蛍光相関分光法による DNA の検出*

金城政孝**

Fluorescence Correlation Spectroscopy in DNA Analysis / Masataka KINJO

Key words: fluctuation analysis, fluorescence correlation spectroscopy, translational diffusion, single molecule detection, molecular diagnosis, laser spectroscopy, restriction enzyme, homogeneous assay

1. はじめに

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, 以下 FCS) は溶液中の蛍光分子のブラウン運動を利用して分子の数と分子の大きさ、または形といった物理量を測定する方法である。FCS の概念や理論、そして基本的な実験は 20 年以上も前にすでに報告されているものの^{1)~4)}、実用的に広く利用できる方法ではなかった。しかしここ数年発展してきた共焦点光学検出系やレーザ技術などの光技術と、また、パーソナルコンピュータを利用したデジタル解析装置などの急速な発展により、FCS は生体高分子の簡便な極微量高感度分析法・検出法として利用されるようになってきた^{5)~7)}。FCS の基本的な特徴は、顕微鏡視野下の極微小領域における平均数個の蛍光分子のブラウン運動に由来する蛍光の「ゆらぎ」を通して、均一系溶液に含まれる蛍光分子の濃度や分子間相互作用を、物理的な分離過程を経ずに、しかもほぼ実時間でモニタできることである。そのため単一分子検出法の一つとして数えられている⁸⁾。また FCS が溶液中の自由な分子運動を検出しているため、研究対象が *in vitro* における分子だけでなく、生きたままの細胞内における物質輸送や分子間相互作用の解析法としても注目されるようになってきた。

本稿では FCS 測定法自体の解説とそれを利用した核酸研究について紹介し、あわせて遺伝子工学や広く分子診断法への応用についても述べてみたい。

2. 蛍光相関分光法

蛍光相関分光装置のダイアグラムを図 1 (a) に示す。基本的な構成はレーザ光励起の共焦点光学系を試料測定部とし、そこでの蛍光発光を検出器でとらえた後、デジタル相関器でデータの記録と解析を行うようになっている。試料測定部の模式的に図 2 B に示す。励起光であるレーザ光は試料溶液のほんの一点に集中され、かつ共焦点光学系の特性からその一点からの蛍光発光を検出器でとらえることになる。実際の溶液中の測定領域は理想的な点ではなく図 1 (c) に示すような円柱状の領域となり、その大きさは直径が約 400 nm、軸長が約 2 μm 、容積としてフェムトリットル (10^{-15} L) の領域になる。この大きさが FCS が対象としている領域であり容積となる。さて、1 M 濃度で 1 L の溶液には約 6×10^{23} 個の分子が存在しているが、フェムトリットル領域には 6×10^8 個の分子が存在し、実際の実験でもよく使われる 10 nM (10^{-8} M) 程度の濃度になると、その領域には平均 5, 6 個の分子が存在することになる。ここで、FCS の測定領域は溶液であり、各蛍光分子はブラウン運動を行っている。したがって一定の測定領域における分子の数は常に一定ではなく、ある値を中心に変動し「数ゆらぎ」が起きている。さらにこの数ゆらぎに起因して、測定される蛍光の強度に「強度ゆらぎ」が発生することになる。さてこのゆらぎの性質について簡単な説明をすると、分子の大きさが小さいときには拡散速度が速く、従ってゆらぎの速さが速い (図 2 A)、逆に分子の大きさが大きいときは、観察されるゆらぎの変化がゆるやかである (図 2 B)。また、蛍光分子の数が多いときはゆらぎが平均化されその変動が小さく (図 2 C)、反対に数が少ない時はゆらぎの大きさが大きい (図 2 D) ことがわかる。この蛍光強度のゆらぎを解析することで拡散速度に関する情報と分子の数に関する情報を得ることができる。このよ

* 原稿受付 平成 10 年 11 月 24 日

** 北海道大学電子科学研究所 (札幌市北区北 12 条西 6 丁目)

1985 年自治医科大学大学院博士課程修了、医学博士。1985 年北海道大学応用電気研究所助手。1997 年北海道大学電子科学研究所助教授。現在に至る。蛍光相関分光法を用いた生体高分子相互作用の研究。生体高分子を対象とした単一分子検出

