

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 19/34

C12Q 1/68

C12M 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510066958.1

[43] 公开日 2005 年 11 月 2 日

[11] 公开号 CN 1690218A

[22] 申请日 2005.4.25

[21] 申请号 200510066958.1

[30] 优先权

[32] 2004.4.26 [33] JP [31] 2004-130041

[71] 申请人 佳能株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 塚田护

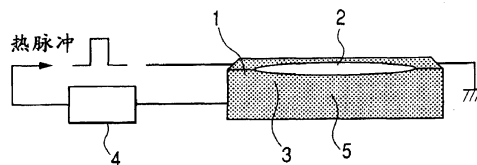
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 陈 昕

权利要求书 5 页 说明书 40 页 附图 4 页

[54] 发明名称 PCR 扩增反应装置、以及利用该装置的 PCR 扩增反应方法

[57] 摘要

本发明提供以目的核酸分子作为模板，可以缩短 PCR 法进行核酸扩增反应需要的时间的 PCR 扩增反应方法、以及可利用的装置。本发明的方法是如下所述的方法：使用可储存 PCR 反应液的微小容量储液部和附设对储存在该储液部的反应液直接、热接触的局所加热用加热器的 PCR 反应容器，向附设的加热器供给脉冲波形电流，实施 PCR 反应的温度循环，可实施高速 PCR 扩增反应。



ISSN 1008-4274

1. 一种PCR扩增反应方法,是由作为模板的核酸链通过PCR反应,对含有对应的碱基序列的DNA链进行扩增的PCR扩增反应方法,其特征是:

作为储存含有上述模板核酸链的PCR反应液的反应容器,
对于被收容的反应液在可能热接触的位置配置加热器,
将上述设定储存量的PCR反应液储存在该附带加热器的反应容器的溶液储存部,

使该附带加热器的反应容器整体与保持在规定温度的介质接触,持续维持在该规定温度,

对于设置在上述反应容器的加热器,外加规定脉冲电压,通过对应于该脉冲时间宽度、脉冲电压大小的脉冲加热,形成PCR反应用的温度循环,

设定重复多次进行上述脉冲电压的外加,反复多次进行与此对应的该温度循环,进行PCR反应的工序。

2. 权利要求1所述的PCR扩增反应方法,其中上述反应容器设定为对向上述加热器外加规定脉冲电压,发生热脉冲,该反应液的温度以至少可以0.01秒数量级显示应答的热容量的反应液储存量和溶液储存部形状。

3. 权利要求1所述的PCR扩增反应方法,其中进行上述PCR反应的工序是周期性反复进行脉冲电压的外加,反复进行与此对应的多次该温度循环的工序。

4. 一种PCR反应装置,是根据权利要求1所述的PCR扩增反应方法可实施PCR反应的PCR反应装置,其特征在于:

作为储存PCR反应液的反应容器,
使用在对上述被储存的反应液可直接进行热接触的位置配置加热器,

设定为对向上述加热器外加规定脉冲电压,发生热脉冲,该反应

液的温度以至少可以在毫秒数量级显示应答的热容量的反应液储存量和溶液储存部形状的反应容器，

备有具有可保持该附带加热器的反应容器的构造，借助于通过与该反应容器的接触产生的热传导，可将该反应容器整体持续维持在规定温度的加热部件，

用于将该加热部件的温度控制在规定温度的加热部件温度控制机构，

对于配置在上述反应容器的加热器，按照所期望的重复次数周期性地外加所期望的脉冲时间宽度、脉冲电压大小的脉冲状电压的脉冲电压发生机构，

用于管理上述加热部件温度控制机构和脉冲电压发生机构操作的MPU单元，

用于输入·设定来自上述MPU单元的管理条件的键盘输入装置和用于表示来自上述MPU单元的管理条件、或被管理的状况信息的表示器。

5. 一种PCR反应容器，是根据权利要求1所述的PCR扩增反应方法可实施PCR反应的PCR反应容器，其特征在于：

储存PCR反应液的反应容器是：在对上述被储存的反应液可直接进行热接触的位置配置加热器，设定为对向上述加热器外加规定脉冲电压，发生热脉冲，该反应液的温度以至少可以在毫秒数量级显示应答的热容量的反应液储存量和溶液储存部形状的附带加热器的反应容器。

6. 一种单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法，

是对具有单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中含有的特定碱基序列的核酸分子进行检测，检测该核酸分子表现出的单核苷酸多态性或遗传多态性的方法，其特征在于：

在具有上述单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中，选择具有对应于相互碱基序列表现出差异的部分的碱基序列的碱基序列的多种核酸探针，

在多种该核酸探针中，选定上述部分碱基序列使得在单核苷酸多态性或遗传多态性之间相互表现出差异的碱基至少一个以上在该核酸探针碱基序列中处于其 3' 末端侧位置，

将多种该核酸探针借助于其 5' 末端连接的接头在同一载体表面上构成结合成阵列状的微阵列，

含有检测对象的特定碱基序列的核酸分子在有选择地只与构成微阵列的多种该核酸探针中的一个进行杂交的条件下，

以含有检测对象的特定碱基序列的核酸分子作为模板，以与该模板有选择地杂交的上述多种核酸探针中的一种作为引物，通过使用温度循环的 PCR 扩增反应进行互补 DNA 链的延伸，

通过在微阵列中对得到的互补 DNA 链的延伸的一个多种该核酸探针进行特定，

对含有对应于被特定的一种上述多种核酸探针含有的碱基序列的部分碱基序列的单核苷酸多态性或遗传多态性进行检测。

7. 权利要求 6 所述的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法，其中，在上述 PCR 扩增反应中，设置由变性、退火和延伸过程构成的温度循环，无论构成一个温度循环的该变性、退火以及延伸的各过程时间中的哪一个都被设定在 10 秒钟以下。

8. 一种单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用反应容器，

是根据权利要求 6 所述单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法可以实施单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用 PCR 扩增反应的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用反应容器，其特征在于：

作为对象的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测是对在具有单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中含有的特定碱基序列法核酸分子进行检测，检测该核酸分子表现出的单核苷酸多态性或遗传多态性，

在具有上述单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中，选择具有对应于相互碱基序列表现出差异的部分碱基序列的碱基序列的多种核酸探针，

在多种该核酸探针中，选定上述部分碱基序列使得在单核苷酸多态性或遗传多态性之间相互表现出差异的碱基至少一个以上在该核酸探针碱基序列中处于其 3' 末端侧位置，

将多种该核酸探针借助于其 5' 末端连接的接头以阵列状结合在同一载体表面上构成微阵列的上述载体在其表面处于可与该反应容器中反应液接触的位置附设在该反应容器中，

而且，对于构成该载体表面上微阵列的上述多种核酸探针，与形成上述 PCR 扩增反应中温度循环的温度变化的热源可借助于该载体中热传导进行热接触，

在上述 PCR 扩增反应时，要使与上述多种核酸探针接触的反应液量对于结合多种该核酸探针的载体表面，相对于其表面的法线方向的液体厚度为 3mm 以下那样设定该反应容器中反应液的储存量与液储存部形状。

9. 权利要求 8 所述的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用反应容器，其中构成上述微阵列的多种核酸探针可结合在载体表面的上述载体材料是无机材料。

10. 一种 PCR 反应装置，是用于进行 PCR 扩增反应的装置，备有：
用于储存 PCR 反应液的反应容器，

在可与上述储存的反应液进行热接触的位置配置的加热器，

具有可保持该附带加热器的反应容器的构造，借助于通过与该反应容器的接触产生的热传导，可将该反应容器整体持续维持在规定温度的部件。

11. 权利要求 10 所述的 PCR 反应装置，在可与上述储存的反应液直接进行热接触的位置配置加热器，

12. 权利要求 10 所述的 PCR 反应装置，其中，上述加热器是叠层在反应容器内壁的至少一部分上构成的。

13. 权利要求 10 所述的 PCR 反应装置，备有用于将该加热部件的温度控制在规定温度的加热部件温度控制机构。

14. 一种 PCR 反应装置，备有：

用于管理上述加热部件温度控制机构以及脉冲电压发生机构操作的 MPU 单元，

用于输入·设定来自上述 MPU 单元的管理条件的键盘输入装置，以及

用于表示来自上述 MPU 单元的管理条件、或被管理的状况信息的表示器。

PCR 扩增反应装置、以及利用该装置的 PCR 扩增反应方法

技术领域

本发明涉及到 PCR 扩增反应装置以及利用该装置的 PCR 扩增反应方法。特别是本发明涉及到可在遗传多态性、单核苷酸多态性 (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) 等解析中利用的 PCR 扩增反应装置、以及利用该装置的 PCR 扩增反应方法、以及应用该装置和/或方法的遗传多态性、SNP 等的检测方法。

背景技术

到目前为止, 作为对核酸链中特定区域进行扩增的代表性手段, 可利用 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法。在 PCR 法中, 对于模板核酸链、例如双链 DNA 等希望扩增的区域, 使用与其两末端的部分碱基序列对应的称为 PCR 引物的一对 DNA 片段, 加 DNA 聚合酶和作为底物的各核酸, 通过反复进行所谓的变性、退火、延伸的温度循环, 可只对目的区域的 DNA 链进行扩增。在该 PCR 反应的温度循环中, 利用 1 个循环为例如变性: 94°C、30 秒; 退火: 55°C、30 秒; 延伸: 72°C、1 分钟的工序, 合计进行 30 次循环的条件。在这样的条件下, 所有温度循环需要的时间约 1.5 小时左右。而当对希望扩增的区域的碱基长度更长的核酸链进行扩增时, 要将由引物 3' 末端开始进行的 DNA 链延伸反应的延伸过程的时间间隔设定更长些。因此, 一般来说温度循环需要的延长时间达到约 1.5 ~ 2.5 小时。

以将需要这样长时间的温度循环工序尽可能缩短一些为目的, 提出了几个方案。例如, 在约 20 ~ 30 分钟内结束扩增反应的装置、Light Cycler (Roche Diagnostics) 等近年来都有销售。然而, 该销售装置中利用的缩短时间法是通过简单地对毛细管状容器吹可调节温度的热风, 试图缩短温度变化上花费的时间的手法。即通过利用毛细管状容

器，着眼于尽可能将反应容器本身的体积缩小，使其热容量变小，可以获得在温度变化上花费的时间被缩短的效果，其温度控制手法本身原理与以往没有什么变化。而如果考虑到在本装置中作为加热和冷却介质利用的空气密度低，其热传导率也小，是最难于进行热传导的介质之一，不能说是最适宜的温度控制系统。

而 PCR 法的最大优点在于可以由含有从生物体采集的种种核酸链的样品中有选择地扩增具有特定碱基序列的核酸链。在进行遗传多态性、SNPs 等解析时，在解析之前，首先需要从含有种种核酸链的样品中有选择地只扩增表现出作为解析对象的碱基序列的不同的核酸链。在该解析 DNA 样品的制备工序中，利用对上述碱基序列的选择性，可以广泛利用 PCR 扩增方法。

以往，对于遗传多态性、SNPs 等解析手法中，特别是还没有限定于碱基序列的方法。对于各种遗传多态性、SNPs 等解析，根据过去积累的技术，可以使用对应于已知表现出差异的部分碱基序列的检测探针用寡核苷酸片段。而作为基于微阵列法的方法，利用 Luminex 公司的 100 种左右的磁珠阵列以及 Nanogen 公司的电极阵列，与以往的微阵列法比较，可以谋求杂交反应时间更加高速化。

除了利用与检测探针杂交反应的微阵列法以外，已知还有几个解析方法。在 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法中，对于有选择扩增的双链 DNA，使可切断表现出差异的部分碱基序列的限制酶作用，由生成的多个 DNA 片段的电泳图的差异判定有无对应的部分碱基序列。而在直接碱基序列决定法中，通过将含有遗传多态性、SNPs 等的核酸链作为模板，利用 DNA 测序用的 Dye 终止剂进行 PCR 扩增后，通过 DNA 测序直接决定碱基序列，判定有无表现出差异的部分碱基序列。

