

(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  
2014年3月6日(06.03.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/034732 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12M 1/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12M 1/42 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/073039
- (22) 国際出願日: 2013年8月28日(28.08.2013)
- (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 2012-189441 2012年8月30日(30.08.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人神奈川大学(KANAGAWA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2218686 神奈川県横浜市神奈川区六角橋3丁目27番1号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 山口 栄雄(YAMAGUCHI, Shigeo); 〒2218686 神奈川県横浜市神奈川区六角橋3丁目27番1号 学校法人神奈川大学内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 八田国際特許業務法人(HATTA & ASSOCIATES); 〒1020084 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス二番町 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,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

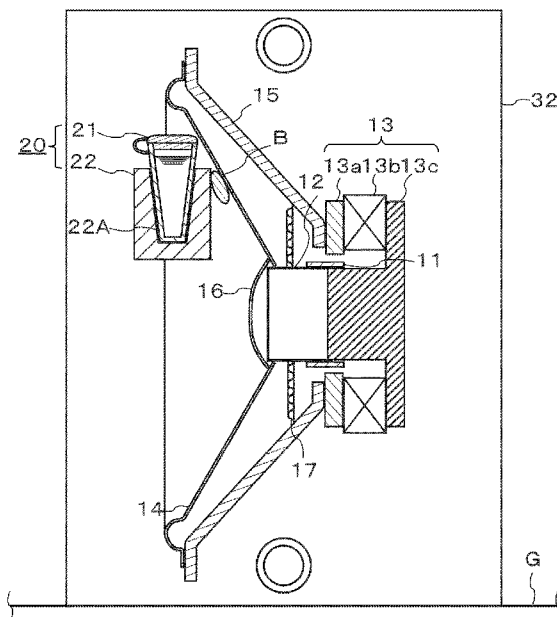
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシヤ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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))

(54) Title: NUCLEIC ACID MODIFICATION DEVICE, NUCLEIC ACID MODIFICATION METHOD, AND METHOD FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 核酸変性装置、核酸変性方法および核酸の増幅方法



(57) Abstract: [Problem] As a possible alternative means to thermal modification, to provide a device for modifying a double-stranded nucleic acid to a single-stranded nucleic acid, and a method for modifying a double-stranded nucleic acid to a single-stranded nucleic acid. [Solution] This nucleic acid modification device (100) has a vibration generator (10) for generating vibration applied to a nucleic acid solution containing a double-stranded nucleic acid, and the double-stranded nucleic acid in the nucleic acid solution is modified to a single-stranded nucleic acid by applying the vibration generated in the vibration generator to the nucleic acid solution.

(57) 要約: 【課題】熱変性の代替手段となりうる、二本鎖核酸の一本鎖核酸への変性装置および二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させる方法を提供する。【解決手段】本発明に係る核酸変性装置100は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に付与する振動を発生する振動発生部10を有し、振動発生部において発生した振動を核酸溶液に付与することによって、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させる。

WO 2014/034732 A1

## 明 細 書

**発明の名称**：核酸変性装置、核酸変性方法および核酸の増幅方法  
**技術分野**

[0001] 本発明は核酸変性装置、核酸変性方法および核酸の増幅方法に関する。

### 背景技術

[0002] ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などにおいて、試料から準備されるDNA等の二本鎖を一本鎖に変性させることが要求される。従来、二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させる方法としては、二本鎖核酸の核酸塩基間の水素結合が熱により切断される性質を利用して、熱変性が主に用いられてきた。

[0003] 例えば、PCR法における典型的な熱変性は、約90～95℃でDNAを含む試料に熱を付加し、二本鎖核酸を一本鎖核酸に解離させる。次いで、アニーリング工程で、試料を約50～65℃に冷却し、DNAに相補的なプライマーをアニーリングさせ、伸長工程で、試料を約70～72℃とし、ポリメラーゼを用いてプライマーを起点として一本鎖に相補的な鎖を伸長させる（例えば国際公開第2008/057375号（JP-A-2010-508813）参照）。これらの工程は、典型的には25～40回繰り返される。

[0004] したがって、PCRに使用されるDNAポリメラーゼは、熱サイクルにおいて、特に90～95℃という高温域で活性を維持する必要がある。

[0005] 一方、二本鎖DNAをアルカリによって変性させて一本鎖とすることも従来より行われている。これは、二本鎖DNAがpH10以上の環境において解離し、一本鎖に変性するという性質を用いたものである。

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0006] 熱変性の場合、上記のように熱変性時に耐えうる耐熱性のポリメラーゼを用いる必要があり、用いられる酵素が限定されるという問題点があった。例えば、PCRに典型的に利用されるTaqポリメラーゼは最適温度が高いた

め、熱変性のサイクルに耐えることができるが、エキソヌクレアーゼ活性が低いと、誤ったヌクレオチドを取り込む確率が若干高い。また、変性が起こる温度は、DNAの塩基構成および長さ（塩基数）によって異なり、長いDNAほどより高い温度が必要となる場合がある。また、Taqポリメラーゼは非常に高価であることも問題となる。

[0007] また、アルカリ変性の場合、例えば、PCR法で用いられるポリメラーゼ等をアルカリ変性時には添加することができず、各工程において、アルカリ変性液、中和液、及びDNAポリメラーゼを添加する必要がある。このため、操作が煩雑となり、多種類のサンプルを同時にPCR増幅することは困難である。

[0008] したがって、高温の熱を付加させる必要のある熱変性や環境が過酷なアルカリ変性に代わる手法により、酵素、例えばポリメラーゼの選択は格段に広がるものと考えられる。

[0009] したがって、本発明は、熱変性の代替手段となりうる、二本鎖核酸を一本鎖核酸へ変性させる核酸変性装置、核酸変性方法および核酸の増幅方法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

[0010] 上記目的を達成する本発明に係る核酸変性装置は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に付与する振動を発生する振動発生部を有し、振動発生部において発生した振動を核酸溶液に付与することによって、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させる点に特徴を有している。

[0011] また、本発明に係る核酸変性方法は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に振動発生部において発生した振動を付与し、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸へ変性させる工程を有している。さらに、本発明に係る核酸の増幅方法は、上記核酸変性方法により一本鎖核酸を得る工程と、前記一本鎖核酸を用いて二本鎖核酸を増幅させる工程を有している。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明の一実施形態に係る核酸変性装置を示す正面図である。

[図2]図1の2-2線に沿う断面図である。

[図3]図3(A)、(B)は振動発生部の発生する振動の振幅について説明するための説明図である。

[図4]本発明の変形例を示す図2と同様の位置における断面図である。

[図5]本発明の変形例に係る核酸変性装置について示す斜視図である。

[図6]振動発生部と容器保持部材との接続についての変形例を示すスピーカーの振動板の軸線を通る位置における断面図である。

[図7]本発明に係る核酸変性装置を使用して二本鎖DNAに振動を加えて、SYBR Green Iにより染色した実験結果を示す電気泳道写真である。

[図8]同装置を使用して二本鎖DNAに振動を加えて、SYBR Green Iにより染色した実験結果を示す電気泳道写真である。

[図9]PCR法により二本鎖DNAを増幅させる際のサイクルを示す図である。

[図10]本発明に係る核酸変性装置を使用してPCR法を行った実験結果を示す電気泳道写真である。

### 発明を実施するための形態

[0013] 本発明に係る核酸変性装置は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に付与する振動を発生する振動発生部を有し、振動発生部において発生した振動を核酸溶液に付与することによって、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させる点に特徴を有している。

