

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6216494号  
(P6216494)

(45) 発行日 平成29年10月18日 (2017.10.18)

(24) 登録日 平成29年9月29日 (2017.9.29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 6 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2012-79766 (P2012-79766)	(73) 特許権者	000002369
(22) 出願日	平成24年3月30日 (2012.3.30)		セイコーエプソン株式会社
(65) 公開番号	特開2013-208067 (P2013-208067A)		東京都新宿区新宿四丁目1番6号
(43) 公開日	平成25年10月10日 (2013.10.10)	(74) 代理人	100090387
審査請求日	平成27年3月24日 (2015.3.24)		弁理士 布施 行夫
審判番号	不服2016-10435 (P2016-10435/J1)	(74) 代理人	100090398
審判請求日	平成28年7月11日 (2016.7.11)		弁理士 大淵 美千栄
		(72) 発明者	山口 明美
			長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内
		(72) 発明者	小枝 周史
			長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 熱サイクル装置及び熱サイクル装置の制御方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ホットスタートPCR酵素を含む反応液と、前記反応液とは比重が異なり、前記反応液とは混和しない液体とが充填され、前記反応液が移動する流路を含む反応容器を装着する装着部と、

前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記流路の第1領域を加熱する第1加熱部と、

前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記第1領域とは異なる前記流路の第2領域を加熱する第2加熱部と、

前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置を、前記装着部に前記反応容器を装着した場合に、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第1領域内となる第1の配置と、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第2領域内となる第2の配置との間で切替える駆動機構と、

前記駆動機構、前記第1加熱部及び前記第2加熱部を制御する制御部と、

を含み、

前記制御部は、

前記第1加熱部を第1温度に制御する第1処理と、

前記第2加熱部を前記第1温度よりも高い第2温度に制御する第2処理と、

前記第2処理の後に、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置が前記第2の配置で第1時間を経過させる第3処理と、

10

20

前記第 1 処理及び前記第 3 処理の後に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第 2 の配置で第 2 時間を経過した場合に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置を、前記第 2 の配置から前記第 1 の配置へと切換えるように前記駆動機構を制御する第 4 処理と、

を行う、熱サイクル装置。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の熱サイクル装置において、

前記制御部は、

前記第 4 処理の後に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第 1 の配置で第 3 時間を経過した場合に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置を、前記第 1 の配置から前記第 2 の配置へと切換えるように前記駆動機構を制御する第 5 処理と、前記第 4 処理とを所定回数繰り返して行う、熱サイクル装置。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の熱サイクル装置において、

前記制御部は、さらに、

前記第 1 加熱部を前記第 1 温度よりも低い第 3 温度に制御し、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第 1 の配置で第 4 時間を経過させる第 6 処理と、

前記第 6 処理及び前記第 2 処理の後に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置を、前記第 1 の配置から前記第 2 の配置へと切換えるように前記駆動機構を制御する第 7 処理と、

を行い、

前記第 7 処理の後に、前記第 3 処理を行う、熱サイクル装置。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の熱サイクル装置において、

前記駆動機構は、前記装着部に前記反応容器を装着した場合に前記流路を前記反応液が移動する方向に対して垂直な成分を有する回転軸の周りに回転させ、

前記装着部は、前記回転軸の延びる方向に複数配列され、

前記反応容器の複数が、それぞれ前記装着部に装着された場合に、それぞれの流路が互いに平行に配置される、熱サイクル装置。

【請求項 5】

熱サイクル装置の制御方法であって、

前記熱サイクル装置は、

ホットスタート P C R 酵素を含む反応液と、前記反応液とは比重が異なり、前記反応液とは混和しない液体とが充填され、前記反応液が移動する流路を含む反応容器を装着する装着部と、

前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記流路の第 1 領域を加熱する第 1 加熱部と、

前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記第 1 領域とは異なる前記流路の第 2 領域を加熱する第 2 加熱部と、

前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置を、前記装着部に前記反応容器を装着した場合に、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第 1 領域内となる第 1 の配置と、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第 2 領域内となる第 2 の配置との間で切換える駆動機構と、

を含み、

前記制御方法は、

前記第 1 加熱部を第 1 温度に制御する第 1 処理を行うことと、

前記第 2 加熱部を前記第 1 温度よりも高い第 2 温度に制御する第 2 処理を行うことと、

前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第 2 の配置で第 1 時間を経過させる第 3 処理を行うことと、

前記第 3 処理の後に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第

2の配置で第2時間を経過した場合に、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置を、前記第2の配置から前記第1の配置へと切換えるように前記駆動機構を制御する第4処理を行うことと、

