45)発行日　平成21年1月28日(2009.1.28)　(24)登録日　平成20年11月14日(2008.11.14)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P

請求項の数 5　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願平10-347493
(22)出願日　平成10年12月7日(1998.12.7)
(65)公開番号　特開2000-166598(P2000-166598A)
(43)公開日　平成12年6月20日(2000.6.20)
審査請求日　平成17年12月7日(2005.12.7)

特許法第３０条第１項適用　ＡＮＡＬＹＴＩＣＡ　ＣＨＩＭＩＣＡ　ＡＣＴＡ，第３６５巻，第１－３号（１９９８年６月５日）第４３－４８頁に発表

特許法第３０条第１項適用　ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，第２５巻，第４号（１９９８年１０月）第７０６－７１５頁に発表

(73)特許権者　000000376
オリンパス株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷２丁目４３番２号
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦
(74)代理人　100091351
弁理士　河野　哲
(74)代理人　100088683
弁理士　中村　誠
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊
(74)代理人　100075672
弁理士　峰　隆司
(74)代理人　100109830
弁理士　福原　淑弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】標的核酸の定量分析方法および装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

プライマと基質分子と核酸合成酵素と標的核酸分子とを含む検液による核酸増幅反応を利用した標的核酸の分析方法であって、

測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識した基質分子を含む検液を用いて、前記核酸増幅反応を実行する工程と、

この核酸増幅させた検液について、微小な測定視野内を出入りする標識分子の運動速度を、所定空間内において１以上の個々の標識分子から測定される出力強度の増減または消失を指標として、前記標識核酸分子の液体中のゆらぎ運動を測定する工程と、

この測定されたゆらぎ運動に基づいて、前記標識分子の前記検液中での動き易さを評価する工程と、

この評価結果に基づいて、前記標識分子で標識された増幅核酸断片を定量する工程

を有することを特徴とする標的核酸の分析方法。

【請求項２】

前記標識分子が蛍光性物質または発光性物質であることを特徴とする、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記測定する工程は、所定の測定領域内の標識分子の存在量を測定する工程を含むことを特徴とする請求項１に記載の方法。

【請求項４】

前記評価する工程は、自己相関関数による演算を実行する工程を含むことを特徴とする請求項１に記載の方法。

【請求項５】

前記増幅反応を実行する工程と前記測定する工程の間に、さらに、核酸増幅反応に関与しなかった前記標識した基質分子を除去する工程を含み、前記測定する工程を検液に非接触な状態で測定するようにしたことを特徴とする請求項１～４の何れか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中に存在する核酸分子を分析する技術に関し、特に、核酸増幅反応による反応結果に基づいて、標的核酸分子を検出するための分析方法および装置に関する。本発明は、単一の核酸分子に関する追跡データを有効に利用して増幅反応の有無および／または反応量を得るような検出方法に適用される。従って、本発明は、標的核酸分子の個数に関係した情報を得る任意の目的にも、有効に適用できる。

【０００２】

【従来の技術】

ＤＮＡやＲＮＡなどの核酸の検出と分子量の測定は、生化学や分子生物学の研究において最も重要な分析手段である。また、最近では、遺伝子診断や遺伝子治療においても重要な分析手段となっている。例えば、遺伝子増幅法として非常に重要なＰＣＲ（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）法においては、その増幅した遺伝子の最終的な検出は、ゲル電気泳動法を用い、鎖長（分子量）毎の分画に分離した後に、特定位置の分画の有無を測定している。

【０００３】

核酸合成酵素としてのＤＮＡポリメラーゼと、複製を開始するためのプライマと、複製時の基質としての四種類の塩基（ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰ）の存在下で、標的核酸分子を、基質分子の重合反応が可能な条件で処理すると、標的核酸由来の一本鎖ＤＮＡを鋳型（ｔｅｍｐｌａｔｅ ＤＮＡ）にして 、相補鎖を合成して二本鎖（ｄｓＤＮＡ）を形成するような核酸増幅が起こることが知られている。

【０００４】

ＰＣＲ法において、増幅されたｄｓＤＮＡの総量は、適宜の容器中またはプレート上の検液全体が放つ蛍光総量として蛍光計測計により測定される。こうして測定された蛍光総量は、充分に増幅された後の標的ＤＮＡに相当する。しかし、ＰＣＲにおける増幅反応は、相反する温度条件下での反応過程、即ち、ｄｓＤＮＡを二本の分かれたｓｓＤＮＡに分離するように変性させるために高温下に試料を置く昇温段階と、ｓｓＤＮＡを上述した１対のプライマとハイブリダイズさせるために温度を下げる降温段階とを含んでいるので、増幅の様子を定量的に追跡することは困難である。従って、従来のＰＣＲ法では、標的核酸の増幅中または増幅前の総量を定量的に解析することは不可能であった。

【０００５】

近年、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定し、自己相関関数（Ａｕｔｏｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ ｆｕｎｃｔｉｏｎ）を用いて、個々の標的分子の微小運動を正確に測定する技術が登場した。この種の方法は、特に、標識分子としての蛍光分子を光学機器によって測定するので、相関蛍光分光法（Ｆｌｕｏｒｅｓｅｎｃｅ Ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ、略してＦＣＳ）と呼ばれている。ＦＣＳを用いた生物学的材料に関する測定データの演算手法は、標識された核酸プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応においてＦＣＳを利用した報告（Ｋｉｎｊｏ，Ｍ．、Ｒｉｇｌｅｒ，Ｒ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２３、１７９５－１７９９、１９９５）に開示されている。

【０００６】

ＦＣＳを用いた標的遺伝子の検出は、最近いくつか報告されている。ＮＡＳＢＡ（Ｎｕｃ

ｌｅｉｃＡｃｉｄＳｅｑｕｅｎｃｅＢａｓｅｄＡｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）がＦＣＳと結合され、血清中のＨＩＶ（ＨｕｍａｎＩｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙＶｉｒｕｓ）の診断に有効な検出法であることが分かった（Ｏｅｈｌｅｎｓｃｈｌａｇｅｒ，Ｆ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９３、１２８１１－１２８１６、１９９６）。このＮＡＳＢＡ法は、ＰＣＲの変法であるが、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、及びＲＮａｓｅＨと言う、３つの酵素の存在下で、２つのプライマと、プローブとして蛍光標識した別途のプライマとを必要とする。

