

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4581380号
(P4581380)

(45) 発行日 平成22年11月17日(2010.11.17)

(24) 登録日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int. Cl. F 1
C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 A
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 10 (全 12 頁)

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-386614 (P2003-386614) | (73) 特許権者 | 000005821 |
| (22) 出願日 | 平成15年11月17日(2003.11.17) | | パナソニック株式会社 |
| (65) 公開番号 | 特開2005-143411 (P2005-143411A) | | 大阪府門真市大字門真1006番地 |
| (43) 公開日 | 平成17年6月9日(2005.6.9) | (74) 代理人 | 100109667 |
| 審査請求日 | 平成18年11月8日(2006.11.8) | | 弁理士 内藤 浩樹 |
| | | (74) 代理人 | 100109151 |
| | | | 弁理士 永野 大介 |
| | | (74) 代理人 | 100120156 |
| | | | 弁理士 藤井 兼太郎 |
| | | (72) 発明者 | 中谷 将也 |
| | | | 大阪府門真市大字門真1006番地 松下 |
| | | | 電子部品株式会社内 |
| | | (72) 発明者 | 行政 哲男 |
| | | | 大阪府門真市大字門真1006番地 松下 |
| | | | 電器産業株式会社内 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 核酸増幅反応容器およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸の増幅に用いる核酸増幅反応容器であって、基板と、この基板内に形成されたキャビティと、このキャビティを封止するための蓋板と、この蓋板に形成されたサンプル注入孔とを備え、前記キャビティ内に蓋板もしくは基板に接続され、前記キャビティ内の熱伝導を促進させて前記核酸の増幅反応を高めるための柱状構造体を設けた核酸増幅反応容器。

【請求項2】

柱状構造体の形状を円形状、長円形状、屈曲形状のいずれかとした請求項1に記載の核酸増幅反応容器。

【請求項3】

柱状構造体を複数個設けた請求項1に記載の核酸増幅反応容器。

【請求項4】

柱状構造体を蓋板もしくは基板と同一の材料とし、その接合面が存在しない一体構造体とした請求項1に記載の核酸増幅反応容器。

【請求項5】

基板と柱状構造体を直接接合した請求項1に記載の核酸増幅反応容器。

【請求項6】

蓋と柱状構造体を直接接合した請求項1に記載の核酸増幅反応容器。

【請求項7】

核酸の増幅に用いる核酸増幅反応容器であって、基板と、この基板内に形成されたキャビ

ティと、このキャビティを封止するための蓋板と、この蓋板に形成されたサンプル注入孔とを備え、前記キャビティ内の熱伝導を促進させて前記核酸の増幅反応を高めるために前記キャビティの形状をミアンダ形状もしくは渦巻き形状とした核酸増幅反応容器。

【請求項 8】

蓋板をガラスとし、基板をシリコンとした請求項 1 または 4 に記載の核酸増幅反応容器。

【請求項 9】

基板上にキャビティを形成する工程と、

前記キャビティを封止するための蓋板上にサンプル注入孔を形成する工程と、前記蓋板もしくは前記基板に前記キャビティ内の熱伝導を促進させて前記核酸の増幅反応を高めるための柱状構造体を設ける工程と、

前記蓋板と前記基板の間の接合を陽極接合法もしくは直接接合法のいずれかの方法で行う工程とを備えた核酸増幅反応容器の製造方法。

【請求項 10】

基板上にミアンダ形状もしくは渦巻き形状のキャビティを形成する工程と、

前記キャビティを封止するための蓋板上にサンプル注入孔を形成する工程と、

前記蓋板と前記基板の間の接合を陽極接合法もしくは直接接合法のいずれかの方法で行う工程とを備えた核酸増幅反応容器の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はポリメラーゼ連鎖反応を用いた核酸の増幅に用いる核酸増幅反応容器およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、遺伝子情報に関する技術が盛んに開発されている。特に医療分野では疾患関連遺伝子を解析することにより、疾患の分子レベルでの治療が可能となってきた。また、遺伝子診断により患者個人ごとに対応したテーラーメイド医療も可能となってきた。さらに、製薬分野においては遺伝子情報を使用して抗体やホルモンなどのタンパク分子を特定し、薬品として利用している。

