

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5987895号
(P5987895)

(45) 発行日 平成28年9月7日 (2016.9.7)

(24) 登録日 平成28年8月19日 (2016.8.19)

(51) Int. Cl.	F I
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
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 2 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2014-503511 (P2014-503511)	(73) 特許権者	000002185
(86) (22) 出願日	平成25年1月16日 (2013.1.16)		ソニー株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/050652		東京都港区港南1丁目7番1号
(87) 国際公開番号	W02013/132891	(74) 代理人	100112874
(87) 国際公開日	平成25年9月12日 (2013.9.12)		弁理士 渡邊 薫
審査請求日	平成27年2月3日 (2015.2.3)	(72) 発明者	松本 真寛
(31) 優先権主張番号	特願2012-52322 (P2012-52322)		東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株
(32) 優先日	平成24年3月8日 (2012.3.8)		式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	佐藤 正樹
			東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株
			式会社内
		(72) 発明者	渡辺 英俊
			東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株
			式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オリゴヌクレオチドプライマーを含んで酵素を含まない第1の試薬液と、酵素を含んでオリゴヌクレオチドプライマーを含まない第2の試薬液と、を用意する調整工程と、

前記調整工程の後に、核酸増幅反応の反応場であるウェルとは異なる固化用容器内で、前記第1の試薬液と前記第2の試薬液とを別個に凍結乾燥する固化工程と、

前記固化工程を経た前記第1の試薬液及び前記第2の試薬液を前記ウェルに配置する収容工程と、を含む、核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

【請求項 2】

前記収容工程は、複数の前記ウェルの各々に、固化された、2種類以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含む前記第1の試薬液を収容する工程を含む、

請求項1記載の核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本技術は、核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法に関する。より詳しくは、核酸増幅反応の反応場となるウェル内に、反応に必要な1種類以上の物質を含む固化された試薬が収容された核酸増幅反応用マイクロチップに関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

近年、半導体産業における微細加工技術を応用し、シリコンやガラス製の基板上に化学的及び生物学的分析を行うためのウェルや流路を設けたマイクロチップが開発されてきている。これらのマイクロチップは、例えば、液体クロマトグラフィーの電気化学検出器や医療現場における小型の電気化学センサなどに利用され始めている。

【0003】

このようなマイクロチップを用いた分析システムは、 μ -TAS (micro-Total-Analysis System) やラボ・オン・チップ、バイオチップ等と称され、化学的及び生物学的分析の高速化や高効率化、集積化あるいは、分析装置の小型化を可能にする技術として注目されている。 μ -TASは、少量の試料で分析が可能なことや、マイクロチップのディスポーザブルユース(使い捨て)が可能ことから、特に貴重な微量試料や多数の検体を扱う生物学的分析への応用が期待されている。

10

【0004】

μ -TASの応用例として、マイクロチップ上に配設された複数の領域内に物質を導入し、該物質を化学的に検出する光学検出装置がある。このような光学検出装置としては、例えば、マイクロチップ上のウェル内で核酸増幅反応等の複数の物質間の反応を進行させ、生成する物質を光学的に検出する反応装置(例えばリアルタイムPCR装置)などがある。

【0005】

従来、マイクロチップ型の核酸増幅装置では、核酸増幅反応に必要な試薬及び鋳型DNAを予め全て混合し、この混合液をマイクロチップに配設された複数のウェル内に導入して反応を行う方法が取られている。しかし、この方法では、ウェル内に混合液が導入されるまでに一定の時間が必要であるため、その間に混合液内で反応が進行し、非特異的な核酸増幅を容易にし、定量性を低下させてしまう問題が生じていた。

20

【0006】

前述の問題に対し、例えば特許文献1には、ウェルに核酸増幅反応に必要な複数の試薬が所定の順序で積層されて固着化されたマイクロチップが開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2011-160728号公報

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本技術は、簡便かつ精度の高い分析が可能な核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題解決のため、本技術は、核酸増幅反応に必要な物質のうち、少なくとも一部を含む試薬液を乾燥させる固化工程と、固化された該試薬液を核酸増幅反応の反応場であるウェルに配置する収容工程と、を含む、核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法を提供する。

40

前記固化工程は、前記試薬液を凍結乾燥する工程を含むことが好ましい。

前記固化工程の前に、組成の異なる複数の前記試薬液を用意する調製工程を含み、該試薬液には、オリゴヌクレオチドプライマーを含んで酵素を含まない第1の試薬液と、酵素を含んでオリゴヌクレオチドプライマーを含まない第2の試薬液と、が含まれていても良い。

また、前記固化工程は、前記第1の試薬液と前記第2の試薬液とを別個に凍結乾燥する工程を含んでいても良い。

さらに、前記収容工程は、複数の前記ウェルの各々に、固化された、2種類以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含む前記第1の試薬液を収容する工程を含んでいても良い。

50

本技術はまた、前記第 1 の試薬液と前記第 2 の試薬液のうち、何れか一の試薬液を前記固化工程によって固化し、前記収容工程の前に、前記固化工程に用いていない試薬液を前記ウェルに滴下して、該ウェル内で乾燥させる固着化工程を含む、核酸増幅反应用マイクロチップの製造方法を提供する。

前記固着化工程は、前記試薬液を真空乾燥する工程を含むことが好ましい。

【発明の効果】

【0010】

本技術により、簡便で精度の高い分析を可能とする核酸増幅反应用マイクロチップが提供される。

【図面の簡単な説明】

10

【0011】

【図 1】本技術の第一実施形態に係るマイクロチップ 1 a の構成を説明するための模式図である。

【図 2】マイクロチップ 1 a のウェル 4 3 内の構成を説明するための模式図である。

【図 3】マイクロチップ 1 a の製造方法を説明するためのフローチャートである。

【図 4】マイクロチップ 1 a の変形実施形態の構成を説明するための模式図である。

【図 5】本技術の第二実施形態に係るマイクロチップ 1 b のウェル 4 3 内の構成を説明するための模式図である。

【図 6】マイクロチップ 1 b の製造方法を説明するためのフローチャートである。

【図 7】本技術の第三実施形態に係るマイクロチップ 1 c のウェル 4 3 内の構成を説明するための模式図である。

20

【図 8】本技術に係るマイクロチップにおける核酸増幅の開始時刻を示す図面代用グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本技術を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本技術の代表的な実施形態を示したものであり、これにより本技術の範囲が狭く解釈されることはない。説明は以下の順序で行う。