【０００７】

ＮＡＳＢＡ法よりも簡単な方法（ＦＣＳによる増幅プローブ伸長検出法、ＡＰＥＸ（ＡｍｐｌｉｆｉｅｄＰｒｏｂｅＥｘｔｅｎｓｉｏｎ）が同じグループから報告されている（Ｗａｌｔｅｒ，Ｎ．Ｇ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９３、１２８０５－１２８１０、１９９６）。それでも、順方向（ｆｏｒｗａｒｄ）プライマと逆方向（ｒｅｖｅｒｓｅ）プライマ・セットの他に、プローブとして蛍光標識した別途のプライマを必要とする。このＡＰＥＸの実験では、自己相関関数の時間的変移が２６サイクル後に観測される。

【０００８】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記ＮＡＳＢＡ法およびＡＰＥＸ法は、いずれも、通常の核酸増幅の材料とは別の標識されたプローブを必要とするので、反応条件が複雑となり、分析精度を安定に制御するのが困難である。また、標識分子は、１つの蛍光標識で標識されているので、標識分子で標識されたプローブのうち、ハイブリダイズしないプローブから出される標識由来の信号がＳ／Ｎ比を顕著に低下させるので、標的核酸分子の初期濃度が少ないほど、検出感度も低下しがちである。さらに、検出可能になるまでに、多くのＰＣＲサイクルを回さなければならない。

【０００９】

本発明は、かかる核酸検出方法の実態に鑑み、標的核酸分子の存在量を正確且つ簡単な構成で定量できる分析方法および装置を提供することを目的とする。

また、本発明の別の目的は、少ないコピー数でも高感度で定量できるようにすることである。また、本発明の別の目的は、微量の試料でも標的核酸分子の有無を検出できるようにすることである。また、本発明の別の目的は、ＰＣＲにおける増幅過程を分子レベルで知ることができるようにすることである。

【００１０】

【課題を解決するための手段および作用効果】

本発明は、蛍光分子で標識したヌクレオチドであるｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ－１１－ｄＵＴＰを核酸含有試料とＤＮＡポリメラーゼともに混合して、核酸増幅を実行したところ、増幅過程で取込まれた蛍光色素分子の運動状態が変化することを画像解析により立証できたという発見に基づくものである。また、本発明は、蛍光色素分子の運動状態を自己相関関数でもって評価したところ、定量性の有る結果が出せたという発見に基づくものである。さらに、本発明は、核酸増幅過程で標的核酸分子に取込まれなかった標識化基質分子をゲルろ過カラム等で分離することで、測定への問題も無く、一層の感度上昇が達成できたという発見に基づくものである。

【００１１】

即ち、本発明の標的核酸の分析方法は、プライマと基質分子と核酸合成酵素と標的核酸分子とを含む検液による核酸増幅反応を利用した標的核酸の分析方法であって、測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識した基質分子を含む検液でもって核酸増幅反応を実行する工程と、核酸増幅させた検液について、上記標識分子からの信号を測定する工程と、測定した信号に基づいて上記標識分子の液中での動き易さを評価する工程と、評価結果に基づいて標的核酸分子を定量する工程とを有することを特徴とするものである。

【００１２】

ここで、測定工程は、所定の測定領域内の標識分子の存在量を測定する工程を含むのが好

ましい。さらに、この測定工程は、所定時間内の移動量を複数回測定するのが好ましい。また、増幅反応を実行する工程と測定工程の間に、さらに核酸増幅反応に関与しなかった上記標識した基質分子を除去する工程を含み、測定工程を検液に非接触な状態で測定するようにすれば、感度上昇を容易に得られる上に、非接触な測定なので、測定精度を低下させず、再現性の良い結果を維持できる点で好ましい。

【００１３】

また、評価工程は、複数の測定データに基づいて移動量の変化を表現する統計学的データに変換する工程を含むのが好ましい。さらに、この変換する工程は、自己相関関数による演算を実行する工程を含むのが好ましい。また、定量工程は、評価結果に基づいて核酸増幅の間に取込まれた標識分子の有無を判断する工程を含むのが好ましい。また、定量工程は、評価結果に基づいて核酸増幅の間に取込まれた標的核酸分子の個数を判断する工程を含むのが好ましい。

【００１４】

また、本発明の標的核酸の分析装置は、プライマと基質分子と核酸合成酵素（＝ポリメラーゼまたは逆転写酵素）と標的核酸分子とを含む検液による核酸増幅反応を利用した標的核酸の分析装置であって、測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識した基質分子を含む検液を保持する保持手段と、保持された検液について、核酸増幅反応の後に標識分子からの信号を測定する測定手段と、測定した信号に基づいて上記標識分子の液中での動き易さを評価する評価手段と、評価結果に基づいて標的核酸分子を定量したデータを出力するデータ出力手段とを有することを特徴とするものである。

【００１５】

ここで、測定手段は、焦点付近の回折限定領域にもたらされる微小視野内での測定を実施する光学系を有するのが好ましい。或いは、測定手段は、共焦点光学系により形成される微小視野内での測定を実施する顕微鏡を有するのが好ましい。さらに、回折限定領域は、平均直径３０±２０μｍのアパーチャーにより形成されるのが好ましい。また、回折限定領域は、平均直径２０±１０μｍのアパーチャーにより形成されるのが好ましい。

【００１６】

また、微小視野は、平均半径２００±５０ｎｍおよび光軸上の平均長さ２０００±５００ｎｍの略円柱状領域であるのが好ましい。

【００１７】

また、評価手段は、所定時間内に得られる複数の測定データを記憶する手段と、記憶した複数の測定データを自己相関関数で演算する演算手段とを有するのが好ましい。さらに、この評価手段は、所定の測定領域内で得られる複数の標識分子に関する測定データを記憶する手段と、記憶した測定データを個々の標識分子毎に自己相関関数で演算する演算手段とを有するのが好ましい。

【００１８】

また、データ出力手段は、自己相関関数で演算された結果に基づいて、複数の追跡データに関する時間的な位置変化を表現する統計学的データに変換する変換手段を含むのが好ましい。

【００１９】

【発明の実施の形態】

本発明においては、ＰＣＲ法における核酸増幅過程に取込まれる基質分子の少なくとも１種類が測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識されている。このような標識分子を有する基質分子は、標的核酸と合成開始用のプライマとの核酸ハイブリダイゼーションの反応工程中では、結合することなく、遊離の状態である。ハイブリダイゼーション反応に続く核酸合成反応において、標的核酸分子に結合したプライマに核酸合成酵素が働きかけると、プライマが伸長しようとして合成に必要な基質分子を次々に取込む。こうして核酸増幅中に基質分子と一緒に取込まれた標識分子は、遊離の標識分子に比べて液体中で動き易さが減少する。