【0003】

また、農業や食品分野などにおいても多くの遺伝子情報を利用した製品が作り出されている。

【0004】

このような遺伝子情報に関する技術において、最も重要な手法の一つとして核酸の増幅反応がある。その中でも、ポリメラーゼ連鎖反応法は遺伝子のある特定の部分のみを大量に増幅する技術であり、分子生物学等の研究用途の他、医療微生物学、遺伝疾患の臨床診断、法医学等広範な分野において利用されている。特に臨床の場における遺伝子診断技術では、より迅速に分析できることが望まれており、ポリメラーゼ連鎖反応法においても高速化技術の開発が要望されている。

【0005】

このポリメラーゼ連鎖反応法によって遺伝子の増幅を行うためには、二本鎖の DNA を一本鎖へと解離させる工程（熱変性工程）、プライマーを結合させる工程（アニーリング工程）およびポリメラーゼにより DNA を伸長する工程（伸長反応工程）の三段階の工程を 1 サイクルとし、これらの工程を 30 ~ 35 サイクル繰り返すことによって行う。これらの工程は条件によっても異なるが、通常それぞれ熱変性工程；94 × 1 分間、アニーリング工程；50 ~ 60 × 1 分間、伸長反応工程；72 × 1 ~ 5 分間の処理条件で行う（例えば、特許文献 1 参照）。

【0006】

また、前記ポリメラーゼ連鎖反応を行うための容器あるいはチップとして次のようなものが提案されている。例えば、上側基材にキャピラリーを配置するための溝を形成し、この

10

20

30

40

50

上側基材と下側基材の間にキャピラリを重ねて接合することで、増幅させたい核酸が入ったサンプルをキャピラリの中に入れることができ、このキャピラリを温度制御することでサンプル内の核酸を増幅させることができる（例えば、特許文献2参照）。

【0007】

さらに、前記ポリメラーゼ連鎖反応を高速化できる装置の開発も行われている。例えば、ロッシュ（Loche）社製 ライトサイクラ（LightCycler）は、熱源として熱風を使用しており、ガラスキャピラリ製の容器にサンプルを供することによって高速化を試みている。また、セファイド（Cepheid）社製スマートサイクラ（SmartCycler）（R）はチューブ壁の薄い専用ポリプロピレン製チューブを用いてポリメラーゼ連鎖反応の高速化を図っている。

10

【特許文献1】特開昭62-000281号公報

【特許文献2】特開2002-207031号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、ポリメラーゼ連鎖反応では40 程度の温度変化を30回以上も繰り返す必要があり、従来のポリメラーゼ連鎖反応を行う装置ではポリプロピレン製のチューブ内にサンプルを供しながらアルミニウムブロックを用いて温度の上昇を行っており、ポリメラーゼ連鎖反応を完了させるためには数時間以上の処理時間を費やす必要がある。また、前記特許文献2で開示される方法はキャピラリを上下基材内に閉じこめることで、ある程度熱伝導性向上が期待できるが、キャピラリ、上側基材、下側基材を個別に構成した後、これらを接着技術などにより接合していることから上下基材とキャピラリ間の熱伝導性に熱障壁が存在し、速やかな温度上昇・下降が妨げられるおそれがある。

20

【0009】

また、前記熱源に熱風を利用する装置では相当の高速化が図られているがそれでも数十分以上の処理時間が必要である。

【0010】

さらに、これらはいずれもキャピラリなどの専用容器を用いて高速化を図っていることから、例えば血液からのDNAの抽出といったポリメラーゼ連鎖反応のための前処理がバッチ処理にならざるを得ず、サンプルの取り扱いが煩雑になるという欠点もあった。

30

【0011】

本発明は上記問題点に鑑み、サンプル中のDNAを精度良く高速に増幅することが可能であり、さらにサンプルの取り扱いが容易なチップ型の核酸増幅反応容器およびその製造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】

