

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-22315
(P2010-22315A)

(43) 公開日 平成22年2月4日(2010.2.4)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	2 G 0 4 3		
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z	4 B 0 2 9		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 B 0 6 3		
G 0 1 N	21/64	(2006.01)	G 0 1 N	21/64	Z			

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2008-189889 (P2008-189889)
(22) 出願日 平成20年7月23日 (2008.7.23)

(71) 出願人 000002185
ソニー株式会社
東京都港区港南1丁目7番1号
(74) 代理人 100082740
弁理士 田辺 恵基
(72) 発明者 森脇 俊貴
東京都港区港南1丁目7番1号ソニー株式会社内
Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA06 EA01 FA03
HA02 LA03 MA11 NA01 NA13
4B029 AA07 BB20 CC01 FA15 GA03
GB06
4B063 QA01 QQ42 QR08 QR32 QR62
QS25 QX02

(54) 【発明の名称】 核酸量検出装置及び核酸量検出方法

(57) 【要約】

【課題】 増殖反応の検出精度を向上し得る核酸量検出装置及び核酸量検出方法を提案する。

【解決手段】 増殖反応の場として基板に形成される複数の容器にそれぞれ対応付けられる各光源素子から、該容器に入れられる蛍光物質に対する励起光を照射する照射ステップと、基板と、各光源素子との間において、各光源素子の光軸を基準とする周囲に配される複数の受光素子で受光される、各光源素子から照射される励起光の散乱光量が一定となるように、各光源素子に対する照射光量を調整する光量調整ステップとを経る。

【選択図】 図7

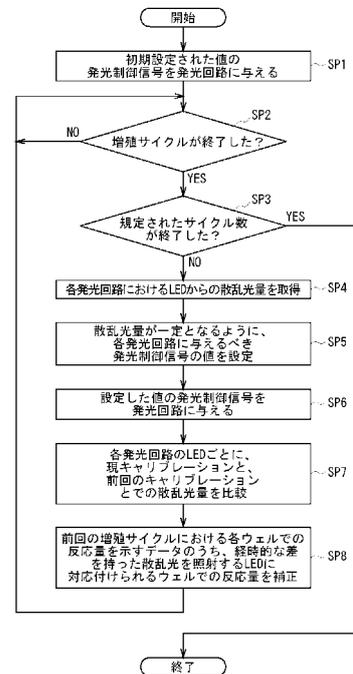


図7 調整処理手順

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸の増殖反応の場として基板に形成される複数の容器にそれぞれ対応付けられ、該容器に入れられる蛍光物質に対する励起光を照射する複数の光源素子と、

上記基板と、上記複数の光源素子との間において、各光源素子の光軸を基準とする周囲に配され、当該光源素子から照射される励起光の散乱光を受光する複数の受光素子と、

上記複数の受光素子で受光される散乱光量が一定となるように、各光源素子に対する照射光量を調整する光量調整部と

を有する核酸量検出装置。

【請求項 2】

上記光量調整部は、

上記増殖反応のサイクル間に設けられる期間ごとに、上記各光源素子に対する照射光量を調整する、請求項 1 に記載の核酸量検出装置。

【請求項 3】

上記基板と、上記複数の光源素子との間に該基板と平行に配され、上記励起光以外の光を反射する反射板

をさらに有し、

上記複数の受光素子は、

上記反射板のうち上記複数の光源素子に対向される面に配される、請求項 1 に記載の核酸量検出装置。

【請求項 4】

上記複数の受光素子ごとに、現在の期間での散乱光量と、該期間よりも 1 つ前の期間での散乱光量とを比較し、前回の増殖反応における上記複数の容器での反応結果を示す値のうち、当該差を有する散乱光量を照射する光源素子に対応付けられる容器での反応結果を示す値を、上記差に応じて調整する反応結果調整部

をさらに有する、請求項 2 に記載の核酸量検出装置。

【請求項 5】

上記反応結果調整部は、

上記差を有する散乱光量を照射する光源素子に対応付けられる容器での反応結果を示す値に、上記差に比例する値を加算又は減算する、請求項 4 に記載の核酸量検出装置。

【請求項 6】

増殖反応の場として基板に形成される複数の容器にそれぞれ対応付けられる各光源素子から、該容器に入れられる蛍光物質に対する励起光を照射する照射ステップと、

上記基板と、上記各光源素子との間において、各光源素子の光軸を基準とする周囲に配される複数の受光素子で受光される、上記各光源素子から照射される励起光の散乱光量が一定となるように、上記各光源素子に対する照射光量を調整する光量調整ステップと

を有する、核酸量検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は核酸量検出装置及び核酸量検出方法に関し、PCR (Polymerase Chain reaction) 装置に好適なものである。

【背景技術】

【0002】

従来、核酸の増殖反応の場となる複数の微小容器に対する熱源として、薄膜トランジスタを用いるようにしたリアルタイム PCR 装置が本出願人により提案されている (例えば特許文献 1)。

【0003】

このリアルタイム PCR 装置における増殖反応の検出系として、微小容器に入れられる蛍光物質の励起光を照射する光源と、該励起光によって励起される蛍光物質の蛍光を受光

10

20

30

40

50

する受光素子とが、微小容器ごとに設けられている。

【特許文献 1】特開 2 0 0 3 - 2 9 8 0 6 8 公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、各光源には一般に製造上のばらつきがあるため、当該光源に対する制御を同一としても、このばらつきに起因して各微小容器に対する励起光量が相違する。この相違は、受光素子から微小容器での増殖反応結果として出力される信号に反映されるため、該信号に示される核酸量の信頼性が乏しいものになってしまう。