【００２０】

従って、有効回数のＰＣＲサイクルを経た試料含有の検液の少なくとも一部を、定量的に分取されるか容器その他に保持されたまま、標識分子の測定に附される。ここで、検液の保持手段は、試験管、ウエル、シャーレ等の凹状の容器でも、スライドガラス等の平坦な板状支持体でもよい。場合によっては、測定手段の表面に直接的に点着させて保持するようにしてもよい。

【００２１】

測定手法は、増幅に伴う標識分子の大きさ変化に関する測定を行うものであれば、適宜選択してよく、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、蛍光計測用フローサイトメータ、イメージサイトメータ、蛍光顕微鏡等が有効に利用できる。測定工程が、３次元の微小視野内において実行されることにより、標的分子の試料含有液の中における自由な微小運動を、ＰＣＲ反応の結果に応じた自然状態のままで高精度に測定できる。これに対して、２次元的な視野内で測定すると、ブラウン運動のように、標識分子の３次元的に自由な移動をもれなく捕らえることができないので、測定精度が低い。微小視野を形成するに当たっては、ハロゲンランプからの光を収束させたり極微小の平均半径からなるアパーチャー（ピンホール、光ファイバ端面等）から出射するように光学設計することによって得ることもできるが、レーザ光線による収束光を利用するのが好ましい。

【００２２】

測定工程の微小視野が、共焦点光学系により形成されることにより、被写界深度の深い測定データが得られるので、個々の任意の標識分子が視野内で常に合焦して正確な位置および出力データを測定手段に供給することができる。

【００２３】

微小視野が、焦点付近の回折限定領域であることにより、個々の標識分子を高いＳ／Ｎ比で測定できる。

【００２４】

回折限定が平均直径１５±５μｍのピンホールにより形成されることにより、少数の選ばれた標識分子からの測定データを効率良く得ることができる。

【００２５】

微小領域が平均半径２００±５０ｎｍおよび光軸上の平均長さ２０００±５００ｎｍの略円柱状領域であることにより、測定視野内に照準された標識分子に関する自由な微小運動を効率良く取得することができる。

【００２６】

本発明では、微小の測定視野内を出入りする標識分子の運動速度を、所定空間内において１以上の個々の標識分子から測定される出力強度の増減または消出を指標として測定している。従って、基質分子を標識する標識分子の種類は、複数の測定時点において、ほぼ一定の出力を維持するような標識材料であるのが好ましい。このような標識分子の材料としては、発光性物質、蛍光性物質、磁性物質、放射性物質その他が挙げられる。特に、発光性物質と蛍光物質は、長時間、発光または蛍光を発するような色素を選ぶのが好ましい。標識分子として、発光色素や蛍光色素を有するものを使用すれば、光学的に容易な構成で分子レベルの測定を実行できる。蛍光色素としては、ＤＡＰＩ、ＦＩＴＣ、ローダミン、Ｃｙ３、ＣＹ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７等種々公知のものが挙げられる。

【００２７】

測定工程が、蛍光分子の液中での動き易さを測定する場合には、フォトマルチプライヤやフォトダイオード等の蛍光測定手段により蛍光データを受光することができる。蛍光測定手段は、単一フォトンを計測し得るような測定モードを備えている方が、蛍光分子に関する個別の測定を行うのに有利である。

【００２８】

測定工程が、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定するものである場合には、本発明を更に有効な実施形態とすることができ、個々の標的分子の微小運動を正確に測定することができる。ゆらぎ運動の測定を行うに当っては、自己相関関数（Ａｕｔｏｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ）を用いて演算するのが好ましい。特に、標識分子として、蛍

光を用いる場合には、自己相関蛍光分光法（Ｆｌｕｏｒｅｓｅｎｃｅ Ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ、略してＦＣＳ）を採用するのが好ましい。ＦＣＳを用いた生物学的材料に関する測定データの演算手法は、標識された核酸プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応においてＦＣＳを利用した報告（Ｋｉｎｊｏ，Ｍ．、Ｒｉｇｌｅｒ，Ｒ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２３、１７９５－１７９９、１９９５）を参照することができる。

【００２９】

ＦＣＳを実施する装置の概略は、図１に示す。このＦＣＳ装置は、共焦点光学系を用いた倒立型の蛍光顕微鏡１と試料からの蛍光を測定するためのフォトマルチプライヤ２と測定データを受信して自己相関関数による演算を行って数値化またはグラフ化を行うデータ処理装置３と、演算結果を画面上に表示する表示装置４とを備えている。

【００３０】

試料含有液１１は、図１に示す通り、試料台１２に載せたスライドガラス１３上に点着させることで、簡単にセットできる。この装置では、特に、微量の試料含有液１１を用いるため、水分の蒸発を防止するための蓋１４をスライドガラス１３上にかぶせてある。この蓋１４は、好ましくは、光透過性がなるべく低いものを用いることで、気密性と遮光性を同時に得られる。但し、蓋の内面は、励起光線の反射を防止するように、できるだけ光反射性の低いものを使用するのが好ましい。試料含有液１１が位置するスライドガラス１３部分の真下には、試料含有液１１中で焦点を結ぶように設定した対物レンズ１５が配置している。

【００３１】

なお、蛍光顕微鏡１は、落射型でもよい。落射型においては、対物レンズ１５のレンズ下面に直接的に試料含有液１１を点着してもよい。また、蛍光顕微鏡１の光源であるレーザ発生装置１６は、図１ではアルゴン（Ａｒ）イオンレーザーを使用しているが、蛍光の種類に応じて、クリプトンアルゴン（Ｋｒ－Ａｒ）イオンレーザー、ヘリウムネオン（Ｈｅ－Ｎｅ）レーザー、ヘリウムカドニウム（Ｈｅ－Ｃｄ）レーザー等に種々変更して構わない。また、蛍光顕微鏡１におけるスライドガラス１３の搬入や搬出、スライドガラス１３等への試料含有液の点着、蓋１４の開閉等の各種動作は、必要に応じて適宜自動化してもよい。

【００３２】

図２は、図１の 蛍光顕微鏡１の測定部分を示す拡大図である。図２（Ａ）に おいて、スライドガラス１３と所定の開口数（図ではＦＡ＝１．２）の対物レンズ１５との位置関係により、微小視野領域２０が形成される。この微小視野領域２０は、図２（Ｂ）に示すように、実際には、ボリュームを持ったレーザ光線の焦点（図では中間のくびれた部分）から上下に伸びた略円柱状の視野を有している。この視野領域２０は、焦点を基準位置として、光軸上の長さＺと平均半径Ｗにより規定される。このような、微小領域２０における蛍光測定は、蛍光分子の微小運動を追跡し得る最小限の領域にまで小さくすることにより、試料含有液１１中の焦点付近以外の蛍光分子に由来するノイズを有効に除去し、１個づつの蛍光分子を正確に測定するのに寄与している。