1. 本技術の第一実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの構成

30

2. 本技術の第一実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの製造方法

(1) 基板層の成形

(2) 試薬液の調製

(3) 試薬液の固化

(4) 試薬の収容

(5) 基板層の貼り合わせ

3. 第一実施形態の変形実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの構成

4. 本技術の第二実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの構成

5. 本技術の第二実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの製造方法

(1) 試薬液の固着化

40

(2) 試薬の収容

6. 本技術の第三実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの構成

【0013】

1. 本技術の第一実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの構成

図 1 は、本技術の第一実施形態に係るマイクロチップ 1 a の構成を説明する模式図である。図 1 A は上面模式図であり、図 1 B は、図 1 A の P - P 断面に対応する断面模式図である。

【0014】

図中符号 1 a で示す核酸増幅反应用マイクロチップ（以下、「マイクロチップ」とも称

50

する)には、試料溶液が導入される領域として、外部からサンプル等の液体が導入される導入部2と、核酸増幅反応の反応場となるウェル41~45と、導入部2と各ウェルとを接続する流路31~35が設けられている。また、ウェル41~45には、後述するように、核酸増幅反応に必要な物質の少なくとも一部を含む試薬R1, R2が収容されている(図1Bにおいて、試薬R1, R2、不図示)。図1及びその説明においては、流路31により試料溶液が供給される5つのウェルを全てウェル41とし、同様に流路32, 33, 34, 35により試料溶液の供給を受ける各々の5つのウェルを、ウェル42, 43, 44, 45として説明する。また、試料溶液とは、核酸増幅反応において増幅の対象となる鋳型核酸であるDNAやRNA等の核酸を含む溶液を指す。

【0015】

本技術に係るマイクロチップを用いて行う「核酸増幅反応」については、温度サイクルを実施する従来のPCR(Polymerase Chain Reaction)法や、温度サイクルを伴わない各種等温増幅法が含まれる。等温増幅法としては、例えば、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法、SMAPI(SMART Amplification Process)法、NASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法、ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids)法(登録商標)、TRC(Transcription-Reverse transcription Concerted)法、SDA(Strand Displacement Amplification)法、TMA(Transcription-Mediated Amplification)法、RCA(Rolling Circle Amplification)法等が挙げられる。この他、「核酸増幅反応」には核酸の増幅を目的とする、変温あるいは等温による核酸増幅反応が広く包含されるものとする。また、これらの核酸増幅反応には、リアルタイムPCR法などの増幅核酸の定量を伴う反応も包含される。

【0016】

マイクロチップ1aは、導入部2、流路31~35及びウェル41~45が形成された基板層12に基板層11が貼り合わされ、さらに基板層11に基板層13が貼り合わされることにより構成されている(図1B参照)。マイクロチップ1aでは、基板層11と基板層12との貼り合わせを大気圧に対して負圧で行った場合、導入部2、流路31~35、ウェル41~45の内部を大気圧に対して負圧(1/100気圧)となるように気密に封止することができる。マイクロチップ1aにおいて、試料溶液が導入される領域を大気圧に対し負圧とすることにより、試料溶液の導入時にマイクロチップ内部の陰圧によって試料溶液が吸引され、微細な流路構造が形成されたマイクロチップ1aの内部への試料溶液の導入が、より短時間で行えるようになる。

【0017】

基板層11, 12, 13の材料は、ガラスや各種プラスチック類とできる。好ましくは、基板層12, 13をガス不透過性を備える材料で構成する。マイクロチップ1aの外面を構成する基板層12, 13をPCなどのガス不透過性を備える材料とすることで、ウェル41~45内に導入された試料溶液が、核酸増幅反応における加熱によって気化し、基板層11を透過して消失(液抜け)するのを防止できる。また、マイクロチップ1aの試料溶液が導入される領域を、大気圧に対し負圧として気密に封止した場合には、マイクロチップ1a外からの空気の浸透を防いで内部の負圧を保持するためにも、基板層12, 13をガス不透過性を備える材料で構成することが好ましい。

【0018】

ガス不透過性を備える基板層の材料は、ガラス、プラスチック類、金属類及びセラミック類などが採用できる。プラスチック類としては、PMMA(ポリメチルメタアクリレート:アクリル樹脂)、PC(ポリカーボネート)、PS(ポリスチレン)、PP(ポリプロピレン)、PE(ポリエチレン)、PET(ポリエチレンテレフタレート)、ジエチレングリコールビスアリルカーボネート、SAN樹脂(スチレン-アクリロニトリル共重合体)、MS樹脂(MMA-スチレン共重合体)、TPX(ポリ(4-メチルペンテン-1))、ポリオレフィン、SiMA(シロキサニルメタクリレートモノマー)-MMA共重合体、SiMA-フッ素含有モノマー共重合体、シリコーンマクロマー(A)-HFBu

10

20

30

40

50

MA（ヘプタフルオロブチルメタクリレート）- MMA 3元共重合体、ジ置換ポリアセチレン系ポリマー等が挙げられる。金属類としては、アルミニウム、銅、ステンレス（SUS）、ケイ素、チタン、タングステン等が挙げられる。セラミック類としては、アルミナ（ Al_2O_3 ）、窒化アルミ（ AlN ）、炭化ケイ素（ SiC ）、酸化チタン（ TiO_2 ）、酸化ジルコニア（ ZrO_2 ）、石英等が挙げられる。

【0019】

基板層11は、弾性を有する材料で構成されることが好ましい。マイクロチップ1aにおいて、導入部2を封止する基板層11を、弾性を有する材料とすることによって、針などの穿刺部材の一部をマイクロチップ1a外部から導入部2に穿通することが可能となる。針を接続したシリンジ等に予め試料溶液を充填しておき、基板層11をその針で穿通すると、封止されていた導入部2がシリンジ内部とだけ接続されて、気泡を生じることなく試料溶液のマイクロチップ1a内への導入が可能となる。

10

【0020】

また、試料溶液が導入される領域を、大気圧に対し負圧として気密に封止した場合には、針の先が導入部2に到達した時点で、マイクロチップ1a外部と導入部2との圧力差によって、シリンジ内の試料溶液は、導入部2へ自動的に吸引される。

【0021】

基板層11を弾性を有する材料により形成しておくことで、試料溶液導入後、針を導入部2から抜いた際、基板層11の自己封止性により穿刺箇所が自然に封止されるようにできる。本技術においては、基板層の弾性変形による針の穿刺箇所の自然封止を、基板層の「自己封止性」と定義するものである。

20

【0022】

弾性を有する基板層の材料としては、ポリジメチルシロキサン（PDMS）等のシリコン系エラストマーの他、アクリル系エラストマー、ウレタン系エラストマー、フッ素系エラストマー、スチレン系エラストマー、エポキシ系エラストマー、天然ゴムなどが挙げられる。