図 1

(a) 蛍光相関分光装置の全体の模式図。アルゴンレーザからの励起光は干渉フィルタ (IF)、ダイクロイックミラー (DM) と対物レンズを介してカバーガラス上の試料溶液に導かれる。蛍光発光はロングパスフィルタ (F) を通り、共焦点上のピンホールで焦点面以外のバックグラウンド光を取り除きアバランシェフォトダイオード検出計 (APD) へと導かれる。(b) 試料測定部の模式図。(c) 測定領域の拡大模式図。測定領域はここでは半径 w 、軸長 $2z$ で定義される円柱状の領域となる。

図 2 FCS の測定対象領域を出入りする蛍光分子の挙動、そこから検出される蛍光強度のゆらぎの関係 (A) 小さな分子と速いゆらぎ。(B) 大きな分子と遅いゆらぎ。(C) 分子数が多いときと平均化されるゆらぎ。(D) 分子の数が少ないときと大きなゆらぎ。

実際の測定は単一光子計測モードなので、ここで示したアナログのような変化ではないことに注意。

うなランダムなゆらぎの強度や速さの程度を評価するために、ある時間 t における蛍光強度を $I(t)$ とすると、その自己相関関数は、

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \tag{1}$$

で示される。

図 1 で示される円柱形の領域における平均分子数 N と分子のその領域における平均通過時間 τ (平均滞在時間)

との関係は下のよう示されることが報告されている⁸⁾⁹⁾。

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/w_{xy}^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/w_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \tag{2}$$

ここで D は並進拡散定数、 w_{xy} 、 w_z は観測視野の半径と軸長をそれぞれ示す。

ここで注目してもらいたいことは $\tau=0$ の時は式 (2) は $G(0) = (1/N) + 1$ となり、 y 軸切片の値の逆数がその領域に存在する分子数を直接示すことである。

また分子を球とすると、その半径 r と拡散定数 D の関係はアインシュタイン・ストークスの式で次のように関係づけられる。

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

k_B , T , η はそれぞれボルツマン定数、絶対温度、および溶媒の粘性である。

観測される蛍光発光のゆらぎを与えるものはここで注目しているブラウン運動（並進拡散）のほかにも、回転拡散や化学平衡によるゆらぎが考えられるが、時間領域が異なる場合が多いのでここでは深く議論はしない。

さて、式 (3) からわかるように並進拡散定数は分子量の変化に一般に鈍感である。つまり球状の分子の場合、大きさが 1000 倍変化しても半径 r は 10 倍程度の変化にとどまり、従って拡散速度とそれに関係づけられている自己相関関数 ($G(\tau)$) の変化も 10 倍程度しか見込めないからである。同じ分子どうしや、ほぼ同じ質量の分子間の反応では検出感度は高くないように見えるかもしれないが、それはあくまでも球状分子を考えているからで、剛体棒状の分子では状況が異なってくる。次に棒状の形態を持つ DNA などの核酸研究における FCS の実際の測定を見てみよう。

3. DNA 鎖長の測定

DNA や RNA などの核酸の分子量を見積もることは分子生物学におけるもっとも重要な分析手段である。DNA 分子量の変化は DNA 鎖長に直接比例し、目的とする DNA を識別したり分画・精製するために日常的に使われている。