【0005】

本発明は以上の点を考慮してなされたもので、増殖反応の検出精度を向上し得る核酸量検出装置及び核酸量検出方法を提案しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

かかる課題を解決するため本発明は、核酸量検出装置であって、核酸の増殖反応の場として基板に形成される複数の容器にそれぞれ対応付けられ、該容器に入れられる蛍光物質に対する励起光を照射する複数の光源素子と、基板と、複数の光源素子との間において、各光源素子の光軸を基準とする周囲に配され、当該光源素子から照射される励起光の散乱光を受光する複数の受光素子と、複数の受光素子で受光される散乱光量が一定となるように、各光源素子に対する照射光量を調整する光量調整部とをもち、

【0007】

また本発明は、核酸量検出方法であって、増殖反応の場として基板に形成される複数の容器にそれぞれ対応付けられる各光源素子から、該容器に入れられる蛍光物質に対する励起光を照射する照射ステップと、基板と、各光源素子との間において、各光源素子の光軸を基準とする周囲に配される複数の受光素子で受光される、各光源素子から照射される励起光の散乱光量が一定となるように、各光源素子に対する照射光量を調整する光量調整ステップとを経る。

【発明の効果】

【0008】

本発明では、容器への中途段階にある光量（散乱光量）が一定となるため、各光源素子における製造上のばらつきがあっても、該ばらつきに起因する光量差は相殺されることになる。つまり、各容器に到達される励起光量は光源素子のばらつきにかかわらず一定となる。したがって本発明によれば、励起光によって励起される蛍光量を、各容器での核酸量自体を反映したものとすることができ、この結果、増殖反応の検出精度を向上することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下図面について、本発明を適用した一実施の形態を詳述する。

【0010】

(1) リアルタイム PCR 装置の構造

図 1 において、本実施の形態によるリアルタイム PCR 装置 1 の構造を示す。このリアルタイム PCR 装置 1 は、反応室に対して、複数の基板 11 ~ 16 を所定間隔で層状に配置した構造を有する。

【0011】

反応基板 11 は、基準層となる基板であり、該基板には、核酸の増殖反応の場とされる容器（以下、これをウェルとも呼ぶ）UL が高密度に形成される。これらウェル UL には、増殖対象の標的核酸及びその標的核酸の増殖に要する各種物質（プライマー、緩衝液、酵素、dNTP、蛍光色素等）が与えられる。

【0012】

例えば 6 [cm] 四方の反応基板 11 を用いた場合、1 [μ L] 以下の容量でなる 4 万

10

20

30

40

50

個程度のウェルU Lを形成することが可能となる。したがって、このリアルタイムP C R装置1は、反応室を小型化した場合であっても、同種又は異種でなる多くの標的核酸を取り扱うことが可能となる。

【0013】

発熱基板12は、反応基板11に対して下側の層として配される基板であり、該基板のうち、反応基板11と対向する面には、各ウェルU Lにそれぞれ対応付けて熱源素子H Dが配され、これら熱源素子H Dの周囲には複数の検温素子T Dが配される。この熱源素子H Dには例えばT F T (Thin Film Transistor)等が用いられ、検温素子T Dには例えばピンダイオード等が用いられる。

【0014】

このリアルタイムP C R装置1では、各ウェルU Lに対応する熱源素子H Dが、該熱源素子H Dを囲む複数の検温素子T Dでセンシングされる温度に応じて個別に制御される。したがって、このリアルタイムP C R装置1は、例えば各ウェルU Lに与えられる標的核酸の種が異なる等に起因して温度条件が異なる場合であっても、高密度に配される各ウェルU Lの温度を、増殖サイクルとして規定される変性段階、アニーリング段階、伸長段階の各段階に要する温度を基準として高精度で調整することができるようになされている。

【0015】

発熱補助基板13は、発熱基板12に対して下側の層として配される基板である。この発熱補助基板13は、反応室全体における熱を吸収又は発散することで、該反応室を設定温度に維持する。

【0016】

したがって、このリアルタイムP C R装置1は、現段階で設定される温度から次段階で与えるべき温度にウェルU Lの温度を移行させるまでの時間(温度勾配の時間)を高速化できるようになされている。ちなみに、発熱補助基板13には例えばペルチェ素子等が用いられる。

【0017】

発光基板14は、反応基板11に対して上側の層として配される基板であり、該基板のうち、反応基板11と対向する面には、各ウェルU Lにそれぞれ対応させて、インターカレータ等の蛍光物に対する励起光を照射する光源素子L Sが配される。この光源素子L Sには例えばL E D (Light Emitting Diode)が用いられる。

【0018】

励起光透過基板15は、反応基板11と発光基板14との中間層として配される基板であり、光源素子L Sから照射される励起光を透過し、該励起光以外の光を反射する。この励起光透過基板15には例えばダイクロミックミラーが用いられる。

【0019】

蛍光透過基板16は、発熱基板12と発熱補助基板13との中間層として配される基板であり、励起光によって励起される蛍光物の蛍光を透過し、該蛍光以外の光を反射する。また発熱補助基板13と対向する面には、各ウェルU Lにそれぞれ対応させて、当該ウェルで励起される蛍光を受光する受光素子L D Aが配される。リアルタイムP C R装置1では、これら受光素子L D Aで受光される蛍光量に応じた標的核酸量が、増殖サイクル単位で算出される。

【0020】

この実施の形態におけるリアルタイムP C R装置1では、励起光透過基板15における発光基板14と対向する面のうち、該発光基板14の各光源素子L Sの光軸に対応する位置を基準とする周囲に対して、当該光源素子L Sから照射される励起光の散乱光を受光する受光素子L D Bが配される。