【0023】

なお、本技術に係るマイクロチップ1aの各ウェルに保持された物質を、光学的に分析する場合においては、各基板層の材質には、光透過性を有し自家蛍光が少なく波長分散が小さいことで光学誤差の少ない材料を選択することが好ましい。

30

【0024】

次に、マイクロチップ1aのウェルに収容された試薬について説明する。図2では、マイクロチップ1aの各ウェルを代表して、ウェル43について模式的に示す。ウェル43には、固形の試薬R1、R2が収容されている。試薬R1、R2には、核酸増幅反応において増幅核酸鎖を得るために必要な物質の少なくとも一部が含まれている。具体的には、増幅の対象であるDNA、RNA等の塩基配列の少なくとも一部に相補的なオリゴヌクレオチドプライマー（以下「プライマー」とも称する）、核酸モノマー（dNTPs）、酵素、反応緩衝液に含まれる成分などである。また、核酸増幅反応に直接必要ではないが、増幅した核酸鎖を検出するための蛍光標識等の標識を備えたプローブや、二本鎖の核酸にインターカレートする検出用試薬なども、増幅核酸鎖の検出に必要な物質として、試薬R1、R2に含まれる成分とできる。

40

【0025】

試薬R1と試薬R2に含まれる核酸増幅反応に必要な成分は、各々異なる組成であっても良い。例えば、試薬R1を、プライマーを含んで酵素を含まない試薬液（第1の試薬液）とし、試薬R2を、酵素を含んでプライマーを含まない試薬液（第2の試薬液）とすることもできる。このようにプライマーが含まれる試薬R1に酵素が含まれず、酵素が含まれる試薬R2にプライマーが含まれないことによって、試料溶液がウェル内に導入されるまでプライマーと酵素が混合されず、プライマーダイマーの発生が抑えられる。試薬R1を、酵素を含んでプライマーを含まない試薬液（第2の試薬液）とし、試薬R2を、プライマーを含んで酵素を含まない試薬液（第1の試薬液）としても良く、試薬R1、R2の

50

組成は任意とできる。なお、試薬 R 1 , R 2 は、図 2 に示される形状には限定されず、ウェル 4 3 内に収容可能な体積であれば、いずれの形状であっても良い。また、マイクロチップ 1 a に設けられた複数のウェルに同一の組成の試薬 R 1 , R 2 が収容されていても良く、異なる組成の試薬 R 1 , R 2 が各ウェルに収容されていても良い。

【 0 0 2 6 】

2 . 本技術の第一実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの製造方法

マイクロチップ 1 a の製造方法について、図 3 に示すフローチャートを参照して説明する。

(1) 基板層の成形

図 3 中、符号 S 1 は基板層の成形工程である。本工程では、基板層 1 2 に、導入部 2、流路 3 1 ~ 3 5、ウェル 4 1 ~ 4 5 を成形する。基板層 1 2 への導入部 2 等の成形は、公知の手法によって行うことができる。例えば、ガラス製基板層のウェットエッチング又はドライエッチングによって、あるいはプラスチック製基板層のナノインプリント、射出成型又は切削加工である。また、導入部 2 等は、基板層 1 1 に成形されても良く、あるいは基板層 1 1 に一部を、基板層 1 2 に残りの部分を成形させても良い。

【 0 0 2 7 】

(2) 試薬液の調製

図 3 中、符号 S 2 は試薬液の調製工程である。本工程では、マイクロチップ 1 a に収容する試薬 R 1 , R 2 の組成に合わせ、液状又はゲル状の試薬液を調製する。試薬液には、核酸増幅反応に必要な物質のうち少なくとも一部が含まれていれば良く、その組成は任意とできる。例えば、プライマーのみが含まれる試薬 R 1 と、酵素のみが含まれる試薬 R 2 を用意しても良い。また、調製する試薬液の種類は 2 種類には限定されず、一の試薬液に含まれる核酸増幅反応に必要な物質は、1 種類であっても、数種類であっても良い。

【 0 0 2 8 】

調製工程で用意される試薬液にプライマーが含まれる場合、プライマーは 1 種類であっても、複数種類であっても良い。本技術に係るマイクロチップ 1 a の製造方法においては、ある塩基配列からなるプライマーに対し、異なる塩基配列を含むプライマーは、別の種類のプライマーと定義する。すなわち、増幅対象である標的核酸鎖について、1 本の核酸鎖の塩基配列に対してデザインされたプライマーと、その相補鎖の塩基配列に対してデザインされたプライマーとを合わせた一対のプライマーセットは、2 種類のプライマーを含むものと定義する。これらのプライマーの種類についての定義は、後述する第二実施形態及び第三実施形態においても、同様である。

【 0 0 2 9 】

試薬液の組成については、例えば、プライマーを含んで酵素を含まない試薬液と、酵素を含んでプライマーが含まれない試薬液とを調製した場合、核酸増幅反応開始時に導入された試料溶液がウェルに到達するまで、プライマーと酵素が混合されず、プライマーダイマーによる核酸の非特異的な増幅が抑えられ、好適である。またプライマーを含む試薬液には、2 種類以上のプライマーが含まれていることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

試薬液の調製工程 S 2 において、試薬液や、そこに加えられるプライマー溶液や酵素溶液は冷温に保持されることが好ましい。試薬液等の冷温での保持は、氷上に試薬液等の入った容器を置いたり、アルミブロック等のチューブを保持する器具を予め冷凍庫などに置き、冷却された状態で使用することによって可能である。

【 0 0 3 1 】

(3) 試薬液の固化

図 3 中、符号 S 3 a は試薬液の固化工程である。本工程では、調製工程 S 2 で用意された複数の試薬液を固化する。すなわち、試薬液を乾燥させ、固相状態の試薬 R 1 , R 2 を作製する工程である。固化工程 S 3 a については、図 3 に示すように二段階に分け、「試薬液の滴下」の工程 S 3 a - 1、「凍結乾燥」の工程 S 3 a - 2、の順に説明する。なお、図 3 は、調製工程 S 2 で用意された試薬液が 2 種類の場合のフローチャートである。

【 0 0 3 2 】

[試薬液の滴下の工程 S 3 a - 1]

