

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5284468号
(P5284468)

(45) 発行日 平成25年9月11日 (2013.9.11)

(24) 登録日 平成25年6月7日 (2013.6.7)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00

A

C 1 2 M 1/02 (2006.01)

C 1 2 M 1/02

B

C 1 2 M 1/10 (2006.01)

C 1 2 M 1/10

D

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34

Z

C 1 2 M 1/38 (2006.01)

C 1 2 M 1/38

Z

請求項の数 11 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-516122 (P2011-516122)
 (86) (22) 出願日 平成21年6月23日 (2009.6.23)
 (65) 公表番号 特表2011-525373 (P2011-525373A)
 (43) 公表日 平成23年9月22日 (2011.9.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2009/003376
 (87) 国際公開番号 W02009/157695
 (87) 国際公開日 平成21年12月30日 (2009.12.30)
 審査請求日 平成24年3月16日 (2012.3.16)
 (31) 優先権主張番号 10-2008-0059211
 (32) 優先日 平成20年6月23日 (2008.6.23)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2009-0053677
 (32) 優先日 平成21年6月17日 (2009.6.17)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 502235773
 バイオニア コーポレーション
 大韓民国, 306-220 テジョン, テ
 ドクグ, ムンピョンードン, 49-3
 (74) 代理人 100089196
 弁理士 梶 良之
 (74) 代理人 100104226
 弁理士 須原 誠
 (72) 発明者 パク ハンオ
 大韓民国 305-761 テジョン ユ
 ソング ジョンミンドン エクスポエー
 ーティー 208-601

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リアルタイムモニタリング装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中央に中空 1 1 が形成され、各々異なる温度を提供するように断熱層 3 0 により区分されるドーナツ形状の加熱ブロック 1 0 a、1 0 b、及び、試料が流出入され、各々異なる温度が伝達されて反応サイクルが繰り返して遂行されるように、前記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b に前記中空 1 1 を通過して一定の間隔で巻かれるキャピラリー 2 0 を含む重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 と、

励起光を発生させる光源 1 1 0 と、

前記光源 1 1 0 から出射された励起光のうち特定波長領域の励起光を通過させるバンドパスフィルター 1 3 0 と、

前記励起光を集光する第 1 集光レンズ 1 4 0 と、

前記励起光を反射させ、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を通過させるビームスプリッター 1 2 0 と、

第 1 モーター 1 6 0 と結合されて回転され、前記ビームスプリッター 1 2 0 で反射した励起光を前記キャピラリー 2 0 に伝達し、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を前記ビームスプリッター 1 2 0 に反射させる、前記重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 の前記中空 1 1 に配置された反射ミラー 1 5 0 と、

前記反射ミラー 1 5 0 により反射されて前記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を検出する蛍光検出部 1 7 0 と、

を含んでなることを特徴とするリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 2】

中央に中空 1 1 が形成され、各々異なる温度を提供するように断熱層 3 0 により区分されるドーナツ形状の加熱ブロック 1 0 a、1 0 b、及び、試料が流出入され、各々異なる温度が伝達されて反応サイクルが繰り返して遂行されるように、前記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b に前記中空 1 1 を通過して一定の間隔で巻かれるキャピラリー 2 0 を含む重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 と、

励起光を発生させる光源 1 1 0 と、

前記光源 1 1 0 から出射された励起光のうち特定波長領域の励起光を通過させるバンドパスフィルター 1 3 0 と、

前記励起光を集光する第 1 集光レンズ 1 4 0 と、

前記励起光を反射させ、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を通過させるビームスプリッター 1 2 0 と、

第 1 モーター 1 6 0 a と結合されて回転され、前記ビームスプリッター 1 2 0 で反射した励起光を前記キャピラリー 2 0 に伝達し、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を前記ビームスプリッター 1 2 0 に反射させる、前記重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 の前記中空 1 1 に配置された反射ミラー 1 5 0 と、

前記反射ミラーと前記連鎖反応ブロックとの間に位置し、前記反射ミラーで反射した励起光及び前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を集光する第 2 集光レンズ 1 4 1 と、

前記反射ミラー 1 5 0 により反射されて前記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を検出する蛍光検出部 1 7 0 と、

を含んでなることを特徴とするリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 3】

前記キャピラリー 2 0 が巻かれている外側に位置した加熱ブロック 1 0 b の外側と結合されるように前記加熱ブロック 1 0 b を囲む形態を有する付加加熱ブロック 1 3 が追加に形成されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 4】

前記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b の外面に、前記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b と前記キャピラリー 2 0 との接触面積を増加させるためにキャピラリー 2 0 の一部が挿入されるように一定の大きさ及び一定の間隔を有する挿入溝 1 2 が形成されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 5】

前記蛍光検出部 1 7 0 は、前記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を集光させる蛍光集光レンズ 1 7 1 と、集光された蛍光のうち特定波長領域の蛍光を通過させる蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 と、前記蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 を通過した特定波長領域の蛍光を検出する蛍光検出センサー 1 7 3 と、を含んでなることを特徴とする請求項 1 に記載のリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 6】

前記蛍光検出部 1 7 0 には、蛍光波長領域に応じて、蛍光集光レンズ 1 7 1、蛍光バンドパスフィルター 1 7 2、及び蛍光ビームスプリッター 1 7 4 が、各々、一つ以上さらに備えられていることを特徴とする請求項 5 に記載のリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 7】

前記第 1 モーター 1 6 0 は、一定速度で回転する定速回転モーターであることを特徴とする請求項 1 に記載のリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 8】

前記蛍光検出部 1 7 0 は、

前記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を集光させる蛍光集光レンズ 1 7 1 と、

集光された蛍光のうち相異なる複数の特定波長領域の蛍光を通過させる一つ以上の蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 が備えられる蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 と、

10

20

30

40

50

前記蛍光バンドパスフィルター固定部 175 を回転させる第 2 モーター 160 b と、
前記蛍光バンドパスフィルター 172 を通過した特定波長領域の蛍光を検出する蛍光検
出センサー 173 と、
を含んでなることを特徴とする請求項 2 に記載のリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 9】

励起光と蛍光の分離効率を増加させるために、前記光源 110 と第 1 集光レンズ 140
との間、及び蛍光測定部に、偏光子 (polarizer) または偏光フィルム (polarizer film
) 131 を追加的に含むことを特徴とする請求項 2 に記載のリアルタイムモニタリング装
置。

【請求項 10】

前記第 1 及び第 2 モーター 160 a、160 b は、一定速度で回転する定速回転モー
ターであることを特徴とする請求項 8 に記載のリアルタイムモニタリング装置。

