

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3867889号
(P3867889)

(45) 発行日 平成19年1月17日(2007. 1. 17)

(24) 登録日 平成18年10月20日(2006. 10. 20)

(51) Int. Cl.

F 2 5 B 21/02 (2006. 01)

F I

F 2 5 B 21/02

Z

請求項の数 14 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2000-611719 (P2000-611719)	(73) 特許権者	502151772
(86) (22) 出願日	平成12年4月5日(2000. 4. 5)		アナリティック イエナ アーゲー
(65) 公表番号	特表2002-542445 (P2002-542445A)		ドイツ連邦共和国 イエナ ディー-0 7
(43) 公表日	平成14年12月10日(2002. 12. 10)		7 4 5 コンラート-ツーゼーシュトラ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/003224		セ 1
(87) 国際公開番号	W02000/061797	(74) 代理人	100061284
(87) 国際公開日	平成12年10月19日(2000. 10. 19)		弁理士 斎藤 侑
審査請求日	平成15年3月6日(2003. 3. 6)	(74) 代理人	100088052
(31) 優先権主張番号	99106900.6		弁理士 伊藤 文彦
(32) 優先日	平成11年4月8日(1999. 4. 8)	(72) 発明者	トレチャコフ, アレクサンドル
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ドイツ連邦共和国 ディー-0 7 7 4 5
			イエナ アム ヘレンベルゲ 1 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急速加熱ブロックヒートサイクラー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の試料を急速加熱ヒートサイクルに課する加熱ブロックヒートサイクラーにして、最も厚い部分において $50\ \mu\text{m}$ を超えない壁厚を有する円錐形坑井のアレイを有する変形可能な極薄壁多坑井板と、同様な形状の坑井のアレイを有する、低外形、低ヒートマス、低熱容量の試料ブロックとを有し、前記変形可能な極薄壁多坑井板の坑井の高さが前記低外形、低ヒートマス、低熱容量の試料ブロックの坑井の高さを超えないようになっている、複数の試料を保持する手段と、少なくとも一つの熱電気モジュールを含む前記低外形、低ヒートマス、低熱容量の試料ブロックを加熱冷却する手段と、移動可能な高圧加熱蓋とガasketを含む複数の試料をシールする手段とを有する加熱ブロックヒートサイクラー。

10

【請求項 2】

前記極薄壁多坑井板は、 $30\ \mu\text{m}$ を超えない壁厚を有する請求項 1 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 3】

前記試料ブロックは、主頂面と主底面とを有している請求項 1 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 4】

さらに前記ブロックの頂面に形成され、隔置された円錐形坑井のアレイを含む請求項 3 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 5】

20

前記ブロックが底面の面積につき 1 cm^2 当り 1.1 Joule/K を超えない熱負荷を有する請求項 3 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 6】

前記ブロックが底面の面積につき 1 cm^2 当り 0.6 Joule/K を超えない熱負荷を有する請求項 3 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 7】

前記熱電気モジュールは、モジュール表面の 6.5 Watt/cm^2 を超えない最大ヒートポンプ動力を有している請求項 1 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 8】

前記熱電気モジュールは、モジュール表面の 5 Watt/cm^2 を超えない最大ヒートポンプ動力を有している請求項 7 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。 10

【請求項 9】

前記熱電気モジュールは、モジュール表面の 3 Watt/cm^2 を超えない最大ヒートポンプ動力を有している請求項 7 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 10】

前記ブロックの温度は、少なくとも 10°C/sec および 6°C/sec の速度で急速にそれぞれ上昇あるいは下降させるようになっている請求項 1 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 11】

前記ブロックの温度は、少なくとも 8°C/sec および 5°C/sec の速度で急速にそれぞれ上昇あるいは下降させるようになっている請求項 1 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。 20

【請求項 12】

前記ブロックの温度は、少なくとも 6°C/sec および 4°C/sec の速度で急速にそれぞれ上昇あるいは下降させるようになっている請求項 1 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 13】

前記高圧加熱蓋が断熱ガスケットを有する請求項 1 に記載の加熱ブロックヒートサイクラー。

【請求項 14】

前記断熱ガスケットは、シリコンゴムガスケットである請求項 13 に記載の加熱蓋。 30

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、ポリメレーズの連鎖反応 (PCR) を自動的に実行させるためのヒートサイクラーに関し、特に急速ヒートサイクラーに関する。さらに具体的には、多種の少量試料の並行処理のための急速加熱ブロックヒートサイクラーに関する。