RFLP 法对于可检测的多态性，需要有选择地使用可切断那个表现出差异的部分碱基序列的限制酶。因此从方法论上看，存在着只适用对应于可利用的限制酶酶切位点的部分碱基序列表现出差异的情况等适用范围有限的问题。而直接碱基序列决定法从原理上讲，由于实际

上使用 DNA 测序仪决定直接碱基序列，所以适用范围没有限定。然而，近似的配列在几个模板中都含有时，单一基因的解析困难，存在在一部分 HLA 分型中出现的错读 (ambiguity) 问题。另外，存在着 DNA 测序利用的检体预处理中需要时间、DNA 测序仪设备的运转费、泳动时间等的作业上、经济效率上的问题。特别是可同时分析的多态数受到 DNA 测序设备的毛细管数的限定，另外相对于毛细管数，如果要分析的检体数少，会造成设备运转效率上的浪费。如果考虑到这些制约，很难说直接碱基序列决定法是最合适的方法。

另外，使用微阵列的方法具有对于涉及高达数千~1万点的许多探针可一并分析的优点。反之，对利用各个探针要检测的核酸链要加上荧光标记等标记，这样的检体预处理需要的时间与直接碱基序列决定法同样，需要数小时，而且，存在着需要对与作为对象的每一个探针进行相关预处理的操作上繁琐问题。另外，在微阵列上的探针·杂交反应通过固相反应进行，反应需要数小时。还有如果检体的 DNA 链长比参与杂交的探针长度过长，有时会有诱发与其他探针的交差反应的可能性。使用磁珠阵列或电极阵列的方法应当是可大幅度改善探针·杂交反应时间的手段。反之，形成象以往那样微阵列的大规模的探针·阵列是困难的，只限于探针种类为 100 左右的阵列。例如，有关 HLA 的多态性，已经确认二百多种等位基因，使用磁珠阵列或电极阵列的方法对于这样以多种类作为对象的分析不能充分应对。

发明内容

就象以上说明的那样，以往的遗传多态性、SNPs 等解析手法能够充分应对个别的应用领域，在谋求更广泛应用方面，无论哪一种手法都是各有优缺点。

在利用无论哪一种解析手法上都是希望减少检体预处理需要的时间、即在用于只选择扩增作为解析对象的碱基序列表现出差异的核酸链的 PCR 扩增反应中所花费的时间。

此外，使用微阵列的方法虽然对于多种探针具有可一并分析的优

点，但在谋求广泛利用方面，希望对于检体预处理需要的时间、以及在微阵列上的探针·杂交反应所需要的时间都进一步减少。

本发明正是解决这些课题的发明，本发明的第一个目的在于提供可用于检体预处理的，可大幅度降低 PCR 扩增反应花费的时间的新的 PCR 扩增装置、以及利用该装置的 PCR 扩增方法。而本发明的第二个目的在于提供这样的新 PCR 扩增装置、以及可以运用利用该装置的 PCR 扩增方法，而且可以利用固定于微阵列上的探针，以高灵敏度，同时更简便、更短时间内检测遗传多态性、SNPs 的新的 SNPs 或遗传多态性为对象的 DNA 检测方法。

本发明人首先就第一个目的的解决手段进行研究，看看在 PCR 扩增反应的温度循环中，成为限速的过程是哪个过程。一般来说，在 PCR 扩增反应中，利用由模板的一条链核酸分子与引物的杂交反应、即与互补链结合形成双链的退火过程；杂交后、使 DNA 聚合酶作用，由构成这样双链的引物 3'末端进行 DNA 链的延伸反应的延伸过程；延伸反应后，加热使双链核酸解离，分离为模板的一条链核酸分子和其互补链的变性过程构成的温度循环。此时，想到了杂交后使 DNA 聚合酶作用，在由构成该双链的引物的 3'末端进行 DNA 链延伸反应的延伸过程中，通过 DNA 聚合酶完成 DNA 链的延伸反应，互补链合成完成需要的时间限制了整个扩增反应。另外，也发现对于加热使双链核酸解离，分离为模板的一条链核酸分子和其互补链的变性过程，如果将该温度设定充分高，即使数十 ms 的加热时间内，过半数的双链的热解离也完成了。

另外，通常在模板的一条链核酸分子与引物的杂交反应中，有时会发生引物与其互补的碱基序列部分以外错误杂交的错合·杂交。利用与全匹配配列杂交的引物的 T_m 值（热解离温度）和带有错配的配列的错合·杂交的引物的 T_m 值不同，通过选择不产生引物的错合·杂交的温度作为退火过程的温度，避免错合·杂交。此时，在此之后的延伸过程，例如将与全匹配配列杂交的引物的 T_m 值（热解离温度）作为退火过程的温度，在此温度以上的温度范围中可以根据 DNA 聚合酶进行的

DNA 链延伸反应的温度条件适当选择。

考虑到以上事实，发现在温度循环过程中，将整个反应液预先在退火过程的温度进行预热，在变性过程中只需数十 ms 就可将反应液的温度加热到目的变性温度以上，然后可以将反应液温度一直急速冷却至退火过程的温度，可以将一个温度循环需要的时间大幅度缩短。根据这一见解，直至完成本发明第一种方式涉及到的 PCR 扩增反应方法的发明。

即本发明第一种方式涉及到的 PCR 扩增反应方法，是由作为模板的核酸链通过 PCR 反应，对含有对应的碱基序列的 DNA 链进行扩增的 PCR 扩增反应方法，其特征在于：

作为储存含有上述模板核酸链的 PCR 反应液的反应容器，对于被收容的反应液在可能热接触的位置配置加热器，将上述设定储存量的 PCR 反应液储存在该附带加热器的反应容器的溶液储存部，

使该附带加热器的反应容器整体与保持在规定温度的介质接触，持续维持在该规定温度，

对于设置在上述反应容器的加热器，外加规定脉冲电压，通过对应于该脉冲时间宽度、脉冲电压大小的脉冲加热，形成 PCR 反应用的温度循环，

设定上述脉冲电压的外加反复多次进行，与此对应的该温度循环反复进行多次，进行 PCR 反应的工序。

上述反应容器设定为对向上述加热器外加规定脉冲电压，发生热脉冲，该反应液的温度以至少可以 0.01 秒数量级显示应答的热容量的反应液储存量和溶液储存部形状优选。另外，进行上述 PCR 反应的工序优选是周期性反复进行上述脉冲电压的外加，反复进行多次与此对应的该温度循环工序。

另外本发明也提供实现上述方法的 PCR 装置。
即本发明涉及到的用于进行 PCR 扩增反应的装置备有用于储存 PCR 反应液的反应容器，

对于上述被储存的反应液在可能热接触的位置配置加热器，
对该加热器外加规定脉冲电压的脉冲电压发生机构，

具有可保持该附带加热器的反应容器的构造，借助于通过与该反应容器的接触产生的热传导，可将该反应容器整体持续维持在规定温度的部件。

对于被收容的反应液优选是在可直接进行热接触的位置配置加热器。

上述加热器如果叠层在至少反应容器内壁的一部构成比较好。

另外优选含有用于将该加热部件 (heating block) 的温度控制在规定温度的加热部件温度控制机构。

优选再备有用于管理上述加热部件温度控制机构和脉冲电压发生机构操作的 MPU 单元，和

用于输入·设定来自上述 MPU 单元的管理条件的键盘输入装置以及用于表示来自上述 MPU 单元的管理条件、或被管理的状况信息的表示器。

其次，本发明人就第二个目的的解决手段进行了研究，研究在 PCR 扩增反应中，对于模板核酸分子，抑制由错合·杂交的引物 3'末端通过 DNA 聚合酶进行的 DNA 链延伸反应的手段。可知使用的引物对于模板核酸分子，即使是带有错配的配列，只要是该 3'末端部是互补的，由该 3'末端通过 DNA 聚合酶进行 DNA 链延伸反应。另外在引物 3'末端有错配时，发现在存在该错配的 3'末端持续通过 DNA 聚合酶开始 DNA 链延伸反应可以说发生频率很低，完全不可能的程度。

另外，对于模板核酸分子，关于含有存在错配的碱基序列的引物，对该错配存在于引物中央时的 T_m 值和错配存在于引物 5'末端或 3'末端时的 T_m 值进行比较。结果，以无错配引物的 T_m 值作为基准，判明虽然错配存在于引物中央时的 T_m 值有意义的低，但错配存在于引物 5'末端或 3'末端时的 T_m 值只是稍低些，几乎没有差别。

但是，对于模板核酸分子，如果考虑到由错合·杂交的引物 3'末端通过 DNA 聚合酶进行的 DNA 链延伸反应的反应产物量，错配存在于引

物中央时，或错配存在于引物 5'末端时，判明有相当的效率，可获得经 DNA 链延伸产生的反应产物，但当错配存在于引物 3'末端时，完全没有获得 DNA 链延伸产生的反应产物。

另一方面，假如错配存在于引物中央时，或错配存在于引物 5'末端时得到的反应产物，其 5'末端本身应当变成具有有错配的该引物的碱基序列的产物。因此，来自该错合·杂交的引物的反应产物对于与带有这样错配的引物的碱基序列互补的探针，可完全杂交。另外，对于模板核酸分子，判明来自无错配引物的反应产物对于与 5'末端或 3'末端存在错配的引物碱基序列互补的探针，可以高频率进行错合·杂交。

根据这些见解，进一步研究，发现将错配存在于其 3'末端的引物 DNA 和无错配引物 DNA 与在其 5'末端连接上接头于同一载体表面上构成结合成阵列状的微阵列时，以作为对象的互补的单链核酸分子为模板，进行单链 PCR 扩增反应，得到只在无错配引物 DNA 3'末端进行了 DNA 链延伸的反应产物，而且只在载体表面上的微阵列特定点变成结合这样反应产物的状态。此外，对结合在该载体表面上微阵列的特定点的反应产物加上标记等，判明也可以容易检测其存在。另外当这样的单链 PCR 扩增反应时，为了使结合在载体表面上的无错配引物 DNA 与模板一条链核酸分子的杂交高准确率发生，通过在适当设定 PCR 反应温度循环条件基础上，通过反复进行所期望的温度循环数，也可确认结合在目的的微阵列特定点的反应产物量被扩增。根据这些见解，应用本发明的 PCR 扩增反应，直至完成第二种发生涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法的发明。

即、本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法是

对具有单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中含有的特定碱基序列的核酸分子进行检测，检测该核酸分子表现出单核苷酸多态性或遗传多态性的方法，其特征是

选择具有上述单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中具有对应于相互碱基序列表现出差异的部分碱基序列的碱基序列的多

种核酸探针，

在多种该核酸探针中，选定能够使在单核苷酸多态性或遗传多态性之间相互表现出差异的至少一个以上碱基处于该核酸探针的碱基序列中 3'末端侧的上述部分碱基序列，

将多种该核酸探针借助于其 5'末端连接的接头在同一载体表面上构成结合成阵列状的微阵列，

含有检测对象的特定碱基序列的核酸分子在有选择地只与构成微阵列的多种该核酸探针中的一个进行杂交的条件下，

以含有检测对象的特定碱基序列的核酸分子作为模板，以与该模板有选择地杂交的上述多种核酸探针中的一个作为引物，通过使用温度循环的 PCR 扩增反应进行互补 DNA 链的延伸，

通过在微阵列中对得到的互补 DNA 链的延伸的一个多种该核酸探针进行特定，

对含有对应于被特定的一个上述多种核酸探针含有的碱基序列的部分碱基序列的单核苷酸多态性或遗传多态性进行检测。

通过利用本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法，有可能可以大幅度减少以检体的预处理、或检体中含有的特定的单链核酸分子作为模板，在引物 3'末端延伸的互补链 DNA 的制备中被利用的 PCR 扩增反应中花费的温度循环的时间。

另外，本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法以检体样品中含有的检测对象的一条链核酸分子作为模板，可以使得含有与该检测对象互补的碱基序列的引物有选择延伸的单链 DNA 借助于该引物 DNA 链 5'末端连接的接头，变成与载体表面上微阵列的该引物 DNA 的点结合的状态。因此从原理上讲，可以使通过单链 PCR 法扩增的反应产物全量与对应的点结合，进行检测，能够达到高检测灵敏度。另一方面，检测对象可以维持与以前微阵列法同样大规模阵列，与探针杂交，预先制备含有与模板的一条链核酸分子相同碱基序列的 DNA 链检体预处理用 PCR 扩增反应、以及大幅度缩短之后的探针·杂交反应需要的合计反应时间。