【請求項 11】

前記第 1 モーター 160、160 a は、前記重合酵素連鎖反応ブロック 100 の前記中
空 11 と平面視で重なる位置に配置されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の
リアルタイムモニタリング装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置に関し、
試料を相異なる複数の温度に加熱または冷却されるようにして重合酵素連鎖反応を発生さ
せ、これをリアルタイムで検出できるようにする重合酵素連鎖反応ブロックを用いた連続
型リアルタイムモニタリング装置に関する。

【背景技術】

【0002】

重合酵素連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) は、DNA の一定部位を特
異的に繰り返して合成して DNA を増幅させる方法であり、極めて少ない量の DNA から
複製して同じ DNA を大量に生成させる方法である。

【0003】

このような重合酵素連鎖反応を介して、ゲノム DNA のように極めて大きい DNA から
所望の DNA 特定部分のみを選択的に増幅させることもできる。このような重合酵素連鎖
反応は、一般的に、1) DNA の変性 (denaturation)、2) Primer の結合 (anne
aling)、3) DNA の複製 (polymerization、extension) の三段階からなる。

【0004】

最近、リアルタイム重合酵素連鎖反応 (Real-time PCR) が一般に公知となっている。
リアルタイム重合酵素連鎖反応とは、反応の結果物をジェルから電気泳動を介して分離し
ないままで反応チューブ内でサイクル毎に DNA の増幅程度を現れる蛍光の強度を測定し
てリアルタイムで反応の状態をモニタリングできる技術であり、正確な定量が可能で、電
気泳動が必要なくて迅速且つ簡便に分析することができるだけでなく、汚染の危険性が少
ないという長所がある。

【0005】

リアルタイム重合酵素連鎖反応機器は、重合酵素連鎖反応のためのサーマルサイクラー
(thermal cycler) と反応物の蛍光を検出するための蛍光検出器 (fluorometer) とを合
体した機器である。従来のリアルタイム (real-time) 重合酵素連鎖反応機器の構成は、
熱電素子と、試料が入っている反応チューブに熱を伝達するためのサーマルブロック (th
ermal block) と、チューブ内部の試料に励起光を出射するための出射光源部、また、試
料で発生される蛍光を受光するための受光部で構成されている。上記重合酵素連鎖反応リ
アルタイムモニタリング装置の原理は、チューブ内の試料を反応させるために、熱電素子
を用いて冷却及び加熱サイクルを繰り返して実行しながらサイクルが終わる毎に、出射光
源部と受光部を用いて試料に光を照射し、試料から発光する蛍光量を測定して連鎖重合反

10

20

30

40

50

応の進行程度をリアルタイムで現れるようにする。

【 0 0 0 6 】

しかし、今まで一般に知られた重合酵素連鎖反応リアルタイムモニタリング装置は、多数の試料は処理できるが、一定の時間の間隔に応じて試料を連続的に反応させることは不可能であり、装置に初めて装着された試料の反応が完了する前までは反応中に他の試料を反応チューブに装着することは不可能であるという問題点があった。

【 0 0 0 7 】

このような従来技術の問題点を克服するために、多様な形態の連続型重合酵素連鎖反応リアルタイムモニタリング技術が提示されている。

【 0 0 0 8 】

このような連続型重合酵素連鎖反応リアルタイムモニタリング技術の一例としては、毛細管を用いた重合酵素連鎖反応装置である米国登録特許 6, 0 3 3, 8 8 0 号が開示されている。上記装置において、熱伝達ブロックは、4 個の異なる恒温ブロックで構成されており、毛細管に溶液供給装置を用いて試料及び試薬を供給したり除去するようになっている。上記装置を用いて重合酵素連鎖反応を進行するためには熱伝達ブロックを回転させながら毛細管に伝達される温度を変化させることによって、重合酵素連鎖反応を遂行するようになる。このような形態の構成を有する技術の一般的な問題点は、重合酵素連鎖反応のために熱伝達ブロックを回転させなければならず、回転の際、各毛細管が熱伝達ブロックとの接触程度に応じて重合酵素連鎖反応程度の差が発生するおそれがあるため、連鎖反応の再現性が足りなくなるという点である。

【 0 0 0 9 】

また、このような形態の装置を使用する場合、時間間隔において連続的に重合酵素連鎖反応を進行させることは不可能である。また、重合酵素連鎖反応が完了した後にのみ反応の進行程度を測定することができる装置で構成されているため、反応が完了する前には進行程度がわからないという問題点がある。

【 0 0 1 0 】

このような問題点を改善する新しい方式の重合酵素連鎖反応リアルタイムモニタリング装置として、大韓民国特許登録第 5 9 3 2 6 3 号（発明の名称：連続流れ状反応装置）に毛細管と原形の加熱ブロックでなる連続式流れ式重合酵素連鎖反应用温度循環装置が開示されている。

【 0 0 1 1 】

上記装置は、変性（melting）、アニーリング（annealing）、延長（extension）温度区域に分かれている直径 3 0 m m の銅ブロックに長さ 3 . 5 m の毛細管を 3 3 回巻いて製作された。毛細管内部に流れる P C R 反応混合物は、銅でなる加熱ブロックを一回ずつ回転することによって、P C R 反応の各サイクルが遂行される。この方法では、重合酵素連鎖反応試料が流れる毛細管を加熱ブロックに巻き、スキャナーに装着された光照射装置を使用して加熱ブロックに巻かれている毛細管に光線を照射し、毛細管で発生する蛍光量を測定するための手段として蛍光検出器が装着されたスキャン装置を使用して毛細管をスキャンするようになる。

【 0 0 1 2 】

この方法では加熱ブロックに巻かれている毛細管に光を照射するための光照射装置と毛細管で発生する蛍光を測定するためのセンサーとを移動装置（moving stage）に装着してスキャナーを線形に駆動させて、スキャナーの移動に応じて毛細管に光を順次照射し、また、毛細管で発生する蛍光をスキャナーの移動に応じて順次測定するようになる。

【 0 0 1 3 】

上記特許では、特定波長の光線を発生させる照射光源部と蛍光検出センサーが毛細管が巻かれている加熱ブロック上を一定速度に移動しながらスキャンする装置を記載している。このような照射光源部と蛍光検出センサーがスキャナーに装着されたまま、毛細管が巻かれている加熱ブロックの中心軸と平行な軸方向またはこれを横切る軸方向に沿って移動しながら毛細管に光を照射したり蛍光を測定し、上記装置は、スキャンする毎に

