



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101302473 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 16

(21) 申请号 200810096187. 4

审查员 王翔宇

(22) 申请日 2008. 05. 09

(30) 优先权数据

2007-126344 2007. 05. 11 JP

(73) 专利权人 索尼株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 森胁俊贵 世取山翼 濑川雄司

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
11240

代理人 余刚 吴孟秋

(51) Int. Cl.

C12M 1/34 (2006. 01)

C12M 1/38 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1687391 A, 2005. 10. 26, 全文.

US 20060073491 A1, 2006. 04. 06,

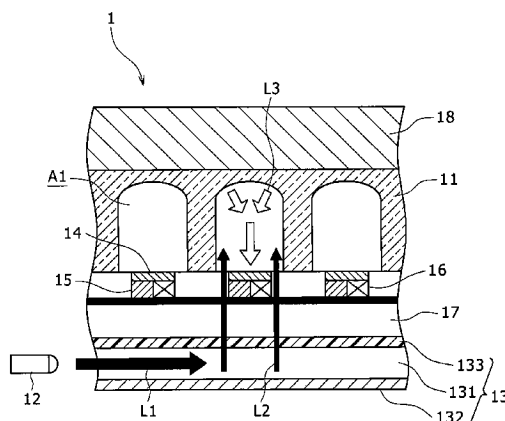
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

实时 PCR 系统

(57) 摘要

一种用于检测基因表达水平的实时 PCR 系统包括:多个反应区域;分别对应于反应区域布置并具有热源的多个加热部;光学单元,能够使特定波长的激发光照射到所有的多个反应区域上;以及分别对应于反应区域布置的多个荧光检测部。每个加热部均设置有温度检测器和控制器,其中,温度检测器用于检测对应热源附近的温度并将温度转换为电信号,以及控制器用于基于在电信号和预先存储的热源的热量值之间的相互关系来控制来自对应热源的热剂量。



1. 一种用于检测基因表达水平的实时聚合酶链反应系统,包括:
多个反应区域;

分别对应于所述反应区域布置并具有热源的多个加热部;

光学单元,能够使特定波长的激发光照射到所有的所述多个反应区域上;以及
分别对应于所述反应区域布置的多个荧光检测部,

其中,每个所述加热部均设置有温度检测器和控制器,所述温度检测器用于检测所述对应热源附近的温度并将所述温度转换为电信号,以及,所述控制器用于基于预先存储的所述电信号和所述热源的热量值之间的相互关系来控制来自所述对应热源的热剂量,所述相互关系存储为对应表格,并且

其中,所述温度检测器包括电致发光器件作为检测介质,用于控制来自所述热源的所述热剂量的所述控制器包括薄膜晶体管作为控制介质,并且,所述电致发光器件和所述薄膜晶体管被布置在同一像素电路中。

2. 根据权利要求1所述的实时聚合酶链反应系统,其中,所述温度检测器包括薄膜晶体管作为检测介质。

3. 根据权利要求1所述的实时聚合酶链反应系统,其中,用于控制来自所述热源的热剂量的所述控制器设置有温度控制电路,并且,所述温度检测器包括布置在所述温度控制电路中的检测介质。

4. 根据权利要求1所述的实时聚合酶链反应系统,其中,每个所述加热区域均还设置有能够进行恒温控制的珀耳帖元件。

实时 PCR 系统

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本发明包含于 2007 年 5 月 11 日向日本专利局提交的日本专利申请 JP 2007-126344 的主题,其全部内容结合于此作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种实时 PCR 系统。更具体地,本发明涉及用于分析基因表达等的实时 PCR 系统。

背景技术

[0004] 近年来,由 DNA 芯片和 DNA 微阵列引起的杂交检测技术已发现越来越多的实际应用。DNA 芯片包括广泛多种集成地固定在基板表面上的 DNA 探针。通过利用该 DNA 芯片来检测在 DNA 芯片中的基板表面上的杂交,可以综合地分析细胞、组织等中的基因表达。

[0005] 现在,这已成为用于定量分析大分子核酸的标准方法,以通过 PCR(聚合酶链反应)来验证通过这种微阵列获取的数据。

[0006] 实时 PCR 能够通过连续地执行“热变性→利用引物(primer)进行退火→聚合物延伸反应”的扩增循环(amplification cycle)使 DNA 等扩增到几十万倍。实时 PCR 实时监控所得到的 PCR 扩增产品以执行大分子核酸的定量分析。

[0007] 根据实时 PCR,可以使用结合在一起作为整体单元的热循环器和荧光光谱仪来监控 PCR 扩增产品。作为这种系统,存在实时 PCR 系统。

[0008] 实时 PCR 系统是反应和处理系统,当在样品中进行扩增反应时,反应和处理系统照射激发光并实时地检测荧光信号。反应和处理系统可以被作用以进行在医疗实践中的基因组 DNA 观察和基因分析研究(包括化学反应)的检测系统等。

[0009] 当利用荧光染料进行标记,以例如,按照扩增 DNA 的 PCR 方法指定要合成的感兴趣的双链 DNA 时,双链 DNA 的加热可以观察从荧光染料发出的荧光的强度变化。

[0010] 当可以利用高特异性引物来仅扩增感兴趣的目标 DNA 时,例如,可以使用利用了“SYBR(™)GREEN I”(分子探针公司的产品)的嵌入。

[0011] 用于当结合双链 DNA 时发出荧光的嵌入剂结合通过 PCR 反应合成的双链 DNA,并且当照射激发光时发出荧光。通过检测该荧光的强度,可以监控扩增产品的量。因此,嵌入并不需要设计和合成目标 DNA 所特有的荧光标记探针,并且能够容易地用于分析各种目标 DNA。

[0012] 此外,当需要单独地检测彼此非常接近的序列时或者当如在 SNP 分型一样需要多重检测时使用探针方法。作为探针方法的一个实例,存在“TAQMAN(™)探针”方法(Applied Biosystems, Inc. 的产品),其将利用荧光材料在 5' 端处以及利用猝光剂材料(quencher material)在 3' 端改变的低核苷酸用作探针。