【0021】

またこのリアルタイムP C R装置1では、1回の増殖サイクルが終了した時点で直ちに次の増殖サイクルを開始するのではなく、図2に示すように、各回の増殖サイクルの終了時点から、光源素子L Sの光量を調整するための期間(以下、これをキャリブレーション

10

20

30

40

50

期間CFとも呼ぶ)が設けられている。

【0022】

そしてこのキャリブレーション期間CFごとに、各受光素子LDBで受光される散乱光量が一定となるように、各ウェルULに対応する光源素子LSの光量が個別に制御される。したがって、このリアルタイムPCR装置1は、規定回数の増殖サイクルを終了するまで、各ウェルULに対して一定量の励起光を照射することができるようになされている。

【0023】

(2)発熱基板の具体的な構成

次に、発熱基板12(図1)の具体的な構成について、図3を用いて説明する。発熱基板12は、励起光が透過可能な例えばガラス等の基板であり、複数対の発熱回路30及び温度センシング回路40と、走査駆動部50と、温度制御部60とを有する。

10

【0024】

各発熱回路30はそれぞれ1つのTF T 3 1を有し、これらTF T 3 1は、反応基板11に形成される各ウェルにそれぞれ対応させてマトリクス状に配される。一方、各温度センシング回路40はそれぞれ複数のピンダイオード41を有し、これらピンダイオード41は、対となる発熱回路30がもつTF T 3 1の周囲に一定の距離をもって所定間隔ごとに配される。

【0025】

ここで、発熱回路30及び温度センシング回路40における具体的な回路構成を説明する。ただし、各対の発熱回路30及び温度センシング回路40はそれぞれ同一の構成であるため、1対の発熱回路30及び温度センシング回路40に着目して説明する。

20

【0026】

図4に示すように、発熱回路30は、熱源素子として機能するTF T 3 1と、スイッチング素子として機能するトランジスタT 1, T 2, T 3と、発熱制御素子として機能するコンデンサ32とによって構成される。

【0027】

一方、温度センシング回路40は、検温素子として機能する複数のピンダイオード41と、スイッチング素子として機能するトランジスタT 4, T 5と、電圧計42とによって構成される。

【0028】

発熱回路30におけるトランジスタT 1, T 2, T 3のゲートには、パルス信号PS 1が第1の走査駆動部50A(図3)から与えられ、温度センシング回路40におけるトランジスタT 3, T 4のゲートには、パルス信号PS 1とは反転した関係にあるパルス信号PS 2が第2の走査駆動部50B(図3)から与えられる。

30

【0029】

例えば、パルス信号PS 1が「High」状態にある場合(発熱回路30が駆動状態にある場合)、パルス信号PS 2が「Low」状態にある(温度センシング回路40が非駆動状態にある)。この状態では、発熱回路30におけるトランジスタT 1, T 2はオン状態にあり、発熱回路30におけるトランジスタT 3と、温度センシング回路40におけるトランジスタT 4, T 5はオフ状態にある。

40

【0030】

この状態の場合、発熱回路30には、加熱すべき温度に相当する電流値の信号(以下、これを加熱制御信号とも呼ぶ)I s i gが温度制御部60(図3)与えられる。発熱回路30では、TF T 3 1におけるドレインとゲートがトランジスタT 2により短絡されているため、発熱制御信号I s i gはトランジスタT 1を介してTF T 3 1に流れる。

【0031】

この結果、TF T 3 1には、発熱制御信号I s i gに応じたゲート・ソース間電圧が発生し、この電圧が、TF T 3 1に発生させるべき熱源要素として、コンデンサ32に保持されることとなる。

【0032】

50

TFT31がエンハンスメント型トランジスタ(すなわち閾値 $V_{th} > 0$)である場合、該TFT31は飽和領域で動作することになるので、TFT31におけるゲート・ソース間電圧を V_{gs} とすると、該電圧 V_{gs} と発熱制御信号 I_{sig} との間には、次式

【0033】

【数1】

$$I_{sig} = \mu \cdot C_{ox} \cdot \frac{W}{L} \cdot \frac{(V_{gs} - V_{th})^2}{2} \quad \dots\dots (1)$$

【0034】

の関係が成立する。ちなみにこの(1)式における「 μ 」はキャリアの移動度を、「 C_{ox} 」は単位面積当たりのゲート容量を、「 W 」はチャネルの幅を、「 L 」はチャネルの長さを示す記号である。

【0035】

これに対して、パルス信号 $PS1$ が「Low」状態にある場合(発熱回路30が非駆動状態にある場合)、パルス信号 $PS2$ が「High」状態にある(温度センシング回路40が非駆動状態にある)。この状態における発熱回路30では、トランジスタ $T1$ 、 $T2$ はオフ状態にあり、トランジスタ $T3$ がオン状態にあるため、電源電圧 V_{DD} からTFT31におけるソース端の GND に向かって電流が流れる。

【0036】

この電源電圧 V_{DD} からTFT31に与えられる電圧は、該TFT31が飽和領域で動作する電圧よりも高く設定される。つまり、TFT31が飽和領域で動作するように、該TFT31に対する電源電圧 V_{DD} は十分に高く、トランジスタ $T3$ のオン抵抗は十分に低く設定される。

【0037】

したがって、TFT31に流れる電流 I_{drv} はドレイン・ソース間電圧 V_{ds} には依存せず、次式

【0038】

【数2】

$$I_{drv} = \mu \cdot C_{ox} \cdot \frac{W}{L} \cdot \frac{(V_{gs} - V_{th})^2}{2} \quad \dots\dots (2)$$