10

20

30

40

50

、一回ずつ重合酵素連鎖反応のモニタリングが行われ、スキヤニングする毎に多数の毛細管をスキヤニングするようになる。また、このように照射光源部、蛍光測定部を移動式装置に装着して一定速度に移動させ、毛細管内の試料で発生する蛍光をスキヤニングして連続的に検出するためには必然的にモーター、線形移送手段のようにこれらを移送する移送装置、移送ガイド装置、移送装置に動力を提供する駆動手段などが備えられなければならない。しかし、多数の光学レンズで構成される照射光源部は、対物レンズのような高価のレンズを使用し、光経路の正確なコントロールのために照射光源部及び蛍光測定部の精巧な配置を必要とするため、重合酵素連鎖反応装置の製作費用が大きく増加されるという問題点を引き起こす。併せて、多数のレンズ、移送装置、動力伝達手段、駆動手段などは、上記装置の大きさを大きくするだけでなく、頻繁な故障と誤作動の原因となることができ

10

【 0 0 1 4 】

従って、このようなリアルタイムモニタリング装置の問題点を克服した、経済的且つリアルタイムモニタリング効果が優れる新しい形態の連続的重合酵素連鎖反応リアルタイムモニタリング装置を開発すべき必要性が台頭されてきた。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

本発明の目的は、連続的に重合酵素連鎖反応をリアルタイムモニタリングすることができるモニタリング装置の構造を簡単に提供でき、重合酵素連鎖反応検出を容易にし、検出正確度を向上させることができるようにする重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置を提供することである。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

本発明のリアルタイムモニタリング装置は、中央に中空 1 1 が形成され、各々異なる温度を提供するように断熱層 3 0 により区分されるドーナツ形状の加熱ブロック 1 0 a、1 0 b、及び、試料が流出入され、各々異なる温度が伝達されて反応サイクルが繰り返して遂行されるように、前記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b に前記中空 1 1 を通過して一定の間隔で巻かれるキャピラリー 2 0 を含む重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 と、励起光を発生させる光源 1 1 0 と、前記光源 1 1 0 から出射された励起光のうち特定波長領域の励起光を通過させるバンドパスフィルター 1 3 0 と、前記励起光を集光する第 1 集光レンズ 1 4 0 と、前記励起光を反射させ、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を通過させるビームスプリッター 1 2 0 と、第 1 モーター 1 6 0 と結合されて回転され、前記ビームスプリッター 1 2 0 で反射した励起光を前記キャピラリー 2 0 に伝達し、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を前記ビームスプリッター 1 2 0 に反射させる、前記重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 の前記中空 1 1 に配置された反射ミラー 1 5 0 と、前記反射ミラー 1 5 0 により反射されて前記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を検出する蛍光検出部 1 7 0 と、を含んでなる。

30

別の観点において、本発明のリアルタイムモニタリング装置は、中央に中空 1 1 が形成され、各々異なる温度を提供するように断熱層 3 0 により区分されるドーナツ形状の加熱ブロック 1 0 a、1 0 b、及び、試料が流出入され、各々異なる温度が伝達されて反応サイクルが繰り返して遂行されるように、前記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b に前記中空 1 1 を通過して一定の間隔で巻かれるキャピラリー 2 0 を含む重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 と、励起光を発生させる光源 1 1 0 と、前記光源 1 1 0 から出射された励起光のうち特定波長領域の励起光を通過させるバンドパスフィルター 1 3 0 と、前記励起光を集光する第 1 集光レンズ 1 4 0 と、前記励起光を反射させ、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を通過させるビームスプリッター 1 2 0 と、第 1 モーター 1 6 0 a と結合されて回転され、前記ビームスプリッター 1 2 0 で反射した励起光を前記キャピラリー 2 0 に伝達し、前記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を前記ビームスプリッター 1 2 0 に反射させる、前記重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 の前記中空 1 1 に配置された反射ミ

40

50

ラー１５０と、前記反射ミラーと前記連鎖反応ブロックとの間に位置し、前記反射ミラーで反射した励起光及び前記キャピラリー２０内の試料で発生した蛍光を集光する第２集光レンズ１４１と、前記反射ミラー１５０により反射されて前記ビームスプリッター１２０を通過した蛍光を検出する蛍光検出部１７０と、を含んでなる。

【００１７】

併せて、前記キャピラリー２０が巻かれている外側に位置した加熱ブロック１０ｂの外側と結合されるように前記加熱ブロック１０ｂを囲む形態を有する付加加熱ブロック１３が追加に形成されることを特徴とする。

【００１８】

また、前記加熱ブロック１０ａ、１０ｂの外面に前記加熱ブロック１０ａ、１０ｂと前記キャピラリー２０との接触面積を増加させるためにキャピラリー２０の一部が挿入されるように一定の大き及び一定の間隔を有する挿入溝１２が形成されることを特徴とする。

【００１９】

【００２０】

また、前記蛍光検出部１７０は、前記ビームスプリッター１２０を通過した蛍光を集光させる蛍光集光レンズ１７１と、集光された蛍光のうち特定波長領域の蛍光を通過させる蛍光バンドパスフィルター１７２と、前記蛍光バンドパスフィルター１７２を通過した特定波長領域の蛍光を検出する蛍光検出センサー１７３と、を含んでなることを特徴とする。併せて、前記蛍光検出部１７０は、蛍光波長領域に応じて蛍光集光レンズ１７１、蛍光バンドパスフィルター１７２、及び蛍光ビームスプリッター１７４が、各々、一つ以上さ

【００２１】

【００２２】

また、前記蛍光検出部１７０は、前記ビームスプリッター１２０を通過した蛍光を集光させる蛍光集光レンズ１７１と、集光された蛍光のうち相異なる複数の特定波長領域の蛍光を通過させる一つ以上の蛍光バンドパスフィルター１７２が備えられる蛍光バンドパスフィルター固定部１７５と、前記蛍光バンドパスフィルター固定部１７５を回転させる第２モーター１６０ｂと、前記蛍光バンドパスフィルター１７２を通過した特定波長領域の蛍光を検出する蛍光検出センサー１７３と、を含んでなることを特徴とする。

【００２３】

また、本発明のリアルタイムモニタリング装置は、励起光と蛍光の分離効率を増加させるために、前記光源１１０と第１集光レンズ１４０との間、及び蛍光測定部に偏光子（polarizer）または偏光フィルム（polarizer film）１３１を追加的に含むことを特徴とする。

【００２４】

併せて、本発明のリアルタイムモニタリング装置の前記第１及び第２モーター１６０ａ、１６０ｂは、一定速度で回転する定速回転モーターであることを特徴とする。

前記第１モーター１６０、１６０ａは、前記重合酵素連鎖反応ブロック１００の前記中空１１と平面視で重なる位置に配置されている。

【発明の効果】

【００２５】

本発明は、従来の移動式光源、移動式蛍光測定部、及び多数個の高価の光学レンズ装置が精巧に組み立て配置されたスキャナーを使用することと異なり、固定式光源と固定式蛍光検出部を備えてモニタリング装置の光源、蛍光測定等の移動なしにモーターの回転のみで制御されることによって、固定された位置でリアルタイムモニタリングが行われて試料の増幅検出が容易であり、且つ検出正確度を向上させることができるだけでなく、製作に所要される費用及び努力を節減することができ、故障が少なく、さらにコンパクトなサイズの装置具現が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】本発明による加熱ブロックを示す斜視図である。