[0014] また、本発明に係る核酸変性方法は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に振動発生部において発生した振動を付与し、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸へ変性させる工程を有している。さらに、本発明に係る核酸の増幅方法は、上記核酸変性方法により一本鎖核酸を得る工程と、前記一本鎖核酸を用いて二本鎖核酸を増幅させる工程を有している。

[0015] 本発明に係る核酸変性装置及び核酸変性方法では、二本鎖核酸を含む核酸溶液に振動発生部において発生した振動を付与し、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させている。そのため、二本鎖核酸は振動をきっかけに

して一本鎖核酸に変性させることができ、熱による付加を必要としない。よって、振動という極めて簡便な方法により二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させることができる。

[0016] 以下、添付した図面を参照しながら、本発明の実施形態を説明する。なお、以下の記載は特許請求の範囲に記載される技術的範囲や用語の意義を限定するものではない。また、図面の寸法比率は説明の都合上誇張されており、実際の比率とは異なる場合がある。

[0017] 図1は本発明の一実施形態に係る核酸変性装置を示す正面図、図2は図1の2-2線に沿う断面図である。

[0018] 図1及び図2を参照して概説すれば、本実施形態に係る核酸変性装置100は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に付与する振動を発生する振動発生部10を有する。核酸変性装置100は、振動発生部10において発生した振動を核酸溶液に付与することによって核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させている。

[0019] また、本実施形態において核酸変性装置100は、核酸溶液を収容する核酸溶液収容部20を有し、核酸溶液収容部20は容器21と、容器保持部材22と、を有する。核酸溶液は容器21に収容され、容器21は容器保持部材22によって保持されている。

[0020] 容器保持部材22は接着剤Bにより振動発生部10と接続されている。これにより、振動発生部10と核酸溶液は、容器21及び容器保持部材22を介して接続される。なお、本発明において、核酸溶液収容部20は容器21のみを有し、容器保持部材22を含まない場合をも包含する。つまり、振動発生部10と核酸溶液は、容器保持部材22を介さず、容器21のみを介して接続する形態も含む。本実施形態では振動発生部10において発生した振動を容器保持部材22に支持される容器21に収容された核酸溶液に付与することによって、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させている。

[0021] 本実施形態では使用時に容器21及び容器保持部材22を介して核酸溶液を振動発生部10に接続することによって、容器21および容器保持部材2

2を介して核酸溶液自体を振動させる。かように核酸溶液自体に振動を付加して流体全体を振動させることにより、効率的に二本鎖核酸を一本鎖核酸へと変性させることが可能となる。以下、詳述する。

[0022] 振動発生部10は、本実施形態においてスピーカーにおいて振動を発生させるボイスコイル11と、ボイスコイル11が巻き回されるボイスコイルボビン12と、ボイスコイルボビン12を支持するダンパー17と、ボイスコイル11に駆動力を与える磁気回路13と、ボイスコイル11による振動を受けて振動する振動板14と、振動板14の周縁部を支持するフレーム15と、を有する。

[0023] ボイスコイル11は、振動板14の振動の伝達方向よりも上流側に設けられる。ボイスコイル11はボイスコイルボビン12に巻き回されている。ボイスコイルボビン12の端部はキャップ16により覆われている。ダンパー17はボイスコイルボビン12の径方向における外方に配置され、ボイスコイルボビン12を支持する。

[0024] 振動板14は、ボイスコイルボビン12と直接連結されている。これにより、振動板14はボイスコイル11からの振動を受け、ボイスコイルボビン12を介してボイスコイル11と共に振動する。振動板14は地面Gに対して水平方向を向くように配置されている。

[0025] 磁気回路13は、プレート13Aと、マグネット13Bと、ヨーク13Cと、を有する。プレート13Aはフレーム15に固定されている。マグネット13Bはプレート13Aとヨーク13Cによって挟持されている。このような構成からなる磁気回路10によって磁界が形成され、音声電流をボイスコイル11に与えることによってボイスコイル11が振動し、ボイスコイル11に接続された振動板14が振動する。振動板14の材料や厚さなどは使用する容器21や核酸溶液の量などを考慮して定めることができる。

[0026] 振動発生部10は、図1に示すようにプラスチック板31、32によって水平方向から挟まれる。振動発生部10は、プラスチック板31、32によって挟まれた状態で振動発生部10の振動方向に障害物が存在せず、振動発

生部 10 の振動が極力妨げられないように地面 G から一定距離離れた状態となるように維持される。プラスチック板 31、32 は振動発生部 10 を挟んだ状態でボルト 33、34 等の締結手段によって固定される。

[0027] 振動発生部 10 がスピーカー等に使用される振動板 14 を用いることで、振動発生部 10 は可聴領域の周波数の振動を発生させる。振動発生部 10 より発生する振動は、容器 21 の形状または大きさ、変性させる二本鎖核酸の特性等により適宜設定すればよいが、可聴領域であることが好ましく、20 ~ 20,000 Hz であることがより好ましく、より好ましくは 50 ~ 2,000 Hz である。

[0028] この範囲の振動を付加することによって、二本鎖を一本鎖へ効率的に変性させることができるとともに、高周波数振動による DNA への損傷を懸念する必要がない。上記可聴領域の振動は、例えば攪拌子による溶液の攪拌の周波数よりは高い一方で、超音波周波数よりは低い周波数となっている。なお、上記実施形態では、可聴領域の周波数の振動を発生させるためにスピーカーを用いているが、可聴領域の振動を発生させる振動源であれば、その他の振動発生源、例えば圧電振動子であってもよい。

[0029] 図 3 (A)、(B) は振動発生部の発生する振動の振幅について説明するための説明図である。上記振動発生部より発生する振動の振幅は、核酸溶液を収容する容器の形状等により適宜設定すればよい。振動の振幅について例示すれば、図 3 (A) に示すように、振動板 14 の円錐台形状の軸線と直交するように振動が発生する場合の振動板 14 の中央部分における直径を  $D_1$ 、また図 3 (B) に示すように振動板 14 の軸線方向に振動が発生する場合の振動板 14 の軸線方向における一端部から他端部までの距離を  $D_2$  とすると、振幅の範囲は  $(D_1 \text{ or } D_2) / 10000 \sim 10 \times (D_1 \text{ or } D_2)$  であることが好ましい。

[0030] 本実施形態において使用する核酸は DNA であるが、核酸としては特に制限が無く、多様な核酸を使用することができる。核酸の具体例としては、DNA、RNA、PNA、オリゴデオキシリボヌクレオチド (oligode

oxyribonucleotides)、オリゴリボヌクレオチド(oligoribonucleotides)等、また、前記核酸の化学的修飾核酸を挙げることができる。化学的修飾核酸として2'-O-メチル(Me)RNA等を例示することができる。二本鎖核酸の例としては、具体的には、DNAとDNAとの組み合わせ;RNAとRNAとの組み合わせ等があるが、好ましくはDNAとDNAとの組み合わせである。

[0031] 二本鎖核酸の調製方法は従来公知の方法を用いることができ、人の血液や細胞などのような生体試料や、食品、土壌や河川水、海水などの環境試料から作製される。これらの試料から二本鎖核酸を抽出する方法としては、例えば、市販のDNA抽出用キット等を用いることができる。