[0013] 具体地,“TaqMan(™)探针”在退火步骤中与模板 DNA 杂交。然而,由于探针上存在猝光剂,所以即使照射激发光,仍抑制了荧光的发出。在扩增反应步骤中,通过 TaqDNA 聚

合酶的 5' → 3' 核酸外切酶活性,使在模板上杂交的“TAQMAN 探针”分解,使荧光染料从探针中释放出来,消除通过猝光剂产生的抑制,因此,发出荧光。通过测量该荧光的强度,可以监控所得到的扩增产品量。

[0014] 在下文中,将描述以上述方式通过实时 PCR 来定量分析基因表达水平或丰度的定量化验的原理。首先,使用其浓度已知的逐级稀释的标准样品作为模板来执行 PCR。然后,确定每个某一恒定量的扩增产品所需的循环数量(阈值循环:Ct 值)。然后,通过分别沿着横坐标和纵坐标描绘这些 Ct 值和最初的 DNA 量来制备校准线。

[0015] 对于其浓度已知的样品,在相同的条件下还进行了 PCR 反应来确定 Ct 值。根据该 Ct 值和上述的校准线,能够确定样品中目标 DNA 的量。

[0016] 作为与上述实时 PCR 有关的技术,在第 2003-298068 号和第 2004-025426 号日本专利审查中公开了关于温度控制等技术。

发明内容

[0017] 这种 PCR 系统的特征在于在检测基因表达水平时极好的定量性能。然而,它们伴随有不能同时一起分析许多样品的问题,因此,综合分析是不可行的。现在通过可以商业获得的热循环器等进行的温度控制要依赖于梯度系统,从而不能单独以温度控制样品。因此,存在不能控制各个样品的扩增水平以使其彼此相等以及副产品可能出现的问题。

[0018] 因此,本发明的主要目的是提供一种实时 PCR 系统,其能够执行综合分析并能够实现每个反应区域高精度地进行温度控制。

[0019] 因此,在本发明的一个实施例中,提供了一种用于检测基因表达水平的实时 PCR 系统,包括:多个反应区域;分别对应于反应区域布置并具有热源的一个或多个加热部;光学单元,能够使特定波长的激发光照射到所有的多个反应区域上;以及分别对应于反应区域布置的一个或多个荧光检测部,其中,每个加热部均设置有温度检测器和控制器,该温度检测器用于检测对应热源附近的温度并将温度转换为电信号,以及该控制器用于基于预先存储的电信号和热源的热量值之间的相互关系来控制来自对应热源的热剂量。由于对各个反应区域布置了加热部,以及由于检测了各个加热部中的热源附近的温度、将温度转换为电信号、预先存储的电信号和热源的热量值之间的相互关系并反馈与热处理的相关性,可以高精度地控制加热。

[0020] 每个加热部的温度检测器可以使用薄膜晶体管(TFT:薄膜晶体管)或 EL(电致发光)器件作为检测介质。

[0021] 用于控制来自每个热源的热剂量的控制器可以设置有温度控制电路,以及温度检测器可以包括布置在温度控制电路中的检测介质。该实施例可以进一步将实时 PCR 系统小型化为一个装置以及系统地控制温度的检测和热源的控制。

[0022] 温度检测器可以包括 EL 器件作为检测介质,用于控制来自热源的热剂量的控制器可以包括薄膜晶体管作为控制介质,并且 EL 器件和薄膜晶体管可以被布置在同一像素电路中。如上所述,通过将温度检测介质和热控介质布置在同一像素内,可以进一步将实时 PCR 系统小型化为一个装置。

[0023] 每个加热部还可以设置有能够进行恒温控制的珀耳帖元件。珀耳帖元件可以执行对应加热部的恒温控制,从而能够更精确地控制对应的反应区域中的反应。

[0024] 根据本发明的实时 PCR 系统,能够高精度地控制基因表达水平。

附图说明

[0025] 图 1 是在侧立面的横截面上示出的根据本发明的实时 PCR 系统的第一实施例的不完整概念图;

[0026] 图 2 是第一实施例的一个实例的不完整概念电路图,其中,每个加热部都设置有其特有的温度检测系统和热源;

[0027] 图 3 是示出了电流值、电压值和温度之间的相互关系的一个实例的示图;

[0028] 图 4 是示出了控制温度值和温度之间的相互关系的一个实例的示图;

[0029] 图 5 是示出了每个加热部的温度检测系统的电路的一个实例的电路图;

[0030] 图 6 是示出了加热部的温度检测系统的电路的另一个实例的电路图;

[0031] 图 7 是通过对应于各个反应区域以矩阵形式排列的加热部的实例示出的概念图;以及

[0032] 图 8 是在侧立面的横截面上示出的根据本发明的实时 PCR 系统的第二实施例的不完整概念图。

具体实施方式

[0033] 在下文中,参考附图来描述根据本发明的实时 PCR 系统的优选实施例。应注意,附图通过实例示出了本发明的优选实施例,并且本发明不应狭窄地由优选实施例解释。

[0034] 首先,参考图 1,下文中将描述根据本发明的实时 PCR 系统的第一实施例。

[0035] 图 1 中的标号 1 标明了根据本发明的实时 PCR 的第一实施例。如所期望的,根据应用目的,视需要可以选择性地确定实时 PCR 系统 1 的大小和层结构。只要实时 PCR 系统 1 能够实现本发明的目的,还可以视需要设计或改进实时 PCR 系统 1 的配置。

[0036] 实时 PCR 系统 1 设置有其中限定有多个反应区域 A1 的井基板 (well substrate) 11、光源 12 和用于引导从光源 12 发出的激发光 L1、L2 的激发光扫描板 13。另外,在测量基板 17 上分别布置滤光片 14、用于检测荧光 L3 的荧光检测器 15 和用于加热反应区域 A1 的加热器 16。

[0037] 在实时 PCR 系统 1 中,通过激发光扫描板 13 引导从光源 12 发出的激发光 L1,然后将其作为激发光 L2 照射到每个反应区域 A1 中。接着,通过对应的荧光检测器 15 检测并测量从反应区域 A1 发出的光 L3。