【図２】本発明による加熱ブロックを示す断面斜視図である。

【図３】本発明による加熱ブロックのその他の例示の断面図である。

【図４】本発明による重合酵素連鎖反応ブロックを示す斜視図である。

【図５】本発明による重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置の概略的な構造を示す斜視図である。

【図６】本発明による重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置の概略的な構造を示す斜視図である。

【図７】本発明によるその他の形態の重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置の例示を示す図である。

10

【図８】本発明によるその他の形態の重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置の例示を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００２７】

以下、添付図面を参照して本発明の重合酵素連鎖反応ブロック及びこれを用いたリアルタイムモニタリング装置を詳細に説明する。

【００２８】

図１は、本発明による加熱ブロックを示す斜視図であり、図２は、本発明による加熱ブロックを示す断面斜視図であり、図３は、本発明による加熱ブロックのその他の例示の断面図であり、図４は、本発明による重合酵素連鎖反応ブロックを示す斜視図である。

20

【００２９】

図示されているように、本発明の重合酵素連鎖反応ブロック１００は、中央に中空１１が形成され、各々異なる温度を提供するように断熱層３０により区分されるドーナツ形状の加熱ブロック１０ａ、１０ｂと、試料が流出入され、各々異なる温度が伝達されて反応サイクルが繰り返して遂行されるように上記加熱ブロック１０ａ、１０ｂに上記中空１１を通過して一定の間隔で巻かれるキャピラリー２０と、を含んでなる。

【００３０】

一般的な重合酵素連鎖反応（polymerase chain reaction；PCR）は、９４ の変性（denaturation）、４５～６７ の結合（annealing）、７２ の複製（polymerization、extension）の三段階になっているが、複製段階を省略しても重合酵素連鎖反応には支障がないため、リアルタイムPCR（real-time PCR）では時間短縮のために複製段階の反応時間をなくす傾向がある。本発明における図面では二つの区画の加熱ブロック１０ａ、１０ｂを示したが、さらに追加しても関係ない。

30

【００３１】

このとき、上記断熱層３０により上記加熱ブロックの区画１０ａ、１０ｂ間の温度干渉を抑制して温度調節がさらに容易になる。上記断熱層３０は、加熱ブロック区画１０ａ、１０ｂ間に相異なる複数の温度の維持が容易になるように熱伝導性が非常に低い物質により製造される。

【００３２】

本発明の図面において、加熱ブロック１０ａ、１０ｂの形状が長空形状に例示されているが、原形、楕円形、多角形、長方形など多様な形状に製造されることができる。

40

【００３３】

また、本発明の重合酵素連鎖反応ブロック１００は、上記キャピラリー２０が巻かれている外側に位置した加熱ブロック１０ｂの外側と結合されるように上記加熱ブロック１０ｂを囲む形態を有する付加加熱ブロック１３が追加に形成されることができる。これは付加加熱ブロック１３を介してキャピラリーに熱を伝達するとき、外部で加熱ブロック１０ｂの内部方向に熱を伝達させる方式にキャピラリーにさらに効率的に熱を伝達することができる。

【００３４】

上記キャピラリー２０は、試料が流出入され、上記加熱ブロック１０ａ、１０ｂにより

50

各々異なる温度が伝達されて反応サイクルが繰り返して遂行されるように、上記中空 1 1 を通過して上記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b に一定の間隔の螺旋型に巻かれることが好ましい。これに伴い、上記キャピラリー 2 0 が各々異なる温度に調節される加熱ブロック 1 0 a、1 0 b を順次的及び反復的に接触することによって、重合酵素連鎖反応を遂行するようになって試料内の遺伝子 (DNA) の増幅が行われるようになる。上記キャピラリー 2 0 が一定の間隔で巻かれる理由は、重合酵素連鎖反応を一定に維持し、これに伴い、後述する反射ミラーを容易に一定角度に回転させるためである。

【0035】

上記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b の外面に、上記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b と上記キャピラリー 2 0 との接触面積を増加させるためにキャピラリー 2 0 の一部が挿入されるように一定の大き及び一定の間隔を有する挿入溝 1 2 が形成されることができ

10

【0036】

図 4 の断面図のように、上記キャピラリー 2 0 の一部が挿入されて固定され、一定の大き及び一定の間隔を有する螺旋型挿入溝 1 2 が形成されることによって、上記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b と上記キャピラリー 2 0 との接触面積が増加して、上記加熱ブロック 1 0 a、1 0 b からさらに効率的な熱伝達が可能である。

【0037】

また、加熱ブロック 1 0 a、1 0 b とキャピラリー 2 0 との接触面積は、上述した重合酵素連鎖反応の段階の反応時間と連係されるため、反応時間を長くするか、或いは短くするかに応じて変わることができ、これは上記加熱ブロックの半径方向への区画幅を異にする

20

【0038】

上記のような構成で形成された本発明の重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 は、DNA 増幅程度をリアルタイムで測定するためのリアルタイムモニタリング装置に用いられるようになる。

【0039】

図 5 及び図 6 は、本発明による重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置の概略的な構造を示す斜視図である。

30

【0040】

図示されているように、本発明の重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置は、重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 と、励起光を出射する光源 1 1 0 と、上記光源 1 1 0 から出射された励起光のうち特定波長領域の励起光を通過させるバンドパスフィルター 1 3 0 と、上記励起光を集光する第 1 集光レンズ 1 4 0 と、上記励起光を反射させ、上記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を通過させるビームスプリッター 1 2 0 と、第 1 モーター 1 6 0 と結合されて回転され、上記ビームスプリッター 1 2 0 で反射した励起光を上記キャピラリー 2 0 に伝達し、上記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を上記ビームスプリッター 1 2 0 に反射させる反射ミラー 1 5 0 と、上記反射ミラー 1 5 0 により反射されて上記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を検出する蛍

40

【0041】

上記光源 1 1 0 は、励起光を発生させる役割をし、従来、一般的に使用するタングステンハロゲンランプ、キセノン放電ランプなどの白色光源、及び、LED、レーザーなどの単色光源が光源として使われることができるが、これに限定されることではない。

【0042】

上記バンドパスフィルター 1 3 0 は、光源 1 1 0 から発生された励起光のうち特定波長領域の励起光を通過させる役割をする。

【0043】

上記光源から出射された特定波長領域の励起光を集光させる第 1 集光レンズ 1 4 0 が備

50

えられ、上記第1集光レンズ140は、励起光を集光することができるレンズであれば、特に限定されずに使用可能であり、両凸レンズ(Double convex lens)であることが好ましい。