[0032] 二本鎖核酸の溶液中の濃度は、検出手法や検出装置の検出感度に依存するので、仕様や予備検討により決定することができる。好ましい一実施形態は、試料1mlあたり1ng~1mg/mLである。

[0033] 核酸溶液が収容された容器21は、振動により核酸溶液が飛散するおそれがあるため、蓋付きの容器である方が望ましい。容器としては特に限定されるものではなく、例えば、0.1~2.0ml程度のマイクロチューブが挙げられる。その材質としてはプラスチックやガラスなどが挙げられ、好ましくはポリプロピレンやポリエチレンを挙げることができる。また、マイクロチューブの容積は0.1~2.0ml程度であることが好ましい。また、マイクロチューブの形状として具体的には、アシスト社製のアシストチューブ型のマイクロチューブやエッペンドルフ社製のエッペンドルフチューブ型のマイクロチューブを挙げることができるが、他社で販売されているほぼ同規格の製品の形状のものも使用することができる。

[0034] 容器保持部材22は、二本鎖核酸を含む核酸溶液を収容した容器21を核酸変性装置上において固定して保持する部材である。本実施形態において容器保持部材22には銅を用いているが、容器21を支持できれば材料はこれに限定されない。

[0035] また、容器保持部材22は容器21の外観形状に沿った収納部22Aを有



しており、これにより容器 2 1 を容器保持部材 2 2 に載置するだけで容器保持部材 2 2 によって容器 2 1 を保持でき、容器 2 1 を容易に着脱することができる。これにより、二本鎖核酸を変性させた際に容器 2 1 から核酸溶液を取り出すことなく、核酸溶液の収容された容器毎、容器保持部材 2 2 から取り出し、核酸溶液を収容した別の容器を載置するだけで次の変性作業を行うことができる。よって、変性作業を簡便に行うことができる。

[0036] また、容器保持部材 2 2 の収納部 2 2 A にはゴム等の滑り止めを設けることができる。このように容器保持部材 2 2 に滑り止め部材を設ければ、容器 2 1 が容器保持部材 2 2 から離脱するような大きさの振動を受けたとしても、容器 2 1 は摩擦により容器保持部材 2 2 から容易に離脱することはなく、強固に固定される。よって、振動が大きい場合に容器が容器保持部材 2 2 から離脱して核酸溶液に振動が伝達しない、といった事態や、振動により容器内の核酸溶液が漏れ出してしまうといった事態を防止することができる。

[0037] また、本実施形態において容器保持部材 2 2 には容器 2 1 を 1 つ設置しているが、複数設置してもよく、複数設置できることで、複数のサンプルを一度に変性させることが可能となる。

[0038] 図 4 は、振動発生部と容器保持部材との接続についての変形例を示す図 2 と同様の位置における断面図である。図 2 では、容器保持部材 2 2 が接着剤 B によって振動板 1 4 の中でも周辺部分である傾斜部分に接続されているが、容器内の核酸溶液に振動を伝達できれば、図 4 に示すように振動発生部 1 0 の中央部分であるキャップ 1 6 の部位に容器保持部材 2 2 を接続してもよい。

[0039] 図 5 は本発明の変形例に係る核酸変性装置について示す斜視図である。容器保持部材 2 2 は、振動発生部 1 0 と容器 2 1 との間において、振動発生部 1 0 からの振動を伝達する振動伝達部材としての機能をも有している。容器保持部材 2 2 以外における振動伝達部材の構成には、例えば図 5 に示すように固定板 4 2 により振動子 1 4 A に固定され、かつ容器 2 1 の挿入が可能な容器挿入孔 4 1 A が設けられた L 字形状の支持板 4 1 が挙げられる。

- [0040] 振動子 14A で発生した図 5 に示す水平方向 A の振動は、支持板 41 を介して容器 21 にも伝達され、これにより容器 21 内の核酸溶液の変性が促される。このように振動伝達部材を構成することによって、容器 21 を直接振動発生部 10 に接続することが難しい場合にも振動伝達部材を介して容器 21 内の核酸溶液に振動を伝達させることができる。よって、二本鎖核酸の変性専用の容器等を用意しなくても変性作業を行うことができる。
- [0041] 上記実施形態では、容器保持部材 22 および接着剤 B を有する核酸変性装置 100 について説明したが、振動発生部を有し、該振動発生部により発生する振動により二本鎖核酸が一本鎖核酸に変性する作用を有する装置である限り、他のいかなる形態も本発明は包含する。例えば、使用時において接着部材（例えば接着剤）を用いて容器を振動発生部に直接接続してもよい。
- [0042] 次に本実施形態に係る核酸変性装置 100 を用いた二本鎖核酸の変性方法について説明する。まず、核酸溶液が収容された容器 21 を容器保持部材 22 に設置し、固定する。次に振動発生部 10 のボイスコイル 11 に音声電流を流して、ボイスコイル 11 を振動させ、振動板 14 を振動させる。容器保持部材 22 は接着剤 B によって振動板 14 に接続されており、振動板 14 の振動を受けて容器保持部材 22 が振動し、さらに容器保持部材 22 に固定された容器 21 が振動して、容器中の核酸溶液に振動が伝達される。
- [0043] 本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、DNA のような核酸に熱を付加するのではなく、振動を核酸溶液に付与するという至極簡便な方法によって DNA 等の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性できることを見つけるに至った。
- [0044] すなわち、本発明の他の実施形態は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に振動発生部 10 において発生した振動を付与し、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸へ変性させる変性工程と、を含む、二本鎖核酸の一本鎖核酸への変性方法である。
- [0045] 振動により二本鎖核酸が一本鎖核酸に変性する機構は詳細ではないが、外部からの振動エネルギーにより核酸同士の水素結合が切断され一本鎖核酸に変性するものと推察される。

- [0046] 後にPCR法等により、核酸を増幅させる場合には、核酸の増幅に必要な4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、一对のプライマー及びDNAポリメラーゼ等を上記溶液に含有させてもよい。
- [0047] 上記変性工程は、上述した核酸変性装置100を用いて行うことができる。
- [0048] 以上説明したように本実施形態に係る核酸変性装置及び核酸変性方法によれば、二本鎖核酸を含む核酸溶液に振動発生部10において発生した振動を付与し、核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させている。
- [0049] 振動による変性は、非常に簡便であり、かつ試料環境が過酷ではないため、従来の熱やアルカリによる変性による種々の制限を受けることなく、二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させることができる。そのため、ハイブリダイゼーションへの応用、PCRとの組み合わせ等に広く利用でき、また生きた細胞や生体での局所的な遺伝子増幅などへの応用も期待でき、遺伝子発現機構の解明に貢献することができると考えられる。
- [0050] 本発明は上述した実施形態にのみ限定されるものではなく、特許請求の範囲において種々の改変が可能である。
- [0051] 図6は振動発生部と容器保持部材との接続についての変形例を示すスピーカーの振動板の軸線を通る位置における断面図である。容器保持部材22は、図2又は図4に示すように、振動発生部10の振動板14を地面Gに対して水平方向を向くように設置し、その状態において振動板14又はキャップ16の部位に容器保持部材22を介して容器21に収容された核酸溶液に振動を付与する実施形態について説明した。しかし、本発明はこれに限定されない。
- [0052] 振動板14は、図6に示すように地面Gに対して鉛直方向を向くように設置して核酸溶液に振動を付与するように構成してもよい。
- [0053] また、上記で得られた一本鎖核酸は、種々の用途に用いることができる。
- [0054] 一実施形態としては、上記一本鎖核酸を用いてPCRにより二本鎖核酸を