鎖長と蛍光相関関数の関係を調べるために、あらかじめランダムに蛍光ラベルをした 50, 217, 343 と 500 塩基対の長さの DNA を酵素を用いた方法で合成し、その拡散時間を測定した¹⁰⁾¹¹⁾。測定は DNA を含む溶液を約 1 滴 (10 μ L) 図 1 (b) のようにカバーガラス面に置くだけである。図 3 (a) に各々の長さの自己相関関数を示す。DNA 鎖長が長くなるにつれて右側へシフトしていくのがわかる。得られたデータを式 (2) に従って解析した結果が図 3 (b) に示している。図 3 (b) の記号は実際の FCS の測定結果を示し、実線のカーブは回転楕円体の拡散速度を求める式に DNA 塩基対の直径を 2 nm、塩基対の間隔 0.34 nm を当てはめて計算したものである。また、同じ分子量で球状と仮定し計算した結果を破線で示した。DNA 分子は溶液中でかなり強固な棒状の構造をしていることが知られているが、ここでの結果は FCS の測定結果と理論計算から求めた結果が非常によく一致し、FCS 測定の精度を示している。塩基数がさらに長くなると、DNA は徐々に折れ曲がり次第に柔らかな構造の性質を示してくる。図 3 (b) の挿入図はその結果である。

FCS による測定がかなり精度の良い方法であることを

(a) 蛍光標識 DNA の蛍光相関関数。モノマー (*), 50 塩基対 (●), 217 塩基対 (○), 343 塩基対 (■), 500 塩基対 (□)。縦軸は 1 に規格化した。

(b) DNA 鎖長と拡散時間との関係とモデルとの比較。拡散時間は DNA モノマーに対して規格化してある。実線は棒状分子として、破線は球状分子として計算した結果。挿入図はさらに長い DNA 分子の時の関係を示す。

図 3

ここで示したが、さらに注目してもらいたい点はこの測定がカバーガラスの上の液滴の蛍光を測定した無侵襲測定である点である。各試料は測定の後、さらに詳細な分析や別の実験にすぐ使うこともできる。次に一つの DNA 試料液滴を用いて、酵素反応を解析した例を示そう。

4. 酵素活性の解析

先の DNA 鎖長の FCS の測定では DNA 分子を含む液滴をカバーガラスを通して蛍光のゆらぎを測定した。ランダムに蛍光レベルされた 500 塩基対 DNA を末端の方から酵素により切断していくと、溶液の全体の系の中には鎖長の短くなったポリマー色素としての DNA と、切り出され徐々に増加してくるモノマーの蛍光色素が混在することになる。その過程を時間を追って測定した結果を図 4 に示す。各測定は 1 分で済む。反応時間によって相関関数の y

図4 500塩基対DNAを核酸分解酵素T7エキソヌクレアーゼで末端から切断していった時の相関関数の変化
時間0の時に反応液20 μ Lに酵素を加え、その後時間を追って測定した。測定時間は1分間。時間の経過とともに振幅が小さくなっていくのがわかる。挿入図は縦軸を規格化して、拡散部分の変化を強調した。時間とともに左へシフトしている。

軸切片 ($G(0)$) が減少し、言い換えると蛍光分子数が増加していることを示している。相関関数を規格化してみると酵素反応に従って相関関数の減衰も速くなり、DNA全体が短くなっている様子が分かる。式(2)で示した相関関数の解析式を比較的単純に拡張した下のような2成分モデルを用いてさらに詳しく酵素反応を解析した。

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N}$$

$$\left[\frac{1-y}{\left(1 + \frac{t}{\tau_{\text{free}}}\right) \left(1 + s^2 \frac{t}{\tau_{\text{free}}}\right)^{1/2}} + \frac{y}{\left(1 + \frac{t}{\tau_{\text{bound}}}\right) \left(1 + s^2 \frac{t}{\tau_{\text{bound}}}\right)^{1/2}} \right] \quad (4)$$

ここで $\tau_{\text{free}} = w_{xy}^2 / 4D_{\text{free}}$, $\tau_{\text{bound}} = w_{xy}^2 / 4D_{\text{bound}}$, $s^2 = w_{xy} / w_z$, D_{free} と D_{bound} はここではモノマーとDNAポリマーのそれぞれの拡散定数である。全体の分子数に占めるDNAポリマーの比率を y としている。

ここでの解析は短くなったDNA鎖とモノマーだけが含まれるとしたシンプルな仮定であるが、実測された相関関数と良く一致した。詳しい解析の結果¹²⁾¹³⁾, 酵素による切断は最初のDNA鎖の長さの約6割まで進行したこと、500塩基のうち蛍光色素でラベルされた塩基は約8個含まれていたことなどがわかった。