【0044】

上記ビームスプリッター (beam splitter) (120) は、上記光源110から発生された励起光を反射させ、上記キャピラリー20内の試料で発生した蛍光を通過させるようになる。上記ビームスプリッター120は、二色性ビームスプリッター (dichroic beam splitter) であることが好ましい。

【0045】

上記ビームスプリッター120により反射された励起光は、上記反射ミラー150に伝達されるようになり、上記ビームスプリッター120を通過した蛍光は、上記蛍光検出部170に伝達されるようになる。

【0046】

上記反射ミラー150は、上記ビームスプリッター120により反射された励起光が伝達され、上記重合酵素連鎖反応ブロック100の中空11に設置される。上記反射ミラー150は、上記ビームスプリッター120で反射した励起光を上記重合酵素連鎖反応ブロック100に備えられた螺旋型に巻かれている上記キャピラリー20に伝達し、上記キャピラリー20内の試料で発生した蛍光を上記ビームスプリッター120に反射させる役割をする。上記反射ミラー150で反射した蛍光は、上記ビームスプリッター120を通過して上記蛍光検出部170に伝達されるようになる。上記反射ミラー150の下部には上記反射ミラー150を回転させる第1モーター160と結合される。上記第1モーター160は、上記反射ミラー150が上記キャピラリー20内の試料に励起光を反射させ、試料で発生した蛍光が蛍光測定部に反射されるように上記反射ミラー150を回転させる役割をする。このとき、上記第1モーター160は、上記反射ミラー150を一定速度に回転可能な定速回転モーターであることが好ましい。

【0047】

上記蛍光検出部170は、キャピラリー20内の試料で発生した蛍光が上記反射ミラー150により反射され、上記ビームスプリッター120を通過した蛍光を検出して遺伝子(DNA)の増幅程度を見積もることができるようになる。

【0048】

上記蛍光検出部170は、図示されているように、上記ビームスプリッター120を通過した蛍光を集光させる蛍光集光レンズ171と、集光された蛍光のうち特定波長領域の蛍光を通過させる蛍光バンドパスフィルター172と、上記蛍光バンドパスフィルター172を通過した特定波長領域の蛍光を検出する蛍光検出センサー173と、を含んでなることができる。図5は、一つの波長領域の蛍光を検出することを示す。

【0049】

多様な波長領域の蛍光を検出することができるように、上記蛍光検出部170は、図6のように、上記ビームスプリッター120を通過した蛍光の波長領域に応じて蛍光集光レンズ171、蛍光バンドパスフィルター172、及び蛍光ビームスプリッター174が、各々、一つ以上さらに備えられることができる。このとき、蛍光ビームスプリッター174a、174bは、検出しようとする蛍光の波長ごとに各々に備えられ、蛍光集光レンズ171a、171b、171cは、キャピラリー20から蛍光検出センサー173a、173b、173cまでの長さごとに各々備えられる。蛍光バンドパスフィルター172a、172b、172cは、検出しようとする蛍光の波長領域別に各々備えられる。

【0050】

このとき、上記蛍光ビームスプリッター174a、174bは、特定波長を基準として、長い波長は通過させて、短い波長は反射させる二色性ビームスプリッター (dichroic beam splitter) であることが好ましく、特定波長の基準は蛍光染料に応じて変わる。

【0051】

図7及び図8は、本発明によるその他の形態の重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリア

10

20

30

40

50

リアルタイムモニタリング装置の例示を示す図である。

【 0 0 5 2 】

本発明のその他の形態の重合酵素連鎖反応ブロックを用いたリアルタイムモニタリング装置は、重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 と、励起光を発生させる光源 1 1 0 と、上記光源 1 1 0 から出射された励起光のうち特定波長領域の励起光を通過させるバンドパスフィルター 1 3 0 と、上記励起光を集光する第 1 集光レンズ 1 4 0 と、上記励起光を反射させ、上記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を通過させるビームスプリッター 1 2 0 と、第 1 モーター 1 6 0 a と結合されて回転され、上記ビームスプリッター 1 2 0 で反射した励起光を上記キャピラリー 2 0 に伝達し、上記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を上記ビームスプリッター 1 2 0 に反射させる反射ミラー 1 5 0 と、上記反射ミラーと連鎖反応ブロックとの間に位置し、反射ミラーで反射した励起光及び上記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光を集光する第 2 集光レンズ 1 4 1 と、上記反射ミラー 1 5 0 により反射されて上記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を検出する蛍光検出部 1 7 0 と、を含んでなる。

10

【 0 0 5 3 】

従来、一般的に使用するタングステンハロゲンランプ、キセノン放電ランプなどの白色光源、及び、LED、レーザーなどの単色光源が光源として使われることができるが、これに限定されることなく、上記光源がレーザー光源の場合、レーザーの光の強度を調節するために、ND (neutral density) フィルター (1 3 2) がさらに追加されることができる。

20

【 0 0 5 4 】

上記重合酵素連鎖反応ブロック 1 0 0 と上記反射ミラー 1 5 0 との間に位置し、上記反射ミラー 1 5 0 で反射した励起光と上記キャピラリー 2 0 内の試料で発生した蛍光の集光が可能な第 2 集光レンズ 1 4 1 は、非球面レンズ (aspheric lens) であることが好ましいが、これに限定されることではない。

【 0 0 5 5 】

また、上記蛍光検出部 1 7 0 は、上記ビームスプリッター 1 2 0 を通過した蛍光を集光させる蛍光集光レンズ 1 7 1 と、集光された蛍光のうち相異なる複数の特定波長領域の蛍光を通過させる一つ以上の蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 が備えられる蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 と、上記蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 を回転させる第 2 モーター 1 6 0 b と、上記蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 を通過した特定波長領域の蛍光を検出する蛍光検出センサー 1 7 3 と、を含んでなることができる。

30

【 0 0 5 6 】

上記蛍光測定部 1 7 0 は、蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 上に一つ以上の蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 を備え、上記蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 に第 2 モーター 1 6 0 b を連結して回転させることによって、蛍光を蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 上に備えられた各々の蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 に通過させて検出できるようになって蛍光検出及び空間の効率を増大させることができる。

【 0 0 5 7 】

即ち、図 6 のように、リアルタイムモニタリング装置において複数の蛍光バンドパスフィルターを使用する場合、蛍光波長領域に応じて蛍光集光レンズ 1 7 1、蛍光バンドパスフィルター 1 7 2、及び蛍光ビームスプリッター 1 7 4 の全部を必要とするようになるが、図 7 及び図 8 のように、その他の形態のリアルタイムモニタリング装置では蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 に複数の蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 を備えることによって、図 6 の蛍光ビームスプリッター 1 7 4 を備えなくてもよく、蛍光集光レンズ 1 7 1 は、1 個のみ使用してもよいので、製作費用及び装置の空間を減らすようになる。