【0012】

上記目的を達成するために、本発明は以下の構成を有する。

【0013】

本発明の請求項1に記載の発明は、核酸の増幅に用いる核酸増幅反応容器であって、基板と、この基板内に形成されたキャピティと、このキャピティを封止するための蓋板と、この蓋板に形成されたサンプル注入孔とを備え、前記キャピティ内に蓋板もしくは基板に接続された柱状構造体を設けた核酸増幅反応容器であり、ポリメラーゼ連鎖反応を用いた核酸の増幅方法に用いる核酸増幅反応容器において、蓋板、基板、もしくはこれらの両面から加熱・冷却を行う際に熱伝導が前記柱状構造体に速やかに伝わるので、キャピティ内の核酸を含む溶液の温度を高速に変更させることができ、結果として確実に高速なポリメラーゼ連鎖反応を行うことができる核酸増幅反応容器を実現することができる。

40

【0014】

本発明の請求項2に記載の発明は、柱状構造体の形状を円形状、長円形状、屈曲形状のいずれかとした請求項1に記載の核酸増幅反応容器であり、この構造とすることにより効率的な熱交換が可能となり、高速なポリメラーゼ連鎖反応を行うことができる核酸増幅反

50

応容器を実現することができる。

【0015】

本発明の請求項3に記載の発明は、柱状構造体を複数個設けた請求項1に記載の核酸増幅反応容器であり、柱状構造体を複数有することによって、より効率的な熱交換が可能となる核酸増幅反応容器を実現することができる。

【0016】

本発明の請求項4に記載の発明は、柱状構造体を蓋板もしくは基板と同一の材料とし、その接合面が存在しない一体構造体とした請求項1に記載の核酸増幅反応容器であり、同一材料であり接合面が存在しないことから、熱交換の障壁がなくなるので、より高速なポリメラーゼ連鎖反応が可能となる核酸増幅反応容器を実現することができる。

10

【0017】

本発明の請求項5に記載の発明は、基板と柱状構造体を直接接合した請求項1に記載の核酸増幅反応容器であり、生産性に優れた高速なポリメラーゼ連鎖反応が可能となる核酸増幅反応容器を実現することができる。

【0018】

本発明の請求項6に記載の発明は、蓋と柱状構造体を直接接合した請求項1に記載の核酸増幅反応容器であり、生産性に優れた高速なポリメラーゼ連鎖反応が可能となる核酸増幅反応容器を実現することができる。

【0019】

本発明の請求項7に記載の発明は、核酸の増幅に用いる核酸増幅反応容器であって、基板と、この基板内に形成されたキャビティと、このキャビティを封止するための蓋板と、この蓋板に形成されたサンプル注入孔とを備え、前記キャビティの形状をミアンダ形状もしくは渦巻き形状とした核酸増幅反応容器であり、キャビティ形状がこれらの形状とすることにより、キャビティの体積に対してキャビティの表面積が大きくなるので、基板との熱交換を効率良く行うことが可能となる。

20

【0020】

本発明の請求項8に記載の発明は、蓋板をガラスとし、基板をシリコンとした請求項1または4に記載の核酸増幅反応容器であり、基板がシリコンよりなることからより高い熱伝導性を持った核酸増幅反応容器とすることができるとともに、蓋板をガラスとすることにより、シリコンからなる基板と陽極接合、直接接合などの接合方法で製造できることから基板と蓋板の間において熱伝導性が良くなり、ポリメラーゼ連鎖反応中に容器内に余分な成分が溶け出さない核酸増幅反応容器を容易に実現することができる。

30

【0021】

本発明の請求項9に記載の発明は、基板と、この基板の上に形成したキャビティと、このキャビティを封止するための蓋板と、この蓋板の上に形成されたサンプル注入孔とを備え、前記キャビティ内に蓋板もしくは基板と一体化した柱状構造体を設けた核酸増幅反応容器の製造方法であり、前記蓋板と前記基板の間の接合を陽極接合法もしくは直接接合法のいずれかの方法で行う核酸増幅反応容器の製造方法であり、前記蓋板と前記基板の間の接合面にはこれら材料以外のものが存在しない接合方法により接合されており、熱伝導性が良く、核酸増幅反応容器中に容器内に余分な成分が溶け出すといった心配がない核酸増幅反応容器を実現することができる。