【００３３】

本発明は、上述した種々の実施の形態に基づき、遺伝病診断、親子鑑定、犯罪調査、遺伝子治療、分子生物学的研究、医薬品開発等に応用可能である。上述した実施の形態についても、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、変更可能な発明を包含する。例えば、上述した実施の形態では、測定装置として、蛍光顕微鏡の試料台にて、顕微鏡観察時と同じ環境下で測定可能なものを説明したが、欧州公開特許第６４０８２８Ａ１号に開示している装置を改良し、サーマルサイクラーの内部の試料含有液に対して、対物レンズから出射するレーザ光をフォーカシング可能となるように光学的に設計すれば、試料含有液をスライドガラス上に移すことなく、増幅反応を連続的に測定できる。また、ＰＣＲサイクルにおける経過時間内の複数データの取り方は、所定サイクル後の一定時間内に継続的または断続的に複数得る場合と、異なるサイクル毎に適当数の測定データを得る場合の何れもあ

り得る。

【００３４】

以下に、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例に限定される ことなく、発明の主旨に基づいて、本発明の出願時の技術水準に応じて自明な範囲における種々の変更が可能である。

【００３５】

【実施例】

（１）蛍光標識したヌクレオシド存在下でのＰＣＲ

０．１Ｕμｌ$^{-1}$Ｐｏｌ Ｉ型ＤＮＡ合成酵素（ＡｍｐｌｉＴａｑ Ｇｏｌｄ、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）、１ＸバッファーＩ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）、２００μＭのｄＡＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＣＴＰ、１２０μＭのｄＴＴＰ、８０μＭのフルオレッセイン１１－ｄＵＴＰ（ＦｌｕｏｒｏＧｒｅｅｎ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｆｌｕ－ｄＵＴＰ）、及び０．８μＭの 順方向（ｆｏｒｗａｒｄ）と逆方向（ｒｅｖｅｒｓｅ）の各プライマを含んだ混合溶液を検液とし、この検液を５μｌと２５μｌで、標準的な核酸増幅を行った。

【００３６】

鋳型として２００ｐｇ／５μｌの全長ラムダファージＤＮＡ（４８．５ｋｂ）を用いた。標的ＤＮＡの長さは、４０００ｂｐであった。核酸増幅に用いたプライマの塩基配列は、順方向プライマがＧＡＴＧＡＧＴＴＣＧＴＧＴＣＣＧＴＡＣＡＡＣＴ（塩基番号＝７１３１－７１５３）、逆方向プライマがＣＴＴＡＡＣＣＡＧＴＧＣＧＣＴＧＡＧＴＧＡＣＴ（塩基番号＝１１０９８－１１１２０）であった。

【００３７】

核酸増幅反応を行うためのＰＣＲ装置は、プログラマブルなサーマル制御システム（ＰＣ７００、Ａｓｔｅｃ社）を用い、上記各検液を収容するＰＣＲ用容器としてオイルフリー反応管（宝酒造）を用いた。即ち、先ず９６℃で１５分間の変成処理（初期変成処理）を行った後に、５５℃で１５分間のインキュベーションによるアニール処理と、６５℃で４分間のインキュベーションによる伸長反応と、さらに９６°Ｃで１．５分間のインキュベーションによる変成処理から成る各回のＰＣＲサイクルを実行した。ＰＣＲ用容器は、予め決めたＰＣＲサイクルで取り出し、次の処理まで－２０℃に保存した。

【００３８】

組み込まれなかったヌクレオシドを取り除く為に、ＰＣＲ反応させた各検液の混合液が５０μｌになるように蒸留水を加えたものをＭｉｃｒｏＳｐｉｎカラム（Ｓ－４００ＨＲ、ＰｈａｒｍａｃｉａＢｉｏｔｅｃ社）にかけた。このカラムでもって収集した各溶液の体積Ｖｃを重量で測定したところ、５５μｌから６０μｌの間に分布していた。溶液は更に精製することなく、次のＦＣＳ測定を行った。１つの塩基対の分子量は６６０Ｄａと仮定した。従って、ラムダファージＤＮＡの分子量は３２×１０^{6}Ｄａと計算出来た。

【００３９】

（２）ＦＣＳ測定

図１に示したようなＦＣＳ装置を用いて、ＦＣＳ測定を実行した。即ち、核酸増幅反応させた検液の一部を試料として、その試料液滴を試料スライド上に点着した状態で、市販のＦＣＳ装置（ＣｏｎｆｏＣｏｒ、ＣａｒｌＺｉｓｓＪｅ ｎａＧｍｂＨ）の試料台に載せ、倍率４０倍の対物レンズ（Ｃ－Ａｐｏｃｈｒｏｍａｔ、ＮＡ＝１．２）により、レンズ内を通ってきたＣＷ Ａｒ$^{+}$レーザービームで励起され、放出光はアバランシュ・ダイオード（ＡＰＤ）であるＳＰＣＭ－２００－ＰＱ（ＥＧ＆Ｇ社）でシングル・フォトン・カウンティング・モードで蛍光信号を測定する。測定した蛍光信号は、デジタル・コリレーターであるＡＬＶ５０００／Ｅ（ＡＬＶ ＧｍｂＨ）で解析することにより評価した。なお、測定用の試料液滴は、実際には、カバーグラス上に２０μｌを点着し、測定中の蒸発を防ぐ為に、カバーグラスを覆うように小さな箱を試料台上にかぶせた。また、焦点領域の試料体積は、ローダミン６Ｇの拡散計数値から決定した。また、体積要素は、フルオレッセインとＦｌｕ－ｄＵＴＰの溶液の濃度を用いて定めた。

【００４０】

約１分間測定した蛍光信号は、逐次記憶部に記憶させるとともに、蛍光自己相関関数Ｇ（ｔ）に適用させることにより解析されるようにプログラミングして、評価を行った。この蛍光自己相関関数Ｇ（ｔ）は、測定領域内での蛍光分子の平均数Ｎ、モノヌクレオシド（モノマーＤＮＡ）としての遊離の標識化基質分子（Ｆｌｕ－１１－ｄＵＴＰ）の並進時間τ_{mono}及びポリマーＤＮＡとしての取込まれた標識化基質分子の並進時間τ_{poly}から、Ｒｉｇｌｅｒらの方法（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ－Ｎｅｗ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ、Ｂｅｒｌｉｎ、１３－２４、ＩｎＪ．Ｒ．Ｌａｋｏｗｉｃｚ（Ｅｄ．）、１９９２参照）に基づき、以下の式１ によって計算した。