[0038] 第一实施例的实时 PCR 系统 1 的特征尤其在于,每个反应区域 A1 设置有对应的加热部 16,以及加热部 16 设置有温度检测器和控制器,温度检测器用于检测加热部 16 的热源附近的温度并将该温度转换为电信号,控制器用于基于预先存储的电信号和热源的热量值之间的相互关系来控制来自热源的热剂量。因此,实时 PCR 系统 1 能够控制单独地且高精度地控制各个反应区域 A1 的温度。应注意,可以通过测量例如每个热源的热量值来估计每个热源的热量值。在下文中将详细描述实时 PCR 系统的各个元件。

[0039] 井基板 11 设置有多个反应区域 (井) A1。在这些区域 A1 中将分别进行预定反应。例如,可以用低荧光塑性材料或玻璃材料形成井基板 11,并且可以矩阵形式排列与人的基因组数一样多的反应区域 A1。

[0040] 在本发明中,用于 PCR 反应的反应区域(井)可以期望地成微腔的形式。例如,当使每个井形成 $300\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m}$ (容量:约 30nL) 的尺寸以及这种井被排列了约 40,000 个井时,所得到的器件具有约 6cm^2 的面积。

[0041] 没有对每个反应区域 A1 的形状加以特定限制,并且每个反应区域 A1 在其能够保留反应混合物的范围内可以是任何形状。在考虑通过其使激发光 L1、L2 导入并照射的光径的同时,可以选择期望的适当形状,该光径用于检测荧光 L3 等。由于实时 PCR 系统 1 需要使荧光 L3 在每个反应区域 A1 中反射,所以每个反应区域 A1 都设置有曲面区域。

[0042] 为了抑制由于光散射和外部光的影响而导致的检测灵敏度的降低,期望地,可以用遮光材料(例如,类金刚石碳等)来涂覆反应区域 A1。

[0043] 该第一实施例使用了光源 12 和激发光扫描板 13 作为能够使特定波长的激发光照射到所有反应区域 A1 中的光学装置,该激发光扫描板 13 将激发光 L1 导入到多个反应区域 A1 中的每一个中。

[0044] 只要可以发出特定波长的光的范围,就不对光源 12 的类型加以特定限制。优选地,可以使用白色或单色发光二极管(LED)。这种发光二极管的使用使得可以轻易地获得不包括不必要的紫外线或红外线的光。

[0045] 不对光源 12 的安装位置或这种光源的数量加以特定限制。虽然在图中未示出,但是可以采用对应于各个反应区域 A1 布置多个光源以使来自各个光源的激发光可以直接照射向其对应的反应区域 A1 的这种结构。这种结构可以通过每个反应区域的对应光源直接照射每个反应区域,从而能够照射更大量的激发光,此外,能够单独地控制激发光 L1、L2 的量。因此,可以相等的级别使激发光 L1、L2 照射到各个反应区域 A1 中。

[0046] 激发光扫描板 13 用于使已从光源 12 发出的激光 L1 导向井基板 11 中的每个反应区域 A1。从光源 12 发出的激发光 L1 被导入到形成在激发光扫描板 13 内的隔离片(spacer) 131 中。反射膜 132 被布置在激发光扫描板 13 的下部中,从而能够将激发光 L2 导向井基板 11。因此,能够通过等量的激发光来激发每个反应区域 A1 内的反应混合物中的探针上的荧光材料。不对反射膜 132 的材料加以特定限制。然而,期望地,可以使用分色镜。

[0047] 在该第一实施例中,仅使激发光 L1、L2 的波长的光透射的滤光片 133 可以期望地被布置在激光扫描板 13 的上部中。滤光片 133 可以有效地从由光源 12 发出的光中提取出激发光 L2 并将激发光导入到各个反应区域中,例如,可以将偏振滤光片等用作该滤光片 133。

[0048] 使反应混合物中的探针上的荧光材料曝光给照射到每个反应区域 A1 中的激发光 L2,因此,产生了荧光 L3。该荧光 L3 在反应区域 A1 内的围壁处被反射,并在布置在反应区域 A1 下的荧光检测器 15 处被检测和测量。

[0049] 在该第一实施例中,优选地,也可以将滤光片 14 布置在每个反应区域 A1 和其对应的荧光检测器之间以提取特定波长的光。只要能够提取特定波长的光(荧光 L3),就不对滤光片 14 的材料加以特定限制。例如,可以使用分色镜。

[0050] 响应于照射到对应区域 A1 中的激发光 L2,每个荧光检测器 15 检测并测量由于激发所嵌入的探针上的荧光材料而发出的荧光。

[0051] 在实时 PCR 系统 1 中,反应区域 A1 分别设置有加热部 16。每个加热部 16 设置有执行对应的反应区域 A1 的温度控制的温度控制系统。例如,当执行 PCR 循环时,对于每个

循环中的“热变性→退火→延伸反应”步骤,温度控制系统可以高精度地影响温度控制。

[0052] 在下文中,将描述用于每个加热部 16 的温度检测器和用于来自其热源的热剂量的控制器。

[0053] 在该第一实施例中,每个温度检测器被布置在其对应的加热部 16 的热源附近。由于可以分别检测各个热源附近的温度,所以可以检测到各个反应区域 A1 中的微小温度变化。对于该检测,可以使用将每个检测到的温度转换为电信号的方法。

[0054] 在第一实施例中,预先存储了电信号和热源的热量值之间的相互关系,并且利用该相互关系来控制来自每个热源的热剂量。因此,可以基于通过温度检测器检测到的温度信息来控制来自每个热源的热剂量。

[0055] 作为用于控制来自每个加热部 16 的热源的热剂量的方法,例如,可以使用以下方法,使由在每个热源处的热控 / 生成电流产生的热量值和预先设定的指标温度之间的相互关系经过实时反馈控制。

[0056] 接着参考图 2,更详细地描述加热部 16。在图 2 中,温度检测系统和热源对应于每个反应区域 A1 而排列。检测到的温度信息(热源附近的温度)被输出至 ADC(模数转换器)。基于该信息,然后在对应于反应区域 A1 布置的 CPU 处执行计算。因此,关于反应区域 A1 的足够热剂量的信息被传送至对应的热源。