40

【0022】

本発明の請求項10に記載の発明は、基板と、この基板の上に形成されたキャビティと、このキャビティを封止するための蓋板と、この蓋板の上に形成されたサンプル注入孔とを備え、前記キャビティの形状がミアンダ形状もしくは渦巻き形状である核酸増幅反応容器の製造方法であって、前記蓋板と前記基板の間の接合を陽極接合法もしくは直接接合法のいずれかの方法で行う核酸増幅反応容器の製造方法であり、前記蓋板と前記基板の間の接合面にはこれら材料以外のものが存在しない接合方法により接合されており、請求項7と同じ作用を有する。

【発明の効果】

50

【 0 0 2 3 】

本発明の核酸増幅反応容器およびその製造方法は高速で加熱・冷却することができる構成を実現することにより、サンプル中のDNAを高速に増幅することが可能な核酸の増幅反応に用いるチップ型の核酸増幅反応容器およびその製造方法を提供することができるという効果を奏するものである。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 4 】

(実施の形態 1)

以下、実施の形態 1 を用いて請求項 1 ~ 3、5、6 に記載の発明について詳細に説明する。

10

【 0 0 2 5 】

図 1 は、本発明の実施の形態 1 における核酸増幅反応容器の構造の一例を示す分解斜視図であり、図 2 はこれの分解図である。

【 0 0 2 6 】

本発明の実施の形態 1 における核酸増幅反応容器は、シリコンよりなる基板 1 にサンプル液を貯留するためのキャビティ 2 と、このキャビティ 2 内には基板 1 と同材料であるシリコンからなる長円形の柱状構造体 6 が設けられている。

【 0 0 2 7 】

この基板 1 および柱状構造体 6 の上部はガラスなどからなる蓋板 3 が接合されておりキャビティ 2 は外部より遮断され、蓋板 3 に設けられたサンプル注入孔 4 を通してサンプルをキャビティ 2 内に封じ込めることができる。ここで、基板 1 と蓋板 3 の接合面には接着剤などは存在しておらず、シリコンからなる基板 1 とガラスからなる蓋板 3 の間では分子間結合が行われている。

20

【 0 0 2 8 】

ここで、基板 1 と蓋板 3 の材料はサンプル液と反応しない材料、例えばシリコン、ガラスの他にゲルマニウム等の半導体、石英、セラミックス、及びチタン酸リチウム、ニオブ酸リチウムなどの単結晶基板を使用することができ、これらの材料を用いた場合には実施の形態 2 で後述する分子間結合である直接接合、陽極接合による接合技術が可能である。このため、本発明の核酸増幅反応容器は効率よく加工することができる。

【 0 0 2 9 】

このように、本発明による核酸増幅反応容器ではキャビティ 2 内に柱状構造体 6 が存在し、この柱状構造体 6 は基板 1 とが同じ材質により一つの構造体とすることにより熱伝導の障壁が少なくなる。

30

【 0 0 3 0 】

さらに、蓋板 3 と基板 1 の接合面は分子間結合が行われているため、接着剤などの異種材料がないので熱伝導において熱障壁がほとんど存在せず、熱伝導が速やかに行われる。

【 0 0 3 1 】

ここで柱状構造体 6 の形状としては長円形状の他に、円形状、屈曲形状などがある。これらの柱状構造体 6 は複数あればより効果が大きくなり、図 3 または図 4 に示すように円形状の柱状構造体 7 または屈曲形状の柱状構造体 8 を複数個形成するとよい。これらの柱状構造体 6、7、8 によってキャビティ 2 の容量体積及び壁の表面積が変わるが、特にこれらの要因が核酸の増幅反応に影響を及ぼす場合には、温度の上昇・下降特性に加えて、容量体積・壁表面積・柱状構造体 6、7、8 の個数等が最適に選ばれることにより所定の性能に制御することが可能になる。