増幅させることができる。すなわち、本発明の他の好適な一実施形態は、二本鎖核酸を含む核酸溶液に振動発生部において発生した振動を付与し、前記二本鎖核酸を一本鎖核酸へ変性させる工程（１）と、前記一本鎖核酸を鋳型として用いて二本鎖核酸を増幅させる工程（２）と、を含む核酸の増幅方法である。

- [0055] 工程（１）については、上述したので、ここでは説明を割愛する。
- [0056] 従来、PCR法やLCR法において、熱変性により二本鎖核酸を一本鎖核酸に解離していた工程の代わりに、本発明では、上記工程（１）を用いる。したがって、核酸の増幅方法としては、熱変性の工程以外は、従来のPCR法およびLCR法の工程を用いて二本鎖核酸を増幅することができる。
- [0057] 上述のように、本発明における変性方法によれば、加熱による変性のように、高価で較正機能に劣る耐熱性のDNAポリメラーゼを使用する必要がない。また、温度変動型のPCR法のように温度変性を必ずしも必要とせず、一定の温度で核酸の増幅を行うことができる。さらに、アルカリによる変性のように、各工程において、アルカリ変性液、中和液、及びDNAポリメラーゼを添加する必要がなく、試料溶液を準備した後、変性、アニーリングおよび伸長を行うことができる。したがって、本発明の核酸の増幅方法は非常に簡便に核酸の増幅を行うことができる。
- [0058] PCR法等により、核酸を増幅させる場合には、工程（１）において、一本鎖に変性させる試料に、後の二本鎖核酸への増幅に必要な各種試薬を含ませることができる。核酸の増幅に必要な試薬としては、４種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、一对のプライマー、DNAポリメラーゼ、緩衝液等が挙げられる。
- [0059] 二本鎖核酸を増幅させる方法としては、等温もしくは可変温度条件で行う２つの方法があり、本発明ではいずれの手法でも実施することが可能である。本発明では等温条件下でも二本鎖核酸の増幅を行うことができることから、操作の簡便性を考慮すると、等温条件下で増幅を行うことが好ましい。
- [0060] 等温条件下とは、PCR反応溶液を含有するPCR反应用容器が設置され

ている環境の温度が各工程において一定となるように制御されている条件下を意味し、PCR反応溶液自体の温度が厳密に一定である必要はない。また、等温とは、厳密に同じ温度である必要はなく、例えば、一定範囲の温度で操作が行われることを指す。例えば、校正機能に優れたDNAポリメラーゼの至適温度は通常、あまり高温ではないため、10~42℃であることが好ましい。

[0061] なお、操作の簡便性を考慮すると、工程(1)においても等温条件下で操作を行うことが好ましい。

[0062] また、利用可能なDNAポリメラーゼとしては、限定されるものではないが、Taqポリメラーゼや、EX-Taq、LA-Taq、Expandシリーズ、Platinumシリーズ、Tbr、Tfl、Tru、Tth、Tli、Tac、Tne、Tma、Tih、及び、Tfi等に代表されるPolI型酵素、Pfu、Pfurbo、Pyrobest、Pwo、KOD、Bst、Sac、Sso、Poc、Pab、Mth、Pho、ES4、VENT、及び、DEEPVENTに代表される $\alpha$ 型酵素、Bca(exo-)DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、Vent DNAポリメラーゼ、Vent(Exo-)DNAポリメラーゼ(Vent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)、DeepVent DNAポリメラーゼ、DeepVent(Exo-)DNAポリメラーゼ(DeepVent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)、 $\Phi$ 29ファージDNAポリメラーゼ、MS-2ファージDNAポリメラーゼ、Z-Taq DNAポリメラーゼ等が挙げられる。これらを単独で用いても良いし、複数組み合わせ合わせて用いても良い。これらのDNAポリメラーゼは市販のものを用いることができる。

[0063] また、核酸増幅産物の検出は、アガロースゲル電気泳動後にエチジウムブロマイドで染色したり、或いは、蛍光インターカレーター存在下で核酸増幅を行った後UVを照射することより行うことができる。また、定量Real

—Time PCR法により定量的に分析することも可能である。

[0064] また、一本鎖同士の核酸ハイブリダイゼーションを行う際に用いる一本鎖核酸を調製する際に、本発明の一本鎖解離方法を用いることもできる。一般的に、核酸ハイブリダイゼーション反応は、サザン (Southern) ハイブリダイゼーション、ノーザン (Northern) ハイブリダイゼーションなどをいう。

## 実施例

[0065] 以下、実施例および比較例を説明する。ただし、本発明の技術的範囲が以下の実施例のみに制限されるわけではない。

[0066] (1) 実施例1：二本鎖核酸の変性

次に図6に記載の核酸変性装置を使用して二本鎖核酸の変性について確認する実験を行った。

[0067] Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製) を用いてシロイヌナズナから100ng/μLのゲノムDNAを抽出した。

[0068] 得られたゲノムDNA 0.1μlを0.1mlのマイクロチューブ (BioPlastics社製、型番BPB77201) に添加し、Tris-EDTAバッファー (TE) 9.9μlで希釈してDNA希釈物を得た後、ローディングバッファー (タカラバイオ社製、6×Loading Buffer) 1μlを添加した。このサンプルを11サンプル用意した。

[0069] そして、サンプルである核酸溶液に振動板からの振動が鉛直方向に伝達する状態において100~1000Hz及び振動無しの11パターンの振動を振幅0.5mmで各120秒間、各核酸溶液に入力した。得られた試料を1%のアガロースゲルで電気泳動後、dsDNAを検出するSYBR (登録商標) Green I (タカラバイオ社製) 及びssDNAを検出するSYBR (登録商標) Green II (タカラバイオ社製) で染色した。電気泳動の印加電圧はDC100Vである。

[0070] 図7は、本発明に係る核酸変性装置を使用してSYBR Green Iにより染色した実験結果を示す電気泳動写真、図8は同装置を使用してSYBR

Green I Iにより染色した実験結果を示す電気泳動写真である。図7、図8では、いずれも図における一番左側から100、200、300と1000 Hz毎に1、000 Hzまで周波数を増やした振動を入力した場合の実験結果を実施例として表示し、一番右側は振動無しの場合の実験結果を比較例として表示している。

[0071] 図7において、グラフ中におけるライン部分は使用した指示薬であるSYBR Green Iが二本鎖DNAに反応した場合に現れる。SYBR Green Iでライン部分が現れず、SYBR Green IIでライン部分が現れると、二本鎖DNAが一本鎖DNAに変性していることが確認できる。

[0072] 図7において、振動無しの場合にラインが表示されているのは二本鎖DNAが残っていることを表している。一方で周波数100～1、000 Hzの振動を付加したサンプルには蛍光がなくなった。この結果から、振動を付加することにより、二本鎖DNAは一本鎖DNAに変性していることが確認できる。

[0073] また、図8によれば、強弱の差はあるものの、ライン部分は十分に視認できることが確認できる。これらを総合すると、二本鎖DNAは100～1、000 Hzの周波数の振動を加えることによって一本鎖DNAに変性させることができると考えられる。

[0074] このように核酸溶液に振動を加えることにより、熱による付加をかけずに二本鎖DNAを一本鎖DNAに変性できることが確認できた。

[0075] (2) 実施例2：PCR法による二本鎖核酸の増幅

下記のように反応液を調製した。

[0076] [表1]