【００４１】

【数１】

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N}\left[\left\{\frac{1-y}{1+\frac{t}{\tau_{mono}}}\sqrt{\frac{1}{1+s^2\cdot\frac{t}{\tau_{mono}}}}\right\} + \left\{\frac{y}{1+\frac{t}{\tau_{poly}}}\sqrt{\frac{1}{1+s^2\cdot\frac{t}{\tau_{poly}}}}\right\}\right]$$

【００４２】

数式１において、ｙはポリマーＤＮＡ成分の割合、$\tau_{mono}=Wo^2/4D_{mono}$、$\tau_{poly}=Wo^2/4D_{poly}$、Ｓ＝Ｗｏ／Ｚｏ（ここで、Ｗｏは焦点付近の微小 視野に形成される略円柱状の測定領域（図２（Ｂ）参照）の体積要素の径であり、２Ｚｏはその長さを意味する）、D_{mono}及びD_{poly}はそれぞれモノマーＤＮＡ及びポリマーＤＮＡの並進拡散係数である。

【００４３】

データ解析は、さらに、データとモデル間の正規化平均二乗偏差を計算するために非線形最小二乗パラメター法を用いて行った。所望のＰＣＲサイクルを経て増幅された分子の総数Ｔは、式２；Ｔ＝（Ｎ／Ｖｃ）Ｖｃにより計算することで、定量化データとして出力するようにした。ここで、Ｖｏは体積要素、Ｖｃはスピンカラムによって収集された溶液の体積である。ＦＣＳ計測中、平均蛍光強度も測定した。その強度は体積要素中で増幅されたＤＮＡに取り込まれたフロロフォアー（Ｆｌｕ－ｄＵＴＰ）の総数を反映している。平均蛍光強度の計測速度をＤＮＡ分子数Ｎｙで割った値は、ＤＮＡ分子の平均計測速度Ｃ／Ｍとして採用した。この値は、ＰＣＲ産物の実効的な標識濃度として用いることができるものであった。

【００４４】

（３）測定領域の算定

測定領域の体積要素は、基準となる試料としての、ローダミン６Ｇ、フルオレッセイン（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ）、及びＦｌｕ－ｄＵＴＰの拡散時間の測定から定めた。フォーカシングされた付近に設けられた測定領域（図２（Ｂ）参照）における長さと径の比率は、式１におけるＳの値から求められ、約５であった。また、体積要素V_0は、1×10^{-15}ｌと計算された。

【００４５】

（４）ＰＣＲによるＦｌｕ－１１－ｄＵＴＰの取込み

ＰＣＲにおける蛍光標識ヌクレオシドの作用効果を明らかにするために、Ｆｌｕ－ｄＵＴＰの濃度を１０％から５０％まで変化させて調べてみた。図３は、アガロース電気泳動における増幅産物４ｋｂの特性を示す写図である。即ち、５０サイクルの核酸増幅反応後の検液としてのＰＣＲ反応混合液３μｌを７％アガロースゲルにかけた。ここで、図３（Ａ）は、エチジューム・ブロマイド（ｅｔｈｉｄｉｕｍ ｂｒｏｍｉｄｅ）染色前、図３（Ｂ）は、エチジューム染色後である。また、図中Ｍは、分子マーカー（ＨａｅIII－ｄｉｇｅｓｔｅｄファイＸ１７４ＤＮＡ）を示す。また、図中、「０」、「１０」、「２０」、「３０」、「４０」および「５０」は、Ｆｌｕ－ｄＵＴＰとｄＵＴＰ＋ｄＴＴＰの％比を示している。ＦＮは、蛍光ヌクレオシド（組み込まれていないヌクレオシド）である。また、図３（Ａ）におけるゲルから発する蛍光の測定にはオレンジ色光学フィルターＹａ

３を用い、図３（Ｂ）における測定には赤色フィルターＲ１を用いた。

【００４６】

図３（Ａ）によれば、５０％のＦｌｕ－ｄＵＴＰ存在下においても、４０００ｂｐの蛍光ＰＣＲ産物を合成することが分かる。標識ＤＮＡの蛍光強度は、Ｆｌｕ－ｄＵＴＰの濃度と共に増加した。増幅ＤＮＡの総生産量はエチジューム染色して示すことが出来るが、この実験では、図３（Ｂ）に示すように、産物量はＦｌｕ－ｄＵＴＰがない場合と同じであることが示された。

【００４７】

（５）ＰＣＲにおける蛍光強度と増幅産物量

図４は、ＰＣＲにおける、Ｆｌｕ－ｄＵＴＰの％比の関数として得た、標識濃度と産物量の関係を示すグラフである。図中、四角印は、ＤＮＡ１分子当たりの平均計測値Ｃ／Ｍを示す。また、黒丸印は、観察視野である測定領域におけるＤＮＡ分子数を示す。図４によると、分子当たりの蛍光強度Ｃ／ＭがＦｌｕ－ｄＵＴＰの増加に連れて増加していることが分かった。この結果は、標識濃度はＦｌｕ－ｄＵＴＰの濃度に依存する、ことを示した。かつまた、ＤＮＡ分子の数は、実験したＦｌｕ－ｄＵＴＰの濃度範囲内ではほとんど一定であった。この結果は、図３に示したゲル電気泳動の解析と一致した。これは、フルオレッセインがＤＮＡ合成酵素の働きを妨げない、ことを示している。モノマーとしての遊離のＦｌｕ－ｄＵＴＰとＰＣＲ産物の各Ｃ／Ｍ値を比較すると、４０００ｂｐのＤＮＡ鎖の中に取込まれたＦｌｕ－ｄＵＴＰモノマーの数が分かる。それは修飾されたヌクレオシドが隣同士に存在している可能性を示している。

【００４８】

（６）ＦＣＳによるＰＣＲのモニター

図５は、ＰＣＲ反応の過程における自己相関関数の推移を示すグラフであり、相関曲線の典型的な時間変化を示している。図中、丸印は１０サイクル、三角印は２０サイクル、逆三角印は３０サイクル、菱形印は４０サイクル、四角印は５０サイクルの核酸増幅反応をそれぞれ終了したときに、測定したものである。