40

【 0 0 3 2 】

また、これらの柱状構造体 6、7、8 と基板 1 あるいは蓋板 3 とを一つの構造体として説明してきたが、これらの柱状構造体 6、7、8 と基板 1 あるいは蓋板 3 とを個別に作製しておいて、その後直接接合の技術を用いて一体化構造とする方法によってもほぼ同等の熱伝導性を有する核酸増幅反応容器を実現することができる。

【 0 0 3 3 】

50

(実施の形態2)

本発明の実施の形態2を用いて本発明の請求項4、7～10に記載の発明について説明する。

【0034】

図5は本実施の形態2における核酸増幅反応容器の基板9の斜視図である。図5において、シリコンよりなる基板9に渦巻き形状のキャビティ10が形成されており、これによりキャビティ10の隔壁はシリコンと一体化されている。加えて、渦巻き形状となっていることからキャビティ10を狭い領域に集中させて形成することができることから、サンプル溶液と基板9との間での熱交換が速やかに行われ、均熱性を高く設計できるという利点を有する。

10

【0035】

また、図6はシリコンよりなる基板11にミアンダ形状のキャビティ12が形成されている。このキャビティ12がミアンダ形状となることの利点は先ほど述べた渦巻き形状の場合と同じであり、さらに付け加えるとミアンダ形状とした場合にはサンプル溶液が基板11の上の一方向に流れることから、サンプル注入孔(図示せず)を基板11の端部に設置することが可能になる。

【0036】

これに対して、渦巻き形状の場合にはサンプル注入孔は一方を渦の中心に持ってくる必要がある。いずれの場合が適当であるかはサンプルや処理プロトコルによって決められるべきである。

20

【0037】

次に、本発明の核酸増幅反応容器を得るための製造方法について図7～図12を用いて説明する。

【0038】

ここでは基板13として厚さ500 μm のシリコン単結晶板を用い、ポリメラーゼ連鎖反応用の核酸増幅反応容器を作製する例について示した。

【0039】

まず、表面が鏡面処理された厚み500 μm のシリコンからなる基板13と厚みが400 μm のガラスからなる蓋板16を用意し、シリコンからなる基板13には図7のようにレジストマスク14を所定のパターンで形成した後、図8のように SF_6 を用いたドライエッチングによってキャビティ15を形成する。このエッチングの深さとしては必要とするサンプルの容量によって変わるが150～400 μm 程度が適当である。そしてこのキャビティ15の形成によって柱状構造体20を設けることができる。

30

【0040】

ここで、シリコンからなる基板13内に形成されるキャビティ15の形成方法としては基板13がシリコン等の半導体であれば、RIE等のドライエッチング工法や強アルカリ性のエッチング液等を用いたウェットエッチング工法を用いることができ、ガラスであればフッ酸等を用いたウェットエッチング工法を用いることもできる。

【0041】

特に、基板13としてシリコン等の半導体を用いれば、半導体分野において公知である微細加工技術を利用し、微小なキャビティ15及び高密度に配置された柱状構造体20を精度良く加工することができるので好ましい。

40

【0042】

次に、図9に示すように蓋板16となるガラス基板にレジストマスク17を形成した後、図10に示すようにサンドブラスト法によってサンプル注入孔18を形成して蓋板16とする。このとき、サンプル注入孔18を形成する方法としては他に沸酸などを用いたウェットエッチング工法、 SF_6 ガス、 CF_4 ガス、 C_3F_8 ガス、 C_4F_8 ガスなどを用いたドライエッチング工法などもある。

【0043】

これらはサンプル注入孔18に要求される加工精度によって最適な方法を選択すること

50

ができる。

【0044】

次に、図11に示すようにシリコンからなる基板13とガラスからなる蓋板16とを酸性洗浄剤を用いて表面を洗浄し、互いの間に空気が入らないように貼り合わせた後、300で3時間加熱することによって、接着剤を用いない直接接合によってシリコンからなる基板13とガラスからなる蓋板16とを接着して図12の核酸増幅反応容器19を得る。その後、必要であればチップ状に切り出して小型の核酸増幅反応容器を得る。

