

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-500029  
(P2008-500029A)

(43) 公表日 平成20年1月10日(2008.1.10)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N</b> 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 B 0 2 4
<b>C 12 Q</b> 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	A 4 B 0 2 9
<b>C 12 M</b> 1/00 (2006.01)	C 12 M 1/00	A 4 B 0 6 3
<b>G 01 N</b> 33/53 (2006.01)	G 01 N 33/53	U
<b>G 01 N</b> 33/569 (2006.01)	G 01 N 33/569	L

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

---

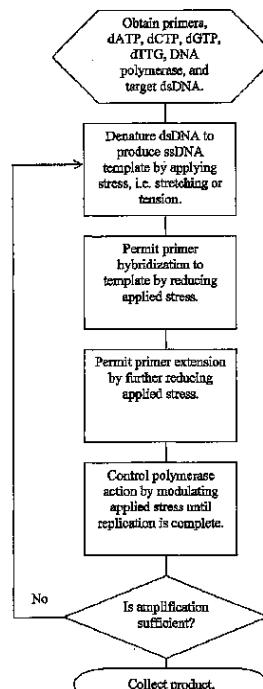
(21) 出願番号 特願2007-513358 (P2007-513358)	(71) 出願人 506371501 ゴエル、アニア GO E L, An i t a アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 02141, ケンブリッジ、カナル パーク 6, スイート 105 6 C a n a l P a r k, S u i t e 105, C a m b r i d g e, M a s s a c h u s e t t s 02141 U . S. A.
(86) (22) 出願日 平成17年5月13日 (2005.5.13)	(74) 代理人 100076428 弁理士 大塚 康徳
(85) 翻訳文提出日 平成18年12月19日 (2006.12.19)	(74) 代理人 100112508 弁理士 高柳 司郎
(86) 國際出願番号 PCT/US2005/016638	
(87) 國際公開番号 WO2006/076022	
(87) 國際公開日 平成18年7月20日 (2006.7.20)	
(31) 優先権主張番号 60/570,907	
(32) 優先日 平成16年5月13日 (2004.5.13)	
(33) 優先権主張国 米国(US)	
(31) 優先権主張番号 60/616,793	
(32) 優先日 平成16年10月6日 (2004.10.6)	
(33) 優先権主張国 米国(US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノ－P C R：核酸増幅及び検出のための方法及び装置

## (57) 【要約】

温度循環に対する依存なしに核酸序列の増幅を提供して通常的なベンチトップ温度循環装置から核酸序列の増幅方法を自由にする方法、装置、組成物が記載される。二重ストランド核酸の変性、プライマーアニーリング、及び重合酵素によるプライマー延長の精密な制御が、核酸に応力を適用することによってなされうる。この方法は、通常的なP C R方法に比べて：P C R過程に対する精密な制御と、全般的に改善された忠実度と、G C - 高含量領域または連続反復領域のような問題性のある序列に対する改善された正確性と、増大された序列長さと、増加された反応収率と、短縮された実験時間と、さらに大きい効率性と、さらに低いコストと、さらに高い移動性と、温度、p H、及びイオン強度のような多様な環境的なパラメータに対する堅固度と、を含む一つ以上の利点を提供しうる。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヌクレオチド序列を増幅する方法であって、

前記方法は、

( a ) 一つ以上の単一ストランド D N A の鑄型ストランドを、前記各鑄型ストランドの一部に相補的な一つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと、

( b ) 前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップと、

( c ) 前記鑄型ストランドを D N A 重合酵素及び 4 種類以上のヌクレオシド三リン酸と接触させるステップと、

( d ) 前記 D N A 重合酵素による前記プライマーの延長を進め、これにより、前記鑄型ストランドに結合された延長生成物を形成するステップと、

( e ) 前記延長生成物を前記鑄型ストランドから分離させるステップと、  
を含み、

その後、前記ステップ ( a ) 、( b ) 、( c ) 、及び ( d ) を、各反復前に前記 ( e ) ステップを行って 1 回以上反復し、

前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップは、前記鑄型ストランドに対する応力の適用を制御することによって、前記混成化を制御するステップを含む、または、

前記 D N A 重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記鑄型ストラ  
ンドに対する応力の適用を制御することによって、各鑄型ストランドに相補的な延長生成  
物を形成するための前記 D N A 重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップ  
を含む、または、

前記鑄型ストランドから前記延長生成物を分離させるステップは、前記鑄型ストラ  
ンドに応力を適用することによって、前記鑄型ストランドから前記延長生成物を分離するス  
テップを含む、または、

前記ステップ ( b ) 、( d ) 、及び ( e ) のうち一つ以上の間に前記鑄型ストランドに  
応力が適用されるものであって、これらの組合せである、  
ことを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップ  
は、前記鑄型ストランドに対する応力の適用を制御することによって前記混成化を制御  
するステップを含み、

前記 D N A 重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記鑄型ストラ  
ンドに対する応力の適用を制御することによって、各鑄型ストランドに相補的な延長生成  
物を形成するための前記 D N A 重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップ  
を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記 D N A 重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記鑄型ストラ  
ンドに対する応力の適用を制御することによって、各鑄型ストランドに相補的な延長生成  
物を形成するための前記 D N A 重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップ  
を含み、

前記鑄型ストランドから前記延長生成物を分離するステップは、前記鑄型ストラ  
ンドに応力を適用することによって前記鑄型ストランドから前記延長生成物を分離するス  
テップ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】**

前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップ  
は、前記鑄型ストランドに対する応力の提供を制御することによって前記混成化を制御  
するステップを含み、

前記鑄型ストランドから前記延長生成物を分離するステップは、前記鑄型ストラ  
ンドに

10

20

30

40

50

応力を適用することによって前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップを含むか、またはこれらの組合せ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DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって各錆型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含み、

前記一つ以上のプライマーを前記錆型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって前記混成化を制御するステップを含み、

前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップは、前記錆型ストランドに応力を適用することによって前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップを含むか、またはこれらの組合せを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型ストランドに対する機械的張力、水力学的応力、または電場エネルギーの適用を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型に制御された量の機械的張力を直接適用するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記錆型ストランドに制御された量の機械的張力を直接適用するステップは、前記一つ以上の錆型ストランドが付着された表面を移動するステップを含むことを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型ストランドに対する水力学的応力を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記錆型ストランドは、流体流れに露出された表面に固定される、流体流れに露出された表面に固定されたDNA重合酵素に結合される、または、逆伝搬性の流体流れによって維持されかつ延長される、ことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型ストランドの一側または両側の末端に連結された粒子に力を適用するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記ステップ(e)で、応力を適用するステップは、前記ステップ(d)で適用される同じ応力の増加された量を適用するステップを含むことを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項13】

前記錆型ストランドの相補的な部分に前記一つ以上のプライマーを混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を約0ないし約30pNの範囲内で制御することによって前記混成化を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記錆型ストランドの相補的な部分に前記一つ以上のプライマーを混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を約10ないし約30pNの範囲内で制御することによって前記混成化を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項15】

10

20

30

40

50

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記鑄型ストランドに対する応力の適用を約30ないし約60pNの範囲内で制御することによって、各鑄型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記鑄型ストランドに対する応力の適用を制御し、前記DNA上の難しい序列が複製される時期に該当する時点に前記応力を増大させることによって、各鑄型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。  
10

【請求項17】

前記DNAは、50%を超えるGC含量を有する数個の残分の一つ以上のセグメントを含み、前記DNAは、90%より高い効率性に增幅されることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記DNAは、60%より高いGC含量を有する数個の残分の一つ以上のセグメントを含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項19】

前記DNAは、8個以上の塩基対の反復単位を含む一つ以上のセグメントを含み、前記DNAは、90%より高い効率性に增幅されることを特徴とする請求項16に記載の方法  
20

。

【請求項20】

前記ステップ(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)は、約65未満で行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記ステップは、約50回以上反復されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項22】

約1000塩基より多くの塩基で構成された鑄型ストランドが増幅されることを特徴とする請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記方法は、約1時間以内に完了することを特徴とする請求項22に記載の方法。  
30

【請求項24】

前記DNAを含む溶液は、pH4-7またはpH8-10を有することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項25】

約1μl未満の容量を有する反応チャンバで行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項26】

前記ステップ(a)の前に、  
RNA試料を取得するステップと、  
相補的なDNAストランドを生成可能にするのに十分な組成物の存在下に、前記RNAを逆転写酵素と接触させるステップと、  
単一ストランドDNAを形成するために、前記DNAを前記RNAから分離するステップと、  
をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。  
40

【請求項27】

前記ステップ(a)の前に、  
DNA試料を取得するステップと、  
前記DNAを変性させるステップと、  
前記DNAストランドを反応チャンバ内で基板に結合させるステップと、  
50

前記反応チャンバをフラッシングして前記試料から汚染物を除去するステップと、  
をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ステップ( a )の第 1 の場合であって、前記一つ以上の鑄型ストランドは、一つの  
D N A 分子から收得されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ステップ( a )の少なくとも第 1 の場合であって、前記一つ以上の鑄型ストランド  
は、精製されていない試料物質内に含まれることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記鑄型ストランドを基板に結合された分子を結合できる複合体化基を含むプライマー  
と接触させることによって、前記鑄型ストランドを前記基板に結合させるステップを含む  
ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 31】

前記複合体化基は、活性化可能であることを特徴とする請求項 34 に記載の方法。

【請求項 32】

前記基板の表面に結合された前記複合体化基及び分子は、ビオチン及びストレプトアビ  
ジンであることを特徴とする請求項 34 に記載の方法。

【請求項 33】

前記プライマーは、光活性化可能な束縛されたビオチンを含むことを特徴とする請求項  
34 に記載の方法。 20

【請求項 34】

病原菌を検出する方法であって、

請求項 1 に記載の方法を含み、

前記病原菌と特異的に関連したヌクレオチド序列の存在如何に対して結果物である D N  
A を探索するステップをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 35】

前記病原菌は、アデノ関連ウイルス( Adeno - Associated Virus : A A V )、アデノウイルス、サイトメガロウイルス( Cytomegalovirus : C M V )、エピスタインバールウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルス、B 型肝  
炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、人間ヘルペスウイルスタイプ 6 、人間免疫欠乏症ウイル  
スタイプ 1 、人間免疫欠乏症ウイルスタイプ 2 、人間 T - 細胞リンパ営養性ウイルスタイ  
プ I 、人間 T - 細胞リンパ営養性ウイルスタイプ I I 、マイコバクテリア結核、マイコブ  
ラズマ、パーボウイルス B - 19 及び豚内因性レトロウイルス( P o r c i n e E n d o  
g e n o u s R e t r o V i r u s : P E R V )で構成される群から選択されることを  
特徴とする請求項 34 に記載の方法。 30

【請求項 36】

第 1 増幅サイクルのための前記鑄型ストランドを準備するために、m l 当り約 1 0 0 0  
個未満の個体またはポリヌクレオチドを含む試料を收得するステップをさらに含むことを  
特徴とする請求項 30 に記載の方法。

【請求項 37】

D N A 序列を増幅する方法であって、

( a ) 二重ストランド D N A を二つの单一ストランド D N A 分子に分離させるのに十分  
な応力を前記二重ストランド D N A に適用するステップを含む方法によって、一つ以上の  
二重ストランド D N A を変性させ、前記一つまたは二つの单一ストランド D N A 分子は、  
以後のステップで鑄型 D N A ストランドとなるステップと、

( b ) 前記鑄型ストランドを前記各鑄型ストランドの一部に相補的な一つ以上のオリゴ  
ヌクレオチドプライマー、D N A 重合酵素及び 4 種類以上のヌクレオシドミリン酸と接触  
させるステップと、

( c ) 前記ステップ( a )での応力適用を減少させて、前記プライマーを各鑄型ストラ  
ンドの該当する相補的な部分にアニーリングさせるステップと、

10

20

30

40

50

(d) 前記錆型ストランドに対する応力を制御して前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップと、

(e) 前記ステップ(a)、(b)、(c)、及び(d)を1回以上反復するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項38】

前記応力を適用する、前記応力を減少させる、および前記応力を制御するステップは、前記DNAを基板または一つ以上の粒子または両者に結合させるステップ及び前記基板または一つ以上の粒子の運動を制御するステップを含むことを特徴とする請求項37に記載の方法。

10

【請求項39】

前記応力を適用する、前記応力を減少させる、および前記応力を制御するステップは、前記DNAを一つ以上の粒子に結合させるステップ及び光学的な操作または磁気的な操作によって前記粒子の運動を制御するステップを含むことを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項40】

前記応力を適用する、前記応力を減少させる、および前記応力を制御するステップは、前記DNAに対する流体流れを調整するステップを含むことを特徴とする請求項37に記載の方法。

20

【請求項41】

前記DNAは、基板に結合された重合酵素によって結合されることを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項42】

前記DNAは、基板に結合されることを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記DNAは、流体流れの速度勾配で伸びることを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項44】

前記DNAは、逆伝搬性の流体流れによって伸びることを特徴とする請求項40に記載の方法。

30

【請求項45】

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるために、前記錆型ストランドに対する応力を制御するステップは、前記DNA上の難しい序列が複製される時に該当する時点に前記応力を増大させるステップを含むことを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項46】

a) 標的序列を含む二重ストランドDNA(dsDNA)試料、前記標的序列の3'末端及びその相補体に相補的なオリゴヌクレオチドプライマー、4種類以上のヌクレオシド三リン酸及びDNA重合酵素を提供するステップと、

b) 前記dsDNAを融解させるのに十分な張力を前記dsDNAから誘発して、前記dsDNAを单一ストランドDNA(ssDNA)に変性させるステップと、

c) 前記錆型ストランド内の前記張力を、前記プライマーの相補的な錆型ストランドへの混成化を許容するのに十分であるように減少させるステップと、

d) 前記錆型ストランド内の張力を、前記DNA重合酵素が前記プライマーを延長してdsDNAを形成させうるレベルまで調整するステップと、

e) 前記ステップ(b)ないし(d)を1回以上反復するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

40

【請求項47】

前記の全体のプロセスは、周囲の温度と同じレベルの温度で行われることを特徴とする請求項46に記載の方法。

50

**【請求項 4 8】**

前記の全体のプロセスは、約 20 より高く、約 60 より低い温度で行われることを特徴とする請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記の全体のプロセスは、室温で行われ、前記ステップ (b) で、張力は、約 65 pN であり、前記ステップ (c) で、張力は、約 30 pN ないし 60 pN に減少し、前記ステップ (d) で、張力は、約 0 pN ないし 30 pN に調整されることを特徴とする請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記張力は、電気的に、磁気的に、または光学的に前記 DNA に結合された一つ以上の粒子を操作するか、前記 DNA が結合された表面を移動させるか、前記 DNA が露出された流体流れを制御するか、またはこれらの組合せによって誘発されかつ制御されることを特徴とする請求項 4 6 に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

密閉された反応チャンバに連結された一つ以上の流体チャンネルを備える核酸序列を複製する装置であって、

前記反応チャンバが、その内部に DNA 分子を維持する手段を備え、

前記装置は、その内部に維持された前記 DNA 分子に可変的であり、制御された量の応力を適用するメカニズムをさらに含むことを特徴とする装置。

**【請求項 5 2】**

核酸プライマー、ヌクレオシド三リン酸、及び重合酵素の導入のための一つ以上の保存チャンバをさらに備えることを特徴とする請求項 5 1 に記載の装置。

**【請求項 5 3】**

前記反応チャンバ内に維持された前記 DNA 分子に応力を適用する前記メカニズムは、第 1 表面及び第 2 表面を含み、その上に DNA 分子を固定するための手段を備え、前記装置は、前記表面のうち一つまたは両者何れもを相互間に移動させうるメカニズムをさらに含むことを特徴とする請求項 5 1 に記載の装置。