【0002】

本発明は、急速で、高い処理能力で、安価でそして便利な PCR ベースの DNA 診断の分析に特に有用である。 40

【0003】

【従来技術】

1985年に発刊された最初の報告書に始まってポリメレーズの連鎖反応から多数の方法ならびに診断分析法が展開されている。試料の温度サイクルは、PCRにおける中心モーメントである。近年、種々の急速ヒートサイクラーは、従来の加熱ブロックヒートサイクルの低処理速度で高試料容量を達成させるべく開発されている。これらのヒートサイクラーは、大まかに2つのクラスに分けられる。

1. 毛細管ヒートサイクラーは、試料を毛細管内に保持して、熱を対流あるいは伝導形式で毛細管の外面に供給している。詳細については、Wittwer, C.T.等の肛門生化学186、第328頁から第331頁 (1990年)、Friedman, N.A., Meldrum, D.R.の肛門生化学70、第299 50

7頁から第3002頁（1998年）ならびに米国特許No. 5, 455, 175を参照されたい。

2. ミクロ的に製造されたヒートサイクラーは、ミクロ的に製造された素子から構成されたヒートサイクラーであり、これらは、一体抵抗性加熱で供給され、受動的（あるいは能動的）に構造上外界へ破棄される熱でガラスあるいはシリコンをほぼエッチされた構造体である。しかしながら別のヒートサイクルの体系、例えば、試料の連続流ヒートサイクルなども使用される。詳細については、Northrup, M.A.等の変換器1993、第924頁から第926頁（1993年）、Taylor, T.B.等の核酸の研究25、第3164頁から第3168頁（1997年）、Kopp, M.U.等の科学280、第1046頁から第1048頁（1998年）、米国特許No. 5, 674, 742ならびに米国特許No. 5, 716, 842を参照されたい。

【0004】

急速ヒートサイクラーの双方のクラスは、リアクタの表面一体積比を増大させて使用するものであり、これにより微小試料（1から20 μ l）への熱伝達速度を増大させている。総DNA増幅時間が10から30分へ短縮される。従来の加熱ブロックヒートサイクラーは、20から100 μ lの試料の温度サイクルを完了するのに通常1から3時間か掛かる。しかしながら、このような有利性をもってしても、多数の短所もある。試薬とリアクタとの間の表面面積を増大すると、酵素の働きにロスが生ずる。さらに、DNAは、特にマグネシウムイオンおよびPCR混合物の標準成分である洗剤の存在下でリアクタのシリカ表面に非下逆的に吸収される。それゆえ、ガラスリアクタにおけるPCRは、担体たんぱく質（ウシ血清アルブミン）の添加ならびに反応混合物の組成の最適化が要される。

【0005】

これらリアクタの別の短所は、試料の装填と回収の方法が非常に複雑なことである。さらに、標準のピペット装置は、通常このようリアクタとの互換性がない。このような複雑で煩わしい手順は、手間の掛かるものであり、ヒートサイクラーの生産率を制限するものとなる。最後に、試薬のコストは、1~10 μ lへの容量の減少により低下するといっても、最終的なコストは、毛細管のコストが高く、又特にミクロ的に製造されたリアクタのコストが高い理由で、かなりのものとなる。