此外，在实施本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法时，通过将本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法运用于该 PCR 扩增反应过程中，可以进一步缩短反应时间。

附图说明

图 1 是表示在本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增方法利用的微型加热器线内藏型 PCR 容器和通过向该微型加热器线外加脉冲电压的高应答性反应液加热方式的模式图。

图 2 是表示在本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增方法利用的层状加热器付设型 PCR 容器和通过向该层状加热器外加脉冲电压的高应答性反应液加热方式的模式图。

图 3 是表示在本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增方法利用的向局所加热用加热器 1 外加脉冲电压、以及带有进行加热部件 5 的加热、温度控制机能的 MPU 单元 4 构成的模式图。

图 4 是表示实施例 1-1 所示的通过 PCR 反应得到的 PCR 扩增产物经电泳获得的解析结果。

图 5 是表示实施例 1-2 所示的通过 PCR 反应得到的 PCR 扩增产物经电泳获得的解析结果。

图 6 是表示在本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增方法利用的对局所加热用加热器外加脉冲电压外加方式的例子的模式图。

图 7 是表示实施例 1-2 所示的对在 PCR 反应中利用的温度循环中局所加热用加热器外加脉冲电压方式的图。

图 8 是表示本发明第二个方式涉及到的 SNPs 或遗传多态性的检测方法中利用的在其底面部形成核酸探针微阵列的 PCR 扩增反应用容器的例子的模式图。

图 9 是表示本发明第二个方式涉及到的 SNPs 或遗传多态性的检测方法中利用的，使用加入了 Dye 终止剂的 PCR 反应混合物和含有模板双链 DNA 的反应液，在其底面部形成核酸探针微阵列的 PCR 扩增反应用容器内中实施的 PCR 反应的模式图。

图 10 是表示在本发明第二个方式涉及到的 SNPs 或遗传多态性的检测方法中利用的，使用加入了的 PCR 反应混合物和含有模板双链 DNA 的反应液，在其底面部形成核酸探针微阵列的 PCR 扩增反应用容器内中实施的伴随 PCR 反应的同时，结合在延伸的核酸探针的 3' 末端侧结合的 Dye 终止剂进行的荧光染色的模式图。

具体实施方式

以下就本发明进行更详细说明。

[本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法]

首先，在本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法中，

PCR 扩增反应中的各温度循环由以下所述构成：模板的一条链核酸分子与引物的杂交反应、即、与互补链结合形成双链的退火过程；杂交后，使 DNA 聚合酶作用，由构成该双链的引物 3' 末端进行 DNA 链延伸反应的延伸过程；延伸反应后，加热使双链核酸解离，分离为模板的一条链核酸分子与它的互补链的变性过程，

将反应容器整体变成在被保持在退火温度的加热部件，预先预热到该退火温度，延伸温度、以及向变性温度过渡的加热利用付设在 PCR 反应容器的局所加热用加热器进行。向该局所加热用加热器外加规定脉冲电压，使其发生热脉冲，该加热器与反应液做成可直接达到热接触的形态，反应液通过该热脉冲可以以至少毫秒数量级温度应答性上升到延伸温度、以及变性温度。此时，由于加热使双链核酸解离，分离为模板的一条链核酸分子和其互补链的变性过程如果将该温度设定到足够高的话，即使数十 ms 的加热时间，大半双链的热解离就可完成。另外，在延伸过程中，通过 DNA 聚合酶完成 DNA 链的延伸反应，虽然互补链合成完成所需要的时间限制整体扩增反应，但除了延伸的碱基长度极端长的情况外，延伸时间即使选择数百 ms 也可充分完成延伸反应。因此，通过按照数百 ms 的延伸过程、数十 ms 的变性过程、以及不外加局部加热用加热器的电压的退火过程的顺序实施温度循环，一个温度循环的时间有可能做到 1 秒多时间。温度循环重复次数即使数

十次，整个温度循环所需要时间可能在数十秒钟至数分钟之间。实际上，利用加热部件达到的预热时间、PCR 扩增反应完了后的放冷时间虽然与以往 PCR 反应方法同样都需要，但 PCR 扩增反应中必需的温度循环本身可缩短至接近极限。

另外，确认加热部件维持的温度不必维持在退火温度，即使在退火温度以下也可以。维持温度比退火温度还低，显然由热流束判断，从原理上讲对于缩短冷却时间更合适，加热部件温度比退火温度低时，即使不下降到加热部件温度在达到退火温度的时刻也可以外加用于变性的脉冲。但很显然此时急速调到变性温度，是不利的。举一例子，为了稳定维持样品温度，即使预先将加热部件设定在 37℃ 左右，也可运用本发明 PCR 方法。

即本发明第一种方式涉及到的 PCR 扩增反应方法

是由作为模板的核酸链通过 PCR 反应，对含有对应的碱基序列的 DNA 链进行扩增的 PCR 扩增反应方法，其特征是：

作为储存含有上述模板核酸链的 PCR 反应液的反应容器，

对于被收容的反应液在可能热接触的位置配置加热器，

使用设定对于该加热器，外加规定脉冲电压，使其发生的热脉冲以至少可在毫秒数量级显示应答该反应液的温度的热容量的反应液储存量和溶液储存部形状的反应容器，

将上述设定贮存量的 PCR 反应液贮存在附设该加热器的反应容器的溶液贮存部，

使该附带加热器的反应容器整体与保持在规定温度的加热部件接触，持续维持在该规定温度，

对于设置在上述反应容器的加热器，外加规定脉冲电压，通过对应于该脉冲时间宽度、脉冲电压大小的脉冲加热，形成 PCR 反应用的温度循环，

周期性地重复上述外加脉冲电压，重复进行多次与此对应的该温度循环，进行 PCR 反应的工序。

在本发明的第一个方式中，一并提供这样的 PCR 扩增反应方法中

利用的 PCR 装置的发明，以及 PCR 反应容器的发明。

即本发明第一个方式涉及到的 PCR 反应装置是

具有上述构成的根据本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法可实施 PCR 反应的 PCR 反应装置，其特征是备有：

作为储存 PCR 反应液的反应容器，

使用对于上述被储存的反应液在可能热接触的位置配置加热器，

设定对该加热器外加规定脉冲电压的脉冲电压发生机构，以至少可在毫秒数量级显示应答该反应液的温度的热容量的反应液储存量和溶液储存部形状的反应容器，

具有可保持该附带加热器的反应容器的构造，借助于通过与该反应容器的接触产生的热传导，可将该反应容器整体持续维持在规定温度的部件，

用于将该加热部件的温度控制在规定温度的加热部件温度控制机构，

对于配置在上述反应容器的加热器，用于周期性地按照所期望的重复次数外加脉冲电压高的脉冲状电压的脉冲状电压发生机构，和

用于管理上述加热部件温度控制机构与脉冲状电压发生机构的操作的 MPU 单元，

用于输入·设定来自上述 MPU 单元的管理条件的键盘输入装置，和用于表示来自上述 MPU 单元的管理条件、或正在管理的状况信息的表示器。

另外本发明第一个方式涉及到的 PCR 反应容器是

具有上述构成的根据本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法可实施 PCR 反应的 PCR 反应装置，其特征是：

储存该 PCR 反应液的反应容器，

对于上述被储存的反应液在可能热接触的位置配置加热器，

设定对该加热器外加规定脉冲电压的脉冲电压发生机构，以至少可在毫秒数量级显示应答该反应液的温度的热容量的反应液储存量和溶液储存部形状的反应容器附带加热器的反应容器。

(加热器与反应容器的形态)

图 1 和图 2 表示本发明第一个方式涉及到的 PCR 反应容器的代表性实施方式。

图 1 是在通常毛细管状的 PCR 容器内部将线圈状加热器 1 以与反应液直接接触的配置内藏的例子。作为该内藏型线圈状加热器 1, 例如利用镍铬合金线加热器(数十~数百 Ω), 对于加入到 PCR 容器 3 中的 PCR 反应液 2, 通过使脉冲状电流通到加热器(外加脉冲状电压), 供给发生的热脉冲。结果、PCR 反应液 2 通过该热脉冲的热量在所期望的时间间隔受到局所加热。为了在用具有大的热容量和高热传导率的材料制作的加热部件 5 中保持整个毛细管状 PCR 容器, 然后通过加热部件 5 的热传导, 进行热扩散。加热部件 5 本体保持在退火温度, 使用上述内藏型线圈状加热器 1, 进行对应于数百 ms 延伸过程、数十 ms 变性过程的局所脉冲加热。通过重复进行该温度循环, 可以实施 PCR 扩增反应。

图 2 表示在板上形成保持反应液本体的储液部的事例。具体来说, 在反应容器的储液部底部利用片状加热器层 1 的表面, 侧壁部利用放热硅橡胶片 3 的挖空部。保持在该储液部的反应液 2 存在薄的绝缘层, 可以获得与形成底部的片状加热器层 1 的表面直接热接触。因此, 直接供给片状加热器层 1 发生的热脉冲, PCR 反应液 2 通过该热脉冲的热量受到所期望时间间隔的局所加热。另外储液部的侧壁部由放热硅橡胶片 3 构成, 而形成底部的片状加热器层 1, 紧贴在基底的加热部件 5 上形成, 然后通过向放热硅橡胶片、加热部件 5 的热传导进行热扩散。

另一方面, 反应容器的整体形态为了防止 PCR 反应时反应液中含有的水蒸发, 希望做成可加盖密闭的构造。

另外, 作为对反应液的局部加热源, 做成将加热器内藏在反应容器内, 或付设在反应容器的形态。此时, 加热器的设置位置选择加热器发生的热可迅速传递到反应液的位置。因此对反应溶液, 希望可获得大接触面积的形态。

如图 1 所示，将镍铬合金线加热器在狭窄的容器内做成尽可能微细的线圈状后储存的形态，就象图 2 所示，对于尽可能薄的液层，做成在其储液的底部配置成平面状的薄膜加热器层的形态，对于反应液做成可以获得大的接触面积的形态。而供给与加热器表面接触的 PCR 溶液的热量，在 PCR 溶液内部借助于热扩散过程，使整体温度上升。因此，在加热器和反应液之间即使获得大的接触面积，离开加热器的距离过大的溶液部分其温度上升会出现有意义的迟缓。即、PCR 容器内部反应液的储存量与溶液储存部形状希望表现出反应液温度至少以毫秒数量级应答的热容量，而且限制反应液与加热器表面的溶液体厚度。具体来说，PCR 反应液的热物性值可以认为大致与水相当，在热传导过程的热扩散率 a 由于用热传导率 λ 和热容量 C_p 、物质的密度 ρ 定义，

$$a = \lambda / (C_p \cdot \rho) \quad (\text{m}^2/\text{s})$$

向该关系式中代入水的热容量 C_p (比热): 1 Cal/deg·g、热传导度 λ : 0.001429 Cal/cm·s·deg、密度 ρ : 1g/cm³ 值，求热扩散率 a ，为 0.143mm²/s。由于 $\sqrt{0.143} \sim 0.38$ ，如果考虑只是一维方向的热扩散，在平板状容器中，如果液体厚度 0.38mm 左右的反应液、或、夹在毛细管内的加热器间的反应液体厚度是这种程度，那么在 1 秒以内热量可以扩散到整个反应液。另外，对于实施控制 Duty 比的多个脉冲的情况，在反应液整体热应答中时间常数可以大致以该值作为参考，进行推定。

另外关于反应容器本体的材料也可以在热脉冲投入后、就冷却过程的时间常数代入该物性值，选定表示适当热扩散特性的材料。而在本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法中，反应容器整体如果将外侧的加热部件 5 本体的温度保持在退火温度，在直至退火过程结束期间，可以冷却至该退火温度，没有多大问题。但是，利用塑料等高分子材料的容器时，热传导度 λ /热容量 C_p (比热) 的比率有时比水小，此时，容器本体的厚度希望做成该比率以下，或不要做成太厚的容器。