[0057] 在该第一实施例中用于每个加热部 16 的温度检测器具有检测对应的热源附近的温度并将其转换为电信号(电流值或电压值)的温度检测器。作为用作在上述温度控制中的温度检测器的检测介质的器件,可以提及具有二极管特性等的器件。这种器件(例如,薄膜晶体管、EL 器件等)配备有具有如图 3 所示的在电信号(电流值或电压值)和温度之间的相互关系的特性。

[0058] 配备有二极管特性的薄膜晶体管、EL 器件等具有以恒定电压施加的电流值或以恒定电流的驱动电压随温度变化的特性。例如,当施加了恒定电压 V1 时,在实际温度为 30℃ 时检测到所施加的电流值 I1,在实际温度为 45℃ 时检测到所施加的电流值 I2,以及在实际温度为 60℃ 时检测到所施加的电流值 I3(参见图 3)。当在控制电流恒定的同时同样测量驱动电压时,能够检测电压值以使其随实际温度而变化。

[0059] 作为用于布置在每个热源附近的温度检测器的检测介质,可以使用配备有二极管特性的器件。优选地,可以使用薄膜晶体管、EL 器件等。

[0060] 没有对薄膜晶体管的类型加以特定限制。例如,可以视需要使用多晶硅、 α -硅等薄膜晶体管。

[0061] EL 器件配备有在恒定电流处的驱动电压或在恒定电压处所施加的电流值随着温度而变化的特性。通过利用这些特性,EL 器件能够检测作为电信号的上述温度信息。

[0062] 在漏极(D)-源极(S)电流值(I_{ds})和加热温度之间,存在如图 4 所示的某一特定的相互关系。通过将该相互关系存储作为对应表格等存储到对应的控制介质中,可以对控制电流等进行控制。因此,可以高精度地控制来自每个热源的热剂量。此外,可以设定控制电流等以校正热剂量。

[0063] 该第一实施例可以设置有助于基于预先获得的电信号和由对应的热源产生的热量值之间的相互关系来校正每个加热部 16 的热剂量的装置。当例如基于对应于通过温度检测系统检测到的温度而产生的物理值来校正热剂量时,基于电信号和温度之间的预存储

的对应表格（相互关系）来控制控制电流。因此，能够获得高精确性的温度控制循环系统。

[0064] 参考图 5，在下文中，将描述每个加热部 16 的温度检测系统的一个实例。温度检测系统由部分 S 和部分 T 组成。部分 S 执行热源附近的温度的检测，而部分 T 构成电压电平控制电路。负载电阻串联连接至 EL 器件，该 EL 器件执行电流值 / 电压值偏移的检测（电信号的变化量的检测）以检测温度。

[0065] 另外，使用了向其栅极 G 施加有恒定电压的薄膜晶体管（源极：S）。通过该结构，在 EL 器件的阴极和薄膜晶体管的源极之间施加了非常高的电压。

[0066] 电阻器 R1 连接至 EL 器件和负载电阻之间的连接触点。在 EL 器件处检测到的电压被施加至差分放大器（AMP）的非转换输入端（+）。电阻器 R2 连接至差分放大器（AMP）的转换输入端（-），以及电阻器 R3 被布置在差分放大器（AMP）的非转换输入端（+）和输出端之间。因此，在 EL 器件处检测到的电压被放大了预定增益并被输出。

[0067] 接着，参考图 6，将描述每个加热部 16 的温度检测系统的另一个实例。例如，如图 6 所示的像素电路，可以简化图 5 所示的上述温度检测系统。具体地，图 6 示出了以下结构，作为部分 T（电压电平控制电路，参见图 5）的替代，基于经由模数转换器（ADC）存储在 ROM 中的线性数据（例如，增益）来检测温差。然后，将该温差检测数据输出至数模转换器（DAC）。该方法可以使用预先存储在 ROM 中的线性数据，因此，可以使用更加精确的温差检测数据。

[0068] 在该第一实施例中，也可以通过每个反应区域 A1 对应的加热部 16 来单独控制每个反应区域 A1 的加热时间。因此，通过单独地控制从一个反应区域到另一个的加热温度和加热时间，可以高精度地且单独地控制各个反应区域 A1 中的扩增反应等。

[0069] 如图 7 所示，可以基于各个反应区域以矩阵形式排列加热部 16。

[0070] 具体地，可以对应于反应区域 A1 布置加热部 16，以沿着栅极线（X- 方向）和数据线（Y- 方向）以矩阵形式排列加热部 16。可以系统地控制各个加热部 16 的热源附近的温度检测和来自各个热源的热剂量的控制（热控）。

[0071] 因此，期望将在各个温度检测器中采用的检测介质布置在用于控制来自对应热源的热剂量的电路中。这种结构的采用能够使装置小型化。因此，虽然实时 PCR 系统是小型装置，但是可以高效地执行综合分析。此外，上述结构可以省略通常另外需要的烦杂制造步骤。

[0072] 更期望地，用于每个热源附近的温度检测器的检测介质可以是 EL 器件，可以通过薄膜晶体管执行每个加热部 16 的热量值的控制（热控），以及可以将 EL 器件和薄膜晶体管布置在同一像素电路中。

[0073] 优选地，使 EL 器件和薄膜晶体管结合在同一像素电路中，这是因为可以系统地控制温度检测和热控并且可以节省空间。

[0074] 用于各个温度检测器的检测介质和用于控制来自个热源的热剂量的检测介质可以形成前检测介质和后检测介质之间插入有保护层的堆叠结构。由于该堆叠结构能够进一步节省空间，所以实时 PCR 系统可以被制造成更小装置。

[0075] 尽管图中未示出，但是用于每个荧光检测器 15 的荧光检测器的像素电路和用于控制来自对应热源的热剂量的控制介质的像素电路可以被布置在同一像素中，作为同一像素的内部构造，温度控制器和荧光检测器可以被形成为在它们之间插入有保护层的堆叠结构。

[0076] 因此,可以在同一像素层中执行热控和荧光检测,此外,可以更容易地实现小型化为一个装置。例如,可以将用于各个荧光检测器 15 的薄膜晶体管和 EL 器件的像素电路布置在用于各个加热部 16 的热控薄膜晶体管和 EL 器件的像素电路中。