**【請求項 5 4】**

前記反応チャンバ内に維持された前記 DNA 分子に応力を適用する前記メカニズムは、一つ以上の表面を含み、その上に DNA 分子を固定するための手段を備え、前記装置は、前記 DNA 上に制御され、可変的な流体流れを提供するメカニズムをさらに含むことを特徴とする請求項 5 1 に記載の装置。

**【請求項 5 5】**

DNA 分子を固定するための手段をその上に含む前記一つ以上の表面は、前記表面を通じた流路をさらに備えることを特徴とする請求項 5 4 に記載の装置。

**【請求項 5 6】**

前記 DNA 上に制御され、可変的な流体流れを提供するメカニズムは、層流において、速度勾配を形成するように配列されることを特徴とする請求項 5 4 に記載の装置。

**【請求項 5 7】**

前記反応チャンバ内に維持された前記 DNA 分子に応力を適用するメカニズムは、層流で速度勾配、流体流れ内の停滞点、逆伝搬性の流体流れまたはこれらの組合せを提供するように配列された流体流れチャンネルを備えることを特徴とする請求項 5 5 に記載の装置。

**【請求項 5 8】**

前記反応チャンバ内に維持された前記 DNA 分子に応力を適用するメカニズムは、DNA 分子に結合された粒子を操作できる光学的、電気的、または磁気的操作器のアレイを含むことを特徴とする請求項 5 5 に記載の装置。

**【請求項 5 9】**

DNA 増幅のための微細流体装置であって、

a ) 基板と、

10

20

30

40

50

b) 前記基板内に位置した流れチャンネルと、  
c) D N A 試料を前記流れチャンネルに導入させうる前記流れチャンネルと流体疎通関係がある流入口及び前記 D N A に応力を適用する手段と、  
を備え、

前記装置は、前記 D N A の変性を促進するために前記流れチャンネルの一つ以上の領域内に温度を調節するために作動的に配置された温度制御器を備えていないことを特徴とする微細流体装置。

【請求項 6 0】

前記基板は、弹性重合体物質で構成されることを特徴とする請求項 5 9 に記載の微細流体装置。 10

【請求項 6 1】

前記流れチャンネルは、前記流れチャンネルに導入された試料が前記流れチャンネルの周囲に循環されるように配列されることを特徴とする請求項 5 9 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 2】

前記微細流体装置は、前記チャンネルを通じて流体が移動するように作動的に配置されたポンプをさらに備えることを特徴とする請求項 5 9 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 3】

前記流れチャンネル内に核酸を固定化する手段を備えることを特徴とする請求項 5 9 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 4】

前記流れチャンネル内に固定化された一つ以上の重合酵素分子を含むことを特徴とする請求項 5 9 に記載の微細流体装置。 20

【請求項 6 5】

前記流れチャンネルは、実質的に円形であることを特徴とする請求項 6 1 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 6】

前記微細流体装置は、前記チャンネルを通じて流体を移動させるために作動的に配置されたポンプをさらに備えることを特徴とする請求項 6 5 に記載の微細流体装置。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、核酸の増幅及び検出に関する。特定の具体例で、本発明は、重合酵素連鎖反応 ( P C R : P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n ) を行う改善された方法、装置及び材料を提供する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

P C R は、特定 D N A 序列または R N A 序列を増幅するために利用される通常的な技法となった。1987年7月28日に M u l l i s に許与された特許文献 1 及び 2 は、基本的な P C R 技法を開示する。P C R 方法の最初公開以後に、P C R 方法は、生物工学及び生物医学の実施に非常な影響を及ぼしている。その後に許与された数千件の米国特許は、前記二つの特許のうち一つまたは両者何れもの開示内容を援用する。 40

【0 0 0 3】

通常的に、D N A 序列の増幅は、まず標的 D N A 序列の両末端に相補的な二つのオリゴヌクレオチドプライマーを選択しあつ取得するステップによって行われる。プライマー、重合酵素、4種類の共通されたヌクレオシド三リン酸の混合物、多様な塩類及び緩衝溶液を標的 D N A と混合し、D N A を変性させるために、これを約 90 ℃まで加熱して標的二重ストランド D N A を单一ストランド D N A 鑄型に分離させる。プライマーの D N A 鑄型の末端へのアニーリング ( すなわち、序列 - 特異的混成化または結合 ) は、約 60 ℃未満まで反応混合物を徐々に冷却することによって行われる。その後、複製、すなわち、プライマー延長とも知られた過程の間に、温度を約 70 ℃以上まで上昇させる。重合酵素は 50

、各DNA鑄型ストランドを3'から5'方向に解読し、プライマーの末端から相補的な序列を5'から3'方向に合成する。これは、DNA増幅の1サイクルを完成し、新たなサイクルのための開始物質を生成する。それぞれの完全なサイクルは、変性、プライマーアニーリング、及びプライマー延長で構成され、その過程は、指数的に増加する数( $2^n$ )の元来の標的DNA序列のコピーを生成する。新たなサイクルを開始するために、反応混合物は、再び90以上まで加熱されて、二重ストランド生成物を单一ストランドDNA鑄型に変性させる。その後、プライマーアニーリング及び延長ステップが反復される。

#### 【0004】

このような基本的なPCR増幅体系は、多様な拡張及び変形と共に、核酸の操作及び検出のための多数の異なる方法、例えば、診断分析及び法医学的分析を含む方法を可能にし、この方法は、少量の初期試料からしきい値量のDNAを生成することを必要とする。PCR技術は、例えば、伝染性疾患及び遺伝性疾患のモニタリング、DNA及びRNAの序列決定、遺伝子発現研究、薬物開発、及び法医学的フィンガープリンティングで利用される。これは、ウイルス性病原菌及び細菌性病原菌の検出、同定及び定量のための標準技術となった。色々なPCR-基盤の診断テストは、例えば、AIDSを誘発するHIV-I；肝癌を誘発しうるB及びC型肝炎ウイルス；子宮頸部癌を誘発しうる人間乳頭腫ウイルス；乳児の肺炎及び気管支炎の主要な原因であるRSVと、女性の骨盤炎症性疾患及び不妊を誘発しうるクラミジアトラコマチス及びネイセリアゴナホエア；移植患者及び他の免疫弱化者の生命を威嚇する疾患を誘発しうるサイトメガロウイルス；及び活性状態で咳及び疲労を誘発し、感染された機関を回復不能に損傷させうるマイコバクテリア結核；を含む病原菌の検出及び/または定量のために利用可能である。しかし、多数の分野で必要性を充足させているにも拘わらず、現在のPCR及びPCR-基盤技術は、依然として色々な根本的な限界点を有する。

#### 【0005】

##### 通常的なPCR及びPCR-基盤技術の限界点

忠実度：正常的な序列に対する正確性が通常的なPCRを制限する。例えば、DNAの増幅のために通常的に利用される耐熱性重合酵素であるTaqは、PCRの間に約 $1 \times 10^{-4}$ 個のエラー/塩基対のエラー率を表す。これは、400個の塩基対から構成されたDNA序列のPCR増幅は、20サイクルの間にPCR生成物の全ての分子のうち、約40,000個のエラーを任意的に導入するということを意味する。

#### 【0006】

難しい標的序列（例えば、GC含量の高い序列または反復序列）に対する正確性は、通常的なPCR及びPCR-基盤技術の非常に重要な限界点である。Taqのような通常的な重合酵素反応のエラー率は、標的ヌクレオチド序列に大きく依存する。例えば、序列がG+C含量が高い場合（例えば、鶏のアビジン遺伝子の5'調節領域での序列）、TaqによるPCRは、度々実行可能な方法ではない。同様に、トリヌクレオチド反復序列（AGC）nまたは連續反復序列（A）nのような単純な反復序列は、TAGのエラー率を反復序列当たり $1.5 \times 10^{-2}$ 個のエラーまで増加させうる。非特許文献1を参照する。この理由のため、さらに高い忠実度（すなわち、さらに低いエラー率）を有するように遺伝工学的に開発された重合酵素に対して、色々な特許が許与された。これらは、Hi-Fi fidelity及びPhusion重合酵素を含む。

#### 【0007】

長さの制限：増幅される標的序列の長さもまた、現在のPCR技術を制限する。一部報告は、10ないし20キロベースまでの序列の増幅を主張するが、これは、通常的な実施では非常に稀であり、非常に難しい。また、長い標的鑄型のPCR増幅は、限定されたセットの適切なDNA序列上でのみ可能である。適切な序列上で非常に日常的であり、コスト効率的なDNA増幅のための現実的な上限は、約300ないし400個の塩基から構成された長さであり、一般的に、G-C含量の高い序列に対しては、その上限が低くなる。

#### 【0008】

制限された増幅：現在のPCR技法はまた、一つの反応混合物で行われうる増幅サイク

10

20

30

40

50

ルの数でも制限される。反復的な加熱及び冷却サイクルは、漸進的な酵素分解（劣化）をもたらし、これは、開始物質が増幅されうる増幅係数を制限する。通常的なPCR増幅が30～35サイクルを超える場合は、非常に稀である。

#### 【0009】

**堅 固 度**：通常的なPCRは、一般的に相当な容量の試薬、体積の大きい装置（例えば、温度循環器）、相当な人間労働力（例えば、退屈な最適化）、及び最少量の開始物質を必要とし、それぞれは、通常的なPCRを高コスト及び相当な時間のかかる方法で作るのに寄与する。現在のPCR技法は、通常的に正常的な序列に対しては、数時間かかるが、難しい序列または長い鋳型に対しては、数日ないし数週かかる。通常的なPCR技法は、反応混合物の温度を循環及び平衡化させるために、相当な量の時間を必要とする。また、理想的でない状態の標的をはっきりと増幅させるためには、時間のかかる最適化が要求される。10

#### 【0010】

通常的なPCR技法を行うためには、細密に制御された条件（例えば、温度、pH及び緩衝溶液の構成成分）が要求される。また、多様な汚染物が標的DNAまたはRNAをコピーするために利用される重合酵素を直接的に抑制または妨害して、PCR増幅を妨害しうる。これは、増幅のために利用されうる開始物質の品質をさらに制限し、増幅ステップがはっきりと行われる前に、DNAまたはRNA抽出技法によって取得されねばならない純度のレベルに追加的な要件を賦課する。通常的なPCRの実行環境は、一般的に実験室に限定され、遠距離場所、医者の診療室、患者の寝床、または野外ではほとんど実行できない。20

#### 【0011】

**診断の敏感度及び特異性**：PCR-基盤の診断及び法医学用キット及び分析法の敏感度は、PCR反応で達成可能な全体収率、正確度、堅 固 度、及び標的の長さに依存的である。現在のPCRの性能パラメータについての前述した限界点は、PCR増幅をはっきりと行うために必要な開始DNAまたはRNAの最少量に限界を設定する。これはまた、通常的なPCRまたはPCR-基盤技術に依存する病原菌検出システム、診断または法医学用キットまたは分析法の敏感度を制限する。PCR-基盤診断、法医学、または病原菌検出システムの特異性は、DNAが増幅されかつ解読される正確性及びはっきりと増幅されかつ確認されうる標的DNAまたはRNAの長さに臨界的に依存的である。30

#### 【0012】

このような理由及びその他の理由のため、現在のPCR-基盤技術及び検出システムは、全体速度、効率性、コスト-効率性、及び用途の範囲の側面で一般的に制限される。通常的なPCR方法及び装置に対する漸進的な改善が、前述した分離された性能パラメータのうち一部に対して提案された。例えば、Tsoらは、2003年9月2日に許与された特許文献3で、試料流体の微量を利用してDNAを増幅するPCRマイクロ反応器を開示する。高温でのDNA変性に対する代案も提案された。例えば、Purvisは、2001年9月18日に許与された特許文献4で、二重ストランド核酸の電気化学的な変性方法を開示した。Stanleyは、2001年3月6日に許与された特許文献5で、さらに他の核酸の電気化学的な変性方法を開示する。Dattaguptaらは、2001年4月10日に許与された特許文献6で鋳型からDNAストランドを置換するためにプライマーを使用する方法を開示した。また、Mullisは、まずDNAストランドを分離するためにヘリカーゼ酵素の利用を提案した。40

#### 【0013】

通常的なPCRの限界点を考慮するとき、多様な漸進的な改善に対する提案にも拘わらず、本発明が属する技術分野で核酸の増幅、操作、序列決定、及び検出のための改善された方法、装置及び組成物に対する必要性が存在する。

【特許文献1】米国特許第4,683,202号明細書

【特許文献2】米国特許第4,683,195号明細書

【特許文献3】米国特許第6,613,560号明細書50

【特許文献4】米国特許第6,291,185号明細書

【特許文献5】米国特許第6,197,508号明細書

【特許文献6】米国特許第6,214,587号明細書

【非特許文献1】Shinde et al., Nucleic Acids Research, 31: 974

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の方法及び装置は、PCRを行う革新技術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】

【0015】

本明細書に記載の技術は、PCRが温度循環に対する依存なしに実行可能にする。本技術は、広範囲な周囲温度でまたは制御された温度で適用されうる。複製及び増幅の間に、必要に応じて、正確な制御が可能であり、これにより、多数の性能パラメータでの実質的な改善を可能にする。“ナノ-PCR<sup>TM</sup>”と呼ばれるこの技術は、核酸のPCR-基盤の検出及び増幅に新たなパラダイムを導入する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

定義

“核酸”、“ポリヌクレオチド”、及び“オリゴヌクレオチド”という用語は、本明細書でリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含むが、これに限定されていない任意の長さのヌクレオチドの重合体形態を含むために使われる。この用語間に長さに対して意図された区分はない。また、この用語は、該分子の一次構造のみを意味する。したがって、特定の具体例で、この用語は、三重ストランド、二重ストランド及び单一ストランドDNA及び三重ストランド、二重ストランド及び单一ストランドRNAを含みうる。それらはまた、メチル化及び/またはキャッピングによるようなポリヌクレオチドの変形された形態及び変形されていない形態を含む。さらに詳細には、“核酸”、“ポリヌクレオチド”、及び“オリゴヌクレオチド”という用語は、(2-デオキシ-D-リボースを含む)ポリデオキシリボヌクレオチド、(D-リボースを含む)ポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-またはC-グリコシドのその他の種類のポリヌクレオチド及び非ヌクレオチド系バックボーン、例えば、ポリアミドを含むその他の重合体類(例えば、ペプチド核酸(PNA))及びポリモルフォリノ(Anti-Virals, Inc. Corvallis, OregonからNeugeneに購入可能である)重合体、及び重合体がDNA及びRNAで発見されるような塩基対の形成または塩基スタッキングを可能にする配列で核塩基を含む場合、合成序列-特異的核酸重合体を含む。

【0017】

本明細書で使われる“プライマー”は、適した温度及び適した緩衝溶液に浸された適した条件(すなわち、4種類のヌクレオシド三リン酸及びDNA重合酵素またはRNA重合酵素または逆転写酵素のような重合作用剤の存在)下で、鋳型-誘導DNA合成の開始点として作用できる单一ストランドのポリヌクレオチドを意味する。プライマーの適した長さは、プライマーの意図された用途に依存的であるが、一般的に7個以上のヌクレオチドで構成された長さであり、さらに一般的には、10個ないし30個のヌクレオチドで構成された長さである。他のプライマーは、30個ないし50個のヌクレオチドで構成された長さのように、長さがさらに長いこともある。PCRプライマーは、通常的に約20~30個の塩基対で構成される長さであり、標的序列の上流に位置した(すなわち、5'から3'方向)一側のストランド及びその序列の下流に位置した(すなわち、3'から5'方向)その反対側のストランドに相補的に選択される。プライマーの5'末端は、増幅されたPCR生成物の末端を限定する。プライマーは、AT含量とほぼ同じGC含量を含み、一つの塩基で構成された長い部位は含めない。また、プライマーは、相互間に実質的に相補的な構造を含んではならない。これは、“プライマーニ量体”または他の二次構造が形成