(外加的电流脉冲的形态)

PCR 反应中的温度循环通常按照变性过程、退火过程、延伸过程的顺序通过反复周期性地使液体温度变化的循环构成。而延伸过程的温度设定在变性温度和退火温度之间。根据情况不同，也可以将延伸过程的温度和退火温度设定为相同，此时，温度循环按照变性温度和退火温度的顺序，反复周期性地使液体温度变化的循环。

例如，通常，当 72℃ 延伸时，通过将 20mer 前后的引物配列长度再加长，引物的 T_m 变高，可在更靠近变性侧温度的条件下，进行 PCR。这样的情况下，通常，由于不需要下降到 20mer 前后时的 55~60℃ 的退火温度，所以对温度循环的高速化是有利的。例如，为了使得 T_m 达到 76℃，将引物设计成更长，即使在往来于 76℃ 和变性温度的体系中，本发明的高速 PCR 也是可能。

在本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法中，将外侧的加热部件 5 本体的温度保持在退火温度，将反应容器本体在退火温度事先预热。在比该退火温度更高的温度中选择的延伸过程温度、以及变性温度时间、将脉冲状电流通到加热器，使热脉冲发生。

图 6 中给出了为了使脉冲状电流通到该加热器，外加在加热器线的两端间的脉冲电压形态的一个例子。图 6 中、(1) 与 (2) 对应于设置退火温度、延伸过程的温度、变性温度的三阶段步骤的温度循环。延伸过程的温度由于设定为比退火温度高，比变性温度低，退火过程后，外加用于波高值低的延伸的脉冲，之后外加用于波高值高的变性的脉冲。外加用于该变性的脉冲后，一旦上升的溶液温度通过向外侧的加热部件的热扩散，再降至退火温度。

图 6 中(3)相当于将退火温度和延伸过程的温度选择相同的情况。通过外加用于波高值高的变性的脉冲，双链核酸解离为单链。然后逐渐使液温降至退火温度，再使引物与模板的一条链核酸分子杂交，然后通过 DNA 聚合酶作用在引物 3' 末端进行互补链 DNA 的延伸，制备双链核酸。

另外，图 6 中，使用象 (3) 那样的单一脉冲电流，取代对该电流量进行控制，通过利用以十分狭窄的脉冲幅表示更高的脉冲高度的脉

冲电流列，控制该 Duty 比，选择在此期间，平均化液温能够维持在所期望的变性温度那样构成也是可能的。即、根据使用的 PCR 容器内部的反应液储存量与液储存部形状，根据预先测定的热的时间常数，可以推定在利用脉冲电流列时的平均化液温。如果利用控制该 Duty 比的脉冲电流列，在保持在变性温度，使用单规一脉冲电流时，在发生部分大幅度超过以温度为目标的温度的逸出时，可以避免逸出现象。

(PCR 反应装置的整体构成)

PCR 反应装置的大致构成是由备有用于保持着内藏上述加热器 1 的 PCR 反应容器 3 的构造的加热部件 5，用于向加热器 1 供给脉冲状电流的信号发生手段以及具备用于对加热部件 5 进行温度控制的机构的 MPU 单元 4 构成。图 3 给出了 MPU 单元 4 的内部构成。1 芯片微型计算机 6 内藏有内藏 A/D 转换器的模拟输入 7、数字输入输出的 I/O 端口 8、用于任意脉冲·连续式发生的定时·计数端口 9。发生的任意脉冲·连续式被输入到电流驱动回路 10。电流驱动回路 10 内藏对于来自数字输入输出的 I/O 端口 8 的多重选择器，可以选择预先设定好的几个波高值中的任一个，将脉冲电流送到加热器 1 (外加脉冲电压)。MPU 单元 4 还备有用于了解装置状态等的表示器 12、或用于发出相当于 PCR 反应条件的脉冲·连续式指令的键盘输入装置 11。这些信息可以以数据形式储存在 1 芯片微型计算机 6 内的存储器中。另外，用于将外侧的加热部件 5 预热·设定在基础的退火温度的 Peltier 驱动回路 13 与数字输入输出の I/O 端口 8 连接，来自 Peltier 元件以及整合到加热部件 5 的内藏型温度传感器的温度信息被输入到模拟输入 7，在温度控制的反馈中利用。

在实行 PCR 反应的温度循环时，可以是实验人员按脉冲·连续式用的程序启动按钮开始的方式。另外，在本发明的第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法中，在 PCR 反应中利用的温度循环所需时间有时也可达到数十秒程度。这样的情况下，包括通过加热部件 5 的预热时间的选择，在将全温度过程预先程序化的基础上，例如、将内藏加热器 1 的反应容器 3 装配到加热部件 5 上，通过该加热器抵抗的检测确认

加热器 1 的连接完了的时刻，也可以做成使程序自动开始的方式。

就象以上说明的那样，通过运用本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法，可以将通过与以往相同程度重复次数的温度循环进行 PCR 扩增反应所需时间缩短数十秒。另外通过缩短各温度循环所需时间，PCR 扩增反应中使用的耐热性聚合酶暴露于高温的时间也被缩短。因此，可以显著减少 PCR 扩增反应中耐热性聚合酶的热劣化，也是保持活性的有效手段。

另外，上面说明的如图 2 所示的板状反应容器形态，如果其底部做成与市售的显微镜载玻片同等形状，在付设在其表面的加热器层用绝缘层表面以阵列状固定核酸探针基础上，构成 PCR 容器，做成在其底部表面设置 DNA 微阵列的 PCR 容器。设置这样形式的 DNA 微阵列的 PCR 容器可能在实施以下说明的本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法时特别好用。

[本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法]

本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法是利用 PCR 扩增反应，有选择地只检测表现出单核苷酸多态性或遗传多态性的多种核酸分子中含有特定碱基序列的核酸分子的方法。

以往，一般的作法都是将在一次样品中含有的表现出单核苷酸多态性或遗传多态性的多种核酸分子作为模板，在预先通过 PCR 扩增反应，将含有对应的碱基序列的 DNA 链制备成 PCR 产物的基础上，使用含有对各单核苷酸多态性或遗传多态性特异的碱基序列的探针对该 PCR 产物进行检测的手法。而在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，利用含有对各单核苷酸多态性或遗传多态性特异的碱基序列的 DNA 引物，以在一次样品中含有的表现出单核苷酸多态性或遗传多态性的多种核酸分子中，将含有对应的碱基序列的核酸分子作为模板，通过单链 PCR 扩增反应，对有选择地进行了 DNA 链延伸的产物进行检测。此时，通过将利用的 DNA 引物本体预先固定在载体表面，可以有效地对进行了有选择地进行了 DNA 链延

伸的扩增产物进行检测。

在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中也与以往的利用微阵列法的检测方法同样，利用以阵列状将含有对各单核苷酸多态性或遗传多态性特异的碱基序列的多种核酸探针固定在同一载体表面上的DNA探针·微阵列。这些多种核酸探针无论哪一个都是借助于其5'末端接头固定在载体表面上，形成可与含有对应碱基序列的一条链核酸分子杂交的形态。另一方面，选择这些碱基序列，要使得各核酸探针与表现出单核苷酸多态性或遗传多态性的多种核酸分子中的一个具有完全一致的碱基序列，而与其他的存在碱基序列差异，特别是在其3'末端侧至少含有一个以上错配碱基。因此，核酸探针与全匹配的一条链核酸分子杂交后，如使DNA聚合酶作用于该双链部分，以全匹配的一条链核酸分子作为模板，可在核酸探针的3'末端进行互补的DNA链的延伸。另一方面，核酸探针虽然存在有引起与具有错配的一条链核酸分子错合·杂交的情况，但至少由于在其3'末端存在错配碱基，即使使DNA聚合酶作用于该双链部分，从原理上讲，不会发生向核酸探针3'末端进行DNA链的延伸。结果在以阵列状固定于载体表面上的核酸探针中，只对具有可与检体样品中含有的一条链核酸分子全匹配·杂交的碱基序列的核酸探针在其3'末端进行互补的DNA链的延伸。通过对进行了该DNA链延伸的核酸探针的地点进行检测，可进行检体样品中含有的一条链核酸分子的特定。该DNA链的延伸反应本身是利用借助于接头固定于载体表面上的核酸探针作为引物的PCR反应，通过利用上述本发明第一个方式涉及到的PCR扩增反应方法，可以大幅度缩短整体检测时间。

本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法，

是对具有单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中含有特定碱基序列的核酸分子进行检测，检测该核酸分子表现出单核苷酸多态性或遗传多态性的方法，其特征是：

在具有上述单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中选

择含有对应于相互碱基序列表现出差异的部分碱基序列的碱基序列的多种核酸探针，

在该多种核酸探针中，为了使在单核苷酸多态性或遗传多态性之间相互表现出差异的碱基至少一个以上在该核酸探针的碱基序列中处于其3'末端侧，选定上述部分碱基序列，

将多种该核酸探针借助于其5'末端连接的接头，以阵列状结合在同一载体表面上构成微阵列，

含有检测对象特定碱基序列的核酸分子在只可与构成微阵列的多种该核酸探针的一种有选择杂交的条件下，

以含有检测对象特定碱基序列的核酸分子作为模板，以有选择地与该模板杂交的上述多种核酸探针的一种作为引物，通过利用温度循环的PCR扩增反应进行互补DNA链的延伸，

通过对在微阵列中可获得的互补DNA链延伸的多种该核酸探针的一种进行特定，

对被特定的含有对应于具有上述多种核酸探针中一种的碱基序列的部分碱基序列的单核苷酸多态性或遗传多态性进行检测。

此时在上述PCR扩增反应中，

设置由变性、退火以及延伸过程构成的温度循环，

对于构成一个温度循环的该变性、退火以及延伸各个过程的时间无论哪一个都可设定在10秒钟以下，而且很优选。

另外，本发明第二个方式也一并提供在这样的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中的PCR扩增反应工序中可利用的反应容器的发明。

即、本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用反应容器，

是具有上述构成，根据本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法可以实施单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用PCR扩增反应的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用反应容器，其特征是：

作为对象的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测是对在具有单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中含有的特定碱基序列法核酸分子进行检测，检测该核酸分子表现出的单核苷酸多态性或遗传多态性，

在具有上述单核苷酸多态性或遗传多态性的基因核酸分子群中，选择具有对应于相互碱基序列表现出差异的部分碱基序列的碱基序列的多种核酸探针，

在多种该核酸探针中，为了使在单核苷酸多态性或遗传多态性之间相互表现出差异的碱基至少一个以上在该核酸探针碱基序列中处于其3'末端侧位置，选定上述部分碱基序列，

将多种该核酸探针借助于其5'末端连接的接头以阵列状结合在同一载体表面上构成微阵列的上述载体在其表面处于可与该反应容器中反应液接触的位置附设在该反应容器中，

而且，对于构成该载体表面上微阵列的上述多种核酸探针，与形成上述PCR扩增反应中温度循环的温度变化的热源借助于该载体中热传导可进行热接触，

在上述PCR扩增反应时，要使与上述多种核酸探针接触的反应液量对于结合多种该核酸探针的载体表面，相对于其表面的法线方向的液体厚度为3mm以下那样设定该反应容器中反应液的储存量与液储存部形状。

另外，在该反应容器中，构成上述微阵列的多种核酸探针可结合在载体表面的上述载体材料优选是无机材料。

在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，检测中利用的核酸探针与利用以往微阵列法的检测方法相同，可以利用将具有对各单核苷酸多态性或遗传多态性特异的碱基序列的多种核酸探针以阵列状固定在同一载体表面上的DNA探针·微阵列的方式。因此，保持着作为微阵列特色的对于核酸探针种类数多时也可构成对应的大规模阵列的优点。

另一方面，在检测工序中利用的PCR扩增反应借助于其5'末端连

接的接头结合在同一载体表面上的核酸探针可以用作 PCR 引物，实施检测。为此，在该 PCR 扩增反应过程中利用的反应液不必将覆盖在微阵列表面上的液体厚度加厚到需要以上。换言之，在 PCR 扩增反应过程中，覆盖在微阵列表面上的反应液的液体厚度在防止反应液蒸发扩散时，因情况不同，也可以减薄至 0.1mm 左右。至少在本发明的检测方法中，供 PCR 扩增反应的反应液的液体厚度在微阵列表面上，一般为 3mm 以下的范围，优选 1mm 以下的范围。