本工程では、前述の、試薬液の調製工程 S 2 において調製された試薬液を、固化工程 S 3 a で使用する固化用容器に滴下する。複数種類の試薬液を調製工程 S 2 で用意した場合は、試薬液を各々別の固化用容器に滴下し、別個に固化させる。また、マイクロチップ 1 a の複数のウェル 4 1 ~ 4 5 に、同じ組成の試薬 R 1 を収容する場合も、ウェルの数に応じた数の固化用容器を用意し、各々の固化用容器に試薬液を滴下する。固化用容器は、いずれの材質であっても良いが、次の凍結乾燥の工程 S 3 a - 2 で設定する温度や気圧に耐性を有するものが好ましい。

【 0 0 3 3 】

[凍結乾燥の工程 S 3 a - 2]

本工程では、前述の、容器に滴下された試薬液を乾燥して固化する。乾燥方法としては、例えば、凍結乾燥が好適である。また、凍結乾燥には、予備凍結、一次乾燥（昇華凍結）、二次乾燥（結合水の除去）の各工程を含むことが好ましい。予備凍結においては、凍結温度は共晶点（試薬液が凍結する温度）以下であれば良いが、酵素の失活の防止や試薬液を完全に凍結させる目的のために - 4 0 程度で凍結させることが望ましい。一次乾燥においては、予備凍結工程で凍結させた試薬液を乾燥させる。この時、試薬液を共晶点以下で乾燥させることにより、乾燥途中での溶解が防止され、試薬液に含まれる水分を昇華させることが可能となる。一次乾燥における真空度は、例えば 1 0 0 P a 以下であることが望ましい。1 0 0 P a における水の沸点は約 - 2 0 であるため、上述した試薬液の共晶点に近く、乾燥途中の試薬液の溶解が防止される。一次乾燥の真空度は、調製した試薬液の共晶点に応じて、適切な値を選択すれば良い。二次乾燥では、一次乾燥後の試薬液に含まれる成分に付いている分子状態の水を除去する。試薬液に含まれる成分の失活、変性等が起こらない程度の温度まで加熱し、試薬液の乾燥度を高めても良い。なお、本技術に係る核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法において、固化工程 S 3 a の乾燥方法は、凍結乾燥に限定されない。

【 0 0 3 4 】

(4) 試薬の収容

図 3 中、符号 S 4 は試薬 R 1 , R 2 の収容工程である。本工程では、前述の試薬液の固化工程 S 3 a によって固化用容器内に作製された固形状の試薬 R 1 , R 2 を固化用容器から取出し、基板層の成形工程 S 1 によっていずれかの基板層に形成されたウェルに収容する。基板層 1 2 に設けられた複数のウェルにおいて、試薬 R 1 , R 2 を収容するウェルはいずれであっても良く、一つであっても複数であっても良い。また、一のウェルに収容する試薬 R 1 , R 2 の数や種類は、任意とでき、複数のウェルに、同一の組成から成る試薬 R 1 , R 2 を収容しても良く、異なる組成からなる試薬 R 1 , R 2 を収容しても良い。試薬 R 1 、又は試薬 R 2 にプライマーが含まれる場合には、一の試薬に含まれるプライマーの種類は 2 種類以上であることが好ましい。例えば、含有するプライマーが各々異なる試薬 R 1 と試薬 R 2 を用意し、マイクロチップ 1 a に設けられた複数のウェルに、試薬 R 1 と試薬 R 2 とが別のウェルに配置されるように収容する。この場合、1 回の核酸増幅反応によって、複数の塩基配列の異なる核酸鎖の増幅について解析することが可能となり、マイクロチップ 1 a を用いた解析がより簡便となる。

【 0 0 3 5 】

(5) 基板層の貼り合わせ

図 3 中、符号 S 5 は基板層の貼り合わせ工程である。本工程では、試薬 R 1 , R 2 が収容されたいずれかの基板層に、他の基板層を貼り合わせる。基板層 1 1 , 1 2 , 1 3 の貼り合わせには、例えば、熱融着、接着剤、陽極接合、粘着シートを用いた接合、プラズマ活性化結合、超音波接合等の公知の手法により行うことができる。また、基板層 1 1 , 1 2 , 1 3 の貼り合わせを、大気圧に対して負圧下で行うことにより、試料溶液が導入される、導入部 2、流路 3 1 ~ 3 5、ウェル 4 1 ~ 4 5 の各領域を大気圧に対して負圧（例えば 1 / 1 0 0 気圧）とすることができる。ウェル 4 1 ~ 4 5 を封止する基板層 1 1 に、P

10

20

30

40

50

DMS等の弾性に加えてガス透過性を有する材料を用いた場合には、基板層11, 12を貼り合わせた後、負圧（真空）下に静置すれば、導入部2等の各領域に存在する空気が基板層11を透過して排出されるため、マイクロチップ1a内部を大気圧に対して負圧（真空）にできる。なお、マイクロチップ1aの内部を大気圧に対し負圧とする工程は、本技術に係るマイクロチップの製造方法において、必須ではない。

【0036】

本技術に係る核酸増幅反応用マイクロチップ1aにおいては、核酸増幅反応に必要な物質の一部を含む試薬R1, R2が、分析場であるウェル41～45内に予め収容されている。このため、核酸増幅反応に必要な残りの物質と標的核酸鎖を含む試料溶液をウェル41～45内に供給するのみで核酸増幅反応を開始することができる。また、複数の固形状の試薬R1, R2をウェル41～45内に収容することにより、核酸増幅反応に必要な複数の物質を、解析開始時まで分離した状態でマイクロチップ1a内に保持することができる。このため、マイクロチップ1aを用いた核酸増幅反応においては、プライマー同士がアニーリングしてプライマーダイマー等を生じることが抑制され、核酸の非特異的増幅が低減される。さらに、試薬R1, R2の調製を各々固化用容器で行うことにより、核酸増幅反応に使用する物質を分けて固化することが容易である。このため、本技術に係る核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法によって、簡便かつ精度の高い分析が可能な核酸増幅反応用マイクロチップの製造が可能となる。

10

【0037】

3. 第一実施形態の変形実施形態に係る核酸増幅反応用マイクロチップの構成

20

図4に、第一実施形態の変形実施形態に係るマイクロチップ1a-2のウェルに収容された試薬Rについて、ウェル43を代表として模式的に示す。マイクロチップ1a-2は、ウェル43等の各ウェルに収容されている試薬R以外の構成については、第一実施形態と同一である。第一実施形態と同一の構成については、同一の符号を付し説明については、省略する。また、マイクロチップ1a-2を構成する基板層11, 12, 13の材料は、マイクロチップ1aにおいて同一の符号を付した基板層と同じである。