[0077] 期望地,可以布置珀耳帖元件 18 以执行各个反应区域 A1 的温度控制。PCR 循环需要执行与步骤“热变性→退火(使用引物的杂交)→延伸反应”相对应的温度控制。珀耳帖元件 18 的布置能够进一步有利于恒温控制并能够执行高精度的温度控制。例如,在 PCR 循环内,在每个反应区域 A1 中的温度可以预先维持在最低温度(例如,55℃)。

[0078] 具有了根据本发明的第一实施例的实时 PCR 系统 1,可以执行通常采用的 PCR 方法。具体地,在使用(1)将要扩增的目标 DNA、(2)至少两类能够特别地与目标 DNA 结合的低核苷酸引物、(3)缓冲剂、(4)酶、和(5)诸如 dATP、dCTP、dGTP 或 dTTP 的脱氧核苷酸三磷酸盐的同时,可以通过重复“热变性→退火(使用引物的杂交)→延伸反应”的循环来将目标 DNA 扩增到所期望的量。

[0079] 在下文中,将描述利用根据本发明的第一实施例的实时 PCR 系统的测量程序的一个实例。

[0080] 将预先设计的不同 DNA 序列的引物分别装入(charge into)反应区域 A1 中,没有对装入方法加以特定限制。例如,可以依赖利用喷墨等方法。将其中包含有各个引物的溶液分别逐滴地添加到反应区域 A1 中,然后对其进行干燥。

[0081] 接着,通过逆转印方法将从样品中提取的所有 RNA 转印到 cDNA 中,并将该 cDNA 装入各个反应区域 A1 中。另外,还装入了作为扩增所需的各个碱基的原材料的脱氧核苷酸三磷酸盐(dNTP)、嵌入剂(“SYBR(TM)GREEN I”)、DNA 扩展扩增反应所需的酶(DNA 聚合酶等)等。

[0082] 在热变性步骤中,设定加热器 16 以将各个反应区域 A1 的内部温度提高到 95℃,从而使双链 DNA 变性为单链 DNA。在随后的退火步骤中,设置加热器 16 以将各个反应区域的内部温度降低到 55℃,从而引物使单链 DNA 结合与其互补的碱基序列。在下一个 DNA 的扩增步骤中,设定加热器 16 以将各个反应区域的内部温度提高到 72℃,从而将引物作为 DNA 合成的起始点,使聚合酶反应能进行到具有扩增后的 cDNA。

[0083] 在上述“95℃(热变性)→55℃(使用引物的杂交)→72℃(DNA 延伸)”的每个温度循环中,将每个反应区域 A1 中的 cDNA 扩增到 2 倍的量。通过对各个反应区域 A1 布置的加热器 16,可以将各个反应区域 A1 内的温度控制为对引物反应设计的最佳值。由于能够控制取决于引物的杂交时间和聚合酶反应时间,所以也能够控制不必要的反应副产品的形成。因此,可以将各个反应区域 A1 中的基因(cDNA)的扩增率控制为彼此相等,因此,可以执行良好精度的 PCR 反应。

[0084] “SYBR(TM)GREEN I”嵌入有在 DNA 的复制反应期间所形成的 ds-DNA。该“SYBR(TM)GREEN I”是嵌入有 ds-DNA 并且通过随后激发光 L2 的照射使其激发以发出荧光(激发光波长:497nm,发射波长:520nm)的材料。

[0085] 当通过 DNA 聚合酶复制 DNA 时,来自光源 12 的光 L1 因此通过激发光扫描板 13 前进,并且作为激发光 L2,使所嵌入的“SYBR(TM)GREEN I”激发以发出荧光 L3。在每个温度循环内,在荧光检测器 15 处测量由此发出的荧光的强度并测定其数量。基于温度循环与其对应的发射强度之间的相互关系,可以将原始 cDNA 的量确定为基因表达水平。

[0086] 接着参考图 8,在下文中将描述根据本发明的实时 PCR 系统的第二实施例,集中描述与第一实施例的不同之处。关于与第一实施例相同的结构的元件,此处省略了其描述。

[0087] 该实时 PCR 系统 2 与第一实施例的实时 PCR 系统 1 的相同之处在于,反应区域(井)A2 中的每一个均设置有其特有的荧光检测器 22 和加热器 26。然而,实时 PCR 系统 2 与实时 PCR 系统 1 的不同之处在于,激发光 L2 向下照射到井基板 21 中并检测透过每个反应区域 A2 的荧光 L3。

[0088] 在实时 PCR 系统 2 中,通过激发扫描板 25 将从光源 24 发出的激光 L1 导向到每个反应区域 A2 中。在激光扫描板 25 中,激发光 L1 穿过隔离片 251,并且将激发光 L2 通过反射膜 252 和滤光片 253 引入井基板 21 中。

[0089] 激发光 L2 被照射到每个反应区域 A2 中的反应混合物中的探针上的荧光材料等上以产生荧光 L3。通过布置在反应区域 A2 之下的荧光检测器 22 检测并测量荧光 L3。

[0090] 通过布置在反应区域 A2 之下的加热器 26 来实现对每个反应区域 A2 的内部温度的控制,并且可以通过珀耳帖元件 23 对反应区域 A2 进行恒温控制。应注意,标号 28 表示测量基板,滤光片 27、荧光检测器 22 和加热器 26 被布置在测量基板 28 的上侧上,以及珀耳帖元件 23 被布置在测量基板 28 的下侧上。

[0091] 在传统的实时 PCR 系统中,需要从 25 分钟~35 分钟的反应时间来执行约 30 个循环的“热变性→退火→延伸反应”循环。在这些循环的过程中,实现约 2°C/sec 的温度控制。另一方面,根据本发明的实时 PCR 系统可以执行 20°C/sec 以上的温度控制,从而可以使每个循环的时间减少了约 40 秒左右。因此,可以在短到 25 分钟的反应时间内实现全部 30 个循环。

[0092] 由于可以通过设计引物来控制退火时间和延伸反应时间,所以可以将各个反应区域中的扩增率设定为恒定倍增因子(例如,两倍左右)。因此,可以提高基因表达水平的检测精确度。