即使在利用毛细管容器的 PCR 反应装置中，例如、Roche 公司的 Light Cycler 等与树脂制容器相比，利用热传导性好的玻璃制毛细管容器，使得温度循环中的升·降温时温度变化率变大，在以往的 1/2 至 1/3 时间内就可以完成 PCR 的温度循环。而在 SCIENCE、Vol. 280、15 MAY 1998 中，同样报道了在热容量小的毛细管进行的 PCR 扩增反应中，在最大 90 秒钟的温度循环中可以获得所期望的扩增率。

在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，PCR 扩增反应过程，可以将覆盖微阵列表面上的反应液的液体厚度稍厚一点，另外作为微阵列用的载体，可以利用玻璃等热传导性好的材料，通过由该载体侧对反应液进行加热、冷却，可以大幅度缩短 PCR 的温度循环。更具体讲，通过适用先前说明的本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应方法，在数十秒钟内也可以完成在微阵列表面上的 PCR 扩增反应中的温度循环。此时，在例如图 2 例举的板型 PCR 反应容器中，可以将底部利用的加热器层表面的绝缘层、例如、SiO₂ 层用作微阵列用的载体表面。

在利用以往微阵列法的检测方法中，对于一次样品液中含有的核酸分子，预先利用树脂制的反应容器，实施 PCR 扩增反应，将具有对应的碱基序列的 DNA 链的扩增作为预处理实施。然后，通过在该预处理制备的扩增产物 DNA 链与微阵列上的核酸探针的杂交反应，在对应的核酸探针点固定检测对象扩增产物 DNA 链。而在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，将固定在微阵列上的核酸探针用作 PCR 引物，通过单链 PCR 扩增反应，在核酸探针

的 3'末端引起 DNA 链的延伸，进行直接检测。因此，至少以往方法中的后段工序的杂交反应在本发明的检测方法中是不需要的，在谋求进一步缩短检测时间上是有贡献的。

图 8 是表示本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测用反应容器的实施方式的一个例子。在该反应容器中，在该容器底部配置微阵列用载体 31，作为反应容器的底部也有功能。在该微阵列用载体 31 的表面，核酸探针 33 借助于其 5'末端连接的接头 32，以阵列状结合在同载体表面上的规定点，构成微阵列。将反应液注入反应容器内，要使溶液覆盖该微阵列的表面，供 PCR 扩增反应用。此时反应液的液体厚度由于选择在 3mm 以下，与容器的平面形状大小相比较，十分小，反应液的加热·冷却主要是通过借助于底部微阵列用载体 31 的热传导过程进行。因此，有望利用作为该微阵列用载体 31 的材料是在热传导率 λ 方面优良、用下述式子定义的热扩散率 a 优良的材料。在热传导过程，该热扩散率 a 使用热传导率 λ 、热容量 C_p 、物质的密度 ρ 通过以下式子定义。

$$a = \lambda / (C_p \cdot \rho) \quad (\text{m}^2/\text{s})$$

在以往微阵列法中，作为 DNA 微阵列用载体一直使用载玻片等。与通常玻璃相比，石英玻璃的热传导率虽然高，但比结晶硅的热传导率还低一位数，比金属的热传导率低约低二位数。在微阵列用载体 31 的下面设置热源、外部加热·降温，进行加热·冷却时，优选是以结晶硅或金属材料作为载体的主要构成材料。而微阵列用载体 31 整体的热容量与载体的厚度成比例，另外下面热源、外部加热·降温和热授受过程的应答速度也依赖于载体的厚度。因此，在反应容器整体的装卸时，在具有充分机械强度的范围内，希望将载体厚度做薄。例如，如果用载玻片形状的矩形硅晶片，只要厚度数百微米左右，对于通常装卸没有特别问题。

热容量 C_p 与物质的密度 ρ 是材料固有的物性值，如果也考虑到这些参数，计算出热扩散率 a ，一般来说，与塑料等有机高分子化合物相比，无机材料更合适。如果对同样材料的无机非晶形材料与结晶

性无机材料进行比较，通常更优选结晶性无机材料。例如、在本发明的第二个方式中，作为微阵列用载体，可以利用玻璃、硅晶片或铝等，而且在制作方面具有经济上的优点。另外以玻璃、硅晶片作为基材，在其表面的微阵列形成部分，使金、铂、银等金属被膜在硅晶片上成膜后，可以使面内的温度均一性提高。而如果在表面的微阵列形成部分设置金属被膜，核酸借助于探针 5'末端连接的接头进行固定化时，在该接头部预先导入巯基（SH 基），在固定化中可简便利用。利用巯基（SH 基）的亲核性，在与金属原子之间形成键，也可以很容易结合固定接头端。

而对于硅晶片或 SiO_2 膜（包括玻璃），预先对表面实施硅烷偶联剂处理，导入在结合形成可利用的反应性官能基。可以利用导入到该表面的官能基，在与核酸探针的 5'末端连接的接头之间形成共价键连接，进行固定化。

另外，就象先前说明的图 2 所示方式的本发明第一个方式涉及到的 PCR 扩增反应容器那样，在构成该反应容器底部的矩形硅晶片的表面也可以设置可用作局所加热用加热器的加热器层。在该表面用 SiO_2 膜覆盖作为绝缘层，可用作固定核酸探针 5'末端连接的接头的载体表面。另外通过使电流通到付设的加热器层，可对反应液直接进行加热。即、就象上面说明的那样，只在 PCR 反应温度循环中的变性过程、以及延伸过程的加热时，使脉冲电流流过该付设的加热器层，可以使热脉冲发生。其结果是在反应液的液体厚度为 0.3mm 左右时，设定 1 个温度循环为约 1 秒左右，可以实施 PCR 反应，而如果液体厚度在 3mm 以下，将步骤应答时间设定在数秒左右后，可以实施 PCR 反应。

此时，脉冲状加热后的冷却可以借助于载体的热扩散，如果是无机材料，即使是玻璃，与水相比，热扩散率 a 大一个数量级程度，可以达到快速扩散。但是，如果是塑料等有机高分子材料，其热扩散率 a 与水没有显著差别，其厚度如果厚，冷却时的应答性比使用无机材料时当然显示出有意义的降低。

而如果反应液的液体厚度做薄，伴随着 PCR 反应的加热，由该表

面进行水蒸发，有时发生反应液的过度浓缩。为了避免这一现象，在将反应液的液体厚度做薄时，优选是将反应容器加个盖，做成将储液部密闭的构造。另外将储液部本体的内容积缩小，也有望谋求减少由反应液蒸发，所占被密闭的储液部内部的水蒸气量。

在本发明的第二个方式中，PCR 扩增反应在微阵列表面进行，例如、在该表面附近的 DNA 聚合酶的底物被消耗。特别是在接近微阵列表面的点，有时底物一消耗，会发生局部反应速度下降。按照这一观点，当将反应液的液体厚度做薄时，希望对反应液进行搅拌。例如、做成具备旋涡混合器或振荡器等、具有搅拌功能的 PCR 装置，更符合该目的。另外、利用加热部件加热型的市售 PCR 装置时，为了提高加热源用加热部件本体的温度跟踪性，一般希望将加热部件的热容量做小。而作为加热源，将市售的 Peltier 元件单体与市售的 Peltier 温度调节器组合后也可以提高温度跟踪性。

另外如果高速实施各温度循环，PCR 反应中使用的 DNA 聚合酶、例如、Taq DNA 聚合酶暴露于高温的时间就可缩短。因此，如果在以往温度循环所需时间内，重复次数一超过 40 次，就会发现酶活性降低，提高将各温度循环所需时间缩短，可以避免酶活性降低，重复次数可增加至 100 次左右。利用产生的这一优点，即使是通过以固定在载体表面的核酸探针作为引物的单链 PCR 扩增反应，目的 DNA 链延伸的核酸探针的总量也可以充分满足该检测灵敏度。

即、在以往的预处理中，通过同时对双链 DNA 链双方进行扩增，重复次数虽然有制约，但可提高整体的扩增效率。然后，与微阵列上的核酸探针的杂交效率虽然未必高，但通过当初的扩增效率，在点上被杂交固定的延伸的 DNA 链总量可以做到能够达到必要的检测灵敏度的范围。在本发明的第二个方式中，利用单链 PCR 扩增反应时，虽然扩增效率本身没有提高，但重复次数增加，另外，被延伸的 DNA 链与核酸探针连接。结果，被固定在各点上的可检测的延伸 DNA 链的总量达到可获得必要检测灵敏度的范围。

另外，在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态

性的检测方法中，不仅以固定于载体表面上的核酸探针作为引物，进行单链 PCR 扩增反应的方式，而且也可以利用对应于作为对象的单核苷酸多态性或遗传多态性的核酸分子间共通的碱基序列的引物，进行多重 PCR 扩增反应的方式。即、将在固定于载体表面上的核酸探针的 3' 末端有选择地延伸的 DNA 链作为模板，使用具有共通的碱基序列的引物，可以获得夹在两引物间部分的 PCR 扩增产物。这个 PCR 扩增产物的 3' 末端当然与固定于载体表面上的模板 DNA 链的 5' 末端部分、即、核酸探针的碱基序列互补。因此提高以下的三段温度循环，该第二段目的 PCR 扩增产物可以与核酸探针全匹配·杂交，获得在其核酸探针的 3' 末端有选择延伸的 DNA 链。利用这个多重 PCR 扩增反应时，与利用单链 PCR 扩增反应时相比，由于可以达到高得多的扩增效率，对于检体样品中含有的检测对象的核酸分子量少时是有效的。

另外，加入到检体中的引物，当例如阵列为大规模时，多态性涉及到多个外显子 (exon) 时等有时也应当有许多。另外，核酸探针的固定化量以及加入到检体侧的引物即使是非对称 PCR 构成也可以。

无论哪一种情况，在使用的核酸探针的 3' 末端侧对于其他单核苷酸多态性或遗传多态性的核酸分子是错配，但通过对于目的单核苷酸多态性或遗传多态性的核酸分子配有匹配碱基，可以利用有选择地只进行以该目的单核苷酸多态性或遗传多态性的核酸分子作为模板的 DNA 链的延伸现象。因此，在单核苷酸多态性 (SNP) 中，即使只存在唯一有差异的碱基时，通过适用本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法，也可以进行检测。

而在以往方法中，核酸探针与预先扩增的 DNA 链进行杂交时，错配的碱基为唯一一个时，以某种程度的频率发生错合·杂交。对于这一区别，关于对象单核苷酸多态性 (SNP)，在将目的核酸探针和对应的碱基序列中有变异的其他三种核酸探针分别点印在基础上，需要对进行全匹配·杂交的点和其余的发生错合·杂交的 3 个点上固定的 DNA 链量进行对比，确认进行全匹配·杂交的点。特别是在全匹配·杂交和错合·杂交之间，当其 T_m 值上没有显著差别时，对其判定必须熟练。

与此相对照，在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，关于对象单核苷酸多态性（SNP），由于只是在其中的一条链有选择地进行 DNA 链延伸，其判定可以高精度地进行。即、在作为对象的单核苷酸多态性（SNP）中，被检测的核酸分子虽然含有 A、T、G、C 中的任一个碱基，但可以均一高精度地决定。

另外，在以往方法中，核酸探针与预先扩增的 DNA 链进行杂交时，杂交后，伴随着延伸的 DNA 链物理吸附于微阵列的载体表面的现象，背景变高的现象也不少。为了防止这一现象的影响，往往需要进行预先实施封闭的 UV-无水柠檬酸处理等的附加处理。与此相反，在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，在利用单链 PCR 扩增反应时，除了在检测对象的核酸探针 3'末端侧延伸的 DNA 链以外，只有存在于本来检体样品中的核酸分子，其量没有问题。另外，在检测对象核酸探针的 3'末端侧延伸的 DNA 链由于牢固地结合于载体表面，通过进行充分清洗，可以达到有效除去物理吸附的核酸分子的效果。