10×Klenow Fragment Buffer(タカラバイオ社製)5 μl  
dNTP Mixture(タカラバイオ社製)4 μl(液最終濃度各200 μM)  
Control Primer(Control PrimerA:配列番号1、Control PrimerB:配列番号2)各0.5 μl  
(液最終濃度各0.2 μM)  
Klenow Fragment(タカラバイオ社製)1 μl(液最終濃度2units/μl)  
λDNA(鑄型DNA、タカラバイオ社製)0.5 μl(液最終濃度0.5ng/50 μl)  
H<sub>2</sub>O 38.5 μl  
Total 50 μl

[0077] 配列番号1の配列は、5′-GATGAGTTCGTGTCCGTACA  
ACT-3′、配列番号2の配列は、5′-GGTTATCGAAATCA  
GCCACAGCGCC-3′である。

[0078] 上記反応液15μlを0.1mlのマイクロチューブ（Bio plastics社製、型番BPB77201）に入れ、サンプルとした。

[0079] 次に、図6の装置を用いて、サンプルである核酸溶液に振動板からの振動が鉛直方向に伝達する状態において、130Hz（波形サイン波）で、15秒振動を与え、その後、15秒静止した。振動15秒、静止15秒を1サイクルとし、11、13、15のサイクル数で実験を行った（図9）。したがって、トータル時間は、30秒×サイクル数となる。この際、温度は37℃に一定に保って行った。一方、比較として、振動を一切与えず、温度だけ37℃に一定に保ったこと以外は上記実施例と同様に実験を行った。保持時間は、上記のトータル時間に合わせた。電気泳動の結果を図10に示す。図10において、振動および静止のサイクルを行ったものを「振動PCR」と、振動を一切与えなかったものを「無振動」と表記した。

[0080] 図10の結果によれば、サイクル数が11では振動PCRのバンドの明るさは無振動のものより暗いが、サイクル数13では同程度の明るさとなり、サイクル数15で無振動のものよりもバンドが濃くなっている。これらのことから、サイクル数を増やすに従い、DNAが増幅されていることがわかる。

[0081] 本出願は、2012年8月30日に出願された日本特許出願番号2012-189441号に基づいており、その開示内容は、参照され、全体として、組み入れられている。

## 符号の説明

- [0082] 10 振動発生部、  
11 ボイスコイル、  
12 ボイスコイルボビン、  
13 磁気回路、



- 1 3 A プレート、
- 1 3 B マグネット、
- 1 3 C ヨーク、
- 1 4 振動板、
- 1 4 A 振動子、
- 1 5 フレーム、
- 1 6 キャップ、
- 1 7 ダンパー、
- 1 0 0 核酸変性装置、
- 2 0 核酸溶液収容部、
- 2 1 容器、
- 2 2 容器保持部材、
- 2 2 A 収納部、
- 3 1、3 2 プラスチック板、
- 3 3、3 4 ボルト、
- 4 1 支持板、
- 4 1 A 容器挿入孔、
- 4 2 固定板、
- A (地面に対して水平の) 振動方向、
- B 接着剤、
- G 地面。