【0045】

このように、直接接合技術を用いることにより、シリコンからなる基板13とガラスからなる蓋板16の接合面は分子間で結合が行われた強固な接合であり、これによって溶液が接触しうる箇所に接着剤などの余分な成分が存在しないことから、ポリメラーゼ連鎖反応中に容器内にこれら成分が溶け出すといった心配がなくなる。

【0046】

なお、本実施の形態2で説明してきた直接接合法では貼り合わせ時の加熱温度を300で3時間加熱としたが、加熱するときの温度はガラスの材質によって変えれば良い。ナトリウム、カリウムなどを含むガラス材料であれば250程度で可能であり、これらを含まないガラス材料であれば400程度まで上げることにより直接接合が可能である。

【0047】

また、ガラスの材質は石英ガラスのように不純物を含まないものでも可能であり、この場合はさらに接合の温度を500以上に上げる必要がある。さらに、蓋板16の材料をシリコンとしても可能である。この場合はキャビティ15を形成したシリコンからなる基板13とサンプル注入孔18を形成したシリコンからなる蓋板16とを直接接合によって貼り合わせることによって形成することが可能である。このときの直接接合の温度は500以上にすればよい。

【0048】

また、このほかに分子間結合を可能にする接合方法としては基板13と蓋板16に電圧をかけながら加熱する陽極接合法や、真空中で基板13と蓋板16にプラズマを照射した後に接合する常温直接接合法などの方法がある。

【0049】

以上、実施の形態1および実施の形態2で述べてきた核酸増幅反応容器を用いて核酸を増幅する手順について述べる。

【0050】

なお、ここで本発明による核酸増幅反応容器の温度上昇・下降に用いられる手段は特に限定されるものではなく、アルミニウムブロックを用いた従来方式の他、前記Light Cyclerのような熱源として熱風を利用した方式、赤外線放射源としてタングステンランプを利用した方式(R. P. Oda et al., Infrared-Mediated Thermocycling for Ultrafast Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA, Analytical Chemistry, 1998, 70, 4361-4368)、電磁誘導加熱を利用した方式などを用いることができる。

【0051】

- また、核酸増幅反応に試用した容器は図13に示したとおりであり、
- (A) キャビティを丸形状とし、柱状構造体は無しとした反応容器(比較例)
 - (B) 長円形状の柱状構造体とした反応容器(本発明品1)
 - (C) 複数の屈曲形状の柱状構造体とした反応容器(本発明品2)
 - (D) 複数の円形状の柱状構造体とした反応容器(本発明品3)

で比較を行った。

【0052】

なお、この比較実験で行った装置は、ポリメラーゼ連鎖反応用のサーマルサイクラー装置として、Roche社のLight Cyclerを用いた。

10

20

30

40

50

【0053】

次に、本発明の核酸増幅反応容器を用いて核酸を増幅する反応としてポリメラーゼ連鎖反応を用いた。このポリメラーゼ連鎖反応を実行するプロトコルについては周知一般的なものであるので詳細な説明は省略し、ここではこのポリメラーゼ連鎖反応を実行するために用いた材料について若干の説明をする。

【0054】

まず使用するテンプレートとして、DNA（寶酒造製）（DNAの塩基配列は、GenBankデータベースのAccession No. V00636, J02459, M17233, X00906を参照）を用いた。またプライマーとして、TaKaRaポリメラーゼ連鎖反応 Amplification Kit（寶酒造製）のControl Primer 1（5'-GATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG-3'）及びPrimer 3（5'-GAATCACGGTATCCGGCTGCGCTGA-3'）を用いた（300bp増幅用）。

10

【0055】

また、増幅したい核酸を含むポリメラーゼ連鎖反应用サンプルは2.5U/μl TaKaRa Z-Taq 0.5μl、10×Z-Taq Buffer 5μl、2.5mM each dNTP Mixture 4μl、20pmol/μl Primer 1及びPrimer 3 各2.25μl、0.25μg/μl ウシ血清アルブミン2μlをポリプロピレン製チューブの中で混合した後、10ng/μl DNA 5μlを加え、最後に蒸留水29μlを加え、ピペティングによって緩やかに混合することによって調整した（総量50μl）。