【0006】

それゆえ、広く普及しているプラスチックチューブや多坑井板に含まれる試料の従来の加熱ブロックヒートサイクル法の試料サイズおよび速度における基本性能を改良するための研究開発が現在まで多くなされていないことは不思議なことである。プラスチックチューブに充填された試料過熱ブロックヒートサイクルの改良は、Half等（生物工学 10, 106-112, 1991年および米国特許No. 5, 475, 610）が記述したものが知られている。Half等は、ポリプロピレン製マイクロ遠心機チューブすなわち薄壁PCRチューブなどの特殊PCR反応互換性一体チューブを開示している。このチューブは、円筒形の上方壁部分と、かなり薄い（すなわち約0.3mm）円錐形下方壁部分と、ドーム形の底部を有している。試料は、20 μ l程度の少量であり、チューブ内に置かれる。チューブを変形可能な機密キャップで閉じ、次いで加熱ブロック本体に機械加工で形成した同形状の円錐形坑井内に配置する。加熱したカバーで各キャップを圧縮し、各チューブがそれぞれの坑井に確実に下方に押し付けられるようにする。加熱プラテン（すなわち加熱した蓋）は、チューブのキャップに的確な圧力を与えることにより種々の目的が達成される。たとえば、円錐形の壁がブロック本体と熱的にしっかり接触維持され、昇温したチューブ中に生ずる上昇空気圧力によるキャップの開きを防止する。さらに、ブロックの頂面から突出するチューブ部分を90~100°Cに保持して、水の凝縮を防止し、ヒートサイクルの課程での試料のロスを防止する。これにより蒸発を防止し、ヒートマスを増大させる鉱水やグリセロールを用いてチューブへの熱の伝達や試料の試料の配置などを改良するために、これら鉱水やグリセロールを加熱ブロックの坑井内に配置する必要性がなくなる。さらに、PCRチューブは、8x12, 96坑井のマイクロプレート形式のツーピースホルダ（米国特許No.5, 710, 381）に配置することができる。このツーピースホルダを使用すれば、1から96の個々の反応チューブのいずれの数での必要な高試料生産が可能となる。従来のマイクロ遠心機チューブと比較するに、薄壁0.2ml PCRチューブを使用すると、6~10時間掛かっていた反応時間が2~4時間に

10

20

30

40

50

短縮させることができる。またDE4022792に薄壁ポリカーボネートマイクロプレートを使用すると4時間以下に反応時間を短縮可能であることが開示されている。市販の熱電気（ペルチエ効果）加熱ブロックヒートサイクラーの傾斜率（例えば3～4℃/sec）に関する最近の改良では、総反応時間にかなりの割合で影響するものはない。さらに、傾斜率をさらに増大しても、薄壁PCRチューブに容れた試料への熱の伝達の割合が制限されているので実用的価値を見出さない（W098/43740参照）。

【0007】

【発明が解決しようとしている課題】

本発明は、プラスチックマイクロプレートでPCRを実施するための従来の加熱ブロックヒートサイクラー同様なものであるが（例えばW098/43740およびDE402279参照）、従来のものと比べて10～30分で1～20μlの試料の30サイクルPCRを実行することができる手段が提供されている。さらに簡便で高生産の多種の少量試料のオイルフリー温度サイクルを廉価で行う急速加熱ブロックヒートサイクラーを提供している。

10

【0008】

【課題を解決する手段】

従って本発明は、複数の試料を急速温度サイクルに課する加熱ブロックヒートサイクラーに関し、

円錐形坑井のアレイを有する極薄壁多坑井板と、同様な形状の坑井のアレイを有する低ヒートマス試料ブロックとを有し、多坑井板の坑井の高さが試料ブロックの坑井の高さを超えないようになっている、複数の試料を保持する手段と、
少なくとも一つの熱電気モジュールを含む試料ブロックを加熱冷却する手段と、
高圧加熱蓋を含む複数の試料をシールする手段と
を有する加熱ブロックヒートサイクラーが提供される。

20

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の好適実施例を添付図を参照して説明する。

本発明の第1の概念は、低外形の高試料密度極薄壁多坑井板1のかなり改良されたものであり、すなわち米国特許No.5, 475, 610およびDE4022792と比較するに小さな低ヒートマスの生物試料（例えば1～20μl）5に10倍の熱伝達を可能とする。この板は、例えば、薄い熱可塑性フィルムを種々の熱成形法により製造される。このような熱可塑性フィルムは、例えば、メタロセン触媒により得られたポリオレフィンフィルムおよび/もしくは共重合フィルムなどのポリオレフィンフィルムである。通常、多坑井板は、非配向、ポリプロピレンーポリエチレン共重合フィルムあるいはメタロセン触媒により得られた成形ポリプロピレンフィルムを真空成形により得られる。このフィルムは、本体に矩形あるいは正方形配列で機械加工された複数の隔置された円錐形坑井をネガティブ成形型（メス型）内で成形される。円錐形坑井を真空成形したフィルムの厚さは、熱成形のためのスタンダード規格により選定される。すなわち、

30

フィルムの厚さ＝坑井延伸比 × 成形坑井の壁の厚さ
である。

【0010】

例えば、延伸比が2で壁の平均厚さが30ミクロンの真空成形坑井は、フィルム厚さが60ミクロンとなる。最適平均壁厚さは、20～40ミクロンであることが判明した。延伸比は、通常2～3である。フィルムの厚さは、通常50～80ミクロンである。小さなドーム形底部の厚さは、通常10～15ミクロンである。DE402279に記載の熱伝達方程式を用いて、熱伝達率は、米国特許No. 5, 475, 610およびDE4022792と比較すると約10倍増大している。