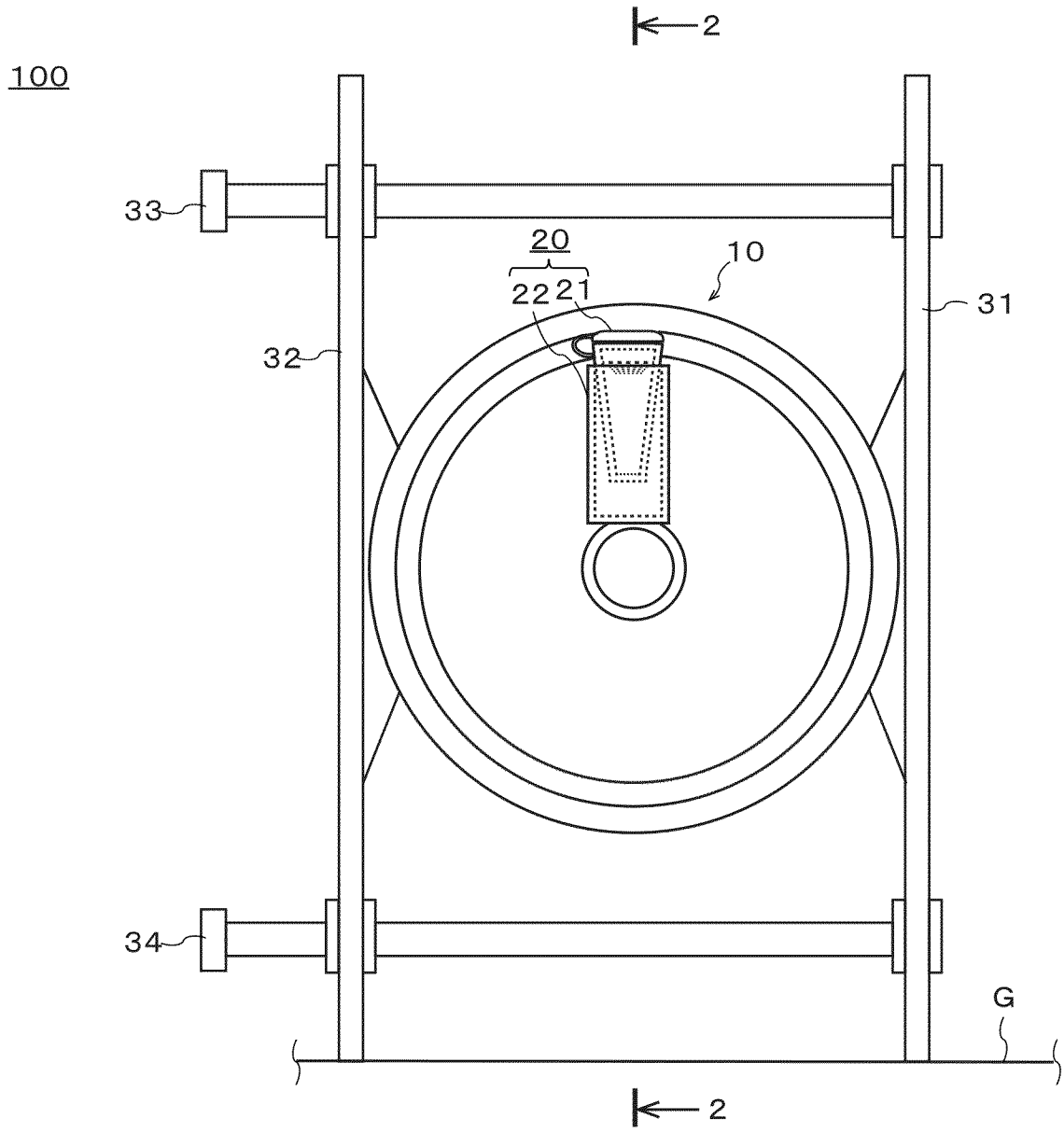
## 請求の範囲

- [請求項1] 二本鎖核酸を含む核酸溶液に付与する振動を発生する振動発生部を有し、  
前記振動発生部において発生した振動を前記核酸溶液に付与することによって、前記核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させることを特徴とする核酸変性装置。
- [請求項2] 前記振動発生部は、可聴領域の振動を発生させる、請求項1に記載の核酸変性装置。
- [請求項3] 前記可聴領域の周波数は、20Hz乃至20,000Hzである請求項2に記載の核酸変性装置。
- [請求項4] 前記核酸溶液を収容する核酸溶液収容部と、  
前記振動発生部と前記核酸溶液収容部との間に設けられ、前記振動発生部において発生した振動を前記核酸溶液収容部に伝達する振動伝達部材と、  
をさらに有する請求項1～3のいずれかに記載の核酸変性装置。
- [請求項5] 前記核酸溶液収容部は、前記核酸溶液を収容する容器を有する請求項4に記載の核酸変性装置。
- [請求項6] 前記核酸溶液収容部は、前記容器を着脱自在に保持する容器保持部材をさらに有する請求項5に記載の核酸変性装置。
- [請求項7] 前記容器保持部材は、前記振動発生部において発生した振動が与えられた際に前記容器の離脱を防止する離脱防止機構を備える請求項6に記載の核酸変性装置。
- [請求項8] 二本鎖核酸を含む核酸溶液に振動発生部において発生した振動を付与し、前記核酸溶液中の二本鎖核酸を一本鎖核酸へ変性させる工程と、  
を含む核酸変性方法。
- [請求項9] 前記振動は可聴領域の振動である、請求項8に記載の核酸変性方法。
- [請求項10] 前記可聴領域の周波数は、20Hz乃至20,000Hzである請

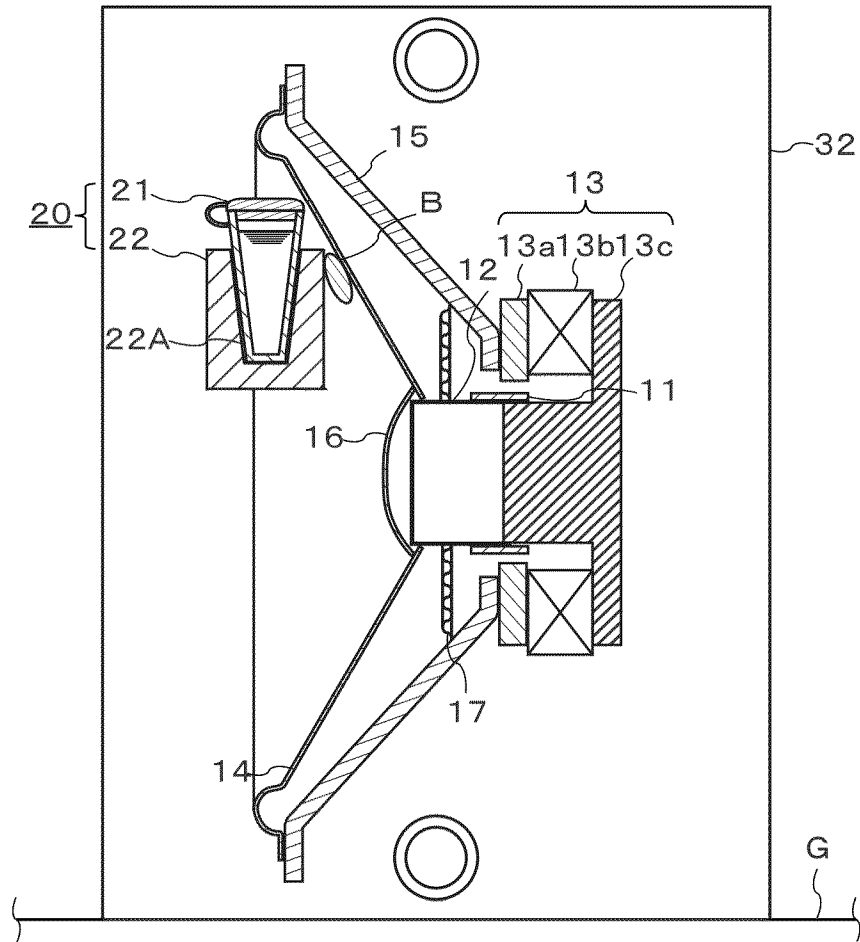
求項 9 に記載の核酸変性方法。

[請求項11] 請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の核酸変性方法により一本鎖核酸を得る工程と、前記一本鎖核酸を用いて二本鎖核酸を増幅させる工程と、を含む核酸の増幅方法。

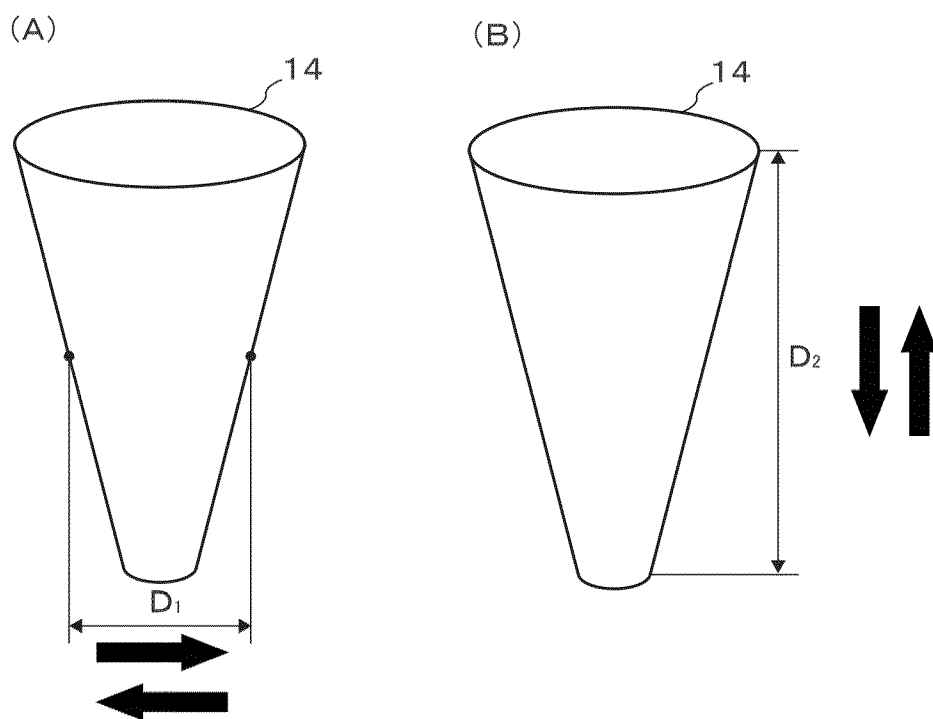
[図1]