【0038】

マイクロチップ1a-2のウェル43には、1種類の試薬Rが収容されている。マイクロチップ1a-2の製造工程は、試薬液の調製工程S2において、調製される試薬液の種類以外は図3に示すフローチャートと同一であり、製造工程の説明は省略する。図4のウェル43に示すように、マイクロチップ1a-2に収容される試薬Rは、1種類であっても良い。例えば、酵素を含む試薬Rをウェル43に収容し、核酸増幅反応開始時に、プライマー等、他の核酸増幅反応に必要な成分を試料溶液と混合してマイクロチップ1a-2導入しても良い。

30

【0039】

本技術に係るマイクロチップ1a-2においては、一部の核酸増幅反応に必要な成分を、予めウェル41～45内に収容することによって、ウェル内に試料溶液が導入されるまで、ウェル内の試薬Rに含まれる成分と他の成分とを分離しておくことが可能である。このため、核酸増幅反応が開始されるまで、例えば酵素とプライマーを分けておくことができ、プライマーダイマー等による非特異的な核酸増幅が抑えられ、マイクロチップ1a-2を用いて、精度の高い分析が可能となる。

40

【0040】

4. 本技術の第二実施形態に係る核酸増幅反応用マイクロチップの構成

図5に、本技術の第二実施形態に係るマイクロチップ1bのウェルに収容された試薬R1, R2について、ウェル43を代表として模式的に示す。マイクロチップ1bは、ウェル43等の各ウェルに収容されている試薬R1, R2の形状以外の構成については、第一実施形態と同一である。第一実施形態と同一の構成については、同一の符号を付し説明については、省略する。また、マイクロチップ1bを構成する基板層11, 12, 13の材料は、マイクロチップ1aにおいて同一の符号を付した基板層と同じである。

【0041】

50

図 5 に示す試薬 R 1 , R 2 は、マイクロチップ 1 a に収容された試薬と同様に、固形の試薬であり、核酸増幅反応において増幅核酸鎖を得るために必要な物質の少なくとも一部が含まれている。試薬 R 1 , R 2 の組成については、マイクロチップ 1 a に収容されている試薬 R 1 , R 2 と同一であるため、説明は省略する。マイクロチップ 1 b に収容された試薬 R 1 , R 2 について、マイクロチップ 1 a における試薬 R 1 , R 2 と異なる点は、ウェル 4 3 に収容された試薬のうち一部が、ウェル 4 3 内に固着されていることである（図 5 参照）。

【 0 0 4 2 】

5 . 本技術の第二実施形態に係る核酸増幅反应用マイクロチップの製造方法

マイクロチップ 1 b の製造方法について、図 6 に示すフローチャートを参照して説明する。基板層の成形工程 S 1 、試薬液の調製工程 S 2 、基板層の貼り合わせ工程 S 5 、の各工程については、第一実施形態と同一であるため、説明は省略し、試薬液の固着化工程 S 3 b 及び試薬の収容工程 S 4 について説明する。

【 0 0 4 3 】

(1) 試薬液の固着化

図 6 中、符号 S 3 b は、試薬液の固着化工程である。本工程では、調製工程 S 2 で用意された複数種類の試薬液のうち、1 種類の試薬液をウェル 4 3 内に固着化する。すなわち、試薬液をウェル 4 3 内で乾燥させ、乾燥状態となった試薬液がウェル内に固着された状態にする工程である。固着化工程 S 3 b については、図 6 に示すように「試薬液の滴下」の工程 S 3 b - 1、「真空乾燥」の工程 S 3 b - 2、の順に説明する。また、マイクロチップ 1 b の製造においては、試薬液の固着化工程 S 3 b に用いない他の試薬液は、第一実施形態と同様に試薬液の固化工程 S 3 a によって、固形状にする。

【 0 0 4 4 】

[試薬液 (R 2) の滴下の工程 S 3 b - 1]

本工程では、前述の、試薬液の調製工程 S 2 において調製された試薬液のうち、1 種類の試薬液を、基板層の成形工程 S 1 において基板層 1 2 等に形成された各ウェルに滴下する。この時、ウェルが形成された基板層 1 2 は、冷却されていることが好ましい。

【 0 0 4 5 】

[真空乾燥の工程 S 3 b - 2]

本工程では、前述の試薬液が滴下された基板層 1 2 を真空下 (6 0 0 - 1 0 0 0 P a) に置き、試薬液を乾燥させる。第一実施形態における試薬液の固化工程 S 3 a と異なり、本工程では基板層 1 2 を変形させない乾燥方法を選択する必要がある。例えば、真空乾燥が好適である。乾燥方法については、その他、試薬液に含まれる物質の性質に合わせて、風乾とすることも可能である。

【 0 0 4 6 】

(2) 試薬の収容

図 6 中、符号 S 4 は、試薬の収容工程である。前述の試薬液の固着化工程 S 3 b の結果、第一実施形態とは異なり、マイクロチップ 1 b においては試薬 R 2 がウェル 4 3 内に存在する。本工程では、この試薬 R 2 が予め固着化されたウェルに、別途、試薬液の固化工程 S 3 a により用意した試薬 R 1 を収容する。マイクロチップ 1 b に収容する固化された試薬 R 1 は、1 種類には限定されず、任意とできる。

【 0 0 4 7 】

本技術に係るマイクロチップ 1 b では、核酸増幅反応に必要な物質の一部を含む試薬 R 1 , R 2 が、分析場であるウェル 4 1 ~ 4 5 内に予め保持されている。このため、マイクロチップ 1 a と同様に、マイクロチップ 1 b を用いて核酸増幅反応を行う際には、核酸増幅反応に必要な残りの物質と標的核酸鎖を含む試料溶液のみをウェル 4 1 ~ 4 5 内に導入すれば良く、簡便に核酸増幅反応を行うことができる。また、ウェル 4 1 ~ 4 5 内に保持された組成の異なる複数の固形状の試薬 R 1 , R 2 に含まれる成分は、核酸増幅反応の開始時まで分離した状態が維持される。このため、例えば酵素とプライマーとを、各々試薬 R 1 と試薬 R 2 に含む成分とすることによって、プライマーダイマー等の発生による核酸

10

20

30

40

50

の非特異的増幅が抑制が可能となる。

【 0 0 4 8 】

6 . 本技術の第三実施形態に係る核酸増幅反応用マイクロチップの構成

図 7 に、第三実施形態に係るマイクロチップ 1 c のウェルに収容された試薬 R について、ウェル 4 3 を代表として模式的に示す。マイクロチップ 1 c は、ウェル 4 3 等の各ウェルに収容されている試薬 R 以外の構成については、第一実施形態と同一である。第一実施形態と同一の構成については、同一の符号を付し説明については、省略する。また、マイクロチップ 1 c を構成する基板層 1 1 , 1 2 , 1 3 の材料は、マイクロチップ 1 a において同一の符号を付した基板層と同じである。