10

20

30

40

50

されていないことを保証する。短いプライマー分子は、一般的に鑄型と十分に安定的なハイブリッド複合体とを形成するために、さらに低い温度を要求する。プライマーが鑄型の正確な序列を反映する必要はないが、鑄型と混成化されるのに十分な程度に相補的でなければならない。“プライマー部位”または“プライマー結合部位”という用語は、プライマーが混成化される標的DNAのセグメントを意味する。“プライマー対”という用語は、増幅されるDNA序列の5'末端の相補体と混成化する5'“上流プライマー”及び増幅される序列の3'末端と混成化する3'“下流プライマー”を含む一セットのプライマーを意味する。

#### 【0018】

本明細書で使われる“相補的”という用語は、一つの核酸が他の核酸分子と一致するか、またはそれに選択的に混成化されるということを意味する。混成化の選択性は、特異性の完全な不在よりさらに選択的な混成化が発生する場合に存在する。通常的に、選択的な混成化は、14～25個以上のヌクレオチドで構成された部位に対して、約55%以上の一致性、択一的に65%以上、75%以上、または90%以上の一致性がある場合に発生するであろう。択一的な一具体例で、一つの核酸は、他の核酸に特異的に混成化される。*M. Kanehisa, Nucleic Acids Res. 12: 203 (1984)* を参照する。

#### 【0019】

“完壁に相補的な”プライマーは、プライマーの全体長さにわたって完全に相補的な序列を有し、不一致を含まない。プライマーは、通常的に標的序列の一部（サブ序列）に完壁に相補的である。“不一致”は、プライマーのヌクレオチドとそれと整列された標的核酸のヌクレオチドとが相補的でない部位を意味する。プライマーと関連して使われる場合、“実質的に相補的な”という用語は、プライマーがその標的序列に完壁に相補的ではなく、その代りに、プライマーの所望のプライマー-結合部位でそれぞれのストランドに選択的に混成化されるのに十分な程度にのみ相補的であるということを意味する。

#### 【0020】

本明細書で使われる“プローブ”は、一つ以上の種類の化学結合、通常的には相補的な塩基対の形成を通じて、通常的には水素結合の形成を通じて相補的な序列の標的核酸に結合し、これにより、二重ストランド構造を形成できる核酸である。プローブは、“プローブ結合部位”に結合するかまたは混成化される。プローブは、特に、一旦プローブがその相補的な標的に混成化された後、プローブの容易な検出を許容するために検出可能な標識で標識されうる。プローブに付着された標識は、例えば、化学または物理的な手段によって検出されうる、本発明が属する技術分野で公知された多様な標識を含みうる。プローブに付着されうる標識は、放射性同位元素、蛍光発光団、発色団、金粒子、量子点、質量標識、電子密集粒子、磁性粒子、スピノン標識、化学発光を放出する分子、電気化学的に活性である分子、酵素、補助因子及び酵素基質を含むが、これに限定されない。プローブは、サイズが非常に多様でありうる。一部プローブは、比較的短い。一般的に、プローブは、7個ないし15個以上のヌクレオチドで構成された長さである。他のプローブは、20個、30個、または40個以上のヌクレオチドで構成された長さである。さらに他のプローブは、長さがさらに長く、50個、60個、70個、80個、90個以上のヌクレオチドで構成された長さである。しかし、他のプローブは、長さがさらに長く、100個、150個、200個またはそれ以上のヌクレオチドで構成された長さである。プローブは、前述した範囲内に属する任意の特定長さでありうる。

#### 【0021】

“好熱性DNA重合酵素”は、40°Cを超える、機能を發揮する最適温度を有する耐熱性DNA重合酵素である。度々、好熱性DNA重合酵素の機能のための最適温度は、50°Cないし80°C、または60°Cないし80°Cの範囲である。このような耐熱性酵素は、通常的なPCRの間に酵素の加熱及び冷却の反復されたサイクルに対して、堅固度をさらに提供するために導入された。

#### 【0022】

10

20

30

40

50

“難しい序列”は、重合酵素がその上で滑るか、ミスをするかまたは作用を中断する傾向のある序列を意味する。難しい序列の例は、G C - 高含量序列と呼ばれる約50%より高い比率のGとCの塩基対を有する一部残分の序列（例えば、6個、9個、12個、15個、または30個の塩基対またはそれ以上の長さのセグメント）、連續的な反復セグメントを含む序列、ポリ-A序列のようなポリ反復序列、ハンティングトン病のような特定の疾患と関連した序列で発見されるトリヌクレオチド反復領域、及びその他そのような問題性序列を含む。

#### 【0023】

##### 通常的なPCRの概要

好熱性（すなわち、耐熱性）DNA重合酵素を利用した標準温度循環式のPCRを行うために、通常的に下記のステップを実行する：1) チューブにPCR用の緩衝溶液、dNTP混合物、プライマー対、DNA重合酵素、及び二重脱イオン水を含むカクテルを準備するステップと、2) 前記チューブに増幅されるDNAを添加するステップと、3) 前記チューブを温度循環器（例えば、Perkin-Elmer<sup>TM</sup> 9600または9700 PCR Thermal Cycler）の温度ロックに配置するステップと、4) 約25回ないし30回のサイクルの間に反復される特定の反応条件（例えば、約1ないし2分間、約90以上まで加熱して二重ストランドDNAの熱変性を行う期間、2分間徐々に約50ないし65まで冷却してアニーリングする期間、及び数分間約70ないし75

まで加熱してプライマー延長と呼ばれる重合を行う期間）で温度循環器をプログラミングするステップ。前記方法を実行すれば、開始物質の約 $2^n$ 倍の増幅を生成し、前記で、nは、行われる増幅サイクルの総数である。

#### 【0024】

通常的なPCRの一部の限界点は、通常的な技法が一般的に行われる方法から誘発される一方、性能パラメータにおける色々な限界点は、直接または間接的に温度循環に対する依存から誘発される。全体反応収率、増幅効率性、敏感度、堅固度、及び移動性はそれぞれ、例えば、温度循環によって制限される。Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、温度循環による限界点だけでなく、通常的なPCRの一般的な実行に内在された限界点を克服する。

#### 【0025】

##### Nano-PCR<sup>TM</sup>

Nano-PCR<sup>TM</sup>方法及び装置は、通常的な方法によって賦課される色々な限界点を克服することによって、PCRの検出及び増幅能力を飛躍的に拡張させうる。表1は、現在のPCRの一般的な性能パラメータをNano-PCR<sup>TM</sup>と比較する。

#### 【0026】

## 【表1】

【表1】  
現在のPCR対応Nano-PCR™の性能パラメータ

性能パラメータ	現世代PCR	Nano-PCR™方法及び装置
正確度- 正常的な序列	約 $1 \times 10^{-4}$ 個のエラー／塩基対の典型的なエラー率	約 $1 \times 10^{-7}$ 個のエラー／塩基対未満のエラー率または改善がさらに可能である
問題性のある序列 (GC-高含量または反復序列) の複製時の正確度	約 $1.5 \times 10^{-2}$ 個のエラー／反復序列の典型的なエラー率	複製過程の正確性制御を通じて約 $1.0 \times 10^{-3}$ 個のエラー／反復序列未満のエラー率が達成されうる
増幅された序列の長さ	通常に約300-400個の塩基対に限定される	20,000個の塩基対までの延びた序列を増幅できる
全体反応収率	試薬及び重合酵素の分解が一般的に約30-35サイクルと増幅を制限する	試薬は、DNA増幅の100回以上のサイクルを耐えられる
コスト	温度循環器は、一般的に約\$4,000以上かかる	Nano-PCR™を行うために、小型で比較的低成本の装置が製造されうる
全体PCR反応時間	数時間ないし数日かかる	1時間未満で行われうる
移動性	実験室環境に限定されたベンチトップ装置で行われる	携帯用装置で行われる
堅固度	細密に制御される運用条件、すなわち、温度、pHが要求される。高度の純粋な開始物質が必要である	温度及びpH変移が可能である。さらに広範囲な開始物質で作業が可能である。可能な汚染物に対してさらに耐性があり、開始物質の準備のためにさらに少なく精巧な抽出方法が適用可能である
敏感度	通常に1000個以上のポリヌクレオチド/mL分析物が要求される	10個未満のポリヌクレオチド/mL分析物が要求される
特異性	診断用キットで偽陽性率が15%を超える	診断用キットで偽陽性率が12.5%よりはるかに低いこともできる。改善された特異性は、標的DNAまたはRNAの序列を確認するために利用される高コストの事後-処理及び生物情報学段階に対する必要性を減少させる

## 【0027】

今まで実行されているPCR及びPCR-基盤技術の共通要素は、順次にDNAを変性し、プライマーをアニーリングし、重合酵素を通じてプライマーを延長する温度循環の利用であった。Nano-PCR™と呼ばれる、本明細書に記載の方法及びその方法を行うための装置は、DNAまたはRNA増幅を行うための温度循環に対する新たな代案を提供するために核酸分子に制御された量の力または応力を適用することを利用する。本明

10

20

30

40

50

細書で使われるよう、核酸に応力を適用することは、核酸を伸張または延長する傾向のある力の核酸に対する直接的及び間接的な適用を含む。例として、応力は、核酸分子自体及び／または核酸に結合された表面、基板、または粒子上に作用するか否かに関係なく、機械的張力の直接適用、流体流れで水力学的な応力または電磁気場によって核酸に適用されうる。複数の応用で、Nano - PCR<sup>TM</sup>は、伝統的に通常的なPCRの性能及び範囲を制限している一つまたはそれ以上の限界点を克服しうる。

### 【0028】

#### 機械的張力の循環

核酸に対する制御された張力の適用は、二重ストランドDNA(dsDNA)の熱変性に対する代案だけでなく、PCR過程の各ステップを正確に制御できる独特の能力を提供する。Nano - PCR<sup>TM</sup>は、DNA / RNA分子及び／または重合酵素に対する機械的応力、水力学的応力、または電磁気的応力のような正確に制御される力の効果を利用してDNAまたはRNAを増幅する新たな接近方法を導入する。

### 【0029】

DNA分子を含む溶液の温度を上昇させること及びDNA分子に対する応力を増加させることは、類似した結果を生成する。したがって、重合酵素反応サイクルは、DNAを変性させるためにDNA鑄型に適用される張力を約65pN以上まで増加させることによって開始されうる。プライマーのアニーリングに該当するステップは、プライマーが鑄型にアニーリングされるようにDNA鑄型に対する張力を徐々に約50pN未満まで減少させることによって行われうる。その後、DNA鑄型での張力は、複製の進行、速度及び／または正確度を制御するために、酵素による重合を通じたプライマーの延長の間に約0ないし約30pNで調節されうる。通常的なPCRの温度循環のように、Nano - PCR<sup>TM</sup>方法では、応力の循環が事前にプログラミングされたサイクルで反復されうる。

### 【0030】

下記の実施例で、この方法が実行されうる多様な様式が記載される。機械的張力のように、核酸分子に適用された水力学的応力及び／または電場が温度循環に対する依存なしにNano - PCR<sup>TM</sup>を行うために循環されうる。もちろん、Nano - PCR<sup>TM</sup>方法は、いかなる温度循環なしにも行われうるが、これは、以下でさらに詳細に議論されるように、温度の制御が一部の具体例で有利でないということを意味しない。図1A及び図1Bは、Nano - PCR<sup>TM</sup>方法の代表的なフローチャートを示す。基本的なプロトコルに対する変形及び追加が、序列の決定、クローニング、突然変異の生成、突然変異の選別、及び病原菌の検出のような特定課題のために適合になされうるということが分かるであろう。

### 【0031】

室温及び標準緩衝溶液の条件で、二重ストランドDNAに約65pN以上の張力を適用すれば、単一ストランドDNA(ssDNA)への変性(すなわち、融解)を誘発しうる。本明細書で使われるよう、"室温"は、安らかな実験室温度の正常的な範囲内の温度、一般的に、約20 - 22と理解される。室温でDNAの力 - 誘導融解に対する理論的なモデルがIoulia Rouzina及びVictor A. Bloomfieldによって説明された("Force - Induced Melting of the DNA Double Helix 1. Thermodynamic Analysis" Biophys J., 80: 882 - 93, 2001; 及び、"Force - Induced Melting of the DNA Double Helix 2. Effect of Solution Conditions" Biophys J., 80: 894 - 900, 2001)。本明細書に記載されたようなRouzina及びBloomfieldingの式を利用して、本発明が属する技術分野の当業者が通常的な融点温度の計算と類似した方式でプライマーを融解する張力の正確なレベルを決定することが可能である。

### 【0032】

プライマーオリゴヌクレオチドの存在下に適用された張力を約65pN未満に徐々に減少させれば、温度循環器で変性されたDNAをプライマーの融点温度未満に徐々に減少さ

10

20

30

40

50

せることと類似した方式でプライマーを選択的に鋳型DNAに結合させうる。したがって、プライマーアニーリングステップの間に、核酸鋳型ストランドに適用された張力は、d s DNAの融解を誘発する量からプライマーアニーリングを可能にする量まで徐々に減少しうる。また、非特異的な結合及び非特異的なプライマーの延長を最小化するために、結合されていないプライマーが反応チャンバから除去されるまで、DNAストランドに対する張力を、重合酵素作用を実質的に妨害するレベルで、例えば、約30 pNまたはそれ以上や約50 pN未満で維持することが望ましい。

#### 【0033】

約0ないし約30または35 pNの範囲にある張力を核酸鋳型に適用することが重合酵素の活性の速度を低下させるために利用されうる。酵素の正確な速度は、重合酵素及び/またはヌクレオシド三リン酸基質の周囲温度または周囲濃度を含む多様な因子に依存する。室温で約35 - 45 pNより大きい張力は、重合酵素の自然的な校正エキソヌクレアーゼの活性を促進する。

#### 【0034】

Nano - PCR<sup>TM</sup>方法の代表的な具体例は：(a) 標的序列を含む二重ストランドDNA(d s DNA)の試料、一つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー、例えば、標的序列の3'末端及びその相補体に相補的なプライマー対と、4種類以上のヌクレオシド三リン酸(すなわち、ATP、CTP、GTP、TTP)と、DNA重合酵素とを提供するステップと、(b) 非温度駆動過程、例えば、d s DNAをssDNAに融解させるのに十分な張力(例えば、約65 pNを超える張力)の適用を利用して前記d s DNAを単一ストランドDNA(ssDNA)鋳型ストランドに変性させるステップと、(c) 前記非温度駆動過程を制御して、プライマーの相補的な鋳型ストランドへの混成化を促進するステップ、例えば、d s DNAを変性させるために張力を利用した場合、ssDNAに適用される張力を減少させる場合と、(d) 前記DNApがd s DNAを形成するためにプライマーを延長せしめるステップと、(e) 所望の量のDNA序列の増幅を取得するまでステップ(b-d)を反復するステップと、を含みうる。