40

【0011】

坑井の容積は、40μlを超えず、好ましくは、16～25μlあり、坑井の高さは、3.8mmを超えず、坑井の開口径は、4mmを超えず、坑井間隔は通常工業規格の4.5mmである。通常坑井板は、真空成形されるもので、坑井の数は、36個（6x6）、64個（8x8）あるいは96

50

個(8x12)である。図1に図示のように、該板に熱接着された0.5~1mm厚の剛性プラスチックフレーム3により、多坑井2を有する板1は取扱いが容易である。しかしながら、小さな寸法の板(36個と64個の坑井)では、上記フレームを有する板は、真空成形下で一体片として製造される。成形サイクルは、非常に短く、15~20秒である。これにより、単一型真空成形装置を用いて、8時間の手作業で一作業員あたり約1000枚製造が可能である。極薄壁板に入れられた少量試料(3~10 μ l)の温度は、1~3秒間で試料ブロック4の温度に等しくなる。これに比較するに、試料を従来の薄壁PCRチューブに入れた場合に例えば25mlの試料の温度が試料ブロックの温度と等しくなるのに15~20秒掛かる。多種試料の急速温度サイクルのための比較的大開口径(すなわち4mm径)低外形の板を使用する基本的な効果は、少量の試料が従来のピペット装置で坑井にすばやく正確に配置できる点である。この場合、毛細管やマイクロリアクタの手間の非常にかかる装填方法に比べて、特に熟練技術の必要がない。

10

【0012】

本発明の第2の概念は、多坑井板を保持するために低外形で低熱容量の、すなわち例えば工業規格の銀製試料ブロックの使用に関する。試料ブロック4は、主頂面と主底面を有する。隔置した試料坑井の配列は、ブロックの頂面に形成される。通常ブロックの高さは、4mmを超えない。36~96坑井板を保持するブロックの熱容量は、4.5~12Joule/Kである。ブロックは、平均0.5~0.6Joule/Kのヒートマス負荷を熱電気モジュール12の表面1cm²に与える。モジュール表面積の最大熱ポンプ能力が5~6Watt/cm²を有する工業規格の高温一段熱電気モジュールを使用することにより、試料ブロックの温度は、傾斜率が5~10°C/sec(図3)で変化させることができる。通常、単一の工業規格熱電気モジュール、すなわち30mm x 30mmと40mm x 40mmのものは、それぞれ36と64坑井板を用いた温度サイクルで使用される。加熱および冷却用の単一熱電気モジュールは、複数のモジュールを使用する場合と比較した場合に、その高さの違いの理由で、モジュール12と試料ブロック4との間、モジュールと空冷ヒートシンク13との間での熱接触が改良されるという効果がある。応答時間が0.01秒を超えない熱電対14を用いて試料ブロック4の温度を感知する。銅のヒートシンク13のヒートマスは、通常500~700Joule/Kの範囲にある。試料ブロック4のヒートマスと比較してヒートシンク13のヒートマスが比較的大きく、これにより急速ヒートサイクル最中におけるヒートシンク13に課せられる平均熱負荷の増大を補償できる。プログラム方式の制御器10が試料ブロックの正確な時間および温度制御をつかさどるために使用されている。

20

30

【0013】

本発明の第3の概念は、加熱した蓋利用技術による少量試料5の有効かつ再現性ある密封を確実にするため、円錐形坑井2の高さを、ヒートサイクラーの試料ブロック4の本体に機械加工で形成された同形状の坑井の高さ以上としないようにすることに関する。坑井板の坑井の底の面積が小さいために、坑井板の坑井の底と試料ブロック本体との間で密な熱接触をさせる必要がない。この点は、DE4022792と対照的である。DE40722792では、大きな球形底面に確実にはめ込んで熱伝達を効率的にする必要があった。よって、図2に図示のように、坑井の幾何学形状が多坑井板1全体を試料ブロック4中に位置決めを可能としている。この場合、加熱蓋のねじ機構6により生ずる圧力が、試料ブロック4の頂面に支持された多坑井板の部分に直接作用し、PCRチューブやPCR板(米国特許No.5475610)の場合がそうであったような板の坑井の薄壁には作用しない。この作用効果のため、従来使用していた圧力、坑井あたり30~50g、に比較して、円錐形の坑井が割れることなく加熱蓋の密封圧力が数倍(5~10倍)に増大可能である。米国特許No.5,508,197に記載の高圧加熱蓋と比較して、ここに示す蓋は、坑井を個々に密封するが、坑井板の縁のみを密封するものではない。よって、多坑井板あたり単一の試料であっても試料ロス無く増幅することができる。坑井の極薄壁と試料ブロック4の本体との密な熱接触が、昇温で密封坑井内で生ずる圧力増大により自動的に達成される。高圧加熱蓋は、ねじ機構6と、加熱金属板7と、金属板7から試料ブロック4を絶縁する熱絶縁ガasket8とで構成される。従来、金属板7は、抵抗性加熱温度で加熱され、その熱は、サーミスタ9で感知され、プログラム方式の制御器1