この実験ではわずか4 nM程度、しかも1滴(10 μ L)の試料を用いることで、連続的に時間を追って鎖長の変化やそこに含まれる分子数の変化を観察することができ、これらから酵素反応を求めうることを示した。

このようにFCSの測定では分子の大きさの変化や分子数の変化というものを顕微鏡レンズの上

に置いたカバーガラス上の均一溶媒中で簡便に、しかも物理的な分離操作を必要としない無侵襲的手法で測定することができる。次にこれまで煩雑な操作が必要であった遺伝子突然変異の検出について示してみる。

5. 分子診断の可能性

特定の遺伝子配列を認識して切断する一群の酵素が制限酵素 (Restriction Enzyme) という名前で知られている。ある制限酵素で個人や個体由来のDNAを切断すると、人の個性のようにDNA配列にも個々の相異があるため、制限酵素によって切り出されるDNA断片長の長さが異なってくる。このことを遺伝子断片長多系 (Restriction Fragment Length Polymorphism) と言う。RFLPは遺伝性疾患の原因遺伝子や癌遺伝子、癌抑制遺伝子などの検出や、親子鑑定をはじめとする広い意味での血縁関係や集団構造、また米などの作物の系統を明らかにすることに使われている。

筆者らはこのRFLPにおいて、個体間の相違や遺伝子突然変異などで変化する遺伝子断片長の変化と同時に断片数も変化する、ということに注目してFCSによる解析方法を検討してみた。モデル実験として、同じ配列のDNAでも異なる制限酵素では切り出されるDNA断片長と断片数が異なってくることに注目して、DNA配列のよくわかってウイルスDNAと4種類の酵素を用いて(図5)、そこから切り出されてくる断片の長さや数をFCSを用いて測定してみた。ここでも蛍光ラベルをしたDNAに制限酵素を加えて時間を追って測定を行った結果を図6に

図5 M13mp18ウイルス環状DNAの制限酵素地図
各制限酵素名と認識する塩基配列を円の中に記載した。数字は切断場所と切断されてくるDNA断片の長さを示している。

図6 M13 mp18 DNA を図5で示した制限酵素で切断したときの相関関数の変化
酵素を加えて37℃で8時間、16時間、40時間保温した後5 μ Lを測定した。相関関数は酵素を加えないで保温した試料に対して規格化してある。

示す。各測定は前の例と同じく1分である。y軸の値の逆数が分子数になるので、8時間経過した時点を見てもわかるように、それぞれの酵素の種類に従ってy軸切片値が異なる。例えばBspMIを用い40時間経過した点を取ると、約0.4という値が得られる。それから推定される分子断片数は2.5となり、最初の子想図の3断片と比較し、良く一致していることがわかると思う。断片長と蛍光発光を顧慮した詳細な解析の結果では、相関関数の振幅の強度として得られた各々の値はほぼ100%反応が進行していることが示された¹⁴⁾。

このような実験結果をもとに我々はFCSを用いた酵素反応溶液中でのRFLP検出法を提唱した¹⁵⁾。この方法は従来の制限酵素反応後ゲル電気泳動を用いたRFLP解析に比べてはるかに時間的にも経済的にも簡便な方法であることが想像できる(図7)。

また、DNAハイブリダイゼーション¹⁶⁾や酵素的遺伝子増幅法(PCR法)¹⁷⁾¹⁸⁾の溶液中でのダイレクトな検出法としてFCSを用いることが可能であることも示されている。このような均一溶媒系における検出法と、焦点面をカバーするのに必要なサブマイクロリットルオーダーの酵素反

図7 FCSを用いたDNA突然変異の検出法

元のDNA配列のうち例えばACCTGCの中の塩基の一つが変異を起こすと制限酵素BspMIでは切断されなくなる。従って断片数は3から2へ減少しFCSで測定される相関関数に変化が現れる。右側はゲル電気泳動を用いる通常の方法。