#### 【0035】

本明細書に記載された方法で、“非温度駆動過程”の利用は、例えば、d s DNAの変性がd s DNAの融点温度以上まで温度を増加させることを通じてのみ達成されるのではなく、温度に依存していない物理的または機械的な力が核酸に適用されるということを意味する。非温度駆動過程は、DNAストランドに張力を適用するステップ、例えば、機械的な力の直接適用によって、流体の流れによって、電場の適用によって、及び/または一つ以上の変性剤の作用によって張力を適用するステップを含みうる。本明細書に記載されたように、そのような力の効果は、温度によって影響を受けるので、所定の状況で前記方法の一つ以上のステップの間に温度を制御し、選択的に調整することが望ましい。

#### 【0036】

増幅される標的序列は、単離されたDNAまたは核酸混合物に含まれ、同一または同一でない長さの相補的なストランド上に含まれうる。方法はまた、RNAを含む組成物として開始するステップ及び逆転写酵素または類似した方法を利用して、DNA鋳型を生成するステップを含みうる。標的序列は、代案的に単一ストランドの核酸上に提供され、これは、第1循環でステップ(b)が不要になる。ステップ(a)の反応成分は、手順の開始時に組合わせられるかまたは必要に応じて別途に導入されうる。選択的に、反応成分はまた、特定のステップの間に反応チャンバから除去されうる。例えば、ヌクレオシド三リン酸(NTPs)は、ステップ(d)の間またはその前に導入され、プライマーは、ステップ(c)の間またはその前に導入され、結合されていないプライマーは、プライマー延長(複製)ステップ前にチャンバから除去されうる。また、本発明の多様な具体例で、約0 - 45 pN、約0 - 35 pN、または約0ないし20 pNの範囲にある張力が、ステップ(d)の間に鋳型DNAストランドに適用されうる。そのような具体例で、ステップ(d)の間に鋳型ストランドに適用される張力の量は、選択的に経時的に変わりうる。ステップ(d)で、鋳型ストランドに適用される張力の量は、G-C高含量のセグメント(例え

10

20

30

40

50

ば、約 50 % 以上の G - C 塩基対または 70 % 以上の G - C 塩基対を含むセグメント) のような難しいかまたはエラー発生の頻繁なサブ序列の位置または反復序列を含むセグメントの位置を基準として、重合酵素の公知のまたは推定された進行によって変わりうる。

### 【 0 0 3 7 】

#### 正常序列及び“難しい”序列に対する Nano - PCR<sup>T M</sup> の正確度

プライマー延長ステップの間に鑄型 DNA に張力が適用される場合、重合酵素は、“逆方向”へ誘導され、重合酵素のエキソヌクレアーゼ活性が優勢でありうる。原子水準及び單一重合酵素 / エキソヌクレアーゼステップの順序に対して、経時的にその過程は確率的であると理解されるであろう。しかし、色々なステップの時間規模に対する平均から考慮すれば、重合酵素は、適用される張力が所定の温度及び溶液条件で理論的に予測されうるしきい値より大きい時、持続的なエキソヌクレアーゼ活性を表すと見なされる。

### 【 0 0 3 8 】

重合酵素のエキソヌクレアーゼ活性が優勢になるしきい値未満の量に調整された量の張力、例えば、室温及び正常的な PCR 溶液条件下で約 35ないし 45 pN 未満、さらに望ましくは、約 10ないし 30 pN の範囲にある量の張力を鑄型 DNA に適用することによって、Nano - PCR<sup>T M</sup> は、通常的な PCR に比べて実質的に向上した正確性の DNA 複製を提供しうる。また、この効果は、通常的な PCR 方法を利用し難いサブ序列に対して達成されうる。多少問題性のあるセグメントの混合を含む鑄型に対するプライマー延長の間に、経時的に鑄型 DNA ストランドに適用される張力の量は、0ないし 45 pN、約 0ないし 35 pN、または約 0ないし 20 pN の範囲で調節されうる。例えば、序列のマップによれば、張力は、難しい領域に対して向上した正確性を図るために約 35 pN 未満のレベルまで必要に応じて増加させ、その後、問題性の少ないセグメント上でのさらに速い進行を許容するために注意して減少させうる。鑄型ストランドの長さは、プライマー延長の間に変わる。方法の一部変形で、鑄型ストランドの長さの変化に対する直接的な対応で鑄型に対する張力を調節して、重合反応の進行及び“難しい”サブ序列の特定位置によって正確に適用される張力を調整することが可能である。重合酵素の進行を直接的にモニタリングすることが現実的でない具体例で、重合酵素の位置は、適用された張力の量で重合酵素の公知の複製速度にかかる時間を乗算することによって推定されうる。

### 【 0 0 3 9 】

したがって、Nano - PCR<sup>T M</sup> は、通常的な PCR に比べて実質的に向上した正確度で正常的な標的鑄型だけでなく、難しい序列 ( 例えば、G C - 高含量 DNA 、連続反復序列、マイクロサテライトまたはトリヌクレオチド反復 DNA ) が複製されかつ增幅される正確な複製を可能にする。現在利用可能な最も高い忠実度の重合酵素のうち一つ ( 例えば、Phusion Enzyme ) が通常的な温度 - 駆動 PCR で利用される一実施例で、有利な場合、すなわち、適切な序列上で約  $4.0 \times 10^{-7}$  個のエラー / 塩基対のエラー率が観察される。これと対照的に、本明細書に記載された Nano - PCR<sup>T M</sup> 方法は、約  $1.0 \times 10^{-7}$  個未満のエラー / 塩基対のエラー率、 $5.0 \times 10^{-8}$  個未満のエラー / 塩基対のエラー率、 $1.0 \times 10^{-8}$  個のエラー / 塩基対、 $5.0 \times 10^{-9}$  個のエラー / 塩基対、 $1.0 \times 10^{-9}$  個のエラー / 塩基対、 $5.0 \times 10^{-10}$  個のエラー / 塩基対、ひいては  $1.0 \times 10^{-10}$  個のエラー / 塩基対のエラー率をもたらしうる。また、本明細書に記載された方法は、50 % 、60 % 、70 % 、75 % 、ひいては 80 % または 85 % より高い G C 含量を有するオリゴヌクレオチド断片の効率的な增幅を可能にしうる。

### 【 0 0 4 0 】

特定の場合で、オリゴヌクレオチド断片は、8 個以上の塩基対で構成された反復的な塩基対単位のセクション ( 例えば、A A A A A A A A 、G C G C G C G C ) を含む。通常的な PCR のエラー率は、そのような場合で増加されて、通常的に  $1.0 \times 10^{-2}$  個のエラー / 塩基対に接近する。本発明の Nano - PCR<sup>T M</sup> 方法は、約  $1.0 \times 10^{-3}$  個未満のエラー / 塩基対未満のエラー率で反復的な塩基対単位の增幅を提供する。特定の条件下で、 $1.0 \times 10^{-4}$  個未満のエラー / 塩基対のエラー率、 $1.0 \times 10^{-5}$  個のエラ

10

20

30

40

50

ー / 塩基対、 $1.0 \times 10^{-6}$  個のエラー / 塩基対、または $1.0 \times 10^{-7}$  個のエラー / 塩基対の誤り率が達成されうる。このような低いエラー率はまた、反復される塩基対単位が 10 個以上の塩基対で構成された長さ、15 個以上の塩基対で構成された長さ、または 20 個以上の塩基対で構成された長さの場合に収得されうる。本明細書に記載された方法で、そのような結果はまた、通常的な PCR 方法を利用する場合、難しい序列であるマイクロサテライト領域、重合酵素のずれ領域、及びその他の連続反復領域に対して収得されうる。

#### 【 0 0 4 1 】

##### 増幅効率性

増幅効率性が式  $N_1 = N_2 (1 + Y)^n$  によって定義され、 $N_1$  は、生成物コピーの数であり、 $N_2$  は、鑄型オリゴヌクレオチドコピーの数であり、 $n$  は、サイクルの数、 $Y$  は、効率性の場合、80 % より高い効率性が達成される。特定条件下で、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、ひいては 99 % より高い増幅効率が達成されうる。そのような増幅効率性はまた、オリゴヌクレオチドの GC 含量が 55 %、60 %、65 %、70 %、ひいては 75 % より高い場合でも収得されうる。オリゴヌクレオチド断片の GC 含量が 50 %、55 %、60 %、65 % または 70 % より高い場合で、50 % より高い増幅効率性が達成されうる。60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、97 %、ひいては 99 % より高い効率性が収得されうる。通常的な PCR で、このような GC - 高含量領域は、水酸化ナトリウム、塩化 TMA 、シウ酸 TMA 、硝酸 TMA 、TMA 硫酸水素、塩化アンモニウム、ベンジルジメチルヘキサデシル塩化アンモニウム、臭化 HTA 、シウ酸 HTA 、ベタイン - 水化物、DMSO 、及びホルムアミドを含むが、これに限定されない多様な変性剤の添加と共に増幅され、その序列が決定される。Nano - PCR™ の特定の具体例では、そのような PCR 添加剤の不在下に本明細書に記載された方法を利用した効率的な増幅が観察される。

#### 【 0 0 4 2 】

##### 堅 固 度 及 び 適 応 性

通常的な PCR 方法は、一般的に温度の正確な制御及び循環に依存する。また、通常的な PCR 方法は、多様な変性剤及び退屈な最適化のような追加的な因子を必要とするであろう。しかし、本明細書に記載されたように、増幅を推進するための張力循環の利用は、PCR 過程に対して温度循環単独によって許容されるよりはるかに高い正確度及び制御を可能にする。また、本明細書に記載された方法は、選択された重合酵素が作用できる温度範囲及び所定の張力でプライマー / 鑄型結合の融点温度のような因子によってのみ限定され、広範囲な温度条件下で作用できる。

#### 【 0 0 4 3 】

もちろん、温度が張力下で重合酵素の速度、正確度及び DNA の融解に影響を及ぼしうると理解されるであろう。一般的に、dsDNA を融解させるために要求される張力の量は、温度上昇によって減少する。概略的なガイドとして、dsDNA を融解させるために約 0 ないし 20 、約 75 pNまでの張力が要求されうる。約 60 で、dsDNA を変性させるために要求される張力の量は、約 45 pN ありうる。融解張力は、ガラス DNA 融点の直下で約 7 pN まで減少する。

#### 【 0 0 4 4 】

一般的には不要であるが、個別的な適用の要件によって本方法の一つ以上のステップの間に温度を制御することが有利でありうる。例えば、反応混合物の温度は、選択された DNA 重合酵素の正確度、重合速度、及び / または張力反応を最適化し、DNA 融解を達成するために要求される張力の量を増加または減少させるか、または個別的な装置または作業環境のために有利な温度で維持されうる。別途に所望しなければ、温度は、一般的に一定であり、全体過程は、正常的な室温またはその付近で行われうる。別途に表示されなければ、本明細書の実施例は、室温で適合な量の張力を利用して記載される。当業者は、さらに高いかまたは低い温度に対して DNA 鑄型に適用される張力を容易に調節しうる。

#### 【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

少量の張力の適用を通じても、熱循環温度は、P C R 反応が行われねばならない温度をそれ以上制限しない。約 7 ないし 4 5 p N の張力を適用することによって、例えば、二重ストランド D N A が変性される温度を約 3 0 ℃まで低下させうる。D N A に適用される張力の量を調整して通常的な P C R で変性のために要求される量よりはるかに低い温度で P C R の実行を可能にする。この効果は、小さい振幅の温度循環を利用した P C R を可能にする。例えば、方法は、約 6 5 p N 未満の力が溶液の温度の約 9 0 ℃未満まで、約 8 0 ℃未満までの上昇と共に調和されて適用される変性ステップを含みうる。

#### 【 0 0 4 6 】

本明細書に記載された方法及び装置は、9 0 ℃未満の温度で行われるかまたは作動される。例えば、オリゴヌクレオチドの変性ステップは、8 0 ℃、7 0 ℃、6 0 ℃、5 0 ℃、4 0 ℃、3 0 ℃、ひいては 2 5 ℃未満で行われうる。アニーリングステップは、5 0 ℃、4 5 ℃、4 0 ℃、3 5 ℃、3 0 ℃、ひいては 2 5 ℃未満で行われうる。また、重合ステップは、7 0 ℃、6 0 ℃、5 0 ℃、4 0 ℃、3 0 ℃、ひいては 2 5 ℃未満で行われうる。

#### 【 0 0 4 7 】

同様に、D N A が含浸される溶液の pH 及びイオン強度が D N A の張力 - 誘導融解曲線に影響を及ぼしうる。したがって、本方法で D N A に適用される力のレベルを調節することによって、N a n o - P C R T M は、通常的な P C R に比べて、P C R 過程を行うためにさらに広範囲な溶液の pH 及びイオン強度の条件を利用可能にする。同様に、全てのかかるパラメータ及び追加的なパラメータは、プライマー延長の張力制御に影響を及ぼしうる。本明細書に記載の方法は、この効果のために調節され、ひいてはこの効果を利用しうる。したがって、N a n o - P C R T M 方法は、一般的にさらに広範囲な温度、イオン強度、p H 及び緩衝溶液の条件に対してさらに堅固であり、これは、N a n o - P C R T M がさらに広範囲な状況で開始 D N A または R N A の少なく厳格な抽出及び精製を必要として行われ、通常的な P C R の範囲を一般的に制限する多様な汚染物質及び酵素抑制剤に対してさらに大きい耐性を有しうるということを意味する。望ましい具現例で、汚染させる物質の存在は、N a n o - P C R T M 過程の一部であって試料をフラッシュンすることによって除去されうる。例えば、汚染物質を含む精製されていない D N A 試料がN a n o - P C R T M 装置に導入され、その D N A は、例えば、張力の制御された適用のために D N A を維持させる、本明細書に記載の手段によって反応チャンバ内に維持される。汚染物質は、反応チャンバからフラッシュングされて除去され、試薬は、チャンバ内にフラッシュングされて供給される。これは、N a n o - P C R T M 過程に実質的な堅固度を提供し、通常的な P C R に不適合な環境で迅速かつ正確な增幅を可能にする。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 機械的な力の直接適用を利用した N a n o - P C R T M

N a n o - P C R T M 方法は、D N A 変性及び / または D N A 重合酵素活性の正確な制御を提供できる非温度駆動過程であって、D N A ストランドに機械的な張力を直接適用する多様な方法を利用して行われうる。二重ストランドオリゴヌクレオチドに張力を適用する色々な相異なる方法がある。例えば、D N A ストランドは、移動可能な要素、個別的に制御可能な要素、または操作されうる粒子にアレイとして固定されうる。

#### 【 0 0 4 9 】

##### 対向するコーティングされた表面の利用 :

一例であって、図 2 A ないし図 2 C に示したように、対向するコーティングされた表面に固定された核酸を利用する方法が行われうる：コーティングされた表面は、各表面に対して同一かまたは相異なる第 1 複合体化分子（例えば、ストレプトアビシン）2 0 1, 2 0 7 を二つの基板表面 2 0 3, 2 0 9 に付着させることによって製造される。コーティングされた基板表面は、適した距離ほど離隔されて相互間に逆に配列される。一つの両末端が第 1 複合体化分子を認識して結合できる第 1 複合体化分子（例えば、ビオチン）に相補的な複合体化分子を含むものである二重ストランド核酸 2 0 5 がコーティングされた表面に固定される。コーティングされた表面間の距離を増大させるか、または表面のうち一つまたは両者を側面移動させることによって固定された核酸の末端に力が適用されうる。例

10

20

30

40

50

えば、基板のうち一つまたは両者は、圧電素子のような移動可能な要素であるか、または移動可能な要素を含みうる。d s D N A を融解させるのに十分な張力（例えば、室温で 65 p N を超える）が核酸に適用され、固定されたストランド及び遊離したストランドを生成しうる。固定されたストランド及び遊離したストランドは、何れも適したプライマー及び重合酵素を利用して複製されうる。望ましくは、固定されたストランドのみが複製されるように遊離したストランドは、フラッシュングされて除去され、選択的に回収されうる。対向する表面の位置は、固定された鋳型ストランドに適用される張力の量を調整するために複製の間に制御されうる。サイクルは、所望するほど反復されうる。