40

【 0 0 5 8 】

このとき、上記第 2 モーター 1 6 0 b は、上記蛍光バンドパスフィルター 1 7 2 を含む蛍光バンドパスフィルター固定部 1 7 5 を一定速度に回転可能な定速回転モーターであることが好ましい。

50

【 0 0 5 9 】

上記蛍光検出センサー 1 7 3 は、P M T (Photo multiplier tube) であることが好ましく、上記蛍光集光レンズ 1 7 1 は、非球面レンズ (Aspheric lens) であることが好ましいが、これに限定されることではない。

【 0 0 6 0 】

また、上記本発明の上記リアルタイムモニタリング装置は、励起光と蛍光の分離効率を増加させるために、図 8 のように、上記光源 1 1 0 と第 1 集光レンズ 1 4 0 との間、及び蛍光測定部に偏光子 (polarizer) または偏光フィルム (polarizer film) 1 3 1 を追加的に含むことができる。上記偏光子を備える場合、上記光源と集光レンズとの間、及び蛍光測定部に共に備えられなければならない。

10

【 0 0 6 1 】

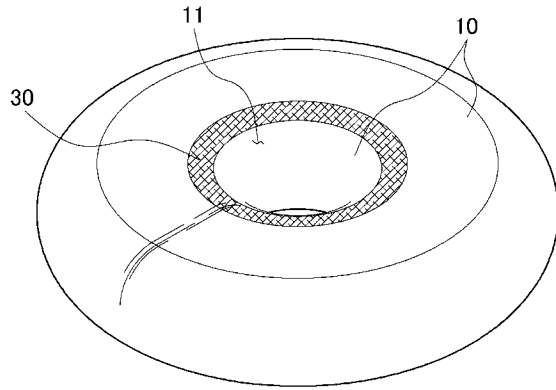
このように、本発明は、固定式光源と固定式蛍光検出部を備えてモーターの回転により固定された位置で試料のリアルタイムモニタリングが可能となるため、装置の故障が少なく、製作に所要される費用及び努力を節減することができ、装置のよりコンパクトなサイズの具現が可能となる。また、モニタリング装置の光源、蛍光測定部の移動が必要なく、位置が固定されたモーターの回転のみで制御されるため、検出が容易であり、且つ検出正確度を向上させることができるという長所がある。

【 符号の説明 】

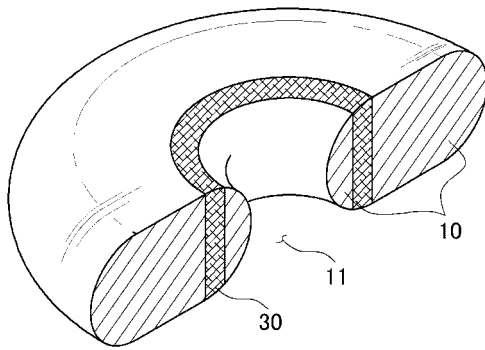
【 0 0 6 2 】

- 1 0 加熱ブロック 20
- 1 1 中空
- 1 2 挿入溝
- 1 3 付加加熱ブロック
- 2 0 キャピラリー
- 3 0 断熱層
- 1 0 0 重合酵素連鎖反応ブロック
- 1 1 0 光源
- 1 2 0 ビームスプリッター
- 1 3 0 バンドパスフィルター
- 1 3 1 偏光子 (polarizer ; または偏光フィルム (polarizer film)) 30
- 1 3 2 N D フィルター (Neutral density filter)
- 1 4 0 第 1 集光レンズ
- 1 4 1 第 2 集光レンズ
- 1 5 0 反射ミラー
- 1 6 0 第 1 モーター
- 1 7 0 蛍光検出部
- 1 7 1 蛍光集光レンズ
- 1 7 2 蛍光バンドパスフィルター
- 1 7 3 蛍光検出センサー
- 1 7 4 蛍光ビームスプリッター 40
- 1 7 5 蛍光バンドパスフィルター固定部