図５から分かるように、自己相関関数のゼロ時間遅れの値（ｙ切片）はＰＣＲサイクルと共に減少している。この結果は、ＤＮＡ分子数の増加に起因している。

【００４９】

図６は、各自己相関関数をゼロ時間遅れのところで規格化したグラフである。図６では、比較の為にＦｌｕ－ｄＵＴＰの曲線が、黒丸印で示されている。また、図中、実線は１０サイクル、破線は２０サイクル、点線は３０サイクル、１点鎖線は４０サイクル、２点鎖線は５０サイクルの核酸増幅をそれぞれ終えたときの値である。図６から分かるように、１０サイクル後に得られた自己相関関数（実線部分）は、Ｆｌｕ－ｄＵＴＰのそれとは明らかな違いがある。この自己相関関数は、簡単な１成分モデルに当てはめることは出来なかったが、上記の式１に示したような２成分モデルに当てはめることが出来た。また、５０サイクルのＰＣＲを実行した検液においてさえ、短い拡散時間成分が検出出来た。短い成分はスピンカラムを通り抜けた未反応Ｆｌｕ－ｄＵＴＰとして定義される。

【００５０】

図７は、ＰＣＲサイクル数の関数としてＰＣＲ反応溶液中（5μｌ）における 増幅ＤＮＡ分子数を示すグラフである。増幅されたＤＮＡ分子の総数を、上記の式２によって計算した。実験上、ラムダファージＤＮＡの初期量を各種検討した。図中、四角印は２００ｐｇ（３．７５×10^6コピー）のラムダファージＤＮ Ａを初期量とした場合を示し、以下、丸印は２０ｐｇ（３．７５×10^5コピー ）、三角印は２ｐｇ（３．７５×10^4コピー）、逆三角印は０．２ｐｇ（３． ７５×10^3コピー）をそれぞれ示す。

【００５１】

図８は、鋳型の初期数の関数としての２０サイクル後のＤＮＡ分子数を示したグラフである。ＤＮＡがＰＣＲによって増幅された場合には、ＤＮＡ分子数はプラトー効果に達する前に指数関数的に増加する。鋳型分子の初期数は、１０サイクル後に１０２４（＝2^{10}）倍に増幅され得るので、３．７５×10^6コピー（ ２００ｐｇ相当）のＤＮＡは３．７５

×１０^{9}コピーという結果となる。しかし ながら、初期コピー数が３．７５×１０^{6}の時、ＦＣＳ計測で１０サイクル後に ７．４４×１０^{9}コピー計測され、同様に、初期コピー数が３．７５×１０^{5}の時には１０サイクル後に０．３１×１０^{9}コピー計測された。このように、ＦＣＳ 計測の定量性は、増幅サンプルの早期段階では忠実度が低いように見える。これは、検出領域において増幅ＤＮＡが少なく、多くの取込まれていない標識ヌクレオシドが分布している結果といえる。

【００５２】

ＦＣＳを用いたこの直接標識ベースのＰＣＲ定量は１０サイクルの増幅後でも、１０^{3}レベルの標的ＤＮＡ初期濃度の検出が可能であるが、図８から分かるよ うに、標的ＤＮＡの初期濃度が２０サイクル後の方がより良く推定出来る。この図ではＤＮＡ分子の初期数と産物の数の関係は直線的であるので、ＦＣＳ計測により目的ＤＮＡ分子数の定量が可能である。また、データは省略するが、別の曲線を用いて同様の関係が５００ｂｐの別のＤＮＡ配列で検出出来ることも確認できた。さらに、種々の実験では、ＰＣＲ２０サイクル、５μｌの試料溶液が用いられた。試料溶液量を増加すれば、もっと精密で且つ高い再現性を得る事が出来ることはいうまでもない。このことは診断応用においては最も重要なことである。それ故、時間や資源を節約するためには、良好な再現性を提供出来るようなサイクル数を実験を通じて適宜選択するのが好ましい。

【００５３】

上述した実験結果に示すように、本発明では、直接標識ＰＣＲに対する分子計数方法としてＦＣＳを用いることに初めて成功した。また、４０００ｂｐの標的核酸に対しても、５０％のｄＴＴＰをＦｌｕ－ｄＵＴＰに置き換えてもＰＣＲが阻害されないことを証明した。例えば５００ｂｐ、１０００ｂｐ、２０００ｂｐといったもっと短い標的核酸に対しては、より強い蛍光バンドが５０熱サイクル後のゲル電気泳動で検出された。この方法は、標識試薬として通常のＰＣＲに用いられる基質分子に蛍光等の測定可能な標識分子に結合させたものを用いるので、他の通常のＰＣＲの工程と同様に、通常の研究室で容易に応用出来る。ここで述べたＦＣＳアッセイは、ＰＣＲ条件のほんの少しの変更と、５μｌ程の少量の検液としての反応溶液と、少数回のＰＣＲサイクルが必要なだけである。ＤＮＡ分子に取込まれた蛍光標識分子は、どの様な遺伝子マーカーや、感染マーカーにも結合させることが出来、既に確立されたＰＣＲ法のノウハウを有効に利用しながら、各種様々な生物の核酸分子を増幅出来る。

【００５４】

本発明によるＦＣＳベースの定量的ＰＣＲは、多くの分野で有利である。というのは、このテクニックは高感度であり、時間や労力を節約し、そして反応成分の構成とその使用手順が極めて簡単であるからである。また、ＦＣＳの測定は非侵襲的であり、ＦＣＳで測定した検液を、更に次の実験、例えば蛍光ハイブリダイゼーションやＦＩＳＨ解析にも都合よく使用することが出来ることも述べておきたい。さらに、ＦＣＳは、均一溶液中の制限酵素消化過程を測定する事もできる。それゆえ、ここで紹介したように、高密度に標識したＤＮＡを用いることによって、点突然変異やＲＥＬＦといった分析が、カラムクロマトグラフィーやゲルクロマトグラフィーのような分離方法を何ら用いることなく、増幅後引き続きＦＣＳで検出出来るのである。これらのＦＣＳベースのＰＣＲ定量法は診断やスクリーニング実験に応用され、さらには１分子検出ベースの新しい分野を開くものである。

【００５５】

以上のように、ＦＣＳにより生物科学における２つの重要なパラメーターを得ることが出来る。それは検出領域（１０$^{-15}$ｌ）における分子の平均数と分子の 並進拡散係数である。本発明では、ＦＣＳを１分子計測の道具として用いてＰＣＲ産物の解析を行った。ＰＣＲによるＤＮＡの増幅過程がプラトーに達する前に、特定のＤＮＡ塩基配列の定量を行う事が出来る。ＰＣＲにＦＣＳを応用出来るようにする為に、酵素的増幅サイクルに用いる基質としてフルオレッセイン１１－ｄＵＴＰを用い、かかる標識したヌクレオシド存在下でＰＣＲを行うことによって、４０００ｂｐのひょう標的ＤＮＡのラベリングを行うことが出来た。１０サイクル後には、ＦＣＳ検出領域における蛍光性分子の拡散時間の増加に