#### 【 0 0 5 0 】

対向するコーティングされた表面 2 1 5 , 2 1 7 を利用する方法を行う装置の変形で、一つの表面または二つの表面何れも、個別的に移動可能な要素 2 1 9 のアレイを形成するために配列され、それぞれは、図 2 C に示したようにプログラミング可能なプロセッサーによって駆動される制御回路によって個別的に処理されうる。そのような制御回路は、プロセッサーに力及び / または変位パラメータを報告するフィードバックチャンネルを含みうる。プリントイングまたはリソグラフィ技法が表面上に分子を固定する部位をパターン化するために利用されうる。前記方法を行う装置はまた、チャンバに試薬を導入するチャンネル、または前記コーティングされた表面を備えるチャンネル及び試薬を個別的にまたは組合させて伝達（及び選択的に保存）する機器及び反応生成物を回収する機器を備えうる。共有結合、抗原 - 抗体、及びストレプタビジン - ビオチンを含むが、これに限定されていない核酸を表面に固定する広範囲に多様な適した方法が知られている。

#### 【 0 0 5 1 】

流体流れの配列が対向する表面の間で D N A ストランドを配向しあつ延長させるために利用されうる。例えば、図 2 B に示したように、D N A は、一端部で固定位置の間に分布された流体流れのための通路を有する表面 2 1 3 に固定されうる。この通路を通じて流体を流すのは、D N A ストランドを所望の方向、例えば、対向する表面 2 1 1 または前記流体流れを受容するために固定表面の間に分布された通路を有しうる、移動可能な要素のアレイに向かって多少均一に配向して延長させるために利用されうる。したがって、方法は、D N A ストランドを第 1 表面に固定するステップ、流体を第 1 表面にある開口部を通じて前記第 1 表面に対向する第 2 表面にある開口部に向かって流して通過させるステップ、及び前記流体流れで配向されたD N A ストランドを前記第 2 表面に固定するステップを含みうる。

#### 【 0 0 5 2 】

各サイクルの進行によって固定されるストランドの数を増加させるために、活性化可能なプライマーが結合されたストランドを複製するために利用されうる。“活性化可能なプライマー”は、化学的または物理的な方法によって活性化されうる化学モイエティを含む。このような“活性化可能な基”は、例えば、適した波長のレーザを利用した光活性化によって活性化される前には不活性である。機能的な複合体化基に転換されるかまたは機能的な複合体化基の遮断を解除しうる複数の活性化可能な化学的な作用基が、本発明の属する技術分野に公知されている。本方法の変形で、活性化可能なプライマーは、固定された単一ストランドの核酸にアニーリングされうる。プライマー延長及び断片複製が行われる。結果物である二重ストランド核酸は、鋳型ストランドに対する張力の適用を通じて変性される。このとき、遊離状態のコピーストランドは、プライマーの活性化可能な基を含む。活性化は、コピーストランドが対向するコーティング表面上に固定させうる。このサイクルは、所望のレベルの增幅が取得されるまで反復されうる。所望の場合、固定された核酸は、例えば、核酸の固定された末端に隣接した序列またはプライマーによってコピーされた核酸の末端に導入された序列を認識する制限酵素の使用によって放出されうる。

#### 【 0 0 5 3 】

##### 光学的トラップまたは磁気的トラップの利用 :

D N A に張力を直接的に適用するさらに他の方法は、D N A が固定された粒子を操作するために光学的なトゥイーザーまたは磁気的トゥイーザーまたはその他のトラップを利用

10

20

30

40

50

しる。光学的なトワイーザーは、光学強度の勾配によって生成される力で粒子を捉える。光の電場によって両極化された誘電体粒子は、勾配を通じて最も明るい地点に引かれる。これと対照的に、反射しかつ吸収する低誘電体粒子は、放射圧によって最も暗い地点に押される。三次元トラップを形成するほど十分に強い選択的に生成された力が、適した形状の波面を有するレーザビームを高い開口数値のレンズによる厳格なフォーカスでもたらすことによって収得されうる。図3Aは、レーザビーム303のフォーカスにトラップされたビード301の間に延長されたDNAストランドを示す。図3Bに示したように、光学的トワイーザーのアレイ307を利用して複数の粒子を操作することが可能である。購買可能な光学的トワイーザーアレイは、Arryx, Inc.によって生産されるアレイを含む。光学的トワイーザーのアレイのさらに他の具現は、E.R.Dufresne and D.G.Grieger, Rev.Sci.Instr.69:1974(1998)、及び米国特許第6,055,106号(2000)を参照する。光学的トワイーザーアレイは、約 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、またはそれ以上の対の光学的トワイーザーまたは磁気的トワイーザーを含みうる。

10

## 【0054】

光学的トワイーザーまたは磁気的トワイーザーを利用して增幅は、一般的に次のように行われうる：核酸が流体媒質で適した粒子の各末端で固定される。粒子は、光学的トラップまたは磁気的トラップを利用して操作されるように改造されうる。dsDNAを変性化させるのに十分な張力、例えば、約65pNより大きい張力が粒子に対する力（例えば、光学的力または磁気力）の適用を通じてオリゴヌクレオチドに適用され、核酸の変性をもたらす。張力は、プライマーと核酸とをアニーリングさせるためにプライマーの存在下に減少しうる。DNA重合酵素による重合は、張力をさらに弛緩させることによって開始されうる。サイクルを反復するために、結果物である二重ストランド核酸が変性されるよう張力が増大しうる。变形で、核酸は、一末端で流体流れに、例えば、磁場によってトラップされたビードに固定されうる。核酸に対する張力を制御するために流体の流速が利用されうる。

20

## 【0055】

単一標的分子から開始して順次にコピーストランドでアレイを満たすことが可能である。コピーストランドは、活性化可能なプライマーを利用して新たなビードに固定されうる。新たなビードは、コピーされたストランドに隣接するように位置しうる。代案的に、事前に固定されたプライマーを有するビードが変性化ステップと関連してコピーされたストランドに隣接するように位置しうる。このような方式によるビードの操作は、選択的に、プログラミング可能なプロセッサーによって自動に制御されうる。

30

## 【0056】

水力学的な応力を利用したNano-PCR<sup>TM</sup>  
Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、制御された流体流れで水力学的な応力をによって張力をDNAに適用することを利用して行われうる。この方式を利用する方法は、ベンチトップ装置であるか、または代案的に携帯用装置に含まれうるような移動可能なサイズに縮少しうる微細流体装置で行われうる。制御された流体流れで水力学的な応力をによってDNAに張力を適用することを利用するNano-PCR<sup>TM</sup>方法は、制御された流体の流速を提供する任意の配列を利用して行われうる。

40

## 【0057】

固定されたDNA重合酵素の利用：装置において、表面に固定された重合酵素を利用するNano-PCR<sup>TM</sup>方法を行う方法は、次のステップを含みうる。重合酵素は、流体が制御される速度でその表面上で流れるように配列された表面上に固定される。例えば、第1複合体化モイエティでコーティングされたチャンネルまたはチャンバ内の表面が、第2複合体化モイエティを含むために変形されたDNA重合酵素を固定するために利用されうる。代表的な複合体化モイエティは、抗原-抗体、ヒスチジン-Ni-NTA、またはビオチン-ストレプトアビシン対を含む。標的dsDNAは、プライマーの存在下に変性され、例えば、dsDNA及びプライマーは、dsDNAを融解させるのに十分な力（例

50

えば、約 65 pN より大きい力) が前記 dsDNA に適用されるように流速を作りうる。流速を低下させることによって重合酵素 / ヌクレオチド / プライマー複合体を形成させうる。プライマー延長及び断片複製は、流速の追加的な低下によって促進されうる。鋳型及びコピーストランドを含む二重ストランドの核酸生成物は、向上した流速の適用を通じて変性され、所望のレベルの増幅が取得されるまでサイクルが反復されうる。そのような方法で、重合酵素は、微細チャンネル、例えば、微細流体 “ラップオンチップ” 型装置の微細チャンネルに固定されうる。

#### 【 0058 】

一つ以上のコーティングされた表面上に固定された重合酵素を利用する方法を実行するための装置の変形で、そのような装置はまた、試薬を前記コーティングされた表面を備える反応チャンバまたはチャンネルに導入するチャンネル及び個別的にまたは組合わせて試薬を伝達し、選択的に保存する機器及び反応生成物を回収する機器を含みうる。  
10

#### 【 0059 】

本発明が属する技術分野で公知のプリンティングまたはリソグラフィ技法が分子を固定させる位置をパターン化するために利用されうる。そのような装置は、反応チャンバまたはチャンネルで流体流れを生成して制御する機器を備える。電気力学的な方法、ポンプ及び注射器機器を備える流体流れを生成しつつ制御する任意の適した方法が利用されうる。試薬溶液は、選択的に反応チャンバを通じて再循環されうる。

#### 【 0060 】

図4は、重合酵素401が基板407に、例えば、ストレプトアビジン結合によって固定される方式を例示する。DNAストランド403は、固定された重合酵素に結合しうる。基板407上を流れる制御された流体流れ409は、水力学的な応力の形態でDNAストランドに対して伸張力の適用を誘発する。前述したように、図1に示した一般的な体系によって、そのような力の適用を利用してNano-PCRが行われうる。  
20

#### 【 0061 】

制御された流体流れで固定されたDNAストランドを利用 : 核酸に張力を適用するさらに他の方法は、制御された流体流れに固定された核酸を含む。本方法は、一般的に次のように行われうる：一末端に表面にコーティングされた第2複合体化モイエティを認識し、これに結合できる第1複合体化モイエティを含む核酸をコーティングされた表面に固定させる。流体は、dsDNAを融解させるのに十分な力(例えば、約 65 pN より大きい力)が固定された二重ストランド核酸に適用され、ストランド分離をもたらすように表面上を流れる。DNA重合酵素及びプライマー、選択的に活性化可能な基を含むプライマーが減少した流速で表面上にフラッシュされる。低下したまたは中断された流速は、重合酵素 / オリゴヌクレオチド / プライマー複合体の形成を可能にする。プライマー延長及び断片複製は、流速の追加的な低下または流れの中止を通じて NTP の存在下に促進されうる。複製後に、流速は上昇して、dsDNAが変性されるように結果物である dsDNA が張力の適用を受ける。活性化可能なプライマーが利用される場合、延長されたプライマーが活性化されうる。このような活性化され、かつ延長されたプライマーは、コーティングされた表面に結合でき、所望の程度の増幅が取得されるまでサイクルが反復されうる。そのような方法で、重合酵素は、微細チャンネル、例えば、微細流体 “ラップオンチップ” 型装置の微細チャンネルに固定されうる。  
30

#### 【 0062 】

図5は、DNAストランド503が固定用分子501を通じて基板507に固定された場合で、水力学的な応力による流体流れ内のDNAの伸張を示す。方向509に流れる流体は、流速の関数として制御された方式でDNAを延長して伸す。図5Bは、流体が制御された速度で構造物の間で流れるように、DNAストランド503が複数の基板構造505に結合分子501によって固定された変形を示す。類似した結果を達成するために利用されうる複数の他の変形があると理解されるであろう。  
40

#### 【 0063 】

一つ以上のコーティングされた表面上に固定された核酸を利用する方法を行う装置の変

10

20

30

40

50

形で、そのような装置はまた、試薬を前記コーティングされた表面を備える反応チャンバまたはチャンネルに導入するチャンネル及び個別的にまたは組合わせて試薬を伝達し、選択的に保存する機器及び反応生成物を回収する機器を備えうる。本発明が属する技術分野で公知のプリンティングまたはリソグラフィ技法が分子を固定させる位置をパターン化するために利用されうる。そのような装置は、反応チャンバまたはチャンネルで流体流れを生成しつつ制御する機器を備えうる。流体流れを生成しつつ制御する任意の適した方法が利用されうる。例えば、流れは、ポンプによって提供され、または静電気的に駆動されうる。試薬溶液は、選択的に反応チャンバを通じて再循環されうる。

#### 【0064】

速度勾配でDNAの伸張及び水力学的なフォーカシングを利用：流体流れを利用して張力を適用する方式が、前記方法と組合せられて利用されるか、または個別的方法の基礎を形成しうる。 DNAは、速度勾配を有する流体で伸しうる。水力学的なフォーカシング及び逆伝搬性伸張流れに対する多様な代表的な配列が図6Aないし図6Cに示される。

#### 【0065】

例えば、Wongらは、複数のかかる技法の基礎を検討して水力学的なフォーカシング方法を説明した(Wong et al., "Deformation of DNA molecules by hydrodynamic focusing." J. Fluid Mech. 497: 55-65, 2003)。図6Aに示したように、水力学的なフォーカシングで、比較的高速で流れる緩衝溶液607の2ストリームが低速で導入される中央ストリームを有する微細チャンネル605で収斂する。収斂するストリームは、実質的な混合なしに中央ストリームを加速させる。その結果は、流れ方向に強い速度勾配を有する流れの領域である。この勾配にあるDNA601が延長された状態まで伸張される。収斂するストリームの流速をさらに向上させれば、dsDNAを変性させて前記微細チャンネルからssDNAを抽出することが可能であろう。これは、ssDNAを反応チャンバに、例えば、重合酵素が固定されているチャンバに伝達可能にする。

#### 【0066】

いかなる固定の必要なしに核酸をトラップし、核酸に張力を提供するために停滞性流れが利用されうる。Perkinsらは、平面形の伸張流れ機器でDNAの伸張を記述した("Single Polymer Dynamics in an Elongation Flow" Science, 276: 2016-21, 1997)。Perkinsの機器で、図6Cに示したように、流体623は、逆方向からT字形の接合部625に流れる。前記接合部の中央に、停滞点629が定立される。この点の外部に、流速勾配が定立される。DNA601は、速度勾配によって逆方向に同一に引かれ、停滞点にトラップされうる。図6Bに示したチャンネル615のような代案的な配列は、チャンネル615に流入される流体または核酸が位置するスロットを横切って逆方向に流れる緩衝溶液のオフセットジェット617を含みうる。

#### 【0067】

##### 適用される電場の循環を利用したNano-PCRT<sup>M</sup>方法

Nano-PCRT<sup>M</sup>方法で電場及び磁場の利用を通じてDNAストランドに力を適用することが可能である。これが達成されうる多様な方式がある。例えば、電場は、微細流体装置で流体流れを駆動させることによってDNAに間接的に力を適用するために利用されうる。前述したように、流体流れは、DNA、例えば、表面及び/または粒子に固定されたDNA、または表面に固定されたDNA重合酵素に結合されたDNAに水力学的な応力を適用するために利用されうる。電気泳動的な力が直接DNAストランドに力を適用しうる。

#### 【0068】

電場はまた、伝導性粒子に結合されたDNAストランドを操作するために利用されうる。したがって、変性、アニーリング、及び/またはプライマー延長ステップが非-温度-駆動過程によって制御され、前記でDNAストランドの一側末端または両側末端が前記DNAストランドに張力を提供するために電場によって操作されうる伝導性粒子、例えば、

10

20

30

40

50

金ナノ粒子に結合されるNano-PCR<sup>TM</sup>方法が行われうる。DNA分子の一側末端が伝導性粒子に付着される場合、残りの末端は、装置内の反応チャンバ内で表面に固定されうる。そのような方法は、各サイクルで生成されるDNAストランドを固定するために本明細書に記載されたような活性化可能なプライマーを利用しうる。