另外，利用多重 PCR 扩增反应时，除了在检测对象核酸探针的 3'末端侧延伸的 DNA 链以外，虽然还存在与他互补的 DNA 链，其中大部分经 PCR 扩增反应后、变性处理后，通过清洗可以除去。或者，反过来，通过适当的温度进行处理，也可以预先将与检测对象核酸探针的 3'末端侧延伸的 DNA 链互补的 DNA 链做成双链 DNA。无论哪一种情况，都可以避免伴随着延伸的 DNA 链物理吸附于微阵列的载体表面的现象，避开背景变高的这一不好的状态。

在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，在利用单链 PCR 扩增反应时，对于在检测对象核酸探针的 3'末端侧延伸的 DNA 链带上标记，进行检测。例如、用附有放射标记的 dNTP 作为底物，可以进行放射标记。或者，在实施单链 PCR 扩增反应时，该反应液如果利用 Taq DNA 聚合酶与底物 dNTP 以及 Dye 终止剂的混合液，在核酸探针的 3'末端侧延伸的 DNA 链当在 3'末端掺入 Dye 终止剂时，其延伸停止。即、通过单链 PCR 扩增反应得到的核酸探针

的 3'末端侧延伸的 DNA 链其 DNA 链长各种各样, 无论哪一个其 3'末端都是被 Dye 终止剂终止的末端。

在图 9 的本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中, 利用单链 PCR 扩增反应时, 对于在核酸探针的 3'末端侧延伸的 DNA 链, 利用 Dye 终止剂 34~37, 给出了定量付与荧光标记方式中的反应液模式图。在反应液中, 对于预先由细胞中提取的检体双链 DNA38, 在 PCR 反应用缓冲液中加入 DNA 聚合酶 (Taq 聚合酶) 39、对应于 4 种核酸的 Dye 终止剂 34~37、以及 dNTPmix。如果开始 PCR 反应的温度循环, 在变性过程中检体双链 DNA38 解离, 变成单链 DNA。然后在退火过程, 在微阵列用载体 31 上, 借助于其 5'末端连接的接头 32 结合的核酸探针 33 与具有互补碱基序列的单链 DNA 杂交。此时, 对于与核酸探针 33 进行全匹配·杂交的一条链 DNA, 在以下的延伸过程中, 由核酸探针 33 的 3'末端开始的一条链 DNA 作为模板, 通过 Taq 聚合酶, 开始 DNA 链的延伸。在该 DNA 链的延伸阶段, 取代 dNTP, 与对应的 Dye 终止剂的核酸连接, 以下的 DNA 链的延伸被停止。在得到的核酸探针 33 的 3'末端侧延伸的 DNA 链以该 Dye 终止剂为终端, 结果可以进行定量荧光标记。如果开始下一次温度循环, 在变性过程中, 由得到的核酸探针 33 的 3'末端侧延伸的 DNA 链解离下模板的一条链 DNA。以下反复进行同样过程, 在温度循环重复结束时, 就象图 10 所示那样, 在该点上存在的核酸探针 33 的相当部分在 3'末端侧延伸的 DNA 链和末端处带有来自 Dye 终止剂的荧光标记。

特别是在反应液中不加 dNTPmix, 只加对应于 4 种核酸的 Dye 终止剂 34~37 作为 DNA 聚合酶 (Taq 聚合酶) 39 的底物, 实施同样的单链 PCR 扩增反应, 以在核酸探针 33 的 3'末端对应于下一个碱基的一种 Dye 终止剂连接的状态终止延伸反应。结果, 在该点, 应当变成由这一类 Dye 终止剂带有的荧光标记。另外, DNA 链的延伸立刻以连接的 Dye 终止剂为终端, 延伸过程所需时间要比通常达到模板一条链核酸分子 5'末端的时间大幅度减少。即使在变性过程, 碱基长度短的核酸探针 33 的 T_m 值由于相对比较低, 在很短时间你也可以做到模板

一条链核酸分子的解离。结果可以缩短变性过程、延伸过程所需时间，可以选择更高速的温度循环。

图8~图10中例举了在载体表面上以借助于其5'末端连接的接头结合的核酸探针作为引物，利用单链PCR扩增反应的方式。另一方面，也利用对互补链的引物，利用多重PCR扩增反应时，如果利用Dye终止剂，由于不能进行双链PCR扩增反应，利用通常的dNTPmix和dUTP荧光标记物，在链中导入荧光标记。此时，导入到在核酸探针33的3'末端延伸的DNA链中的荧光标记虽然并不是定量的，但对检测灵敏度并没有影响。而在利用多重PCR扩增反应时，由于进行互补链的延伸，各阶段的温度循环所需时间虽然相对变长，但整体的扩增效率本身加速度式地增高。即、与利用单链PCR扩增反应比较，利用多重PCR扩增反应时，少设定温度循环重复次数，即使温度循环所需时间为同等程度，也可以使核酸探针33的3'末端延伸的DNA链生成量变得更多。因此，多重PCR扩增反应的利用主要是当一次样品中存在的检测对象的核酸分子量少时，如果温度循环所需时间为数十分钟左右，可以获得达到充分检测灵敏度所必需的、核酸探针33的3'末端延伸的DNA链量。特别是在谋求利用多重PCR扩增反应时，就象先前说明的图2所示方式的本发明第一个方式涉及到的PCR扩增反应容器那样，利用温度应答性好的反应容器，可以将温度循环所需时间缩短。

另外，本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法以往微阵列法比较，具有以下优点。

首先，在以往微阵列法中，作为预处理工序，以单核苷酸多态性或遗传多态性的核酸分子作为模板，进行PCR扩增反应，预先对含有带有各单核苷酸多态性或遗传多态性特征的碱基序列部分的DNA链进行扩增。在该预处理过程中，对于被扩增的DNA链，预先进行荧光标记。例如、利用通常的dNTPmix和dUTP荧光标记物，向链中导入荧光标记时，导入到被扩增的DNA链中的荧光标记量、一般都应表现出很宽的分布。而导入到被扩增的DNA链中的荧光标记应当显示同一荧光波长。

由于上述原因，与核酸探针进行杂交时，除了与检测对象的已进行了荧光标记的 DNA 链全匹配的核酸探针之外，对于表现出错配的核酸探针发生错合·杂交时，由于导入到被扩增的 DNA 链中的荧光标记量的不均，两者间的荧光辉度的差别有时不明显。

而在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，即使是以高频率发生错合·杂交的核酸探针的碱基序列，在单链 PCR 扩增反应中，固定于载体上的核酸探针的 3'末端侧碱基表现出与检体的一条链核酸分子错配时，由于不能表现出该错配的 3'末端方向进行 DNA 链的延伸，所以也没有附加荧光标记。即、在单核苷酸多态性或遗传多态性的检测中利用的核酸探针的碱基序列相对于目的错配碱基序列以外，至少满足在其 3'末端侧显示错配的条件，对于其 T_m 值，在可以选择不产生有意义差别的 T_m 方面具有更宽的自由度。

另外，在以往的微阵列法中，考虑与全匹配错配的 T_m 值的差别后进行杂交反应的温度设定，对于构成微阵列的多数核酸探针，不容易进行最适杂交反应温度设定是常有的事。与此相反，如果运用本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法，由于没有利用杂交反应，所以对于构成微阵列的多数核酸探针，使 T_m 值一致后容易发现反应均一性，具有更广泛的适用范围。由于该优点，在进行表现出错配的碱基数少的单核苷酸多态性进行检测时，本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法成了特别有效的方法。

此外在上述 DNA 链的延伸过程中实施荧光标记，利用单链 PCR 扩增反应的方式中，假如在一次样品中存在大量物理吸附于载体表面的核酸分子，这些核酸分子没有被荧光标记，作为背景荧光，也并没有导致干涉。因此，也不需要进行用于防止对载体表面物理吸附的处理。另外，在 DNA 链延伸过程中的荧光标记效率中即使多少存在不均，对于检测灵敏度也没有本质上的影响。

特别是在利用单链 PCR 扩增反应的方式中，作为 DNA 聚合酶的底物，如果采用对应于 4 种碱基只使用 Dye 终止剂，直接地使一个 Dye

终止剂连接在核酸探针的 3'末端，实施荧光标记的手法，要检测的点可以通过最大 4 色的 Dye 终止剂实施分色。因此，就象以往微阵列法那样，与利用的荧光标记是一种时相比，其识别力大幅度提高。例如、在存在不均一性的 MHC 的多态解析等中，在基因组基因上如果存在来自双亲的两个对立基因，需要检测双方。在以往的微阵列法中，通常由于利用的荧光标记是一种，变成两者重合图像，由于对象的等位基因型不同有时不容易进行判别。与此相反，通过实施利用最大 4 色的 Dye 终止剂进行分色，其判别也变得格外容易了。

另外，如果利用本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法，在借助于其 5'末端连接的接头结合在载体表面上的核酸探针的 3'末端进行 DNA 链延伸的过程中，不只是可以选择实施荧光标记的方式，而且也可以在核酸探针的 3'末端一旦进行了 DNA 链延伸后，选择利用对该延伸的 DNA 链以高定量性杂交的荧光标记二次探针进行检测的方式。对于该二次探针，例如，对于一群单核苷酸多态性或遗传多态性的核酸分子，也可以使用他们共通的碱基序列分子。即、在本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法中，在表示结合于载体表面上的核酸探针 3'末端有无延伸的 DNA 链的目的中，由于使用荧光标记二次探针，不需要对于各个 DNA 链碱基序列的特异性。换而言之，对于荧光标记二次探针的碱基序列的自由度高、其杂交条件的设定变得非常容易。

就象以上说明的那样，本发明第二个方式涉及到的单核苷酸多态性或遗传多态性的检测方法在维持作为微阵列法特长的适于使用许多核酸探针的大规模阵列的同时，可以大幅度缩短检测时实施的 PCR 扩增的反应时间。而且在适用于单链 PCR 扩增法时，可以提高该检测灵敏度，另外作为非干涉的多重 PCR 扩增也适用。另一方面，由于也可避免起因于背景荧光的检测灵敏度低下，特别是在进行 SNPs、多态解析方面，是个有用的方法。

【实施例】

以下给出实施例，对本发明进行具体说明。下述实施例虽然是本发明涉及到的优选实施方式的一个例子，但本发明并不限于这些实施例的方式。

(实施例 1-1)

在本实施例 1-1 中，在市售的 PCR 容器内部制作内藏可直接加热 PCR 反应液的微型加热器线的形状的 PCR 反应容器。

首先，作为微型加热器线，将镍铬合金线加热丝 ($\Phi = 230\mu\text{m}$ 、 $26\Omega/\text{m}$) 卷在钢丝 (piano wire) ($\Phi = 500\mu\text{m}$) 上，形成线圈间隔：约 $500\mu\text{m}$ 、线圈外径：约 $1000\mu\text{m}$ 、线圈部分长：10mm 的线圈状镍铬合金线加热器。将该线圈状加热器 1 装到市售的 $200\mu\text{l}$ 容 PCR 容器中。线圈状加热器 1 向 PCR 容器的固定通过向加热器通电后进行局所加热，使树脂制容器口附近熔融，对加热器线末端进行固定。该微型加热器线内藏型 PCR 容器 3 以插入到加热部件 5 的固定穴内的状态使用。该加热部件 5 本体具有大的热容量，可加热保持一定温度。因此在即使不向线圈状加热器 1 通电的状态，微型加热器线内藏型 PCR 容器 3 整体也可维持在所期望的退火温度。向线圈状加热器 1 通电，进行局所加热后，如果停止通电，通过由 PCR 容器 3 向加热部件 5 的热传导，进行急速的放热。

向微型加热器线内藏型 PCR 容器 3 加入纯水 $25\mu\text{l}$ ，向加热器线外加脉冲幅：100ms、周期：1Hz 的方形波脉冲电压，渐渐提高脉冲电压。此时，在达到脉冲波高值：43V 的时刻，确认看到来自水汽化产生的发泡。由此在上述外加脉冲电压条件下，PCR 容器内部、线圈状加热器附近的纯水确认在外加脉冲时间最终时被加热到沸点 (100°C)。即、在外加脉冲的初期，当初，水温虽然下降到室温程度，在外加脉冲期间，渐渐受到加热，温度上升，在外加脉冲的最终点，上升至沸点 (100°C)。然后在没有外加电压的 900ms 期间渐渐进行热扩散，在下一次的外加脉冲之前下降到 50°C 以下的水准。