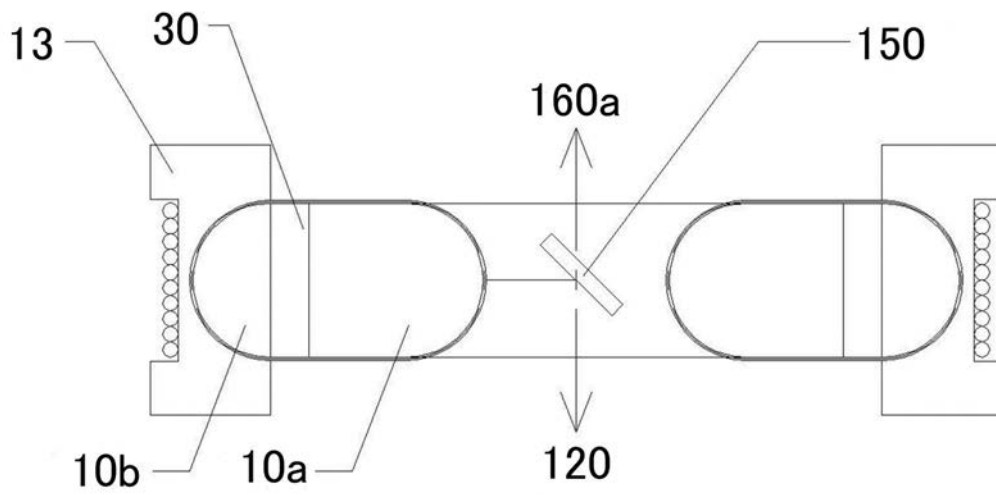
【図 1】



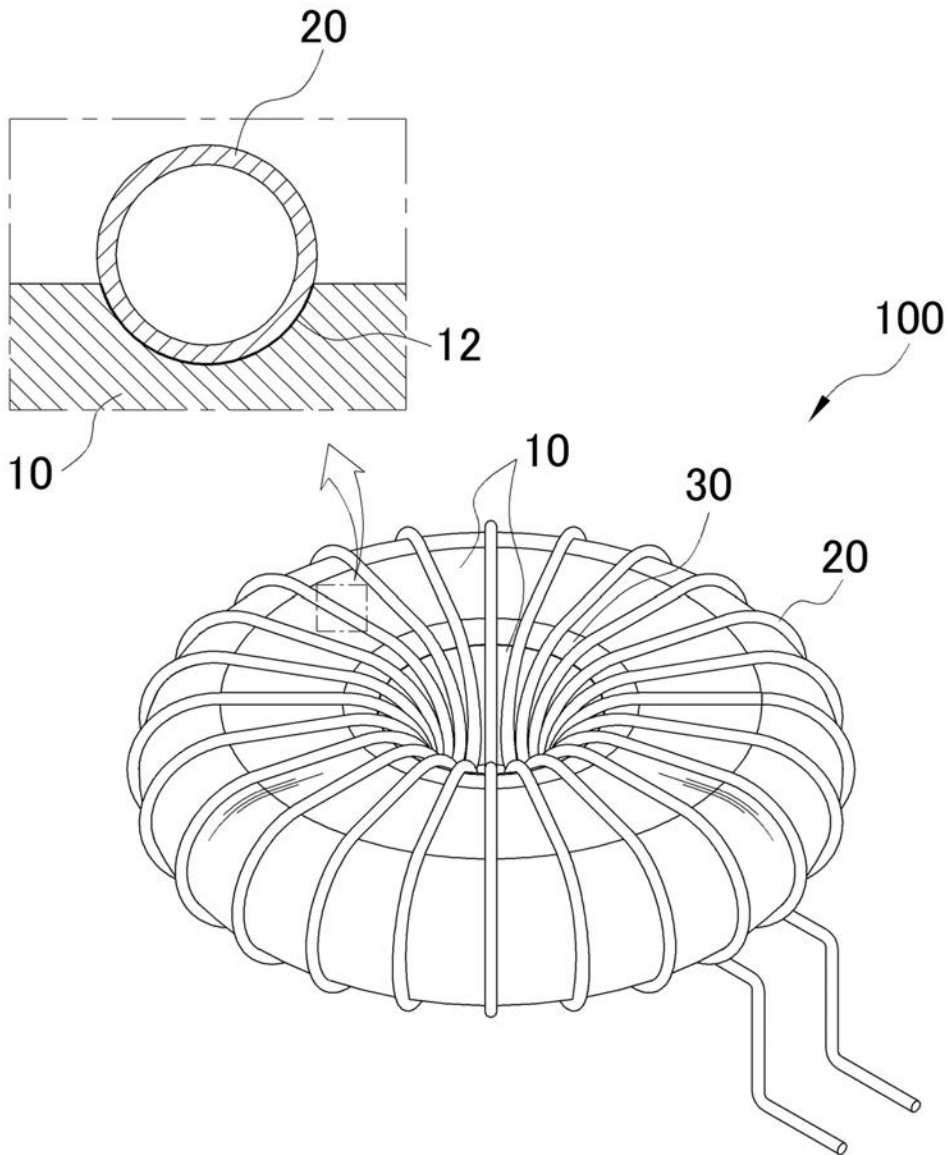
【図 2】



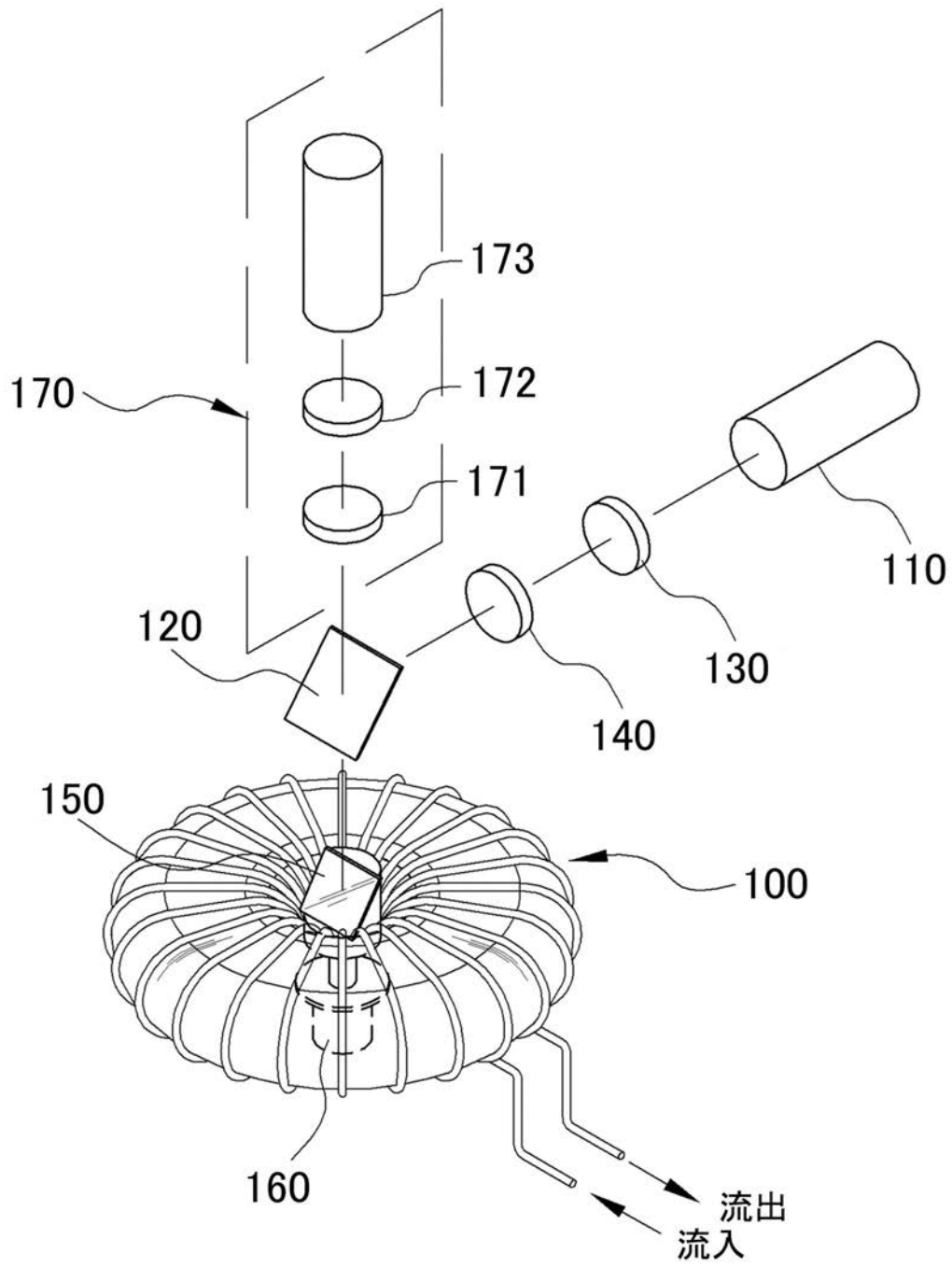
【図 3】



【図4】

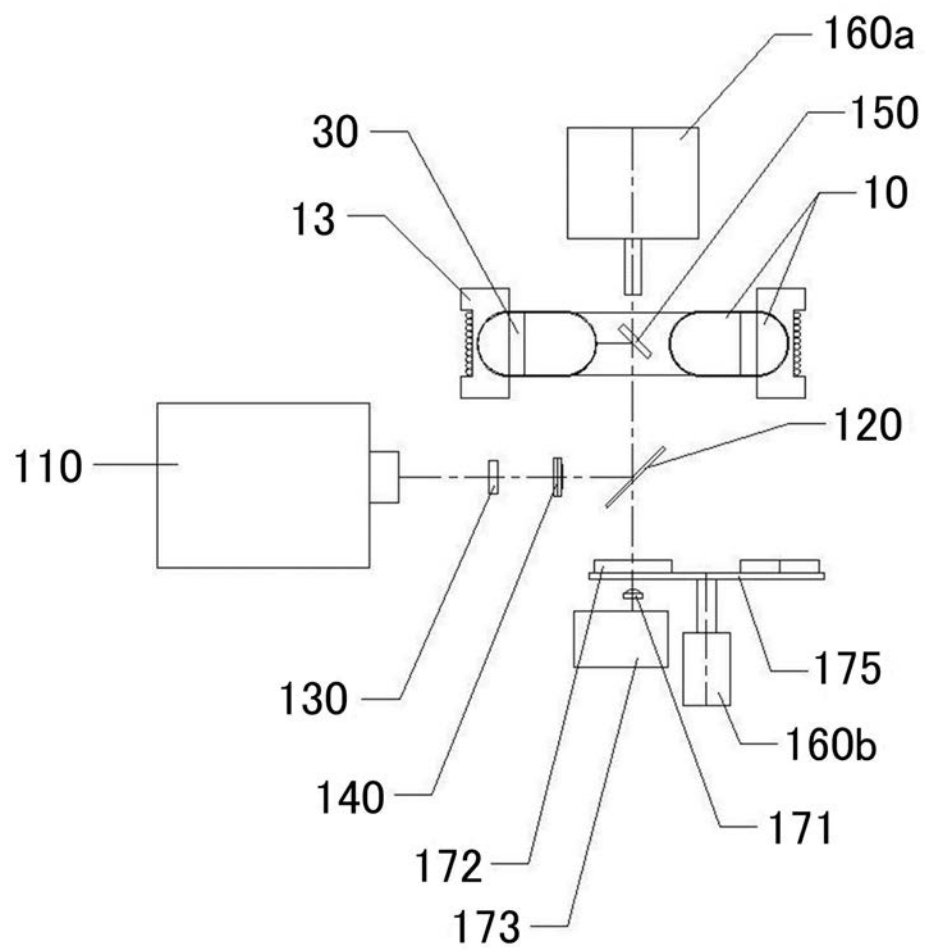


【図5】

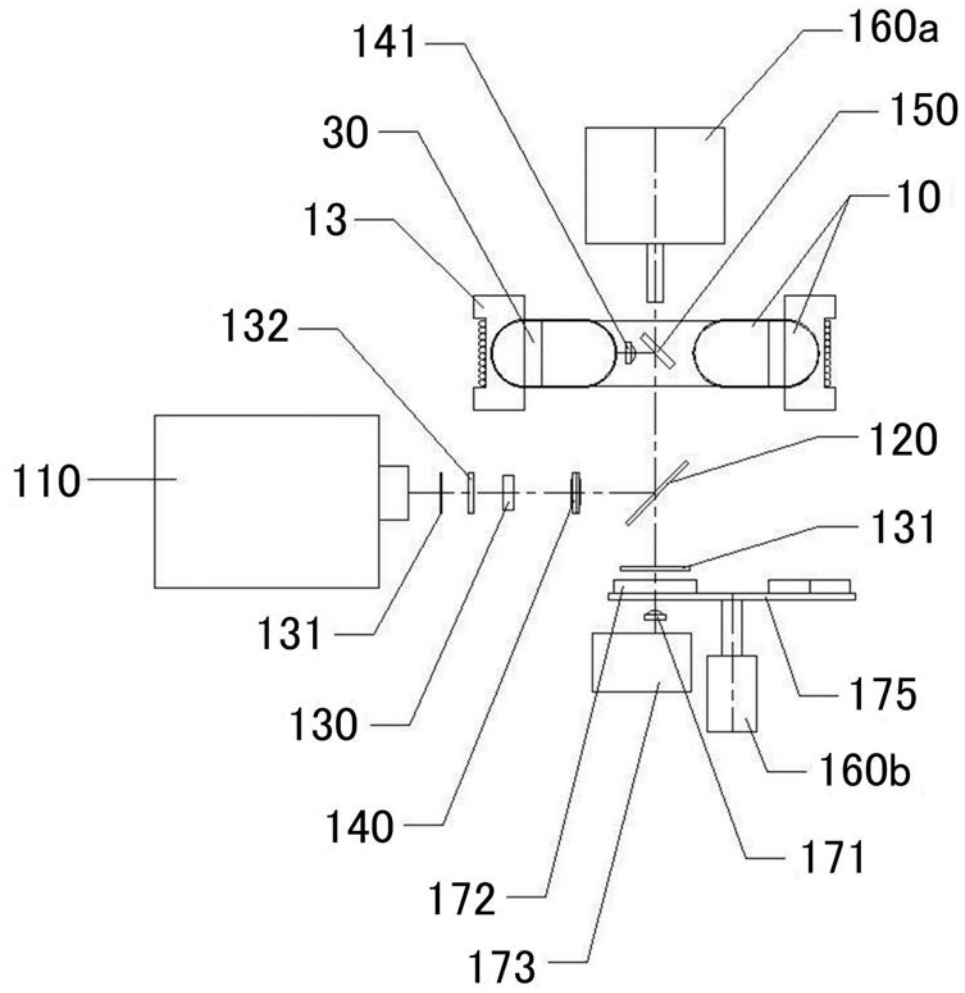


[illegible]

【図7】



【図8】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/64 (2006.01) G 0 1 N 21/64 Z

(72)発明者 パク ハンイ
 大韓民国 3 0 2 - 7 6 4 テジョン ソグ タンバンドン ハンヤンエーピーティー 6 - 7 0
 1

(72)発明者 チョイ イルキュ
 大韓民国 3 6 1 - 8 5 9 チュンチョンブクド チュンジュシ ホンデックグ ゲシントランシ
 エ 2 0 9 - 1 2 0 6

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 特開2 0 0 5 - 2 9 5 8 7 7 (J P , A)
 特表2 0 0 8 - 5 1 1 3 1 6 (J P , A)
 国際公開第2 0 0 7 / 0 9 4 7 4 4 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
 C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
 P u b M e d
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)