【0039】

によって与えられる。

【0040】

一般に、TFTでは(1)式及び(2)式の右辺に現れる各パラメータがばらつくものであるが、この発熱回路30では、TFT31が飽和領域で動作するので、該パラメータの値に関係なく、電流 I_{drv} と発熱制御信号 I_{sig} とは一致することとなる。

【0041】

したがって、TFT31での発熱量は、該TFT31の特性ばらつきによらず、温度制御部60(図3)から与えられる発熱制御信号 I_{sig} と、電源電圧 V_{DD} との積で決まる正確なものとなる。

【0042】

また発熱制御信号 I_{sig} は、温度制御部60(図3)において、その電流値を正確に可変することができるものである。したがって、この発熱回路30は、温度制御部60での電流制御によって、TFT31を通じてウェルに対する温度を正確に可変することが可能となる。

【0043】

一方、温度センシング回路40には、パルス信号 $PS1$ が「Low」状態(発熱回路3

10

20

30

40

50

0 が非駆動状態)、かつ、パルス信号 P S 2 が「H i g h」状態(温度センシング回路 40 が駆動状態)にある場合、側温制御信号 I d e t が温度制御部 60 (図 3)与えられる。

【0044】

この場合、温度センシング回路 40 では、側温制御信号 I d e t はトランジスタ T 4 を介して直列に接続された複数のピンダイオード 41 に流れる。この結果、これらピンダイオード 41 には電圧が加わり、該電圧が電圧計 42 によって計測されることになる。

【0045】

この電圧計 32 における計測値は、温度制御部 60 (図 3)によって T F T 31 周囲における平均的な温度を示すパラメータとして取り込まれ、該温度制御部 60 (図 3)において、発熱制御信号 I s i g の電流値を決定するために用いられる。

10

【0046】

このようにして各対の発熱回路 30 及び温度センシング回路 40 は、温度制御部 60 の制御のもとで、交互に動作するようになされている。

【0047】

走査駆動部 50 (図 3)は、各発熱回路 30 に対して、所定間隔ごとに駆動期間をもつ同位相又は異位相のパルス信号を第 1 の走査駆動部 50 A から送出する一方、各温度センシング回路 40 に対して、対とされる発熱回路 30 に送出されるパルス信号とは反転した関係にあるパルス信号を第 2 の走査駆動部 50 B から送出する。

【0048】

このようにして走査駆動部 50 は、発熱回路 30 の駆動と、温度センシング回路 40 の駆動とを単位(以下、これを駆動サイクルとも呼ぶ)として、各発熱回路 30 及び温度センシング回路 40 を対ごとに循環駆動させるようになされている。

20

【0049】

温度制御部 60 は、C P U (Central Processing Unit)と、R O M (Read Only Memory)と、当該 C P U のワークメモリとしての R A M (Random Access Memory)とを含むコンピュータとして構成される。

【0050】

この温度制御部 60 は、ウェルに与えるべき温度(以下、これをウェル温度とも呼ぶ)として、変性段階に要する温度(95)から標的核酸の種に応じて増減した温度を初期設定する。

30

【0051】

そして温度制御部 60 は、増殖サイクルにおける変性段階、アニーリング段階、伸長段階への移行タイミングを計測し、該移行タイミングとなったときには、ウェル温度の設定を、その移行すべき段階に要する温度(95 、55 又は72)から標的核酸の種に応じて増減した温度に変更する。

【0052】

また温度制御部 60 は、ウェル温度を基準として、加熱すべき温度に相当する電流値の信号(以下、これを加熱制御信号とも呼ぶ)を駆動サイクルごとに生成するようになされている。

40

【0053】

すなわち温度制御部 60 は、駆動対象の温度センシング回路 40 に対して、例えば 100 [μ A] の側温制御信号 I d e t 1 と、10 [μ A] の側温制御信号 I d e t 2 とを与え、これらを与えたときの電圧計 42 (図 4)の計測値から、該温度センシング回路 40 に対する発熱回路 30 での温度を求める。

【0054】

具体的には、側温制御信号 I d e t 1 を与えたときの電圧値と、側温制御信号 I d e t 2 を与えたときの電圧値との差が電圧計 42 (図 4)の計測値となるが、この計測値を V とすると、次式

【0055】

50

【数 3】

$$\text{Temp (C)} = 5.0072 \times \Delta V + 273.15 \quad \dots\dots (3)$$

【0056】

により求める。この(3)式における「5.0072」はボルツマン定数である。

【0057】

また温度制御部60は、駆動対象の温度センシング回路40を用いて、対となる発熱回路30での温度を求めた場合、この求めた温度(測定温度)と、ウェル温度との温度差に比例する電流値を発熱制御信号I s i gの電流値として決定し、該決定した電流値の発熱制御信号I s i gを生成する。

10

【0058】

そして温度制御部60は、この発熱制御信号I s i gを、かかる温度センシング回路40に対する発熱回路30が駆動対象となったとき、該発熱回路30に対して送出する。

【0059】

このようにして温度制御部60は、規定された回数分の増殖サイクルを経るまで、発熱回路30に対する温度センシング回路40で測定した温度とウェル温度との温度差に応じて、駆動サイクルごとに発熱回路30に送出すべき加熱制御信号を生成するようになされている。

【0060】

したがって、この温度制御部60は、ウェル温度に至るまでそのウェル温度に応じた固定の電流値でなる加熱制御信号を与え続ける場合に比して、温度勾配を滑らかに(一定に)推移させることができ、この結果、急激な温度変化に起因する標的核酸等の劣化を回避できるようになされている。