[0093] 本领域技术人员应了解,根据设计要求和其它因素,可以进行各种修改、组合、子组合和改进,均应包含在本发明的权利要求或等同物的范围内。

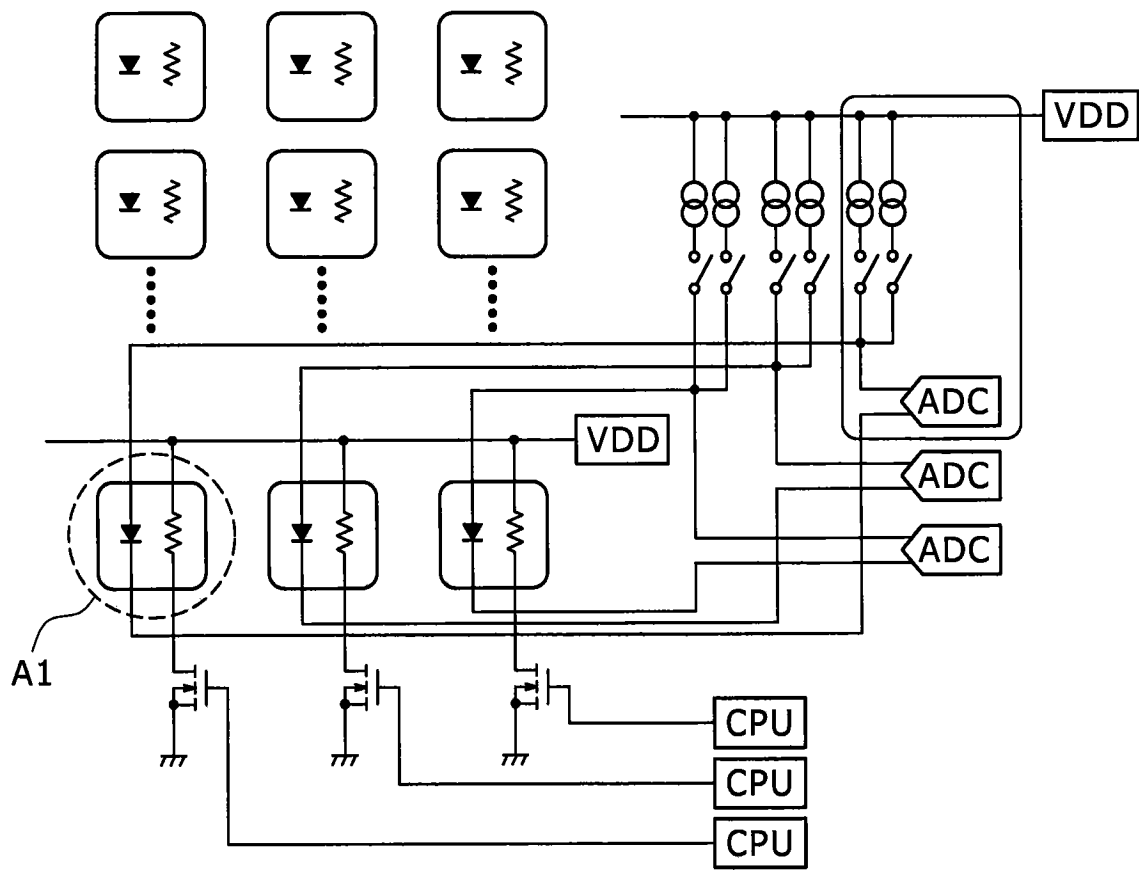


图 2