20

【0056】

次に、このように調製したポリメラーゼ連鎖反应用サンプルを前記（A）～（D）に示した本実施の形態の核酸増幅反応容器にそれぞれ注入した。それぞれの核酸増幅反応容器は注入孔4を耐熱性テープで封止することによってサンプルを封入した。このようにして、サンプルを封入した核酸増幅反応容器をRoche社製LightCycler内に設置し、初期変性反応98 1秒、変性反応98 1秒、アニーリングと伸長反応66 4秒となる反応条件で30サイクル繰り返した。トータルの反応時間は522秒であった。

【0057】

この温度上昇・下降サイクルを実行した後、遠心チューブ内に核酸増幅反応容器を挿入し、10krpmの回転数で1分間遠心処理を行うことにより、核酸増幅反応容器からポリメラーゼ連鎖反应用サンプルの回収を行った。

30

【0058】

次に、回収したサンプルはAgilent Technology社製Agilent 2100 Bioanalyserを用いて解析を行い、増幅する目的である300bpの核酸の定量を行った。

【0059】

この核酸増幅反応の評価結果を図14に示す。

【0060】

図14の結果より、本実施の形態2における核酸増幅反応容器の形態である（B）、（C）および（D）において、比較例（A）の柱状構造体20を有せず、キャビティ15が円形である核酸増幅反応容器（A）を用いた場合と比較し、明らかに目的の核酸の増幅産物が多いことがわかる。よって、本実施の形態2の核酸増幅反応容器（B）、（C）および（D）を用いることにより、比較例の核酸増幅反応容器を用いた場合と比較して効率よく、良好な核酸の増幅反応が行えることを確認した。

40

【産業上の利用可能性】

【0061】

本発明にかかる核酸増幅反応容器は、高速にサンプル液の温度上昇・下降を行うことができ、核酸を増幅反応させる容器、例えばポリメラーゼ連鎖反応容器として有用である。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 6 2 】