【 0 0 4 9 】

マイクロチップ 1 c のウェル 4 3 には、核酸増幅反応において増幅核酸鎖を得るために必要な物質の少なくとも一部が含まれている試薬 R が固着されている (図 7) 。試薬 R に含まれる核酸増幅反応に必要な成分は、1 種類であっても良く、複数種類であっても良い。

【 0 0 5 0 】

マイクロチップ 1 c の製造工程では、基板層の成形工程 S 1 、試薬液の調製工程 S 2 、及び基板層の貼り合わせ工程 S 5 については、第一実施形態と同様であり、説明は省略する。試薬液をウェル 4 3 に固着化させる工程については、第二実施形態の、試薬液の固着化工程 S 3 b と同様に、所定の組成に調製された試薬液を基板層 1 2 に設けられた各ウェルに滴下し、真空乾燥等によって試薬液をウェル 4 3 内に固着化させる。

【 0 0 5 1 】

試薬液の滴下の際、調製された試薬液は、冷温に保存されていることが好ましい。また、各ウェルが形成された基板層 1 2 も冷温に保存されることが好ましい。例えば、予めアルミブロックなどの基板層 1 2 を保持する器具を冷凍庫で冷やしておき、冷却された器具の上に基板層 1 2 を置き、試薬液の滴下を行っても良い。マイクロチップ 1 c において、ウェル 4 3 等に固着化される試薬 R は、1 種類であっても良く、組成の異なる試薬 R 1 , R 2 としても良い。複数の試薬 R 1 , R 2 をウェル 4 3 内に固着化させる場合は、いずれか一の試薬液をウェル 4 3 内に滴下し、真空乾燥等により固着化させ、その固着化された試薬 R 1 の上に、次の試薬液を滴下し乾燥させ、この滴下と乾燥の工程を繰り返しても良い。

【 0 0 5 2 】

試薬液の調製工程から試薬液の乾燥工程の開始まで、試薬液を低温に保つことによって、試薬液に含まれる核酸増幅反応に必要な成分において、物質の結合や酵素の活性が抑えられる。このため、プライマーダイマー等の発生が抑制され、核酸の非特異的増幅が低減する。

【 0 0 5 3 】

なお本技術は、以下のような構成もとることができる。

(1) 核酸増幅反応に必要な物質のうち、少なくとも一部を含む試薬液を乾燥させる固化工程と、固化された該試薬液を核酸増幅反応の反応場であるウェルに配置する収容工程と、を含む、核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

(2) 前記固化工程は、前記試薬液を凍結乾燥する工程を含む、上記 (1) 記載の核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

(3) 前記固化工程の前に、組成の異なる複数の前記試薬液を用意する調製工程を含み、該試薬液には、オリゴヌクレオチドプライマーを含んで酵素を含まない第 1 の試薬液と、酵素含んでオリゴヌクレオチドプライマーを含まない第 2 の試薬液と、が含まれる、上記 (1) 又は (2) 記載の核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

(4) 前記固化工程は、前記第 1 の試薬液と前記第 2 の試薬液とを別個に凍結乾燥する工程を含む、上記 (3) 記載の核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

(5) 前記収容工程は、複数の前記ウェルの各々に、固化された、2 種類以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含む前記第 1 の試薬液を収容する工程を含む、上記 (3) 又は

10

20

30

40

50

(4) 記載の核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

(6) 前記第1の試薬液と前記第2の試薬液のうち、何れか一の試薬液を前記固化工程によって固化し、前記収容工程の前に、前記固化工程に用いていない試薬液を前記ウェルに滴下して、該ウェル内で乾燥させる固着化工程を含む、上記(3)記載の核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

(7) 前記固着化工程は、前記試薬液を真空乾燥する工程を含む、上記(6)記載の核酸増幅反応用マイクロチップの製造方法。

【実施例】

【0054】

<実施例1>

1. 核酸増幅反応における非特異的増幅の検出

本技術に係るマイクロチップを用いた核酸増幅反応における、核酸鎖の非特異的増幅の抑制について、検証した。

【0055】

[材料及び方法]

1. マイクロチップの製造

本実施例に使用したマイクロチップは、内部に収容される試薬の作製方法等が異なる4種類のマイクロチップである。4種類のいずれのマイクロチップについても、PDMS製及びガラス製の基板を材料に用いた。また、本実施例で行う核酸増幅反応に必要な試薬として、インフルエンザA型の増幅に用いる4種類のプライマー、Bst DNAポリメラーゼ、dNTPs、反応緩衝液を用意した。試薬液の調製工程から収容工程までは、各々のマイクロチップごとに下記に説明する。

【0056】

<1> マイクロチップ1

本技術に係る核酸増幅反応用マイクロチップの比較例として、マイクロチップ1(以下、M1と称する)を製造した。M1の製造においては、4種類のプライマー、Bst DNAポリメラーゼ、dNTPs、及び反応緩衝液を含む試薬液を調製した。基板層に成形されたウェル内に1.2μlの試薬液を滴下し、約2時間の真空乾燥(約1000Pa)処理によってウェル内に試薬液を固着化させた。

【0057】

<2> マイクロチップ2

マイクロチップ2(以下、M2と称する)は、固化された試薬がウェル内に収容されたマイクロチップである。M2の製造においては、4種類のプライマー、Bst DNAポリメラーゼ、dNTPs、及び反応緩衝液を含む試薬液の調製は、氷上に固化用容器を置いて冷却しながら行った。1.2μlの試薬液が入った固化用容器を、-40℃に6時間以上置いて、試薬液を凍結させた。試薬液が凍結した後、固化用容器を、凍結乾燥機(FDU-2200, EYELA)にセットした。試薬液の凍結状態を保ったまま、真空下(約6~8Pa)で、試薬液の乾燥を12時間以上行った。その後、ドライチャンバーの温度を30℃に設定し、試薬液の乾燥をさらに6時間以上行った。凍結乾燥によって固化された試薬は、固化用容器から取り出し、基板層に成形されたウェルに収容した。

【0058】

<3> マイクロチップ3

マイクロチップ3(以下、M3と称する)は、含有する物質の異なる複数の固化された試薬がウェル内に収容されたマイクロチップである。M3の製造においては、4種類のプライマー、Bst DNAポリメラーゼ、dNTPs、及び反応緩衝液の核酸増幅反応に必要な成分のうち、プライマーを含む試薬液(以下、FluAと称する)を冷却しながら調製した。また、Bst DNAポリメラーゼ、dNTPs、及び反応緩衝液を含む試薬液(以下、RMと称する)についても、冷却しながら調製した。調製した試薬液を、FluAについては0.4μl、RMについては0.8μl、別の固化用容器に滴下した。固化用容器に入れた各々の試薬液を、M2と同様に、凍結乾燥によって固化した。固化され