#### 【0069】

##### Nano-PCR<sup>TM</sup>方法の代表的な適用

Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、病原菌及び生物学的な武器検出用キット及びシステムに採用されうる。そのような病原菌の例は、次のものを含むが、これに限定されていない：アデノ-関連ウイルス(Adeno-Associated Virus:AAV)、アデノウイルス、サイトメガロウイルス(Cytomegalovirus:CMV)、エプスタイン-バールウイルス、エンテロウイルス、A型肝炎ウイルス(Hepatitis A Virus:HAV)、B型肝炎ウイルス(Hepatitis B Virus:HBV)、C型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus:HCV)、人間ヘルペスウイルスタイプ6(Human Herpes Virus Type 6:HHV-6)、人間免疫欠乏症ウイルスタイプ1(Human Immunodeficiency Virus Type 1: HIV-1)、人間免疫欠乏症ウイルスタイプ2(Human Immunodeficiency Virus Type 2: HIV-2)、ヘルペスシンプレックスウイルスタイプ1及びタイプ2(Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2: HSV-1及びHSV-2)、人間T-細胞リンパ腫性ウイルスタイプI及びタイプII(Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I and Type II: HTLV-I及びHTLV-II)、マイコバクテリア結核、マイコプラズマ、パーボウイルスB-19、呼吸器細胞融合ウイルス(Respiratory Syncytial Virus:RSV)及び豚内因性レトロウイルス(Porcine Endogenous Retrovirus:PERV)。Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、この方法が提供できる敏感度、正確度及び堅固性の強化のために、全ての環境で全ての病原菌の検出のために利用されうる。10 20

#### 【0070】

通常的なPCR-基盤診断法を利用した特定病原菌の検出及び確認は、一般的に病原性個体またはそのポリヌクレオチドが特定しきい値の濃度で生物学的な流体(例えば、血液、唾液など)に存在することを要求する。例えば、マイコバクテリア結核の検出下限は、 $7.5 \times 10^3$  個の個体/m<sup>1</sup>と報告された。HCV RNAは、100ないし1000個のRNA分子/m<sup>1</sup>範囲で検出可能である。Shimは、PCRは立証されたマイコバクテリア結核-含有ノジュールの約87.5%を検出すると報告した。その数値は、12.5%の検出に対する偽-陰性率に該当する。望ましい具体例で、Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、前述したような病原菌を一般的に12.5%未満、10%、5%、2.5%、1%、0.5%、0.25%、または0.1%の偽-陰性率で検出するために利用されうる。30

#### 【0071】

また、通常的なPCRは、一般的に、約30-35回のサイクルに限定されるが、Nano-PCR<sup>TM</sup>は、それに限定されないように行われうる。これは、DNA融点温度以上に加熱する反復的なサイクル後の重合酵素の分解のためである。これと対照的に、Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、選択的に40回、50回、60回、70回、100回、またはそれ以上のサイクルを含みうる。Nano-PCR<sup>TM</sup>は、等温方式でまたは小さい振幅の温度変調で行われうるので、Nano-PCR<sup>TM</sup>は、複数のサイクルのために反復され、(例えば、室温で)酵素の寿命によってのみ限定される。40

#### 【0072】

したがって、Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、通常的なPCRによって要求される量より実質的に少ない量の開始物質(個体またはそのDNAまたはRNA)を増幅するために利用されうる。Nano-PCR<sup>TM</sup>方法は、一つの分子のDNAまたはRNAだけの少量も検出してはっきりと増幅し、偽-陰性率を大きく低下させて100%までの向上した敏感度を提供するために利用されうる。前述したような病原菌に対して、個体またはポリヌ50

クレオチドは、1000個未満の個体またはポリヌクレオチド/m1、100個の個体またはポリヌクレオチド/m1、25個の個体またはポリヌクレオチド/m1、10個の個体またはポリヌクレオチド/m1、5個の個体またはポリヌクレオチド/m1、ひいては1個の個体またはポリヌクレオチド/m1の濃度で検出されうる。

#### 【0073】

本方法の代表的な変形は、試料から一つ以上の特定のDNA序列の存在または不在を検出するか、または二つの相異なるDNA序列を区分するために利用されうる。そのような変形で、標的DNAは、前述したように増幅されうる。本方法はまた：増幅されたDNAをプローブまたはプローブ（例えば、検出される序列に相補的であり、蛍光標識のような検出可能なモイエティを含むオリゴヌクレオチド）と接触させるステップと、前記増幅されたDNAに結合されたプローブの存在または不在を観察することによって試料内に特定のDNA序列の存否を検出するか、または複数のプローブのうち如何なるプローブが前記増幅されたDNAに結合されたかを検出して、二つの相異なる序列の間を区別するステップと、をさらに含みうる。

#### 【0074】

本方法のさらに他の変形は、RNA上にコーディングされた序列の増幅及び／または検出のために利用されうる。標的序列は、単離されたRNAまたは核酸混合物内のRNA上にコーディングされうる。本方法は：試料（例えば、組織または体液）からRNAを単離するステップと、逆転写を行い、それにより該cDNAを取得するステップと、前記標的序列を前述したように増幅するステップと、を含みうる。そのような方法は、前述したように、試料内に特定の序列の存在を検出するステップと、をさらに含みうる。

#### 【0075】

本発明のさらに他の変形は、DNAの序列決定のために利用されうる。そのような方法は、選択的に前述したようにDNAを増幅するステップ及び前記DNAの序列を決定するステップを含みうる。前記DNAの序列決定は、(a)標的序列を含むdsDNAの試料であって、前記試料は、4個の併行的な反応で分離される試料、前記標的序列の3'末端に相補的なプライマーと、4種類以上のヌクレオシド三リン酸（すなわち、ATP、CTP、GTP、TTP）とを提供するステップと、併行的な反応それぞれに蛍光モイエティのような検出可能な化学的モイエティで選択的に標識されたddATP、ddCTP、ddGTP、及びddTTPから選択された相異なるデオキシヌクレオシド三リン酸（ddNTP）、及びDNA重合酵素を提供するステップと、(b)非温度-駆動過程、例えば、dsDNAをssDNAに融解させるのに十分な張力（例えば、約65pNより大きい力）の適用によってdsDNAをssDNA鑄型ストランドに変性させるステップと、(c)プライマーが相補的な鑄型ストランドに混成化されるように、例えば、dsDNAを変性させるために張力を利用した場合、ssDNAに適用される張力を減少させることによって非温度-駆動過程を制御するステップと、(d)dsDNAを形成するためにDNApがプライマーを延長させるステップと、(e)所望の量のDNA序列の増幅が取得されるまで前記ステップ(b-d)を選択的に反復するステップと、多様な单一分子の序列決定体系のように、前記反応で生成される各ヌクレオチドの長さを検出することによって、または塩基-特異的な蛍光モイエティまたは一部の他の塩基-特異的な信号を検出することによって序列を決定するステップと、を含みうる。

#### 【0076】

##### Nano-PCRTM装置

本明細書に記載されたような非温度-駆動PCRを行うために利用される複数の相異なる装置の種類及び構成がある。そのような装置のうち一つは、装置上にある微細流体チャンネル内の流速が制御可能で可変的な微細流体装置である。望ましい具体例で、装置は、反応チャンバを有し、前記反応チャンバは、チャンネル、チャンネルの配列、または密閉された空間でありうる。反応チャンバは、一般的に核酸を維持する手段及びその内部に維持された前記核酸に応力または張力を適用する手段を含む。したがって、本明細書に記載の方法のうち一つを行うように設計された配列は、その内部に、核酸に結合できる粒子ま

たはそれらの相補的な複合体化分子を獲得できる複合体化分子、複合体化分子を有する表面、移動可能な要素、流体流れを配向し、流速勾配を形成するチャンネル、ポンプ、弁及び膜を有するチャンネル及び密閉された空間の組合せを含むと予想しうる。チャンバは、例えば、光学的微細操作器が利用される場合、光学的に透明な窓を含みうる。装置は、携帯用ユニットに含まれうる微細流体装置として製造されうる。所望の場合、Nano-PCR<sup>TM</sup>は、1 μl未満、例えば、約50 - 1000 nL、望ましくは、約100 - 500 nLの溶液容量で行われうる。

#### 【0077】

一実施例であって、図7Aは、試薬が流入口701, 707及び715を通じて導入されうる装置の可能な構成を示す。一つ以上の保存チャンバ705, 711が準備された緩衝溶液、ジデオキシヌクレオシド三リン酸、重合酵素をためるために提供されうる。弁703, 709, 717及び718は、チャンネルの間の接合部で流体流れを制御するために配列された一つ以上の流体ゲートを備えうる。反応チャンバ715は、例えば、図2ないし図6に示したように、その内部に含まれた核酸分子に対して張力の制御された適用が可能に配列されうる。チャンネル721及びポンプ723は、チャンバ715を通じた試薬の再循環及び制御された流れを可能にするために選択的に提供される。ポンプ723は、本発明が属する技術分野で認定される任意の適したメカニズム、例えば、連動式ポンピング、一つ以上のベローズまたはピストンの使用によるポンピング、電動力によるポンピング及びそのような装置の変形または組合せによって作動されうる。再循環が望ましくない場合、流れは、チャンバ715内で、または外部的に、例えば、流入口及び/または出口701及び719に付着された注射器によって制御されうる。円形、または概略的に円形のチャンネル構成を利用する微細流体装置の例は、図7Bによって示される。流入口751は、チャンネル給送反応チャンネル763に直接またはこれから使用のために一つ以上の保存チャンバ753, 754への試薬の導入を可能にする。弁755, 757及び759は、反応チャンネルへの流入及び流出を制御する。ポンプ761は、連動式作用、例えば、連続的に制御される方式で一つ以上の弁ゲートのチャンネル763への撓み、電動力、または微細流体学部分で認定される任意の他の手段によって、チャンネル763で流速を制御するために作動されうる。例えば、国際公開特許WO/02081729号公報に記載されたように、流れを制御するために制御される順序で装置のチャンネルに撓む弹性重合体物質で製造された構造を含む連動式ポンピングの配列及び弁を利用して装置が構築されうる。

#### 【0078】

図7Bに示した装置の作動は、非温度-駆動PCRの間に、その作動についての説明を通じてさらに理解されうる。核酸増幅反応の具体的な例で、標的核酸を含むかまたは潜在的に含む試料が流入口751を通じてループ763に導入される。一部の実施例で、ループ763の一つ以上の壁は、図4及び図5に示したように重合酵素またはヌクレオチドを固定するために製造された。代案的に、ループは、図6に示したように、追加的な流入口を利用するかまたは表面を回転させることによって流速勾配、逆伝搬性流体流れを生成するために配列されうる。増幅反応を行うために必要な他の試薬は、同様に流入口を通じて導入される。典型的な試薬は、標的核酸に特異的に混成化されるプライマーまたはプライマー（例えば、正方向プライマー及び逆方向プライマー、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（すなわち、dATP、dTTP、dGTP及びdCTP）、重合酵素、緩衝液及び重合酵素によって要求される多様な補助因子（例えば、金属イオン）を含む。

#### 【0079】

試料及び必要な増幅試薬のループ763への導入後に、結果物である溶液は、ポンプ761の作用によって循環される。ポンプ作用の速度を変化させて、溶液循環/流速を調節しうる。標的核酸に対する約65 pNの力の適用を招く流速は、核酸を変性させることで定立されている。流速は、標的核酸に適用される力が約30 pNないし60 pNの範囲に属するように低下する。これは、重合酵素/核酸/プライマー複合体の形成を可能にする。プライマー延長は、流速を30 pN未満の適用される力に該当する値にさらに低下させ

10

20

30

40

50

ることによって開始される。プライマー延長の終了時、流速はまた、結果物である二重ストランド核酸を変性させるために上昇する。前記ステップは、所望の量の標的核酸が収得されるまで反復される。弁759を開放して流出口765を通じて溶液を流すことによって増幅された標的核酸に接近しうる。

#### 【0080】

$\text{Nano-PCR}^{\text{T.M}}$ 方法を行う機器は、個別的に反応装置の要素を扱って制御できるプログラミング可能な制御装置を備え、またセンサー及びフィードバック回路を含んで制御装置が適用された応力及び铸型延長のような反応パラメータをモニタリングしつつ分析でき、所望の場合、それらを調節しうる。

#### 【実施例】

#### 【0081】

##### 実施例1：対向するコーティングされた表面を利用した方法及び装置

標準方法によって一対のストレプトアビジン-コーティングされた表面を製造した(Sabanayagam, Smith, and Cantor. "Oligonucleotide immobilization on micropatterned streptavidin surfaces." Nucleic Acids Res. 2000, Vol. 28, No. 8 pp i - iv)。ビオチン化されたdsDNA(一ストランドの両末端でビオチン化された)を前記表面に添加し、表面の間に前記dsDNAを固定化させた(Jeffrey M. Rothenberg and Meir Wilchek. p-Diazobenzoyl-biotin: a new biotinylation reagent for DNA Nucleic Acids Research Volume 16 Number 14 1988)。表面に適用される铸型の濃度を調整して、DNA分子の表面密度は調節されうる。室温で、コーティングされた表面の間の距離を増大させて約65pNより大きい張力をdsDNAに適用した。これは、dsDNAを変性させ、増幅のための標的ssDNAのみを残した。結合されたDNAを束縛されたビオチン基を含むプライマーと接触させ、表面の間の距離を縮小させて30pNないし60pNの力が固定されたssDNAに適用させた。プライマーを標的DNAにアニーリングさせ、DNA重合酵素及びヌクレオチドを結果物である複合体に添加した。プライマー延長は、適用される張力を30pN未満までさらに減少させることによって開始された。プライマー延長が完了すれば、表面の間の距離を増大させて結果物である二重ストランドに65pNより大きい力を適用させた。この力の適用は、複製ヌクレオチドストランドをその铸型から分離(変性)させた。束縛されたビオチンモイエティを含む複製ストランドを光活性化させ、ストレプトアビジン-コーティングされた対向する表面に結合させた。標的ヌクレオチドに対する所望の程度の増幅を收得するまで前記ステップを反復した。

#### 【0082】

束縛されたビオチン試薬は、Molecular ProbesまたはPierceのような商業的な供給会社から購買した。例えば、光活性化可能なニトロベンジル基を有するビオチン誘導体(MeNPOC-biotin)が生物分子及び表面への容易な結合に適した形態で存在する(Pirrung MC, Huang CY. A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using "caged" biotin. Bioconjug Chem. 1996 May - Jun; 7 (3) : 317 - 21)。

#### 【0083】

##### 実施例2：固定された重合酵素を利用した方法及び装置

標準方法によってストレプトアビジン-コーティングされた微細チャンネルの表面を製造した(Sabanayagam, Smith, and Cantor. "Oligonucleotide immobilization on micropatterned streptavidin surfaces." Nucleic Acids Res. 2000, Vol. 28, No. 8 pp i - iv)。ビオチン化されたDNA重合酵素を前

10

20

30

40

50

記微細チャンネルに流し、表面飽和のために放置した。酵素のビオチン化のための商業用キットが、例えば、Pierce Labsから利用可能である。結合されていない酵素は、微細チャンネルから流し、標的ヌクレオチド（例えば、ssDNA、RNA）及びプライマーを60 pNより大きい力を前記ヌクレオチドに適用するチャンバ流速で流入させた。30 pNないし60 pNの力が前記ヌクレオチドに適用されるように流速を低下させて重合酵素／ヌクレオチド／プライマー重合体を形成させた。チャンバ流速を30 pN未満にさらに低下させてプライマー延長を行った。プライマー延長が完了すれば、流速を上昇させて65 pNより大きい力を結果物である二重ストランドに適用した。このような力の適用は、複製されたヌクレオチドストランドをその鋸型から（変性）分離させた。分離されたストランドを重合酵素結合がなされるまで微細流体チャンバを通じて循環させ、前記ステップは、標的ヌクレオチドに対して所望の程度の増幅が収得されるまで反復した。