応をコントロールする精密工学的手法を組み合わせること、測定時間が短い利点などから、これまでにない大規模試料集団への遺伝子診断や分子診断法として利用可能であろう。具体的には、我々に身近な集団健康診断や農林畜産業などでの育種における品種の管理、食品衛生上でのウイルスや微生物遺伝子の検出、また脳研究などにおける個々

の細胞を識別して遺伝子の発現を解析することも将来可能になることが期待される。核酸を対象とした生理活性物質やコンビナトリアルケミストリー等におけるマスキリングにも応用可能であろう。

6. 終わりに

FCS は先に書いたように直径約 400 nm の領域にレーザー光を集光しその領域からの蛍光を検出する方法である。このような高い空間分解能の特性から、FCS は生きている細胞の中の生化学反応や生理的環境をまた解析しうる方法でもある。結果や解釈等に疑問が残るものの、すでに細胞内でのビーズの動きや、細胞核内での核酸 (mRNA) や内在性の蛍光物質の動きを測定した興味深い例が報告されている^{19)~21)}。また、微細な希薄溶液の流れをコントロールする方法と組み合わせて流束中の蛍光色素分子を検出する方法として利用したり²²⁾、マイクロチャンネル中の単一 DNA 塩基配列解析法のためのモニタとしての利用が考えられている²³⁾²⁴⁾。溶液中の自由な運動ではなく固体表面へ結合した単一 DNA 分子の構造変化を解析する手段としても用いられ²⁵⁾²⁶⁾、2 次元平面での単一分子検出法としての利用も今後発展して行くものと期待できる。

さらに、FCS が 1 種類の蛍光色素を用いるのに比べて 2 種類の蛍光色素を用いた蛍光相互相関分光法 (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) が近年報告されるようになってきた^{27)~30)}。2 台のレーザと 2 つの検出系というようにハードウェアの構成は格段に難しくなるが、FCS では検出が困難であるような分子量が同じくらの分子間の相互作用を検出する方法として今後有望であろう。

FCS は精密な光学系と高感度検出系の上に成り立ち、これまでにない溶液系の高感度微量分析手段となっている。FCS により得られる情報は「分子の大きさ」と「分子の数」というシンプルなものである。逆にこのことは FCS が基本的な検出手段であることを示し、各研究者のアイデア次第で様々な分野で利用できるものと考えられる。