20

【0061】

(3)光源基板の具体的な構成

次に、発光基板14(図1)の具体的な構成について、図5を用いて説明する。発光基板14は、複数の発光回路70と、走査駆動部80と、調整部90とを有する。

【0062】

各発光回路70はそれぞれ1つのLED71を有し、これらLED71は、反応基板11に形成される各ウェルにそれぞれ対応させてマトリクス状に配される。ここで、発光回路70における具体的な回路構成を説明する。ただし、各発光回路70はそれぞれ同一の構成であるため、1つの発光回路70に着目して説明する。

30

【0063】

図6に示すように、発光回路70は、光源素子LSとして機能するLED71と、スイッチング素子として機能するトランジスタT10、T11と、発光量制御素子として機能するコンデンサ72とによって構成される。

【0064】

発光回路70におけるトランジスタT10のゲートには、パルス信号PSが走査駆動部80(図5)から与えられる。例えば、パルス信号PSが「High」状態(駆動期間)にある場合、発光回路70におけるトランジスタT10はオン状態とされる。

40

【0065】

この状態の場合、発光回路70には、照射すべき発光量に相当する電流値の信号(以下、これを発光制御信号とも呼ぶ)I s gが調整部90(図5)から与えられ、トランジスタT10を介して流れる。

【0066】

これによりトランジスタT10のソースとトランジスタT11のゲート間には、発光制御信号I s gに応じた電圧が発生し、この電圧は、当該ソース・ゲート間に設けられたコンデンサ72に保持される。

【0067】

50

この結果、コンデンサ 72 に保持される電圧に応じた量の電流が、電源電圧 VDD から LED 71 に対して与えられ、該 LED 71 では、その電流量に応じた発光量の励起光が照射されることとなる。

【0068】

コンデンサ 72 に対する保持電圧は、発光制御信号 I_{sig} の値に応じて決まるものであるが、この値は調整部 90 (図 5) によって可変される。したがって、この発光回路 70 は、調整部 90 での電流制御に応じて、LED 71 ごとに、各ウェル UL に対する励起光を一定量で照射することが可能となる。

【0069】

走査駆動部 80 (図 5) は、キャリブレーション期間 CF (図 2) を駆動区間とするパルス信号を各発光回路 70 に与えて、当該発光回路 70 を同時期又は所定順に循環駆動させるようになされている。

10

【0070】

調整部 90 は、CPU、ROM および当該 CPU のワークメモリとしての RAM を含むコンピュータとして構成される。

【0071】

この調整部 90 は、ROM に格納されるプログラムに基づいて、現増殖サイクルから次の増殖サイクルに移行するまでのキャリブレーション期間 CF (図 2) ごとに、各 LED 71 に対する光量が一定となるように対応する発光回路 70 に与えるべき電流量を調整する。

20

【0072】

またこの調整部 90 は、現在のキャリブレーション期間 CF において各受光素子 LDB で受光される散乱光量と、前回のキャリブレーション期間 CF において各受光素子 LDB で受光される散乱光量との差に応じて、前回の増殖サイクルで算出された標的核酸量をウェル UL 単位で個別に調整するようになされている。

【0073】

この調整部 90 での具体的な調整処理は、例えば図 7 に示すフローチャートにしたがって行われる。

【0074】

すなわち調整部 90 は、増幅反応の開始操作が行われるとこの調整処理手順を開始し、ステップ SP1 において、初期値として設定される電流値の発光制御信号 I_{sig} を生成し、これを各発光回路 70 に送出する。

30

【0075】

そして調整部 90 は、次のステップ SP2 に進んで、増殖サイクルにおける伸長段階に対して指定される時間を経過したか否かを判定し、該時間を経過したものと判定した場合には、次のステップ SP3 に進んで、規定されたサイクル数を終了したか否かを判定する。

【0076】

ここで、規定されたサイクル数を終了していない場合、調整部 90 は、キャリブレーション期間 CF に移行したものと認識し、次のステップ SP4 に進んで、各受光素子 LDB で受光される散乱光量を取得し、これを内部のメモリにデータとして保存する。

40

【0077】

また調整部 90 は、続くステップ SP5 において、各受光素子 LDB から取得した散乱光量が一定となるように、各発光回路 30 に与えるべき発光制御信号 I_{sig} の電流値を設定する。

【0078】

そして調整部 90 は、次のステップ SP6 に進んで、ステップ SP4 において各発光回路 30 に対して設定した発光制御信号 I_{sig} を生成し、これを対応する発光回路 70 に送出する。

【0079】

50

この後、調整部 90 は、ステップ S P 7 に進んで、キャリブレーション期間 C F への移行が 2 回目以降である場合には、現在のキャリブレーション期間 C F 内にステップ S P 3 で取得した各受光素子 L D B の散乱光量と、前回のキャリブレーション期間 C F 内にステップ S P 3 で取得した各受光素子 L D B の散乱光量とを、対応する受光素子 L D B 同士で比較する。

【 0 0 8 0 】

ここで、現キャリブレーション期間 C F と、前キャリブレーション期間 C F との散乱光量の差を有する受光素子 L D B が 1 つでもある場合、このことは、その受光素子 L D B に対応する L E D 7 1 では、経時的な光量差があることを意味する。

【 0 0 8 1 】

この場合、調整部 90 は、ステップ S P 8 に進んで、現キャリブレーション期間 C F と、前キャリブレーション期間 C F との散乱光量の差を有する受光素子 L D B が照射対象とするウェル U L について、前回の増殖サイクルのときに受光素子 L D A で受光される蛍光量に応じて算出された標的核酸量を示すデータを取得する。