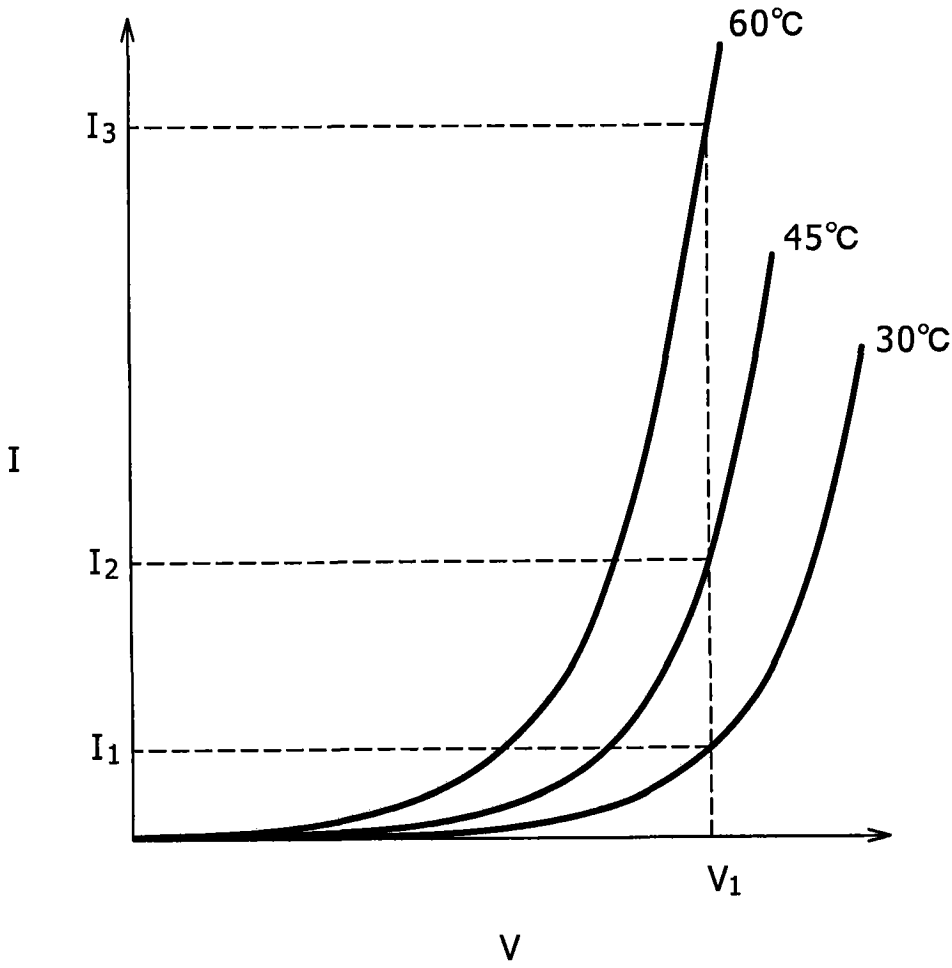


图 3

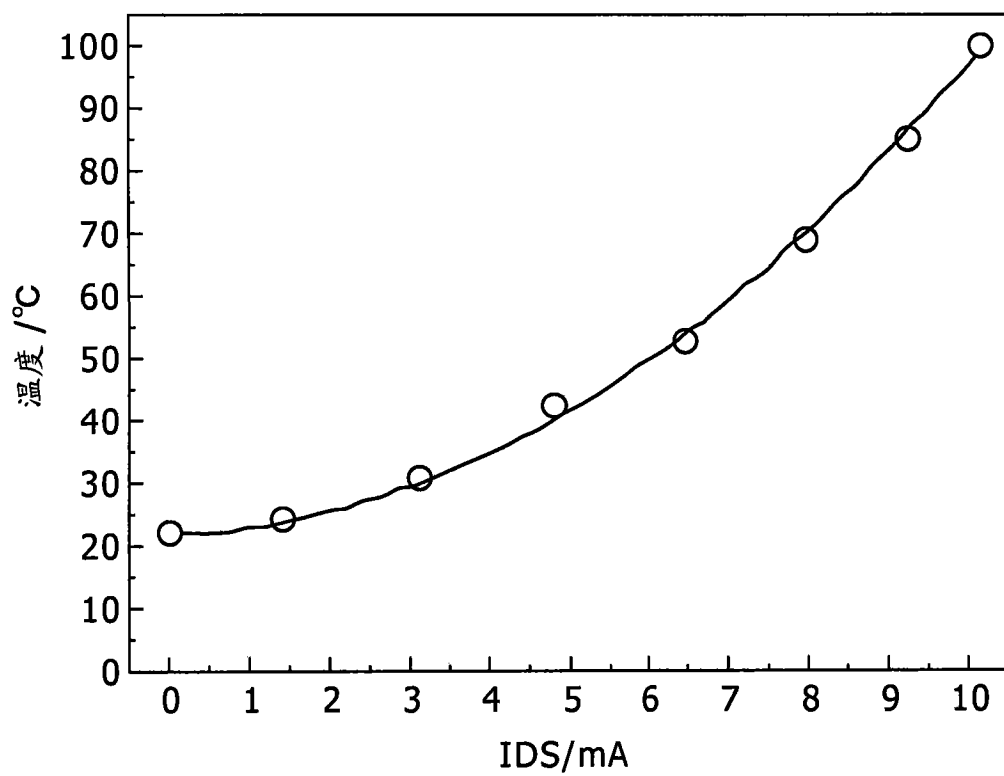


图 4

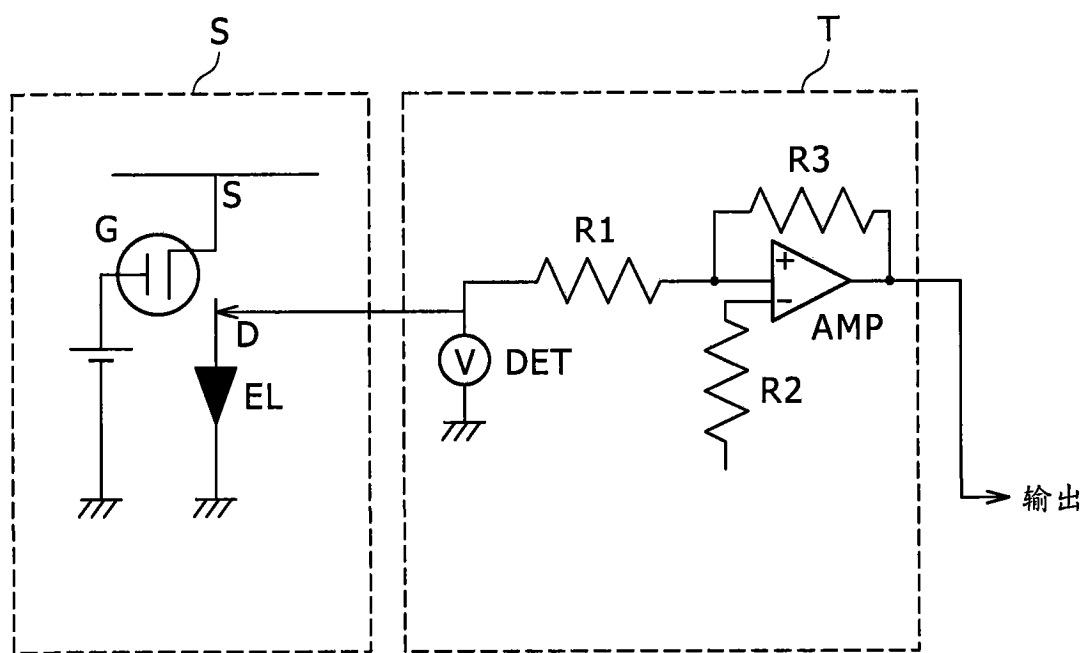


图 5