10

20

30

40

50

た F l u A 及び R M を、固化用容器から取り出し、一のウェルに両方が収容されるように、各々基板層に成形されたウェルに収容した。

【 0 0 5 9 】

< 4 > マイクロチップ 4

マイクロチップ 4 (以下、M 4 と称する) は、複数回に分けて、含有する成分の異なる試薬液がウェル内に固着化されたマイクロチップである。M 4 の製造においては、M 3 と同様に、試薬液 F l u A と試薬液 R M を調製した。0 . 4 μ l の F l u A をウェル内へ滴下し、M 1 と同様に真空乾燥によってウェル内へ固着させた。F l u A が固着されたウェルを有する基板層を冷却し、低温に保った状態で、F l u A が固着されたウェルに 0 . 8 μ l の R M を滴下した。再び、M 1 と同様に真空乾燥を行い、R M をウェル内に固着させた。

10

【 0 0 6 0 】

以上 4 種類の、試薬が収容、又は固着化されたウェルを有する基板層については、ウェルを封止するために、他の基板層を貼り合わせた。酸素プラズマ照射 (O ₂ : 1 0 c c , R F 出力 : 1 0 0 W , R F 照射時間 : 3 0 秒) により、各基板層の表面を処理し、真空中で貼り合わせ、マイクロチップ M 1 ~ 4 を完成させた。

【 0 0 6 1 】

2 . 核酸増幅反応

上記の工程によって製造されたマイクロチップ M 1 ~ 4 を用いて、核酸増幅反応を行った。核酸増幅には L A M P 法を用いた。M 1 から M 4 に試料溶液を導入し、6 3 において核酸増幅反応を行った。試料溶液には、A 型インフルエンザ陽性検体 (ポジティブコントロール , 以下、P C と称する) と、A 型インフルエンザ陰性検体 (ネガティブコントロール , 以下、N C と称する) と、水 (ノンテンプレートコントロール , 以下、N T C と称する) を用いた。増幅核酸鎖の検出は蛍光検出によって行い、検出用試薬として S Y B R G r e e n を用いた。

20

【 0 0 6 2 】

[結果]

図 8 に本実施例の結果を示す。図 8 は、M 1 ~ 4 の各マイクロチップにおいて、核酸増幅の開始を、試料溶液ごとに示す。核酸増幅の開始の時刻は、S Y B R G r e e n によって得られた蛍光強度をプロットした増幅曲線が、立ち上がって所定の閾値に達した時と定義した。なお、図 8 に示す M 1 ' は、M 1 と同一の製造工程によって製造されたマイクロチップであり、M 1 と同様に核酸増幅反応に用いた。

30

【 0 0 6 3 】

核酸増幅反応の結果、M 1 ~ 4 のマイクロチップ (M 1 については、M 1 ' を参照) において、P C を導入したウェルでの核酸増幅が検出された。すなわち、ウェルに収容された試薬は、核酸増幅反応に使用可能な状態で保存されていることが示された。一方、N C 及び N T C が導入された M 1 ~ 4 のマイクロチップのウェルにおいても、核酸の増幅が観察された。これは、マイクロチップ M 1 ~ M 4 のウェル内で核酸鎖の非特異的増幅が起きたことを示している。本実施例で行った核酸増幅反応において、核酸の鋳型核酸鎖に特異的な増幅は、核酸増幅反応開始後 3 0 分以内に検出されている (図 8) 。そのため、本来、核酸増幅が生じないはずの N C 及び N T C が導入されたウェルにおいて、反応開始後 3 0 分以内に核酸増幅が生じることは、マイクロチップを用いて行う解析に支障をきたす。

40

【 0 0 6 4 】

図 8 に示すように、M 3 における非特異的な核酸増幅の開始は、核酸増幅反応開始後 5 0 分以降であった。一方、比較例である M 1 における非特異的な核酸増幅の開始は、反応開始後 2 0 分程度から検出されている。この結果から、M 3 を用いた核酸増幅反応では、非特異的な核酸増幅が抑制されていることが示された。

【 0 0 6 5 】

M 2 と M 4 における、非特異的な核酸増幅の開始は、一部のウェルにおいては、3 0 分を過ぎたあたりであった。M 3 の結果に比べ、M 2 及び M 4 の結果では、非特異的な核酸

50

増幅の開始時刻が早かった。しかし、核酸増幅反応開始後 30 分以内に、NTC 及び NC において核酸増幅は認められなかった。この結果から、M2 及び M4 では、M1 (比較例) に比べ、非特異的な核酸増幅は抑制されていることが示された。また、M2 及び M4 における非特異的な核酸増幅の抑制効果は、同程度であった。

【0066】

本実施例の結果から、核酸増幅反応に必要な物質を含む試薬がウェルに収容されたマイクロチップを用いることにより、核酸増幅反応において非特異的な核酸増幅の抑制が確認された。特に、プライマーを含んで酵素を含まない試薬液と、酵素を含んでプライマーを含まない試薬液とが、各々固化されてウェルに封止されているマイクロチップ (M3) においては、非特異的な核酸増幅が大きく抑制された。すなわち、本技術に係るマイクロチップの製造法によって製造されたマイクロチップでは、非特異的な核酸増幅が低減し、分析の精度が向上していた。

10

【0067】

また、酵素とプライマーとを含む固相状の試薬が収容されたマイクロチップ (M2) や、プライマーを含む試薬が固着化されたウェルに酵素を含む試薬液が滴下されて作製されたマイクロチップ (M4) においても、比較例 (M1) に比べ、非特異的な核酸増幅反応が抑制されていることが観察された。これは、マイクロチップの製造工程において、冷却状態の酵素とプライマーが混合された後に乾燥された試薬を用いて行う核酸増幅反応において、非特異的な核酸増幅反応が抑制されたことを示している。以上から、本技術に係る核酸増幅反应用マイクロチップは、試料溶液等を導入することのみで簡便に分析が行える上、非特異的な核酸増幅が抑制されるため、精度が高い分析が可能であることが確認された。

20

【産業上の利用可能性】

【0068】

本技術に係る核酸増幅反应用マイクロチップによれば、簡便かつ高精度に核酸増幅による分析を行うことができる。そのため、臨床における遺伝子型判定や感染病原体判定などのための核酸増幅を行う装置として、本技術に係る核酸増幅反应用マイクロチップは用いられ得る。