【 0 0 8 2 】

そして調整部 90 は、このデータにおける標的核酸量に対して、現キャリブレーション期間 C F と、前キャリブレーション期間 C F との散乱光量の差に比例する量を加算又は減算することによって、L E D 7 1 での経時的な光量差に起因するずれ量を補正した後、ステップ S P 2 に戻る。なお、この「差に比例する量」には、標的核酸の種に応じた比例定数を加味するようにしてもよい。このようにすれば、より真値に近い標的核酸量を得ることができる。

【 0 0 8 3 】

これに対して、現キャリブレーション期間 C F と、前キャリブレーション期間 C F との散乱光量の差を有する受光素子 L D B が 1 つもない場合、調整部 90 は、ステップ S P 8 を経ることなくステップ S P 2 に戻る。

【 0 0 8 4 】

このようにして調整部 90 は、ステップ S P 3 において、規定されるサイクル数の増殖サイクルを経るまで、次の増殖サイクルまでのキャリブレーション期間 C F 内に、各 L E D 7 1 に対する光量を調整するとともに、前回の増殖サイクルで算出された標的核酸量を適宜補正するようになされている。

【 0 0 8 5 】

(4) 動作及び効果

以上の構成において、このリアルタイム P C R 装置 1 では、複数のウェル U L にそれぞれ対応付けられる L E D 3 1 (光源素子 L S) から照射される励起光の散乱光を受光する受光素子 L D B (図 1) が、当該ウェル U L と L E D 3 1 (光源素子 L S) との間に設けられる。これら受光素子 L D B は、対応する L E D 3 1 (光源素子 L S) の光軸を基準とする周囲に配される (図 1) 。

【 0 0 8 6 】

このリアルタイム P C R 装置 1 における調整部 90 (図 6) は、これら受光素子 L D B で受光される散乱光量が一定となるように、各 L E D 3 1 から照射すべき発光量を調整する。

【 0 0 8 7 】

このリアルタイム P C R 装置 1 では、ウェル U L への中途段階にある光量 (散乱光量) が一定となるため、各 L E D 3 1 における製造上のばらつきがあっても、該ばらつきに起因する光量差は相殺されることになる。つまり、各ウェル U L に到達される励起光量は L E D 3 1 のばらつきにかかわらず一定となる。

【 0 0 8 8 】

したがってこのリアルタイム P C R 装置 1 では、励起光によって励起される蛍光量を、各ウェル U L での核酸量自体を反映したものとすることができ、この結果、増殖反応の検出精度を向上することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

この実施の形態の場合、調整部 90 は、かかる調整を初回のみとせず、増殖サイクルが終了するたびに（キャリブレーション期間 C F ごとに）実行する（図 2）。

【 0 0 9 0 】

したがってこのリアルタイム P C R 装置 1 では、次の増殖サイクルの開始前における各 L E D 3 1 それぞれの状態に応じて、ウェル U L への中途段階にある光量（散乱光量）を一定とすることができる。つまり、各 L E D 3 1 における製造上のばらつきのみならず、当該 L E D 3 1 の経時的変動のばらつきがあっても、各ウェル U L に到達される励起光量を一定とすることができる。この結果、このリアルタイム P C R 装置 1 では、増殖反応の検出精度をより一段と向上することができる。

10

【 0 0 9 1 】

リアルタイム P C R 装置 1 では、温度変化の激しい密閉空間に各 L E D 3 1 が配されるため、各 L E D 3 1 の経時的変動のばらつきは生じ易い。したがって、L E D 3 1 の経時的変動のばらつきがあっても、各ウェル U L に到達される励起光量を一定とすることができるということは特に有用となる。

【 0 0 9 2 】

ところで、現在のキャリブレーション期間 C F において受光素子 L D B で受光される散乱光量と、前回のキャリブレーション期間 C F において受光素子 L D B で受光される散乱光量とに差がある場合（L E D 3 1 に経時的変動があった場合）、該現在のキャリブレーション期間 C F において、ウェル U L に到達される励起光量が一定とされる。このため、次の増殖サイクルにおいて励起光によって励起される蛍光量は、各ウェル U L での核酸量自体を反映したものなる。

20

【 0 0 9 3 】

しかしながら、次の増殖サイクルで得られる蛍光量と、前回の増殖サイクルでの蛍光量との関係では、L E D 3 1 における経時的な差が残ることになる。この実施の形態の場合、調整部 90 は、現在と前回との散乱光量とに差がある場合、その差を有する散乱光量を照射する L E D 3 1 に対応付けられるウェル U L での核酸量を、該差に応じて調整する。

【 0 0 9 4 】

したがってこのリアルタイム P C R 装置 1 では、L E D 3 1 に経時的変動があっても核酸量の換算を均一化でき、この結果、増殖反応の検出精度をより一段と向上することができる。

30

【 0 0 9 5 】

さらにこの実施の形態の場合、受光素子 L D B（図 1）は、複数のウェル U L と、L E D 3 1（光源素子 L S）との間に配される励起光透過基板 15 のうち、該 L E D 3 1 に対向される面に配される。

【 0 0 9 6 】

したがってこのリアルタイム P C R 装置 1 では、励起光透過基板 15 の表面までの段階にある光量（散乱光量）を一定にさえすれば、該励起光透過基板 15 において励起光以外の光が遮断されるため、励起光透過基板 15 からウェル U L までにノイズ光の混在を未然に防ぐことができる。この結果、リアルタイム P C R 装置 1 では、各ウェル U L に到達される励起光量を確実に一定とすることができる。

40

【 0 0 9 7 】

以上の構成によれば、各ウェル U L に到達される励起光量を L E D 3 1 のばらつきにかかわらず一定としたことにより、増殖反応の検出精度を向上し得るリアルタイム P C R 装置 1 を実現できる。