10

## 【0084】

実施例3：DNA固定化を利用した方法及び装置

標準方法によってストレプトアビシン・コーティングされた微細チャンネルの表面を製造した（Sabanayagam, Smith, and Cantor. "Oligonucleotide immobilization on micropatterned streptavidin surfaces." Nucleic Acids Res. 2000, Vol. 28, No. 8 pp i-iiv）。ビオチン化されたdsDNA（一ストランドの両末端でビオチン化された）を前記微細チャンネルに流し、表面結合のために放置した（Jeffrey M. Rothenberg and Meir Wilchek. p-Diazobenzoyl-biotin: a new biotinylation reagent for DNA Nucleic Acids Research Volume 16 Number 14 1988）。結合されたdsDNAに65 pNより大きい力を適用するチャンバ流速は、定立されている。これは、dsDNAを変性させ、増幅のための標的ssDNAのみを残した。DNA重合酵素、ヌクレオチド、及び束縛されたビオチン化プライマーを前記微細チャンネルに流した。束縛されたビオチン試薬は、Molecular ProbesまたはPierceのような商業的な供給企業から購買可能である。例えば、光活性化可能なニトロベンジル基を有するビオチン誘導体（MenPOC-biotin）が生物分子及び表面への容易な結合に適した形態で存在する（Pirring MC, Huang CY. A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using "caged" biotin. Biocjug Chem. 1996 May-Jun; 7(3):317-21）。30 pNないし60 pNの力が結合されたssDNAに適用されるように流速を低下させた。プライマーを標的DNAにアニーリングさせ、結果物である化合物がDNA重合酵素との複合体を形成しようとした。チャンバ流速を30 pN未満にさらに低下させてプライマー延長を行った。プライマー延長が完了すれば、流速を上昇させて65 pNより大きい力を結果物である二重ストランドに適用した。このような力の適用は、複製されたヌクレオチドストランドをその鋸型から（変性）分離させた。束縛されたビオチンモイエティを含む複製ストランドを光活性化させ、ストレプトアビシン・コーティングされた微細チャンネルの表面に結合させた。標的ヌクレオチドに対する所望の程度の増幅を収得するまで、前記ステップを反復した。

20

30

40

50

## 【0085】

実施例4：光学的トウィーザーを利用した方法及び装置

二重ストランドDNA複合体を周囲温度で適した媒質に込められたポリスチレンビードの間に固定化させた（“Overstretching B-DNA: the Elastic Response of Individual Double Stranded and Single Stranded DNA Molecules” by Steven B. Smith, Yujia Cui, and Carlos Bustamante Science (1996) vol. 271, pp 795-799）。約65 pNの伸張力を

50

光学的トワイーザーの利用を通じてDNAに適用した(Rouzina, L, and V.A. Bloomfield. 2001b. Force-induced melting of the DNA double helix 2. Effect of solution conditions. Biophys. J. 80: 894-900)。その力は、DNA変性を招いた。プライマーを媒質に添加し、伸張力を60 pN未満に減少させた。これは、プライマーを変性された単一ストランドDNAにアニーリングさせた。DNA重合酵素及びヌクレオチドを媒質に添加して伸張力を0ないし30 pNに減少させて高度に正確な複製を開始させた。複製が完了すれば、約65 pNの伸張力をそれぞれの二重ストランドDNA分子に適用して、単一ストランドDNA分子を放出させた。これは、操作器のアレイを利用することによってその規模が拡張されうる。例えば、ARRYX, INC.によって製造された光学的トラップアレイのようなアレイが利用されうる。  
10

#### 【0086】

本発明は、その特定の具体例を参照して詳細に記載されたが、本発明の範囲を逸脱せず多様な変更がなされ、その同等物が採用されうるということを、当業者ならば明確に分かることであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0087】

【図1A】温度循環に依存しないPCR方法の代表的なフロー チャートである。

【図1B】温度循環に依存しないPCR方法の代表的なフロー チャートである。

【図2A】対向する表面の間に固定されたDNAストランドに張力を適用するための代表的方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。  
20

【図2B】対向する表面の間に固定されたDNAストランドに張力を適用するための代表的方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

【図2C】対向する表面の間に固定されたDNAストランドに張力を適用するための代表的方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

【図3A】光学的トラップまたは磁気的トラップを利用してDNAストランドに張力を適用する方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

【図3B】光学的トラップまたは磁気的トラップを利用してDNAストランドに張力を適用する方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

【図4】流体流れ内で基板に固定された重合酵素に結合されたDNAストランドに張力を適用する代表的な方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。  
30

【図5A】流体流れで一側末端に固定されたDNAストランドに張力を適用する代表的な方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

【図5B】流体流れで一側末端に固定されたDNAストランドに張力を適用する代表的な方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

【図6A】流速勾配に浮遊しているDNAストランドに張力を適用するための代表的な方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

【図6B】流速勾配に浮遊しているDNAストランドに張力を適用するための代表的な方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。

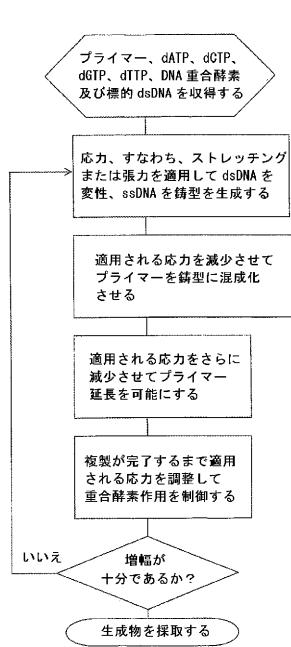
【図6C】流速勾配に浮遊しているDNAストランドに張力を適用するための代表的な方法及びそのための反応チャンバの要素の配列を示す図面である。  
40

【図7A】温度循環または熱による変性に依存していないPCR方法を行うための代表的な装置の概略図である。

【図7B】温度循環または熱による変性に依存していないPCR方法を行うための代表的な装置の概略図である。

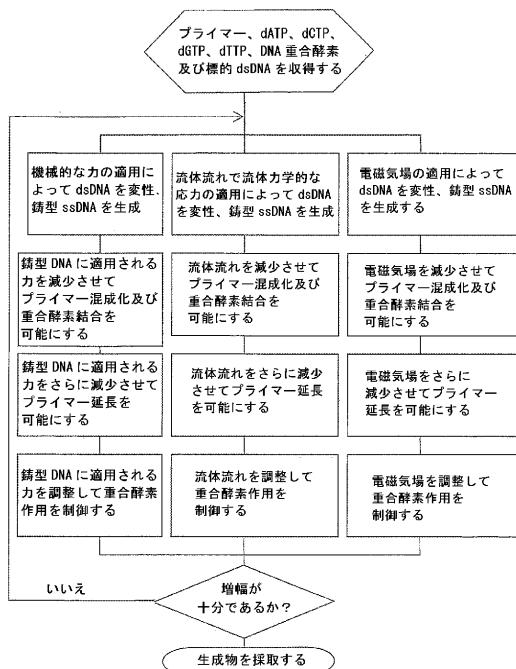
【図 1 A】

【図 1 A】



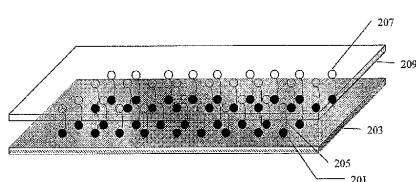
【図 1 B】

【図 1 B】



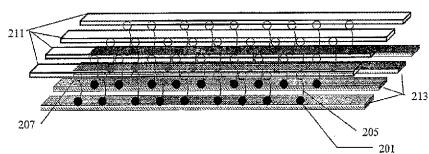
【図 2 A】

【図 2 A】



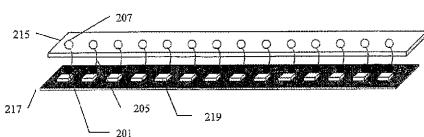
【図 2 B】

【図 2 B】



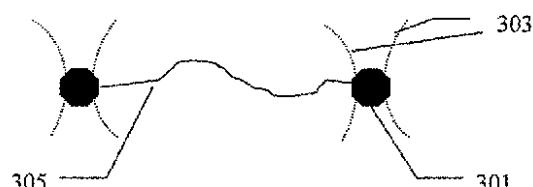
【図 2 C】

【図 2 C】



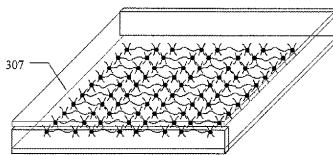
【図 3 A】

【図 3 A】

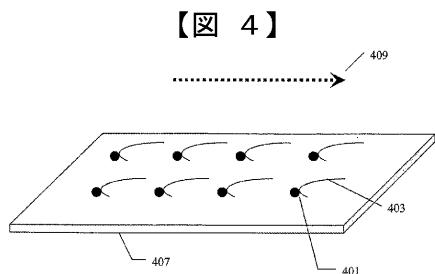


【図 3 B】

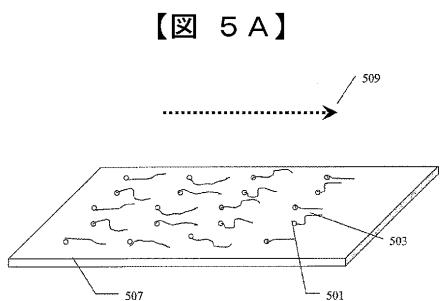
【図 3 B】



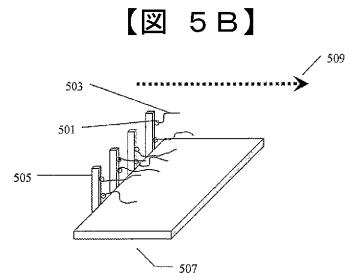
【図 4】



【図 5 A】



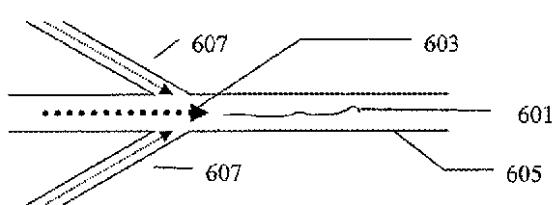
【図 5 B】



【図 5 A】

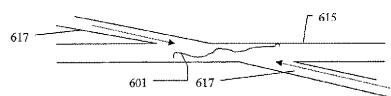


【図 6 A】



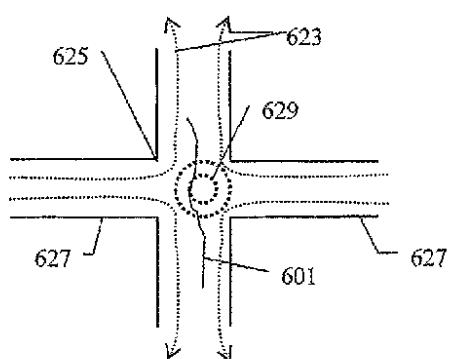
【図 6 B】

【図 6 B】



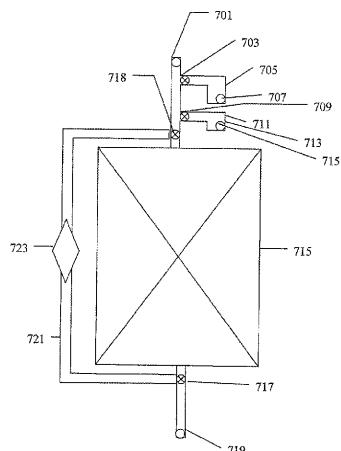
【図 6 C】

【図 6 C】

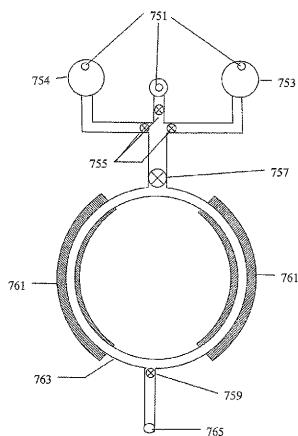


【図 7 A】

【図 7 A】



【図 7 B】  
【図 7 B】



【手続補正書】

【提出日】平成19年1月10日(2007.1.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヌクレオチド序列を増幅する方法であつて、

(a) 一つ以上の単一ストランドDNAの鑄型ストランドを、前記各鑄型ストランドの一部に相補的な一つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと、

(b) 前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップと、

(c) 前記鑄型ストランドをDNA重合酵素及び4種類以上のヌクレオシド三リン酸と接触させるステップと、

(d) 前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を進め、これにより、前記鑄型ストランドに結合された延長生成物を形成するステップと、

(e) 前記延長生成物を前記鑄型ストランドから分離させるステップと、を含み、

その後、前記ステップ(a)、(b)、(c)、及び(d)を、各反復する前に前記(e)ステップを行って1回以上反復し、

前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップは、前記鑄型ストランドに対する応力の適用を制御することによって、前記混成化を制御するステップを含む、または、

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって、各錆型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含み、

及び、オーブションに更に、

前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離させるステップは、前記錆型ストランドに応力を適用することによって、前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップを含む、または、

前記ステップ( b )、( d )、及び( e )のうち一つ以上は、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップを含むことを特徴とする方法。

#### 【請求項2】

前記一つ以上のプライマーを前記錆型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって前記混成化を制御するステップを含み、

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって、各錆型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって、各錆型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含み、

前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップは、前記錆型ストランドに応力を適用することによって前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップ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】

前記一つ以上のプライマーを前記錆型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の提供を制御することによって前記混成化を制御するステップを含み、

前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップは、前記錆型ストランドに応力を適用することによって前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップ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DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって各錆型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含み、

前記一つ以上のプライマーを前記錆型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御することによって前記混成化を制御するステップを含み、

前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップは、前記錆型ストランドに応力を適用することによって前記錆型ストランドから前記延長生成物を分離するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

#### 【請求項6】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型ストランドに対する機械的張力、水力学的応力、または電場の適用を制御するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

#### 【請求項7】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型に制御された

量の機械的張力を直接適用するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記錆型ストランドに制御された量の機械的張力を直接適用するステップは、前記一つ以上の錆型ストランドが付着された表面を移動するステップを含むことを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型ストランドに対する水力学的応力を制御するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記錆型ストランドは、流体流れに露出された表面に固定される、流体流れに露出された表面に固定されたDNA重合酵素に結合される、または、逆伝搬性の流体流れによって維持されかつ延長される、ことを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記錆型ストランドに対する応力の適用を制御するステップは、前記錆型ストランドの一側または両側の末端に連結された粒子に力を適用するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ステップ (e) で、応力を適用するステップは、前記ステップ (d) で適用される同じ応力の増加された量を適用するステップを含むことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

前記錆型ストランドの相補的な部分に前記一つ以上のプライマーを混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を約 0 ないし約 6 5 pN の範囲内で制御することによって前記混成化を制御するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記錆型ストランドの相補的な部分に前記一つ以上のプライマーを混成化させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を約 10 ないし約 6 5 pN の範囲内で制御することによって前記混成化を制御するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力の適用を0 pN より大きい値ないし約 4 5 pN の範囲内で制御することによって、各錆型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記錆型ストランドに対する応力を制御し、前記DNA上の難しい序列が複製される時に該当する時点に前記応力を増大させることによって、各錆型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記DNA重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記DNAは、50%を超えるGC含量を有する数個の残分の一つ以上のセグメントを含み、前記DNAは、90%より高い効率性に增幅されることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記DNAは、60%より高いGC含量を有する数個の残分の一つ以上のセグメントを含むことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記DNAは、8個以上の塩基対の反復単位を含む一つ以上のセグメントを含み、前記DNAは、90%より高い効率性に増幅されることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項20】