よって増幅ＤＮＡの検出が出来た。ＰＣＲ検出の微少な検出領域の体積（５μｌ）中の標的ＤＮＡの初期分子数は、３．７５×１０^{6}コピーから３．７５１０^{3}コピーの範囲であった。

【００５６】

蛍光エネルギー転移解析のような蛍光クエンチングに基づいたＰＣＲ定量法が以前に報告されている（Ｈｅｉｄ，Ｃ．Ａ．ら、ＧｅｎｏｍｅＲｅｓ．、６、９８６－９９４、１９９６、Ｌｉｖａｋ，Ｋ．Ｊ．、ＰＣＲ ＭｅｔｈｏｄＡｐｐ ｌ．、４、３５７－３６２、１９９５）。この技法は市販されているが、第１、第２のＰＣＲプライマ・ペアーの他に、従来技術として述べたＮＡＳＢＡ法とかＡＰＥＸ法と同じく、一つのプローブ・シーケンスの中に２種類の色素を含んでいる。プローブのオリゴ塩基設計にあたっては、プライマの塩基配列と競合しない塩基配列を考えるだけでなく、融解温度（Ｔｍ）も考慮する必要がある。しかも、ドナーとアクセプター色素の位置も蛍光強度の増加効率及びポリメラーゼの５'ヌクレアーゼ活性に影響する。もう一つのゆらぎ分光法（蛍光クロスコリレ ーション分光法）が均一溶液中における特定目標遺伝子の検出法として報告されている（Ｃａｓｔｒｏ，Ａ．ら、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．、６９、３９１５－３９２０、１９９７）。クロスコリレーション法では非常に低濃度の目標配列を検出出来るけれど、この方法は依然として、実験溶液中では２種類の蛍光プローブを必要とする。

【００５７】

簡便性の観点からは、ＦＣＳに基づいたＰＣＲ定量法はエネルギー転移法およびクロスコリレーション法に比べて、重要な利点を有する。ＰＣＲの再現性と感度は、酵素のタイプ（ＰｏｌＩタイプ或いはタイプ）、プライマ配列、及び反応条件に強く依存する。一度これらの条件が決定されると、ＦＣＳに基づいたＦＡ－ＰＣＲはプライマ比をわずかに変えるだけで、通常のＰＣＲアッセイにすぐに応用出来る。それ故、ルーチン的ＰＣＲ条件はＦＡ－ＰＣＲの条件に容易に変更出来る。しかも、ＲＴ－ＰＣＲ（逆転写ＰＣＲ）のような他の増幅方法も、この方法に変更することが出来、将来的には一個の細胞中のｍＲＮＡを定量することも出来る。

【００５８】

ゲル電気泳動及びカラムクロマトグラフィーではＰＣＲ産物はプライマと副産物から分離される。しかしながら、目標産物は電気泳動とゲル物質からの抽出課程で稀釈され、さらにヌクレアーゼと接触する機会もあり、変成することもある。逆にＦＣＳでは測定後のサンプル回収に便利であり、それはサンプル液滴はカバーグラスの上に置くだけであり、ＦＣＳは非浸襲性であるため、ＰＣＲ溶液は稀釈されることがなく、測定中に変成することもない。ゲル電気泳動の分解能は高く、１塩基の長さの違いを検出出来るが通常１時間程度の泳動時間を要するのに対して、ＦＣＳは非常な高速測定であり（実施例では１分間であるが、ＦＣＳ装置の設計に応じて、適宜、それ１分より長くてもよく、好ましくは１分未満であってもよい）、例えば臨床検査やスクリーニング検査のような大量検体検査では利点がある。ＦＣＳ検査後のサンプルは直ちにゲル電気泳動等で詳細に解析出来、ＦＣＳ測定結果を確認したり、塩基配列を解析したり出来る。かつまた、回収されたサンプルは後に続く実験に使用することが出来る。たとえば、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることが出来る。もしも、ＦＣＳ測定後に増幅サンプルを回収する必要がなければ、キャリーオーバーによる汚染の危険性もなく廃棄出来る。というのは、ＦＣＳは非接触型の測定法だからである。

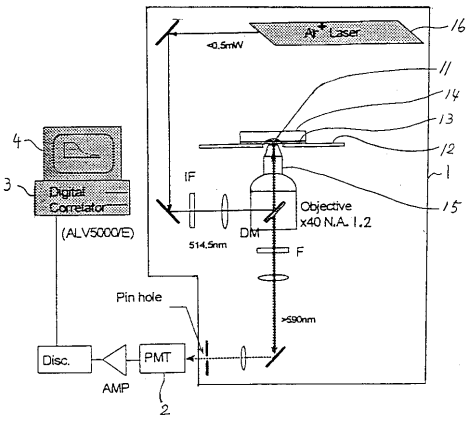
【００５９】

ＦＣＳは非侵襲性であり、直接測定を可能にするので、ＰＣＲサンプル量はＦＣＳが必要とする測定量で決まる。発明者による今回の測定は１０μＬのサンプル量で行ったが、理論的には１０$^{-15}$Ｌの体積要素レベルまで減らすことが出 来る。しかし、ＰＣＲ量は１μＬまで減らすことが出来れば、他の方法と比べて、経済面で大きな利点と言える。かつまた、ＦＣＳは蛍光顕微鏡を基礎としており、検出領域を対物レンズ上におくことが出来るため、ｉｎ－ｓｉｔｕＰＣＲによる特定のＲＮＡやＤＮＡの定量に用いることが出来る。