【 0 0 9 8 】

(5) 他の実施の形態

上述の実施の形態では、発光回路 70 として図 6 に示す回路構成が適用された。しかしながら、回路構成はこの実施の形態に限定されるものではなく、種々の回路構成を適用す

50

ることができる。

【0099】

また上述の実施の形態PCR法を適用したがこれ以外の増殖反応法を適用することができる。例えば、dsDNAからRNAを得るIVT(In Vitro Transcription)法、逆転写酵素のRNase活性を用いてRNAをトリミングしてRNAを得るTRC(Transcription Reverse transcription Concerted amplification)法、RNAポリメラーゼを用いてRNAプロモーターが組み込まれたdsDNAからRNAを得るNASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法、RNAとDNAのキメラ構造からなるプライマーを利用し、RNAからssDNAを得るSPIA法、DNAのループ形成を利用し、一定の温度でDNAをRNAからdsDNAを得るLAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法、複数の酵素を組み合わせで一塩基多型(SNP(Single Nucleotide Polymorphism))を識別しながらdsDNAを得るSMAPI(SMART Amplification Process)法、DNAとRNAが結合したキメラプライマーを用いてdsDNAを得るICAN法(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification)法などが挙げられる。

10

【0100】

また上述の実施の形態では、リアルタイムPCR装置1として、いわゆる透過型のものが適用された。しかしながら、これに代えて、例えば、図1との対応部分に同一符号を付した図8に示すように、いわゆる反射型のリアルタイムPCR装置100を適用するようにしてもよい。

20

【0101】

このリアルタイムPCR装置100における反応基板111には、側壁の底面がR状に形成された複数のウェルULが形成され、これらウェルULに対応させて受光素子LDAが一面に配される。各光源素子LSから照射される励起光は、励起光透過基板15を介して反応基板111に形成される対応するウェルULに導光される。各ウェルULでは、励起光によって励起される蛍光物の蛍光はウェルULの壁面で反射し、反応基板111の一面に受光素子LDAに入射する。

【0102】

このような反射型のリアルタイムPCR装置100を適用した場合であっても、上述の実施の形態と同様の効果を得ることができる。

30

【0103】

なお、リアルタイムPCR装置1又は100の構成要素は図示した場合に限らず、適宜設計変更することができる。

【産業上の利用可能性】

【0104】

本発明は、遺伝子解析、遺伝子診断又は医薬の創製などのバイオ産業上において利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】リアルタイムPCR装置の概略構造を示す断面図である。

40

【図2】キャリブレーション期間の説明に供する略線図である。

【図3】発熱基板の構成を示す概略図である。

【図4】発熱回路及び温度センシング回路の構成を示す図である。

【図5】発光基板の構成を示す概略図である。

【図6】発光回路の構成を示す図である。

【図7】調整処理手順を示すフローチャートである。

【図8】他の実施の形態によるリアルタイムPCR装置の概略構造を示す断面図である。

【符号の説明】

【0106】

1, 100 ... リアルタイムPCR装置、11, 111 ... 反応基板、12 ... 発熱基

50

板、13 …… 発熱補助基板、14 …… 発光基板、15 …… 励起光透過基板、16 …… 蛍光透過基板、30 …… 発熱回路、40 …… 温度センシング回路、50, 80 …… 走査駆動部、60 …… 温度制御部、70 …… 発光回路、71 …… LED、72 …… コンデンサ、90 …… 調整部、T10, T11 …… トランジスタ、VDD …… 電源電圧。