前記ステップ(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)は、約65未満で行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記ステップは、約50回以上反復されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項22】

約1000塩基より多くの塩基で構成された鑄型ストランドが増幅されることを特徴とする請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記方法は、約1時間以内に完了することを特徴とする請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記DNAを含む溶液は、pH4-7またはpH8-10を有することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項25】

約1μl未満の容量を有する反応チャンバで行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項26】

前記ステップ(a)の前に、  
RNA試料を取得するステップと、  
相補的なDNAストランドを生成可能にするのに十分な組成物の存在下に、前記RNAを逆転写酵素と接触させるステップと、  
単一ストランドDNAを形成するために、前記DNAを前記RNAから分離するステップと、  
をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項27】

前記ステップ(a)の前に、  
DNA試料を取得するステップと、  
前記DNAを変性させるステップと、  
前記DNAストランドを反応チャンバ内で基板に結合させるステップと、  
前記反応チャンバをフラッシングして前記試料から汚染物を除去するステップと、  
をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項28】

前記ステップ(a)の第1の場合であって、前記一つ以上の鑄型ストランドは、一つのDNA分子から取得されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項29】

前記ステップ(a)の少なくとも第1の場合であって、前記一つ以上の鑄型ストランドは、精製されていない試料物質内に含まれることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項30】

前記鑄型ストランドを基板に結合された分子を結合できる複合体化基を含むプライマーと接触させることによって、前記鑄型ストランドを前記基板に結合させるステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項31】

前記複合体化基は、活性化可能であることを特徴とする請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記基板の表面に結合された前記複合体化基及び分子は、ビオチン及びストレプトアビジンであることを特徴とする請求項30に記載の方法。

【請求項33】

前記プライマーは、光活性化可能な束縛されたビオチンを含むことを特徴とする請求項30に記載の方法。

【請求項 34】

病原菌を検出する方法であって、  
請求項 1 に記載の方法を含み、  
前記病原菌と特異的に関連したヌクレオチド序列の存在如何に対して結果物である DNA を探索するステップをさらに含む、  
ことを特徴とする方法。

【請求項 35】

前記病原菌は、アデノ関連ウイルス (A d e n o - A s s o c i a t e d V i r u s : A A V ) 、アデノウイルス、サイトメガロウイルス (C y t o m e g a l o v i r u s : C M V ) 、エピスタインバールウイルス、エンテロウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、人間ヘルペスウイルスタイプ 6 、人間免疫欠乏症ウイルスタイプ 1 、人間免疫欠乏症ウイルスタイプ 2 、人間 T - 細胞リンパ営養性ウイルスタイプ I 、人間 T - 細胞リンパ営養性ウイルスタイプ II 、マイコバクテリア結核、マイコプラズマ、パーボウイルス B - 19 及び豚内因性レトロウイルス (P o r c i n e E n d o g e n o u s R e t r o V i r u s : P E R V ) で構成される群から選択されることを特徴とする請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

第 1 増幅サイクルのための前記鑄型ストランドを準備するために、m 1 当り約 1 0 0 0 個未満の個体またはポリヌクレオチドを含む試料を取得するステップをさらに含むことを特徴とする請求項34に記載の方法。

【請求項 37】

DNA 序列を増幅する方法であって、  
( a ) 二重ストランド DNA を二つの单一ストランド DNA 分子に分離させるのに十分な応力を前記二重ストランド DNA に適用するステップを含む方法によって、一つ以上の二重ストランド DNA を変性させ、前記一つまたは二つの单一ストランド DNA 分子は、以後のステップで鑄型 DNA ストランドとなるステップと、

( b ) 前記鑄型ストランドを前記各鑄型ストランドの一部に相補的な一つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー、DNA 重合酵素及び 4 種類以上のヌクレオシド三リン酸と接触させるステップと、

( c ) 前記ステップ ( a ) での応力適用を減少させて、前記プライマーを各鑄型ストランドの該当する相補的な部分にアニーリングさせるステップと、

( d ) 前記鑄型ストランドに対する応力の適用を制御して前記 DNA 重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップと、

( e ) 前記ステップ ( a ) 、( b ) 、( c ) 、及び ( d ) を 1 回以上反復するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 38】

前記応力を適用する、前記応力を減少させる、および前記応力を制御するステップは、前記 DNA を基板または一つ以上の粒子または両者に結合させるステップ及び前記基板または一つ以上の粒子の運動を制御するステップを含むことを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記応力を適用する、前記応力を減少させる、および前記応力を制御するステップは、前記 DNA を一つ以上の粒子に結合させるステップ及び光学的な操作または磁気的な操作によって前記粒子の運動を制御するステップを含むことを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記応力を適用する、前記応力を減少させる、および前記応力を制御するステップは、

前記DNAに対する流体流れを調整するステップを含むことを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項41】

前記DNAは、基板に結合された重合酵素によって結合されることを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項42】

前記DNAは、基板に結合されることを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項43】

前記DNAは、流体流れの速度勾配で伸びることを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項44】

前記DNAは、逆伝搬性の流体流れによって伸びることを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項45】

前記DNA重合酵素によって前記プライマーを延長させるために、前記錆型ストランドに対する応力を制御するステップは、前記DNA上の難しい序列が複製される時期に該当する時点に前記応力を増大させるステップを含むことを特徴とする請求項37に記載の方法。

【請求項46】

a) 標的序列を含む二重ストランドDNA(dsDNA)試料、前記標的序列の3'末端及びその相補体に相補的なオリゴヌクレオチドプライマー、4種類以上のヌクレオシド三リン酸及びDNA重合酵素を提供するステップと、

b) 前記dsDNAを融解させるのに十分な張力を前記dsDNAから誘発して、前記dsDNAを単一ストランドDNA(ssDNA)に変性させるステップと、

c) 前記錆型ストランド内の前記張力を、前記プライマーの相補的な錆型ストランドへの混成化を許容するのに十分であるように減少させるステップと、

d) 前記錆型ストランド内の張力を、前記DNA重合酵素が前記プライマーを延長してdsDNAを形成させうるレベルまで調整するステップと、、

e) 前記ステップ(b)乃至(d)を1回以上反復するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

【請求項47】

前記の全体プロセスは、周囲の温度と同じレベルの温度で行われることを特徴とする請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記の全体プロセスは、約20より高く、約60より低い温度で行われることを特徴とする請求項46に記載の方法。

【請求項49】

前記の全体プロセスは、室温で行われ、前記ステップ(b)で、張力は、約65pNであり、前記ステップ(c)で、張力は、0pNより大きい値ないし約60pNに減少し、前記ステップ(d)で、張力は、0pNより大きい値ないし約45pNに調整されることを特徴とする請求項46に記載の方法。

【請求項50】

前記張力は、電気的に、磁気的に、または光学的に前記DNAに結合された一つ以上の粒子を操作するか、前記DNAが結合された表面を移動させるか、前記DNAが露出された流体流れを制御するか、または、これらの組合せ、によって誘発されかつ制御されることを特徴とする請求項46に記載の方法。

【請求項51】

密閉された反応チャンバに連結された一つ以上の流体チャンネルを備える核酸序列を複製する装置であって、

前記反応チャンバが、その内部にDNA分子を維持する手段を備え、

前記装置は、前記装置の内部に維持された前記DNA分子に可変的であり、制御された量の応力を適用するメカニズムをさらに含むことを特徴とする装置。

【請求項52】

核酸プライマー、ヌクレオシド三リン酸、及び重合酵素の導入のための一つ以上の保存チャンバをさらに備えることを特徴とする請求項51に記載の装置。

【請求項53】

前記反応チャンバ内に維持された前記DNA分子に応力を適用する前記メカニズムは、第1表面及び第2表面を含み、前記表面上にDNA分子を固定するための手段を備え、

前記装置は、前記表面のうち一つまたは両者何れもを相互間に移動させうるメカニズムをさらに含むことを特徴とする請求項51に記載の装置。

【請求項54】

前記反応チャンバ内に維持された前記DNA分子に応力を適用する前記メカニズムは、一つ以上の表面を含み、その上にDNA分子を固定するための手段を備え、

前記装置は、前記DNA上に制御され、可変的な流体流れを提供するメカニズムをさらに含むことを特徴とする請求項51に記載の装置。

【請求項55】

DNA分子を固定するための手段をその上に含む前記一つ以上の表面は、前記表面を通じた流路をさらに備えることを特徴とする請求項54に記載の装置。

【請求項56】

前記DNA上に制御され、可変的な流体流れを提供するメカニズムは、層流において、速度勾配を形成するように配列されることを特徴とする請求項54に記載の装置。

【請求項57】

前記反応チャンバ内に維持された前記DNA分子に応力を適用するメカニズムは、層流で速度勾配、流体流れ内の停滞点、逆伝搬性の流体流れ、または、これらの組合せ、を提供するように配列された流体流れチャンネルを備えることを特徴とする請求項51に記載の装置。

【請求項58】

前記反応チャンバ内に維持された前記DNA分子に応力を適用するメカニズムは、DNA分子に結合された粒子を操作できる光学的、電気的、または、磁気的操作器のアレイを含むことを特徴とする請求項51に記載の装置。

【請求項59】

DNA增幅のための微細流体装置であって、

a) 基板と、

b) 前記基板内に位置した流れチャンネルと、

c) DNA試料を前記流れチャンネルに導入させうる前記流れチャンネルと流体疎通関係にある流入口及び前記DNAに応力を適用する手段と、  
を備え、

前記装置は、前記DNAの変性を促進するために前記流れチャンネルの一つ以上の領域内に温度を調節するために作動的に配置された温度制御器を備えていないことを特徴とする微細流体装置。

【請求項60】

前記基板は、弾性重合体物質で構成されることを特徴とする請求項59に記載の微細流体装置。

【請求項61】

前記流れチャンネルは、前記流れチャンネルに導入された試料が前記流れチャンネルの周囲に循環されるように配列されることを特徴とする請求項59に記載の微細流体装置。

【請求項62】

前記微細流体装置は、前記チャンネルを通じて流体が移動するように作動的に配置されたポンプをさらに備えることを特徴とする請求項59に記載の微細流体装置。

【請求項63】

前記流れチャンネル内に核酸を固定化する手段を備えることを特徴とする請求項 5 9 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 4】

前記流れチャンネル内に固定化された一つ以上の重合酵素分子を含むことを特徴とする請求項 5 9 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 5】

前記流れチャンネルは、実質的に円形であることを特徴とする請求項 6 1 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 6】

前記微細流体装置は、前記チャンネルを通じて流体を移動させるために作動的に配置されたポンプをさらに備えることを特徴とする請求項 6 5 に記載の微細流体装置。

【請求項 6 7】

ヌクレオチド序列を増幅する方法であって、

( a ) 一つ以上の单一ストランド D N A の鑄型ストランドを前記各鑄型ストランドの一部に相補的な一つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと、

( b ) 前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップと、

( c ) 前記鑄型ストランドを D N A 重合酵素及び 4 種類以上のヌクレオシド三リン酸と接触させるステップと、

( d ) 前記 D N A 重合酵素による前記プライマーの延長を進め、これにより前記鑄型ストランドに結合された延長生成物を形成するステップと、

( e ) 前記延長生成物を前記鑄型ストランドから分離させるステップと、  
を含み、

その後、各反復前に前記 ( e ) ステップを行い、前記ステップ ( a ) 、 ( b ) 、 ( c ) 及び ( d ) を 1 回以上反復し、

前記一つ以上のプライマーを前記鑄型ストランドの相補的な部分に混成化させるステップは、前記鑄型ストランドに対する応力の適用を制御することによって前記混成化を制御するステップを含む、または、

前記 D N A 重合酵素によって前記プライマーを延長させるステップは、前記鑄型ストランドに対する応力の適用を制御することによって各鑄型ストランドに相補的な延長生成物を形成するための前記 D N A 重合酵素による前記プライマーの延長を制御するステップを含む、または、

前記鑄型ストランドから前記延長生成物を分離させるステップは、前記鑄型ストランドに応力を適用することによって前記鑄型ストランドから前記延長生成物を分離するステップを含む、または、

前記ステップ ( b ) 、 ( d ) 、及び ( e ) のうち一つ以上は、前記鑄型ストランドに対する応力の制御された適用を含む、  
ことを特徴とする方法。

【請求項 6 8】

重合酵素を利用して D N A を複製するステップを含む、 D N A を増幅及び / または序列決定する方法の改善であって、

前記序列決定方法の一つ以上のステップの間に前記重合酵素の活性を制御するステップを含み、

前記重合酵素を制御するステップは、前記 D N A に対する応力の適用を制御するステップを含む、

ことを特徴とする D N A を増幅及び / または序列決定する方法の改善。

【請求項 6 9】

前記 D N A に対する応力の適用は、機械的張力、水力学的応力、電磁気力、または、これらのうち一つ以上の組合せの適用から選択された応力を適用する方式を含むことを特徴とする請求項 6 8 に記載の D N A を増幅及び / または序列決定する方法の改善。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 01 N 37/00 (2006.01)</b>	G 01 N 33/53	M
	G 01 N 37/00	1 0 2
	G 01 N 37/00	1 0 1

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100115071

弁理士 大塚 康弘

(74)代理人 100116894

弁理士 木村 秀二

(74)代理人 100130409

弁理士 下山 治

(72)発明者 ゴエル, アニタ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02141, ケンブリッジ, カナル パーク 6,  
スイート 105

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 BA80 CA01 CA09 HA12

4B029 AA23 BB20 CC08 FA15 GA08

4B063 QA01 QQ10 QQ43 QR32 QR62 QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	Nano-PCR : 用于核酸扩增和检测的方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008500029A</a>	公开(公告)日	2008-01-10
申请号	JP2007513358	申请日	2005-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	Goeruanita GOEL ANITA		
申请(专利权)人(译)	戈埃尔 , 梅艳芳		
[标]发明人	ゴエルアニタ		
发明人	ゴエル,アニタ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12M1/00 G01N33/53 G01N33/569 G01N37/00		
CPC分类号	A61K41/00 B01L3/502761 B01L3/502776 B01L7/52 B01L2200/0636 B01L2200/0663 B01L2300/0816 B01L2300/0861 B01L2300/0896 B01L2400/0415 B01L2400/043 B01L2400/0454 B01L2400/0487 B82Y5/00 B82Y30/00 C12Q1/686 Y02A50/54 C12Q2565/629 C12Q2523/307 C12Q2527/101 C12Q2535/101		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.A C12M1/00.A G01N33/53.U G01N33/569.L G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N37/00.101		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029 /AA23 4B029/BB20 4B029/CC08 4B029/FA15 4B029/GA08 4B063/QA01 4B063/QQ10 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	大冢康弘 下山治		
优先权	60/570907 2004-05-13 US 60/616793 2004-10-06 US		
其他公开文献	JP5007440B2 JP2008500029A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

描述了提供核酸序列扩增而不依赖于温度循环的方法，装置和组合物，从而使方法从常规台式热循环装置中解放出来。双链核酸的变性，引物退火和通过聚合酶对引物延伸的精确控制可以通过对核酸施加应激来实现。这些方法可以提供优于常规PCR方法的一个或多个益处，包括：对PCR过程的精确控制;一般提高保真度;提高有问题序列的准确性，如富含GC或串联重复区域;序列长度更长;提高反应产率;缩短实验时间;效率更高;更低的花费;更大的便携性;以及对各种环境参数的稳健性，例如温度，pH和离子强度。