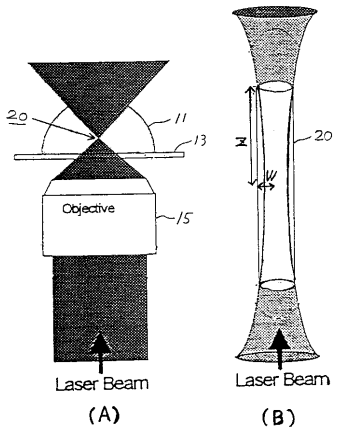
【００６０】
発明者は、ＰＣＲ溶液の解析に２成分モデルを使用して、良好な結果を得た。しかし、他の実験では多くのＤＮＡ種が存在するかもしれない。そのような場合には、ＤＮＡの種は従来のゲル電気泳動法で良く分離出来る。観測されたＦＣＳデータのモデル関数からの相関曲線の違いから溶液中に分布する他の成分の存在が示唆することができるが、単純な２成分モデルはそのような場合は限界があると思われる。その結果、もっと詳細な定量解析が必要とされる場合は、ＣＯＮＴＩＶＮ（Ｍａｘ－ＰｌａｎｋＩｎｓｔｉｔｕｔｅ製）のようなコンピュータープログラムを上述した本発明の方法に沿うように若干改訂するようにして、分布関数を得る多成分ＦＣＳ解析法を開発するのが好ましい。
【００６１】
本発明における測定工程は、物理的分離手段を用いることもなく、非侵襲的且つ非接触的に測定でき、使用するサンプル量も少ない。比較的少ないＰＣＲサイクル数で測定する場合のように、標的核酸分子の初期量が明らかに少ないような測定条件で分析する場合には、測定工程に先だって、増幅過程で取り込まれなかった標識分子をゲルろ過等の適宜のＢｏｕｎｄ／Ｆｒｅｅ分離手段によって除去してから、上記非侵襲的且つ非接触的な測定を実行すれば、容易にＳ／Ｎ比を高めて感度上昇できるという有利な一面も有する。このような少量のサンプルの物理的取り扱いは毛細管を使用したり、薄いカバーグラスや、フィルムをかぶせたガラス表面上の小さな穴を用いて行うことが出来、リアルタイム解析に用いることも出来る。これらの特性とさらなる改良により、増幅課程のモニターは容易に（リアルタイムモニタリング）、自動検出システム（ロボティックス）も可能であることは明白である。我々はＦＣＳに基づいたＦＡ－ＰＣＲ定量法は感度、定量精度、簡便性において利点を有すると結論する。この方法は迅速スクリーニングのみならず、分子診断の新時代を開くものと期待している。
【００６２】
【発明の効果】
本発明によれば、基質分子に標識分子を標識してＰＣＲによる増幅反応を行うとともに、標識分子の動き易さを測定するようにしたので、試料中の標的核酸の存在量を簡単な構成で正確に定量的に検出できる。
【図面の簡単な説明】
【図１】図１は、本発明の方法を実施するための装置の一例を示す概略図。
【図２】図２は、図１の装置の一部拡大図。
【図３】図３は、アガロース電気泳動における増幅産物４ｋｂの特性を示す写図。
【図４】図４は、ＰＣＲにおける、Ｆｌｕ－ｄＵＴＰの％比の関数として得た、標識濃度と産物量の関係を示すグラフ。
【図５】図５は、ＰＣＲ反応の過程における自己相関関数の推移を示すグラフ。
【図６】図６は、各自己相関関数をゼロ時間遅れのところで規格化したグラフ。
【図７】図７は、ＰＣＲサイクル数の関数としてＰＣＲ反応溶液中（5μｌ）における 増幅ＤＮＡ分子数を示すグラフ。
【図８】図８は、鋳型の初期数の関数としての２０サイクル後のＤＮＡ分子数を示したグラフ。
【符号の説明】
１…蛍光顕微鏡、
２…フォトマルチプライヤ、
３…データ処理装置、
４…表示装置、
１１…試料含有液、
１２…試料台、
１３…スライドガラス、
１４…蓋、
１５…対物レンズ、

１６…レーザー発生装置。

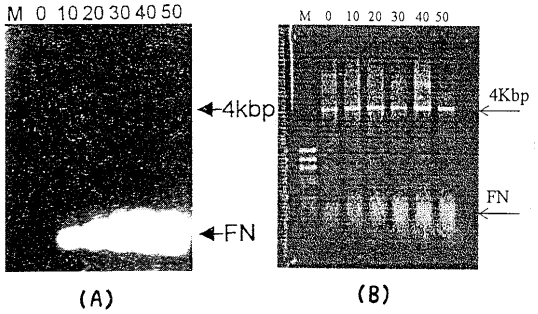
【図１】



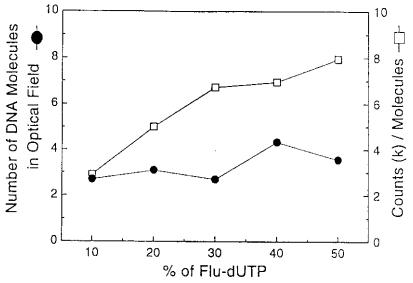
【図２】



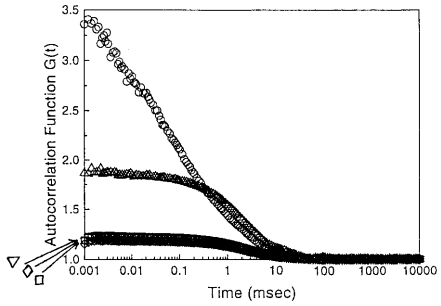
【図３】



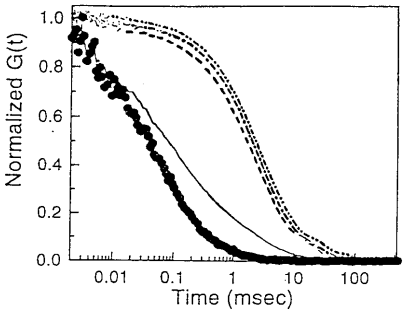
【図４】


Number of DNA Molecules in Optical Field
Counts (k) / Molecules
% of Flu-dUTP

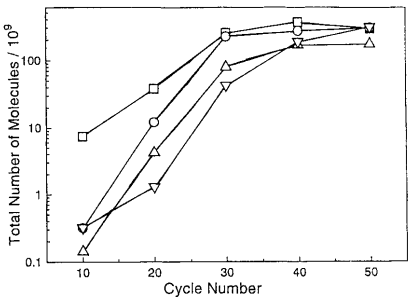
【図５】


Autocorrelation Function G(t)
Time (msec)

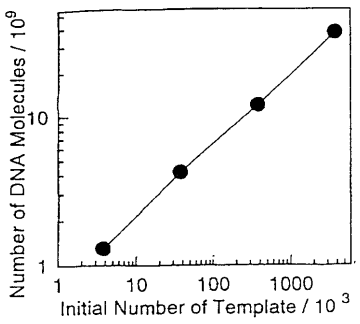
【図６】


Normalized G(t)
Time (msec)

【図７】


Total Number of Molecules / 10^9
Cycle Number

【図８】


Number of DNA Molecules / 10^9
Initial Number of Template / 10^3

フロントページの続き

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
(72)発明者 金城 政孝
北海道札幌市北区北２３条西１３丁目南新川宿舎１０－４０４

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, pages 12805-12810 (1996)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, pages 12811-12816 (1996)

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12Q 1/68
C12N 15/09
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)