40

50

0で制御されていた。ガスケット8は、通常1.5～2mmの厚さのシリコンゴムガスケットである。このガスケットにより密封フィルム11を多坑井板1の頂面に密に押し付けることができ、金属板7から試料ブロック4を熱絶縁できる。密封フィルム11は、通常50ミクロンのポリプロピレンフィルムである。驚くべきことに、上述の坑井板を密封する手段により、試料の容量は、例えば、0.5 μ lと非常に少ないが、PCR効率を低下させずに容易に増幅できる。

【0014】

比較のため、従来の低圧加熱蓋（米国特許No.5,475,610）と高圧加熱蓋（米国特許No.5,508,197）は、最小容量が15～20 μ lの試料のオイルフリー温度サイクルに高信頼で使用可能である。しかしながら、工業規格形式で図2に示したような密封方法で弾性壁を有する極薄壁マイクロ板を用いれば、サイズと速度の上で従来の加熱ブロックヒートサイクラーの性能を改良できることは明白である。十分な合成を得るために、坑井板は、強化プラスチックフィルムよりマッチドダイ成形（打抜き）、整形ゴム工具成形、油圧成形などの技法で成形可能である。さらに、このような坑井板は、ソーピース部分でも形成できる。この場合、フレーム3は、坑井板の縁を支持するばかりでなく坑井2をそれぞれ支持する。この場合、坑井の高さは、フレームの底側から測定しなければならない。このようなフレームは、ロボット式の場合に好適なスカート付フレームとして製造できる。

【0015】

本発明による急速加熱ブロックサイクラー（図2）をヒト乳頭腫ウィルスDNAの455-ベース対の長断片の増幅に実験的にテストした。試料容量は、3 μ lであった。温度サイクルに使用した温度/時間曲線は、図3に示す。試料（すなわち何らの担体分子もない標準PCR混合物）は、従来のピペット機器で坑井板の坑井に移した。坑井板は、密封フィルム11で覆い、ヒートサイクラーの加熱ブロックに移し、図2に図示の加熱蓋により密閉した。密封時30PCRサイクル数で図3に図示の温度/時間曲線を使用して10分行った。加熱速度は、毎秒10℃とし、冷却速度は、毎秒6℃とした。PCR生成物は、従来のアガロース電気泳動法により解析した。455-ベース対の長DNA断片は、図示の傾斜率（上述）で高特性で増幅した。

【0016】

【発明の効果】

総括するに、本発明は、毛細管あるいはミクロン単位で製造した急速ヒートサイクラーと比較すると、かなりの作用効果がえられる。従来のピペット機器により多種少量試料を容易に極薄壁多坑井板に装填できる。またこれら試料は、高圧加熱蓋を用いて急速かつ効率的に密封できる。増幅時、試料は容易に覆うことができ、電気泳動放あるいは交雑による生成物の解析に具することができる。これにより高い生産増幅が可能である。最後に、標準PCR混合物が、BSAなどの担体を添加することなく急速温度サイクルに使用できる。つけたしの話でないが、使い捨て低廉価の極薄壁坑井板により総合経費のかなりの低減を可能とする。本発明による急速加熱ブロックヒートサイクラーが、すなわち例えば、多ブロックヒートサイクラー、交換式ブロックヒートサイクラー、温度勾配ヒートサイクラーなど種々の形式で製造可能であることは明白である。さらに384坑井板などの高試料密度板での反応を行う目的でも製造可能であることは明白である。