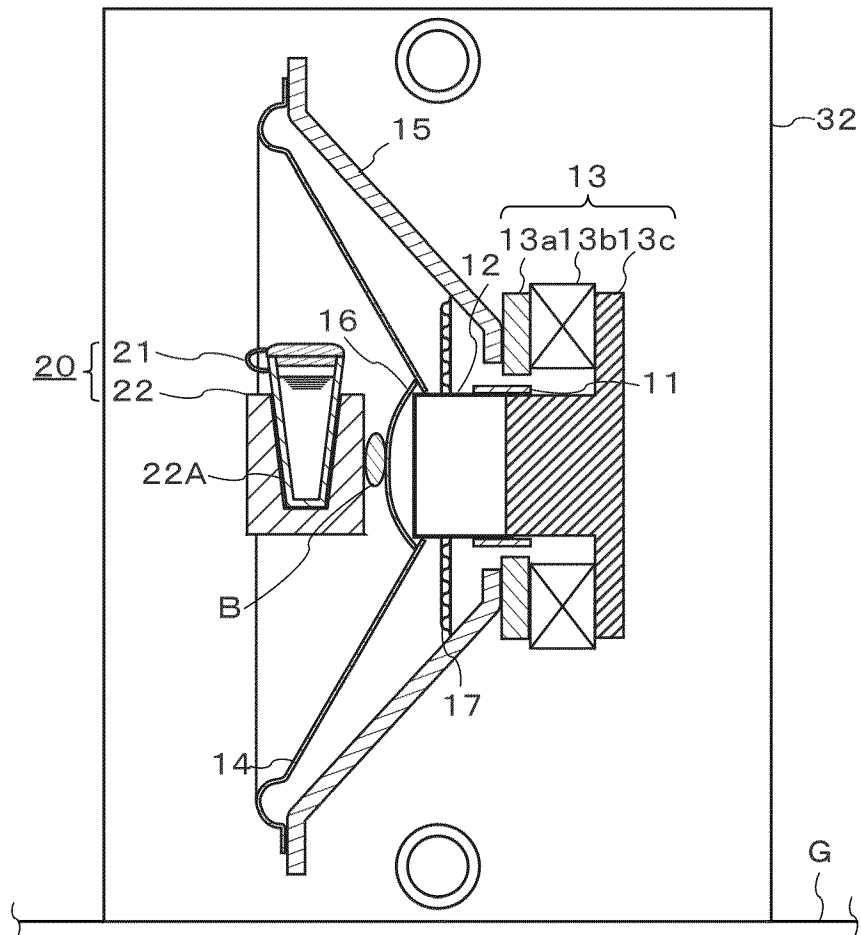
[図2]



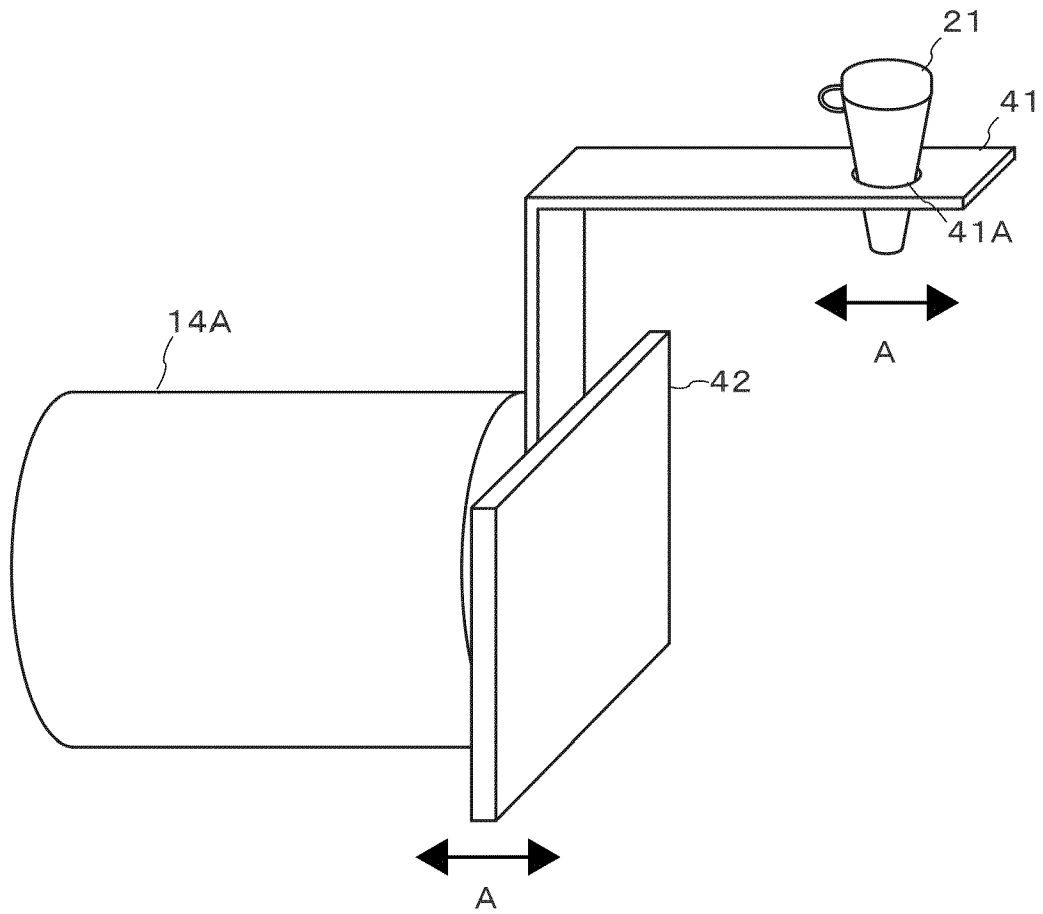
[図3]



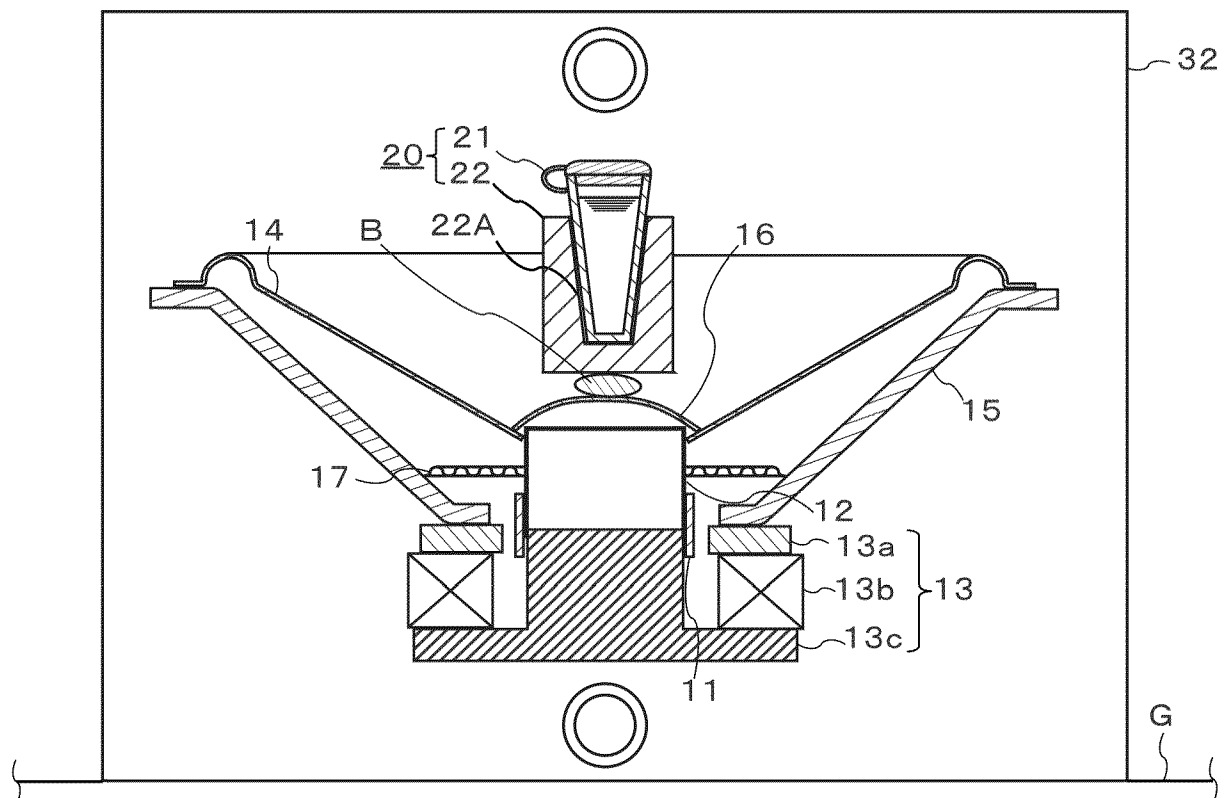
[図4]