【 図 1 】

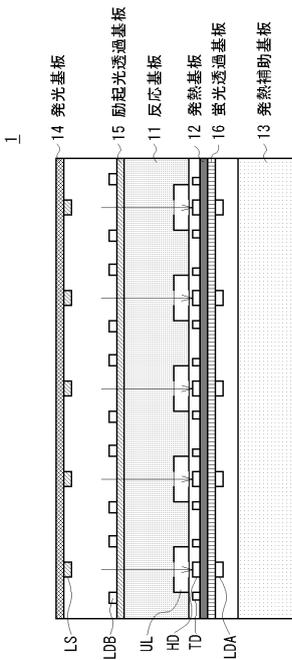


図 1 リアルタイムPCR装置の概略構造

【 図 2 】

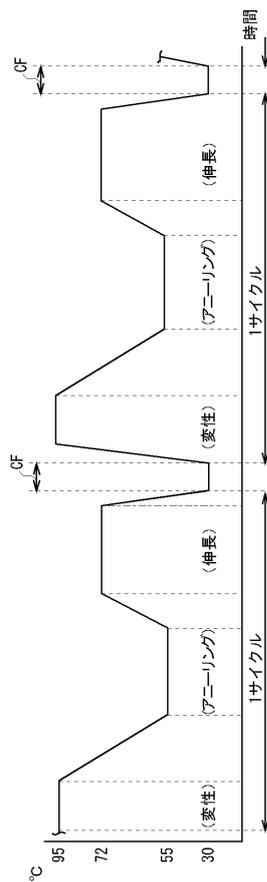


図 2 キャリブレーション期間

【 図 3 】

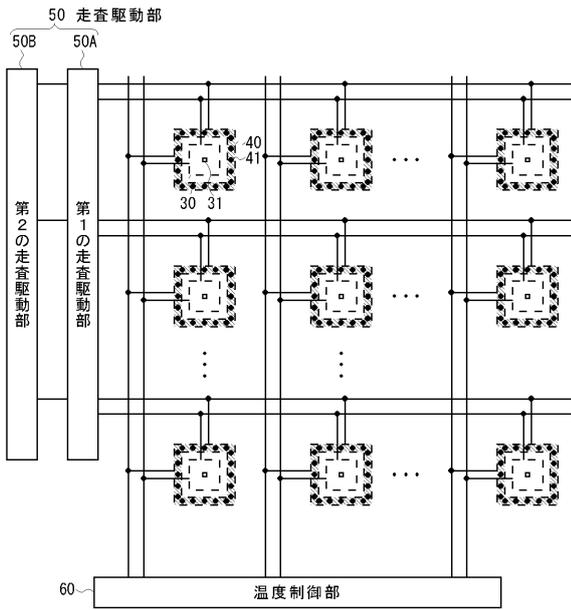


図3 発熱基板の構成

【 図 4 】

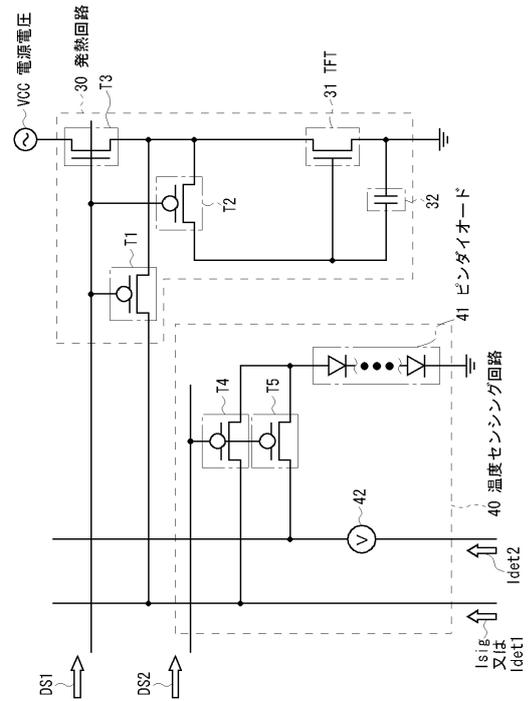


図4 発熱回路及び温度センシング回路の構成

【 図 5 】

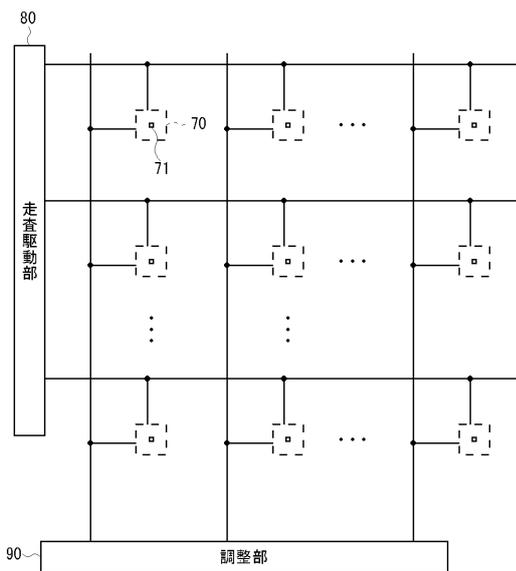


図5 発光基板の構成

【 図 6 】

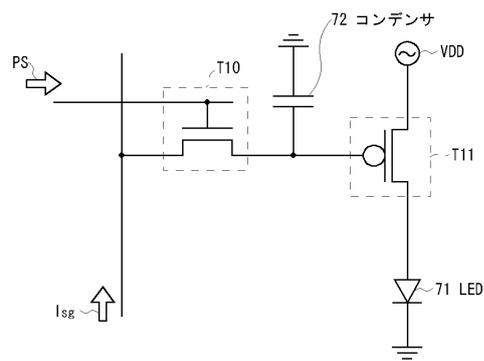


図6 発光回路の構成

【 図 7 】

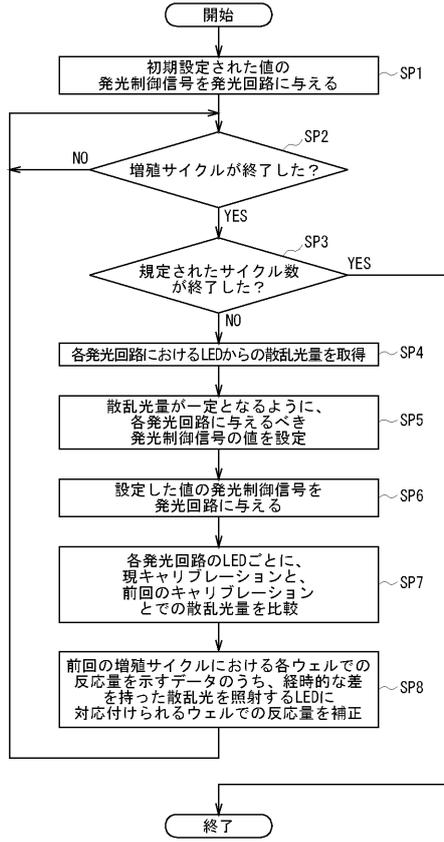


図 7 調整処理手順

【 図 8 】

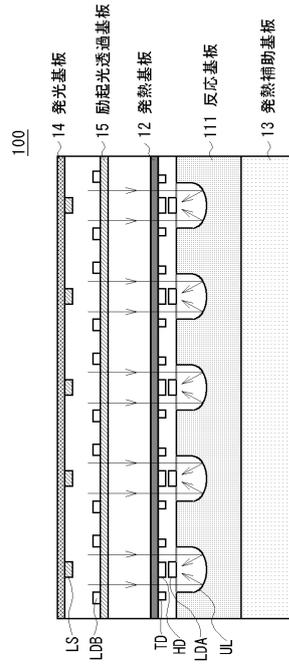


図 8 他の実施の形態によるリアルタイムPCR装置の構成