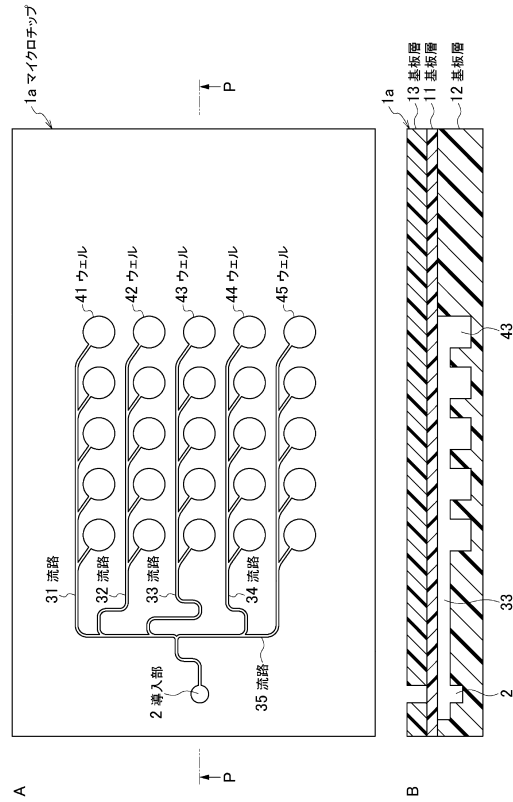
【符号の説明】

【0069】

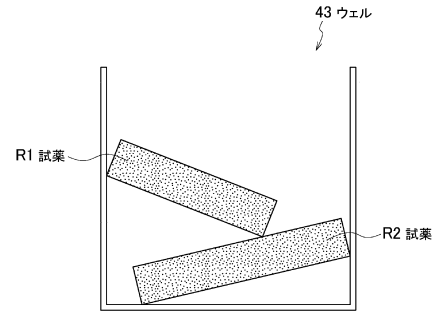
R, R1, R2 : 試薬、1a, 1a-2, 1b, 1c : マイクロチップ、11, 12, 13 : 基板層、2 : 導入部、31, 32, 33, 34, 35 : 流路、41, 42, 43, 44, 45 : ウェル

30

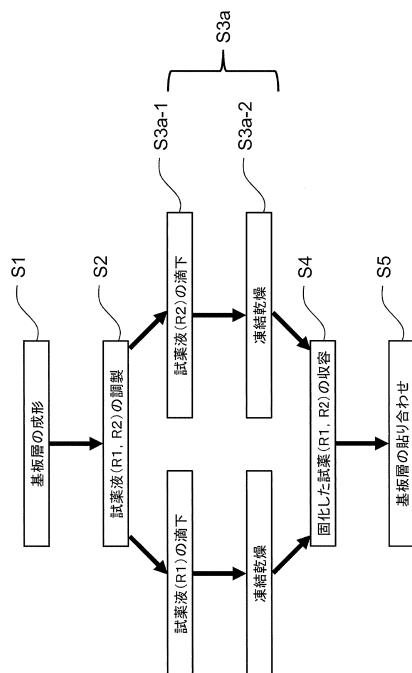
【図 1】



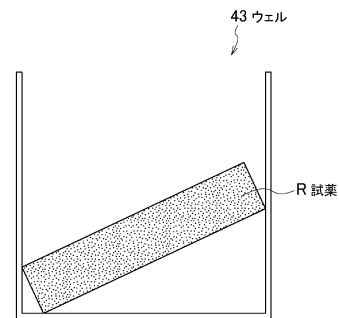
【図 2】



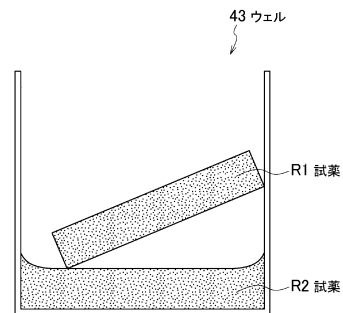
【図 3】



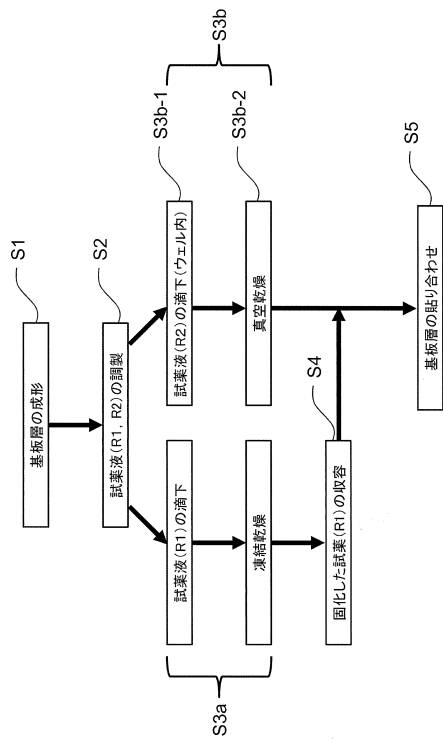
【図 4】



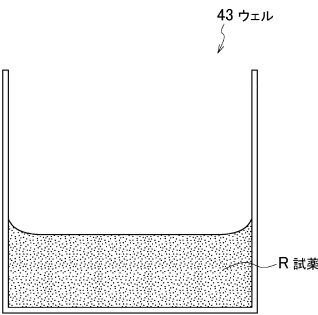
【図 5】



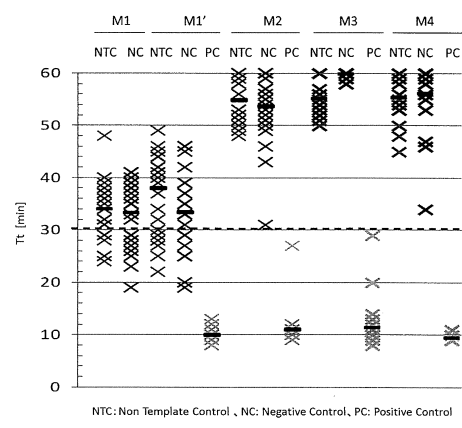
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2011/099251(WO,A1)

特開2012-024072(JP,A)

特表2010-502199(JP,A)

国際公開第00/070973(WO,A1)

特開平10-234822(JP,A)

特開平08-291078(JP,A)

特開平03-118328(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12M 1/00

C12N 15/09

G01N 37/00

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

DWPI(Thomson Innovation)