【図 1】本発明の実施の形態 1 における核酸増幅反応容器の一例の構造を示す斜視図

【図 2】同分解斜視図

【図 3】同核酸増幅反応容器の別の例の構造を示す要部の斜視図

【図 4】同核酸増幅反応容器の他の例の構造を示す要部の斜視図

【図 5】本発明の実施の形態 2 における核酸増幅反応容器の一例の構造を示す要部の斜視図

【図 6】同核酸増幅反応容器の別の例の構造を示す要部の斜視図

【図 7】同核酸増幅反応容器の製造方法を示す断面図

【図 8】同断面図

10

【図 9】同断面図

【図 10】同断面図

【図 11】同断面図

【図 12】同断面図

【図 13】(A)、(B)、(C)、(D) 同実験で試用した核酸増幅反応容器の分解平面図

【図 14】同核酸増幅反応容器を用いたポリメラーゼ連鎖反応の特性比較図

【符号の説明】

【 0 0 6 3 】

1 基板

20

2 キャビティ

3 蓋板

4 サンプル注入孔

6 柱状構造体

7 円形状の柱状構造体

8 屈曲形状の柱状構造体

9 基板

10 キャビティ

11 基板

12 キャビティ

30

13 基板

14 レジストマスク

15 キャビティ

16 蓋板

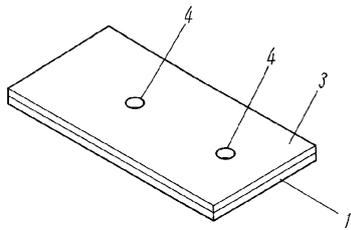
17 レジストマスク

18 サンプル注入孔

19 核酸増幅反応容器

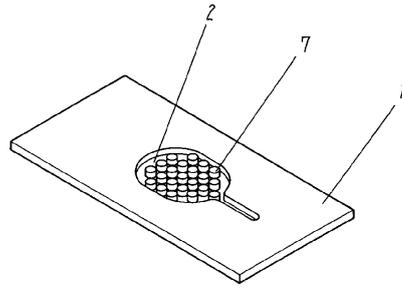
20 柱状構造体

【図1】

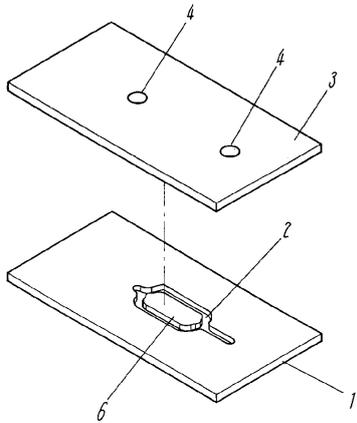


1 基板
 3 蓋板
 4 サンプル注入孔

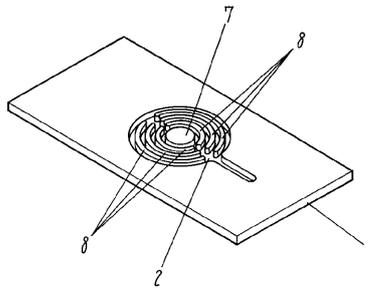
【図3】



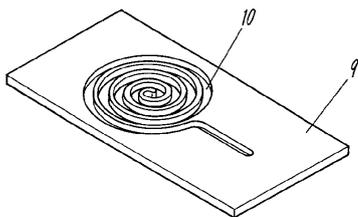
【図2】



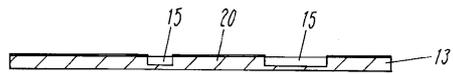
【図4】



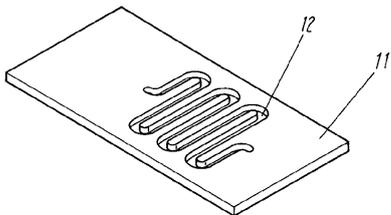
【図5】



【図8】



【図6】



【図9】



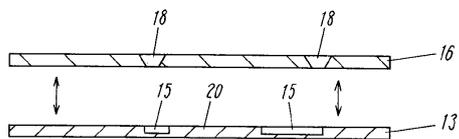
【図7】



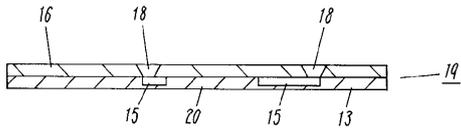
【図10】



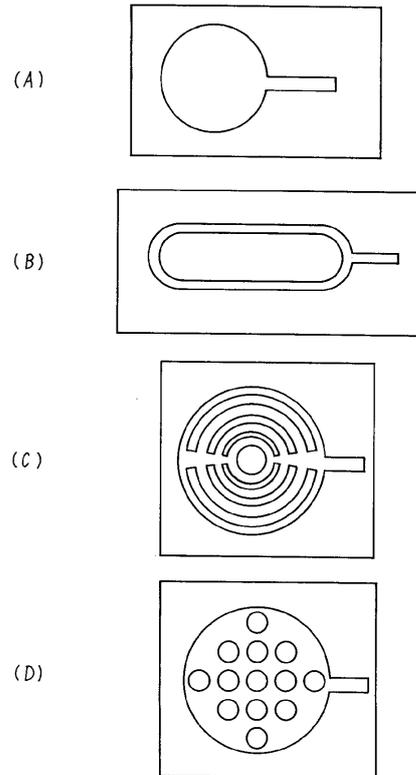
【図11】



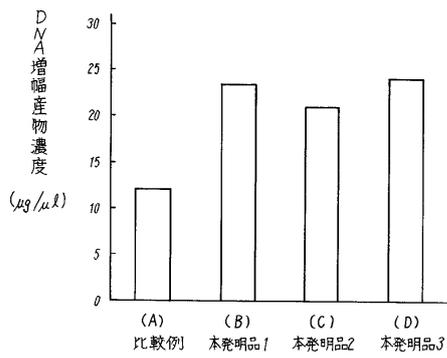
【図12】



【図13】



【図14】



フロントページの続き

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特開平09-262084(JP,A)
特開2002-184775(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12M 1/00-3/10
BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)