参考文献

- 1) M. Ehrenberg and R. Rigler : Rotational Brownian Motion and Fluorescence Intensity Fluctuations, *Chem. Phys.*, **4**, (1974) 390.
- 2) E. L. Elson and D. Magde : Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory, *Biopolymers*, **13**, (1974) 1.
- 3) D. E. Koppel : Statistical Accuracy in Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Phys. Rev. A*, **10**, (1974) 1938.
- 4) N. Thompson : Topics in Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York and London, (1991) 337.
- 5) M. Eigen and R. Rigler : Sorting Single Molecules: Application to Diagnostics and Evolutionary Biotechnology. [Review], *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, (1994) 5740.
- 6) R. Rigler : Fluorescence Correlations, Single Molecule Detection and Large Number Screening - Applications in Biotechnology, *J. Biotechnol.*, **41**, (1995) 177.
- 7) S. Maiti, U. Haupts and W. Webb : Fluorescence Correlation Spectroscopy: Diagnostics for Sparse Molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, (1998) 11753.
- 8) R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren and P. Kask : Fluorescence Correlation Spectroscopy with High Count Rate and Low Background: Analysis of Translational Diffusion, *Eur. Biophys. J.*, **22**, (1993) 169.
- 9) R. Rigler, J. Widengren and Ü. Mets : Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications, Springer-Verlag, Berlin, (1992) 13.
- 10) 金城政孝, 小山富康 : 拡散測定による DNA 構造解析: レーザー自己相関蛍光測定法の開発, *日本バイオオロジー学会誌*, **9**, 2 (1995) 74.
- 11) S. Björling, M. Kinjo, Z. Föles-Papp, E. Hagman, P. Thyberg and R. Rigler : Fluorescence Correlation Spectroscopy of Enzymatic DNA Polymerization, *Biochemistry*, **37**, 37, (1998) 12971.
- 12) G. Nishimura, R. Rigler and M. Kinjo : Number Analysis of Fluorescence Correlation Spectroscopy for the Cleaving Process of Fluorescence Labeled DNA, *Bioimaging*, **5**, (1997) 129.
- 13) 西村吾朗, 金城政孝 : 蛍光相関法による単一分子レベルの酵素反応解析, *生物物理*, (1999) 印刷中.
- 14) M. Kinjo, G. Nishimura, T. Koyama, Ü. Mets and R. Rigler : Single-molecule Analysis of Restriction DNA Fragments Using Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Anal. Biochem.*, **260**, 2, (1998) 166.
- 15) M. Kinjo and G. Nishimura : Fluorescence Correlation Spectroscopy as a Detection Tool of Point Mutation in Genes, *Bioimaging*, **5**, (1997) 134.
- 16) M. Kinjo and R. Rigler : Ultrasensitive Hybridization Analysis Using Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Nucleic Acids Res.*, **23**, (1995) 1795.
- 17) M. Kinjo : Quantitative Analysis of Polymerase Chain Reaction Using Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Anal. Chim. Acta*, **365**, (1998) 43.
- 18) M. Kinjo : Detection of Asymmetric PCR Products in Homogeneous Solution by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biotechniques*, **25**, 4, (1998) 706.
- 19) R. Brock, M. Hink and T. Jovin : Fluorescence Correlation Microscopy of Cells in the Presence of Autofluorescence, *Biophys. J.*, **75**, (1998) 2547.
- 20) J. Politz, E. Browne, D. Wolf and T. Pederson : Intranuclear Diffusion and Hybridization State of Oligonucleotides Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy in Living Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, (1998) 6043.
- 21) K. Berland, P. So and E. Gratton : Two-photon Fluorescence Correlation Spectroscopy: Method and Application to the Intracellular Environment, *Biophys. J.*, **68**, (1995) 694.
- 22) R. Keller, W. Ambrose, P. Goodwin, J. Jett, J. Martin and M. Wu : Single-Molecule Fluorescence Analysis in Solution, *Appl. Spectrosc.*, **50**, 7, (1996) 12 A.
- 23) M. Brinkmeier, K. Dörre, K. Riebesel and R. Rigler : Confocal Spectroscopy in Microstructures, *Biophys. Chem.*, **66**, (1997) 229.
- 24) K. Dörre, S. Brakmann, M. Brinkmeier, K. Han, K. Riebesel, P. Schwill, J. Stephan, T. Wetzl, M. Lapczynska, M. Stuke, R. Bader, M. Hinz, H. Seliger, J. Holm, M. Eigen and R. Rigler : Techniques for Single Molecule Sequencing, *Bioimaging*, **5**, 3, (1997) 139.
- 25) S. Wennmalm, L. Edman and R. Rigler : Conformational Fluctuations in Single DNA Molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 20, (1997) 10641.
- 26) L. Edman, Ü. Mets and R. Rigler : Conformational Transitions Monitored for Single Molecules in Solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 13, (1996) 6710.
- 27) A. Castro and J. G. K. Williams : Single-molecule Detection of Specific Nucleic Acid Sequence in Unamplified Genomic DNA, *Anal. Chem.*, **69**, (1997) 3915.
- 28) A. Koltermann, U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler and M. Eigen : Rapid Assay Processing by Integration of Dual-color Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy: High Throughput Screening for Enzyme Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 4, (1998) 1421.
- 29) U. Kettling, A. Koltermann, P. Schwill and M. Eigen : Real-time Enzyme Kinetics Monitored by Dual-color Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 4, (1998) 1416.
- 30) R. Rigler, Z. Földes-Papp, F. Meyer-almes, C. Sammet, M. Volcker and A. Schnetz : Fluorescence Cross-correlation - A New Concept for Polymerase Chain Reaction, *J. Biotechnol.*, **63**, 2, (1998) 97.