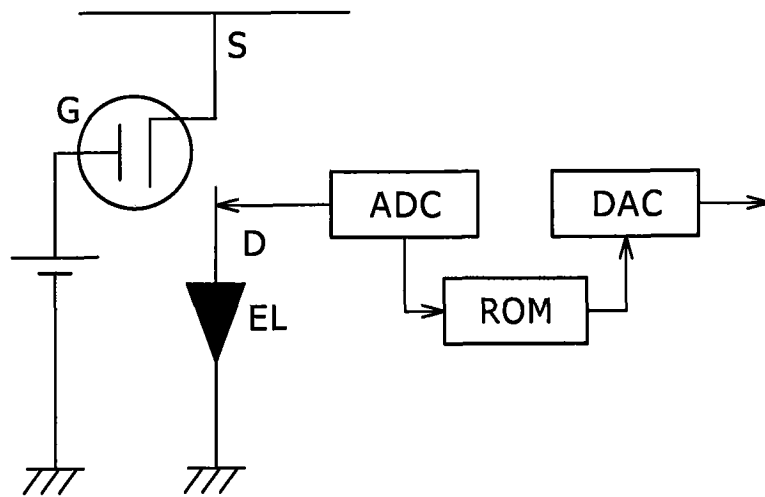


图 6

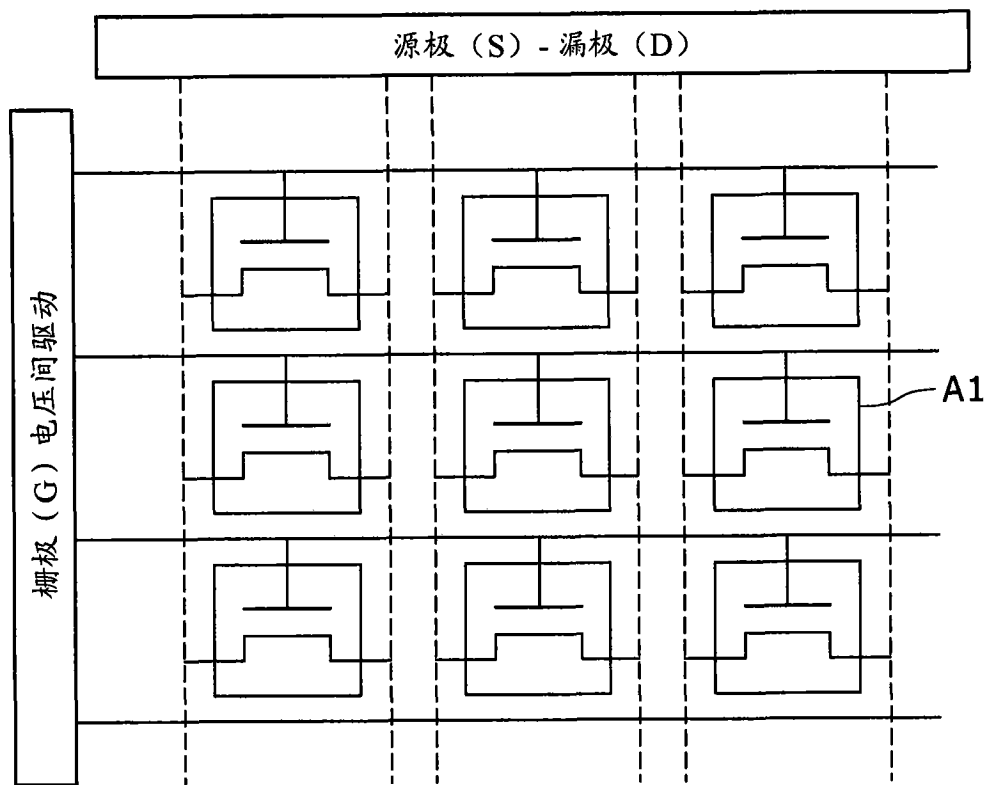


图 7

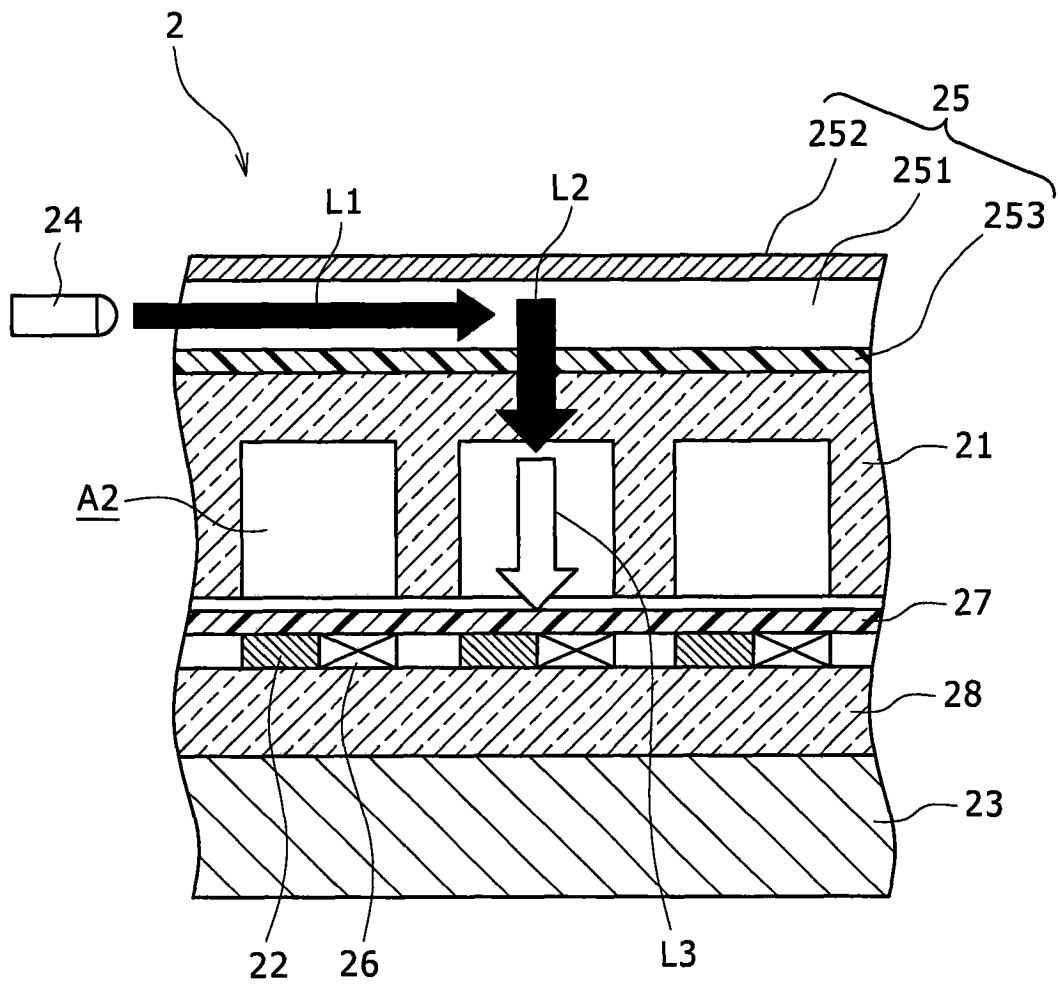


图 8