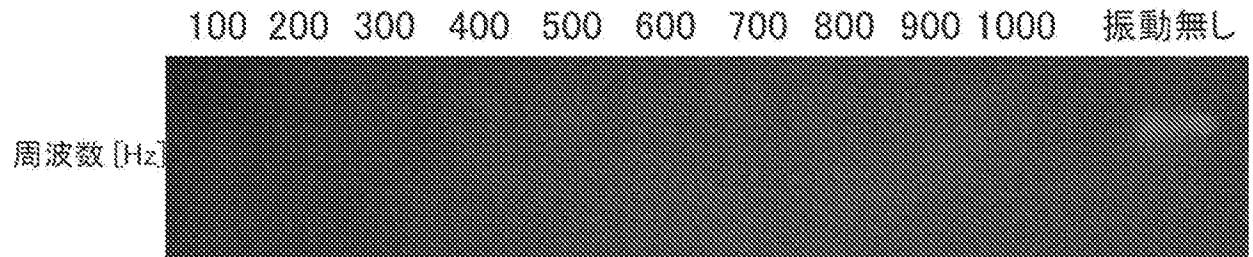
[図5]



[図6]



[図7]

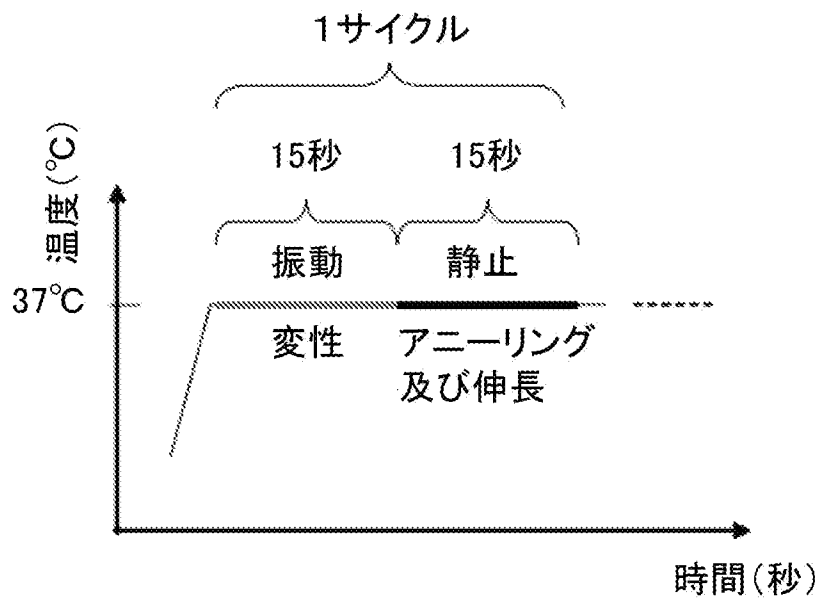


[図8]

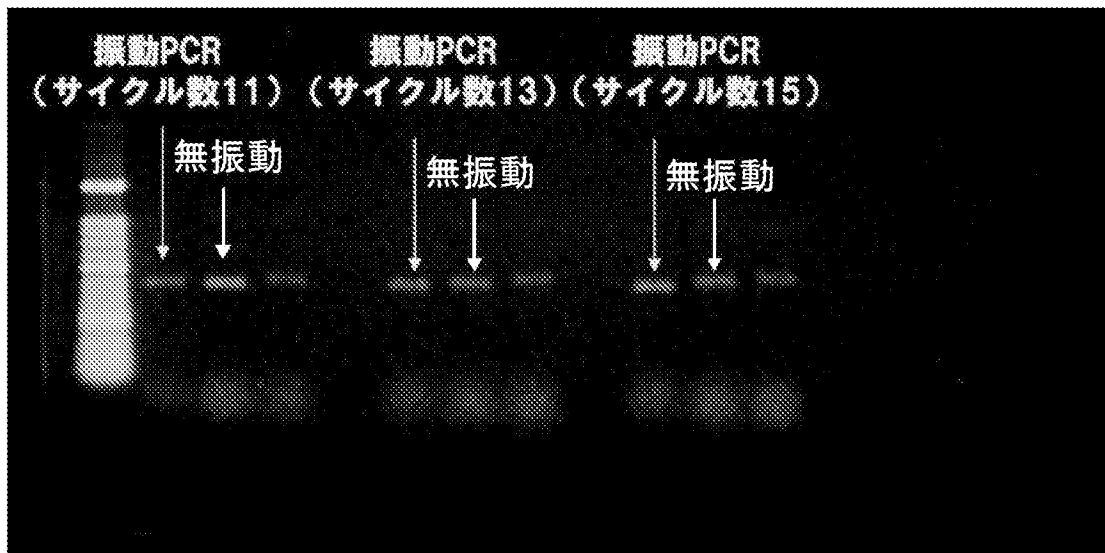




[図9]



[図10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/073039

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01)i, C12M1/42(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68  
(2006.01)i

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)

C12M1/00, C12N15/00-15/90, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII), WPIDS(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	SOKOLOFF, J. B., Damping and softening of low frequency vibrational modes of long molecules when placed in a viscous solvent., The journal of chemical physics, 1988, Vol.89, No.4, pages 2330-2335	<u>1, 4-8</u> 2-3, 9-11
A	WO 2010/138800 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.), 02 December 2010 (02.12.2010), entire text & US 2011/0130560 A1 & CA 2763354 A1 & EP 2435565 A1 & JP 2012-527905 A	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

"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  
06 November, 2013 (06.11.13)

Date of mailing of the international search report  
19 November, 2013 (19.11.13)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/073039

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/057375 A2 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.), 15 May 2008 (15.05.2008), entire text & WO 2008/057375 A3            & EP 2140026 A2 & JP 2010-508813 A            & US 2010/0112567 A1	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12M1/42(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i		
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)) Int.Cl. C12M1/00, C12N15/00-15/90, C12Q1/68		
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 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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(JDreamIII), WPIDS(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
X A	SOKOLOFF, J. B., Damping and softening of low frequency vibrational modes of long molecules when placed in a viscous solvent., The journal of chemical physics, 1988, Vol.89, No.4, pages 2330-2335	1, 4-8 2-3, 9-11
A	WO 2010/138800 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 2010.12.02, 全文 & US 2011/0130560 A1 & CA 2763354 A1 & EP 2435565 A1 & JP 2012-527905 A	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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、一般的技術水準を示すもの 「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矛盾するものではなく、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 06. 11. 2013	国際調査報告の発送日 19. 11. 2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 清水 晋治 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3535

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	WO 2008/057375 A2 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.) 2008.05.15, 全文 & WO 2008/057375 A3 & EP 2140026 A2 & JP 2010-508813 A & US 2010/0112567 A1	1-11