将该条件在脉冲电压外加装置 4 中程序化，作为 PCR 循环，将反

复向线圈状加热器外加脉冲电压，设定周期：1Hz、脉冲波高值：43V、脉冲幅：100ms、反复次数：30次。向制作的微型加热器线内藏型 PCR 容器 3 中加下述组成的反应液。

【表 1】反应液组成

成分		配合量
PCR 反应混合物	PCR mix (Qiagen 公司)	12.5 μ l
Template	pUC118/EcoRI (Takara Shuzo 公司)	1 μ l
正向引物	5'-GAGTCGACCTGCAGGCAT-3'	1 μ l
反向引物	5'-TAAGTTGGGTAACGCCAG-3'	1 μ l
纯水		9.5 μ l
合计		25.0 μ l

在该反应液 2 中实施先前的 PCR 循环，进行 DNA 片段扩增。图 4 给出了通过电泳 (Bioanalyzer、Agilent Technologies 公司) 对含有该 PCR 产物的样品进行分析的结果。参照模板质粒 pUC118 的碱基序列和 PCR 引物对的碱基序列，对应于目标 PCR 扩增产物大小，在约 85bp 附近可确认有带。

(实施例 1-2)

在本实施例 1-2 中，在硅晶片上形成 SiO₂/PolySi/SiO₂ 的叠层构造，将该多晶硅膜做为加热器层，再于表面叠层内部设计为挖空的放热硅橡胶片，制作板状 PCR 反应容器。

首先，将硅晶片切成通常显微镜载玻片规格大小 (长×宽 = 25mm×75mm)。在该表面，利用 RF 溅射装置，在气氛：80% Ar - 20% O₂、压力：5mTorr、外加 RF 功率：6W/cm² 的条件下，形成膜厚 0.1 μ m 的 SiO₂ 膜 (下部绝缘层)。

在该 SiO₂ 膜 (下部绝缘层) 表面通过 RF 溅射法将靶做成 Si，在表 2 的成膜条件下形成 1 μ m 的多晶硅膜。

【表 2】RF 溅射成膜条件

成膜条件	设定值
溅射气体种类 (流量)	Ar 200 normal-mL/s
	H ₂ 20 normal-mL/s
基板温度	150℃
靶·偏压	-180V
基板偏压	10V
供给电力 (RF 频率)	100W/100MHz
成膜速度	25nm/min

另外在多晶硅膜表面,在与下部绝缘层用 SiO₂膜同样的条件下,作为上部绝缘层,形成 0.1μm 的 SiO₂膜,做成 SiO₂/PolySi/SiO₂的叠层构造。

另一方面,将厚度 1.0mm 的放热硅橡胶片加工成外形的宽比载玻片规格仅小 5mm (长×宽 = 25mm×70mm)、内侧具有长×宽 = 20mm×30mm 的矩形的挖空部的形状。使该放热硅橡胶片紧贴在表面设计成 SiO₂/PolySi/SiO₂的叠层构造的硅晶片上。由此,放热硅橡胶片的挖空部形成可贮存样品溶液的深 1.0mm 的池状容器部。在其上面,作为盖部同样加上切成载玻片规格的硅晶片,做成可以密闭的池状容器部的构造。在该容器中, SiO₂/PolySi/SiO₂的叠层构造中,利用多晶硅膜作为加热器层,做成由上述池状容器的底部进行加热的形态。

该加热器付设型 PCR 容器 3 以紧贴在加热部件 5 上的状态使用。该加热部件 5 本体具有很大的热容量,被加热保持在一定温度。因此,在没有向片状加热器 1 通电的状态下,加热器付设型 PCR 容器 3 整体被维持在所期望的退火温度。而当向片状加热器 1 通电,进行局所加热后,如果停止通电,由于由 PCR 容器 3 向加热部件 5 的热传导,可进行急速放热。

在 PCR 循环中,作为外加在多晶硅膜加热器的脉冲电压,设定如图 7 所示反复进行周期: 1Hz、延伸时外加电压: 2V、450ms、变性时外加电压: 20V、50ms、退火时: 0V、500ms、重复次数: 30 次。向制作的加热器付设型 PCR 容器中加入下列组成的反应液。

【表 3】反应液组成

成分		配合量
PCR 反应混合物	PCR mix (Qiagen 公司)	25 μ l
Template	pUC118/EcoRI (Takara Shuzo 公司)	2 μ l
正向引物	5'-GCGGTAATACGGTTATCCAC-3'	2 μ l
反向引物	5'-TAAGTTGGGTAACGCCAG-3'	2 μ l
纯水		19 μ l
合计		50 μ l

将该 50 μ l (50mm³) 反应液加入到 20mm×30mm 的挖空部, 实施先前那样的 PCR 循环, 进行 DNA 片段的扩增。图 5 给出了对含有该 PCR 产物的样品进行电泳 (Bioanalyzer, Agilent Technologies 公司) 后的分析结果。参照模板质粒 pUC118 的碱基序列和 PCR 引物对的碱基序列, 对应于目标 PCR 扩增产物的大小, 确认在约 350bP 附近的带。

(实施例 2-1)

[PCR 反应容器的制作]

在本实施例 1-2 中, 在硅晶片表面叠层在内部设计成挖空的放热硅橡胶片, 制作板状 PCR 反应容器。

首先将硅晶片切成通常显微镜载玻片规格大小 (长×宽 = 25mm×75mm)。而将厚度 1.0mm 的放热硅橡胶片加工成外形为载玻片规格 (长×宽 = 25mm×75mm)、内侧具有长×宽 = 20mm×30mm 的矩形的挖空部形状。将该放热硅橡胶片紧贴在切成上述矩形的硅晶片的上面。由此, 放热硅橡胶片的挖空部形成可贮存样品溶液的深 1.0mm 的池状容器部。在其上面, 作为盖部同样加上切成载玻片规格的硅晶片, 做成可以密闭的池状容器部的构造。

[微阵列的制作]

(向硅晶片表面导入官能基)

按照以下步骤向切成载玻片规格的矩形硅晶片表面导入 DNA 探针固定利用的官能基。

首先用超纯水将矩形硅晶片超声清洗 5 分钟。氨基硅烷偶联剂水

溶液通过向纯水中添加硅烷偶联剂 KBM-603 (信越硅公司制), 终浓度为浓度 1%, 于室温搅拌 2 小时, 使其溶解, 进行制备。然后将清洗后的矩形硅晶片浸入硅烷偶联剂水溶液, 于室温下放置 20 分钟。经该浸渍处理后, 提出硅晶片, 用纯水轻轻清洗表面。然后用氮气吹矩形硅晶片两面, 使其干燥。然后将干燥的矩形硅晶片在加热到 120°C 的烘箱中, 烘烤 1 小时。通过烘烤处理, 完成偶联剂与硅晶片表面的反应, 硅晶片表面导入了来自硅烷偶联剂的氨基。

然后将同仁化学研究所生产的 N-马来酰亚胺乙酰氧基琥珀酰亚胺 (N-(6-Maleimidocaproyloxy) Succinimido; 以下简称 EMCS) 溶解于二甲亚砜与乙醇的 1:1 混合溶剂中, 终浓度为 0.3mg/ml, 制备 EMCS 溶液。上述烘烤处理结束后, 将硅晶片放置冷却, 在制备的 EMCS 溶液中于室温浸泡 2 小时。在该 EMCS 溶液中的浸渍处理中, 来自导入表面的硅烷偶联剂的氨基与 EMCS 的琥珀酰亚胺基进行反应, 在硅晶片表面导入马来酰亚胺基。将从 EMCS 溶液提出的矩形硅晶片用二甲亚砜与乙醇的 1:1 混合溶剂进行清洗, 除去未反应的 EMCS。然后再用乙醇清洗, 除去混合溶剂后, 对表面导入了马来酰亚胺基的硅晶片进行干燥。

(探针 DNA 的准备)

由已经进行了公开发表的基因信息登记的数据库 EBI (The European Bioinformatics Institute) 的大小 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) 获得有关 HLA 的 BRB1 的基因数据, 选定用于识别以下序列的 4 种探针碱基序列。

>DRB1*0804

5' - cggtgacggagctggggcggcctg

>DRB1*0407

5' - tgcagacacaactacggggttggt

>DRB1*1303

5' - gtgacggagctggggcggcctagc

>DRB1*0301

5' - atacttccataaccaggaggagaa

含有选择的碱基序列的探针 DNA 的合成用 DNA 合成仪进行。另外在合成的探针 DNA 的 5' 末端预先导入 SH 基。在该 SH 基导入中使用市售的巯基·改性剂 (Glen Research 公司制)。通过该操作, 对于固相合成的寡核苷酸链: NNNNNNNNNN,

在该 5' 末端作为连接链, 借助于 $-(\text{CH}_2)_6-$, 以

5' HS - $(\text{CH}_2)_6$ - O - PO₂ - O - NNNNNNNNNN - 3' 形式导入巯基 (-SH)。

另外, 在各探针的 3' 末端含有对其他等位基因的碱基序列的错配, 而且表示各个错配的碱基在考虑 A、C、T、G 4 种的基础上, 也可选择其他碱基序列。合成的探针 DNA 为了使含有的各个 DNA 的浓度为吸光度 0.40D (吸收波长 260nm), 溶解于甘油 5%、AcetylenolEH (川研 Fine chemicals 公司制) 1% 水中。制备的探针 DNA 溶液充填到泡沫喷墨打印机 (商品名: BJF-850, 佳能公司制) 用墨盒中。而该泡沫喷墨打印机根据规定的膜作成方法通过输入印字图形, 以最小点·孔距约 120 μm , 可以点印含有数微微升探针 DNA 的液滴。

(微阵列的制作)

对于导入了上述官能基的硅晶片, 按照 1 探针 DNA 4 点、合计 16 点的微阵列点印含有探针 DNA 液滴。点印后, 静置于 30 分钟加湿盒内, 使硅晶片表面的马来酰亚胺基与探针 DNA 5' 末端的巯基 (-SH) 反应。然后用含有 100mM 的 NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 将残留在硅晶片表面的未反应探针 DNA 清洗。获得在硅晶片表面上通过 5' 末端借助于连接链 $-(\text{CH}_2)_6-$ 固定了各寡核苷酸链的微阵列。

[样品溶液的制备]

由 IHWG (International Histocompatibility Working Group) 获得表 4 中的 4 种系列细胞。将各系列细胞按照细胞密度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 那样悬浮于细胞悬浮液 (10mM Tris-HCl pH7.6、10mM EDTA、50mM NaCl) 中。将该细胞悬浮液 0.5ml 作为样品, 添加 50 μl 蛋白酶 K 溶液 (10mg/ml、Dissolved in dH₂O), 50 μl 10% SDS

(Dissolved in dH₂O), 于 45℃温育 3 小时。

再加入等量 0.6ml 的 PCI (苯酚氯仿异戊醇 25: 24: 1), 进行 10 分钟振荡, 结束细胞破碎。该细胞破碎后, 重复进行两次将水层取到另外试管的操作。对分级的可溶性级分 (水层) 样品实施通常的乙醇沉淀操作, 使含有的核酸链析出。然后将析出的核酸链沉淀使用 vacuum 离心机进行轻微干燥。

【表 4】

系列细胞 (13 th WS No.)	HLA-DRB1
9381	0301; 0407
9030	0407
9297	1303
9398	1303; 0804

[通过 PCR 进行目的物的检测反应]

通过上述的样品制备, 在分离的核酸链沉淀物中含有各系列细胞的基因组基因。于试管容器中进行脱水干燥, 向核酸链沉淀物样品添加加有 Dye 终止剂的 PCR 反应混合物 (ABI 社、BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 40μl、缓冲液 (ABI 社、Sequencing Buffer) 160μl, 混合后作为反应液。将该反应液 200μl 加入到通过于上述表面形成微阵列的矩形硅晶片制作的 PCR 反应容器中, 为了防止蒸发, 用盖用的矩形硅晶片覆盖密封。对于加入到该反应容器中的反应液按照下面表 5 的温度循环进行单链 DNA 的扩增反应。