【0017】

以下は、本発明の例を示すものであるが、本発明を限定するものでない。

例

図2に示すごとく、複数の試料を急速温度サイクルに課する、本発明による加熱ブロックヒートサイクラーであり、以下の構成を有する。

1. 36坑井板
2. 16 μ l坑井
3. 0.5mm厚薄プラスチックフレーム
4. 3cm x 3cm試料ブロック（ヒートマス4.5Joule/K）
5. 3 μ l試料
6. 加熱蓋のねじ機構

- 7. 加熱青銅板 (厚さ5mm)
- 8. 熱絶縁1.5mm厚シリコンゴムガスケット
- 9. サーミスタ
- 10. プログラム方式制御器
- 11. 50 μ m厚ポリプロピレン密封フィルム
- 12. 57ワット熱電気モジュール (3cm x 3cmペルチェモジュール)
- 13. 空冷銅ヒートシンク (540Joul/k)
- 14. 約0.01秒の応答時間のサーモカップル

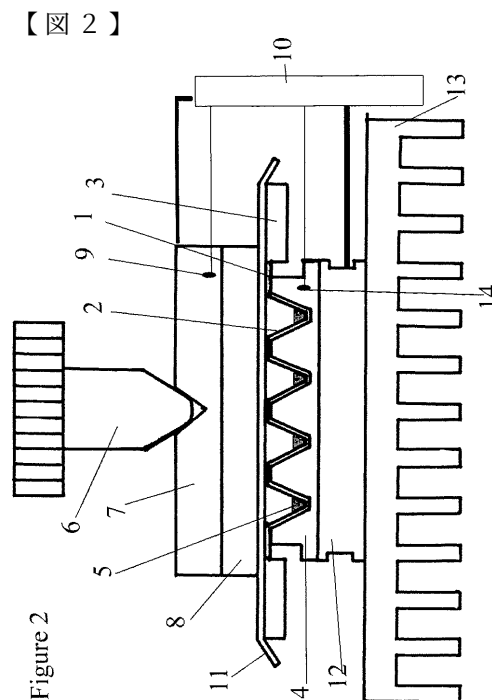
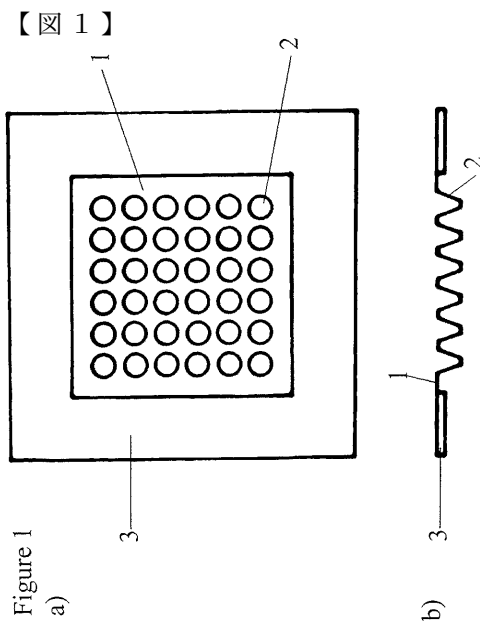
【図面の簡単な説明】

【図1】 極薄壁多坑井板を図示する。

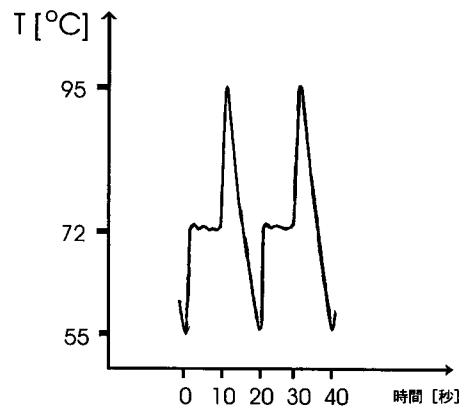
【図2】 急速加熱ブロックヒートサイクラーを図示する。

【図3】 試料ブロックの温度/時間のグラフを図示する。

10



【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 ザルーツ, ハンスーペーター
ドイツ連邦共和国 ディー07646 オーバーボトニッツ ドルフシュトラーセ 22

審査官 長崎 洋一

(56)参考文献 特開平07-005180 (JP, A)
特表平06-500727 (JP, A)
特開平07-151764 (JP, A)
特開平06-233670 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
F25B 21/02