【表 5】温度循环

操作步骤	温度	时间	重复次数
变性	96℃	5s	
变性	96℃	1s	
退火	50℃	1s	100 次
延伸	60℃	1s	
pool	4℃	保持	

结束上述单链 DNA 扩增反应后，对反应容器中形成微阵列的矩形硅晶片表面于振荡器上，用 70% 乙醇反复进行两次 1 分钟清洗。离心除去清洗液，对在矩形硅晶片表面形成的微阵列区域进行荧光显微镜观察。即、由从系列细胞制备的含有基因组基因的 DNA 样品在对应于该 HLA - DRB1 的等位基因的探针 DNA 的 3' 末端延伸 DNA 链，应当在其末端结合了 Dye 终止剂。表 6 归纳了伴随着该 DNA 链的延伸，观察起因于结合在探针 DNA 3' 末端侧的 Dye 终止剂的荧光有无的结果。

【表 6】

检体 (系列细胞)	DRB1*0804	DRB1*0407	DRB1*1303	DRB1*0301
9381	-	+	-	+
9030	-	+	-	-
9297	-	-	+	-
9398	+	-	+	-

由以上结果确认对应于各系列细胞含有的等位基因，只有可与该等位基因杂交的探针 DNA 的点进行单链 DNA 扩增反应，被荧光染色。

本发明的 PCR 反应方法可用于生命科学、生物技术等领域中利用的核酸链的 PCR 扩增反应的高效率化，另外利用本发明 PCR 扩增反应的核酸检测方法可成为应用于基因组多样性、遗传多态性、SNPs 等、变异或错配碱基的检测中的所谓利用 DNA 微阵列的核酸检测方法。

序列表

- <110> 佳能株式会社
- 5 <120> PCR 扩增反应装置、以及利用该装置的 PCR 扩增反应方法
- <130> 10009676CN01
- <140>
- 10 <141>
- <160> 4
- <170> MS-WORD
- 15 <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- 20 <220>
- <223> 合成的 DNA 探针
- <400> 1
- 25 cgggtgacgga gctggggcgg cctg 24
- <210> 2
- <211> 24
- <212> DNA
- 30 <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的 DNA 探针
- 35 <400> 2
- tgacagacaca actacggggt tggt 24
- <210> 3
- <211> 24
- 40 <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>

-
- <223> 合成的 DNA 探针
- <400> 3
gtgacggagc tggggcggcc tagc 24
5
- <210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
- 10
- <220>
<223> 合成的 DNA 探针
- <400> 4
15 atacttccat aaccaggagg agaa 24

图1

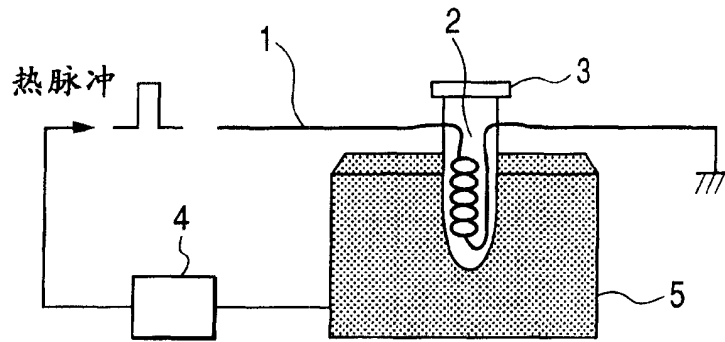


图2

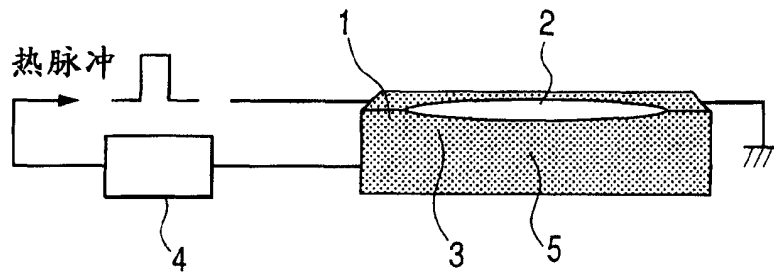


图3

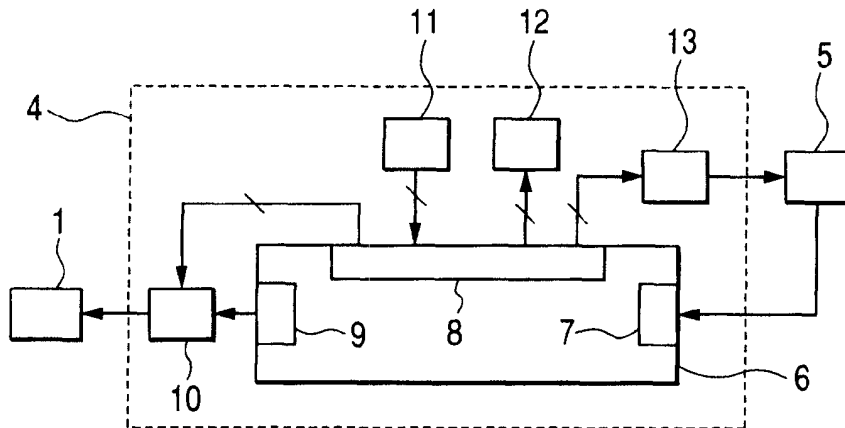


图 4

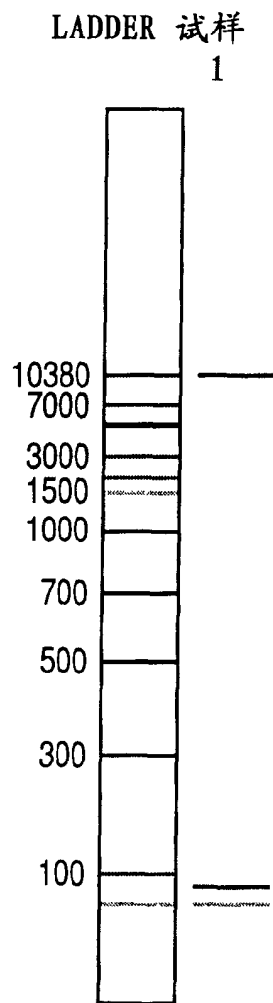


图 5

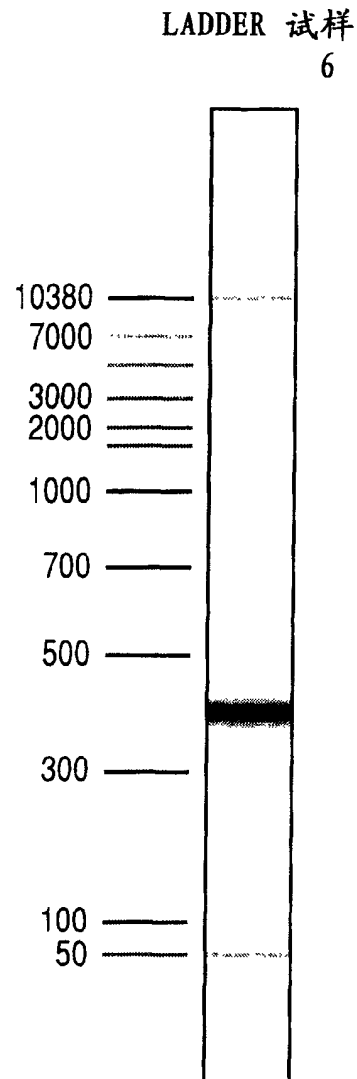


图6

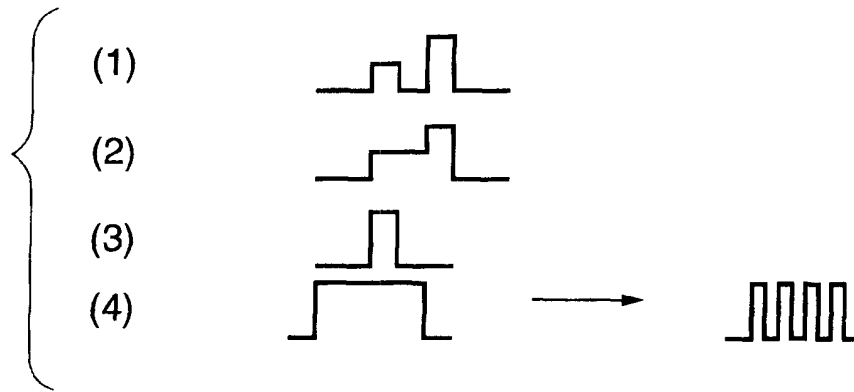


图7

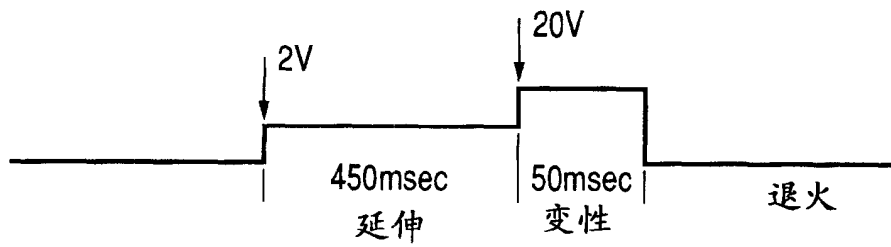


图8

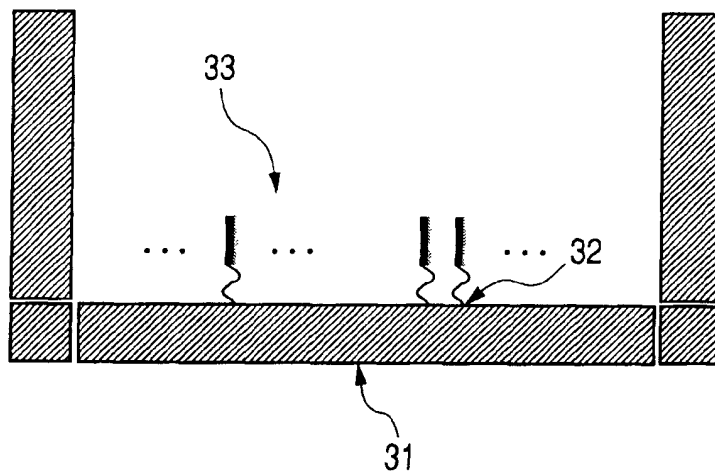


图9

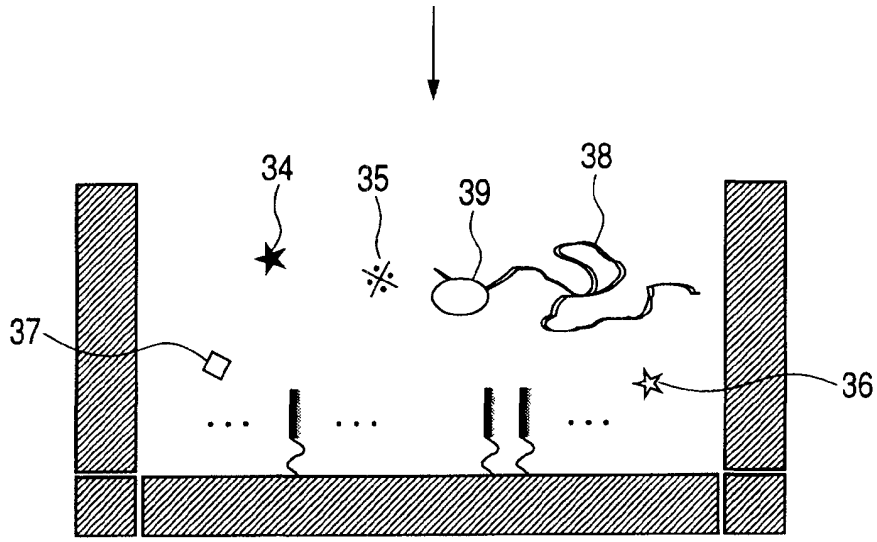


图10