を含む、熱サイクル装置の制御方法。

【請求項6】

請求項5に記載の熱サイクル装置の制御方法において、

前記駆動機構は、前記装着部に前記反応容器を装着した場合に前記流路を前記反応液が移動する方向に対して垂直な成分を有する回転軸の周りに回転させ、

前記装着部は、前記回転軸の延びる方向に複数配列され、

前記反応容器の複数が、それぞれ前記装着部に装着された場合に、それぞれの流路が互いに平行に配置される、熱サイクル装置の制御方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、熱サイクル装置及び熱サイクル装置の制御方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、遺伝子の利用技術の発展によって、遺伝子診断や遺伝子治療など遺伝子を利用した医療が注目されている他、農畜産分野においても品種判別や品種改良に遺伝子を用いた手法が多く開発されている。遺伝子を利用するための技術として、PCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応) 法などの技術が広く普及している。今日では、PCR法は生体物質の情報解明において必要不可欠な技術となっている。

20

【0003】

PCR法は、増幅の対象とする核酸(標的核酸)及び試薬を含む溶液(反応液)に熱サイクルを施すことで、標的核酸を増幅させる手法である。熱サイクルは、2段階以上の温度を周期的に反応液に施す処理である。PCR法においては、2段階又は3段階の熱サイクルを施す手法が一般的である。

【0004】

PCR法では一般に、チューブや生体試料反应用チップ(バイオチップ)と称する、生化学反応を行うための容器を使用する。しかしながら従来の手法においては、必要な試薬等の量が多く、また反応に必要な熱サイクルを実現するために装置が複雑化したり、反応に時間がかかったりするという問題があった。そのため微量の試薬や検体を用いてPCRを精度よく短時間で行うためのバイオチップや反応装置が必要とされていた。

30

【0005】

このような問題を解決するために、特許文献1には、反応液と、反応液と混和せず反応液よりも比重の小さい液体とが充填された生体試料反应用チップを、水平方向の回転軸の周りに回転させることで、反応液を移動させて熱サイクルを施す生体試料反応装置が開示されている。

【0006】

また、PCRにおける増幅の精度を向上させるために、PCRに用いる酵素(PCR酵素)を熱によって活性化させるホットスタートの工程を含むPCRが知られている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2009-136250号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

特許文献1に記載の装置は、バイオチップを連続して回転させることで反応液に熱サイクルを施していた。しかしながら、反応液は回転に伴ってバイオチップの流路内を移動す

50

るので、反応液を所望の温度に所望の時間保持したり、ホットスタートのように通常のPCRの熱サイクルとは異なる工程を含むPCRを実現したりするためには、さらなる工夫が必要であった。

【0009】

本発明は、以上のような問題点に鑑みてなされたものであり、本発明のいくつかの態様によれば、ホットスタートを含むPCRに適した熱サイクル装置及び熱サイクル装置の制御方法を提供することができる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(1) 本形態に係る熱サイクル装置は、ホットスタートPCR酵素を含む反応液と、前記反応液とは比重が異なり、かつ、前記反応液とは混和しない液体とが充填され、対向する内壁に前記反応液が近接して移動する流路を含む反応容器を装着する装着部と、前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記流路の第1領域を加熱する第1加熱部と、前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記第1領域とは異なる前記流路の第2領域を加熱する第2加熱部と、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置を、前記装着部に前記反応容器を装着した場合に、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第1領域内となる第1の配置と、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第2領域内となる第2の配置との間で切替える駆動機構と、前記駆動機構、前記第1加熱部及び前記第2加熱部を制御する制御部と、を含み、前記制御部は、前記第1加熱部を第1温度に制御する第1処理と、前記第2加熱部を前記第1温度よりも高い第2温度に制御する第2処理と、前記第2処理の後に、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置が前記第2の配置で第1時間を経過させる第3処理と、前記第1処理及び前記第3処理の後に、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置が前記第2の配置で第2時間を経過した場合に、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置を、前記第2の配置から前記第1の配置へと切替えるように前記駆動機構を制御する第4処理と、を行う。

【0011】

本形態によれば、装着部、第1加熱部及び第2加熱部の配置を切り換えることで、反応容器が第1の配置に保持された状態と、反応容器が第2の配置に保持された状態とを切り換えることができる。第1の配置は、反応容器を構成する流路の第1領域が、重力の作用する方向における流路の最下部に位置する配置である。第2の配置は、反応容器を構成する流路の第2領域が、重力の作用する方向における流路の最下部に位置する配置である。すなわち、反応液の比重が相対的に大きい場合には、重力の作用によって第1の配置においては反応液を第1領域に、第2の配置においては反応液を第2領域に保持できる。第1領域は第1加熱部によって加熱され、第2領域は第2加熱部によって加熱されるので、第1領域と第2領域とは異なる温度とすることができる。したがって、第1の配置又は第2の配置に反応容器を保持する間、反応液を所定の温度に保持できるので、加熱時間を容易に制御可能な熱サイクル装置を提供できる。また、第3処理及び第4処理では反応液が第2温度に保持され、第4処理の後に反応液が第2温度よりも低い第1温度に保持される。この熱サイクル装置をPCRに適用する場合には、第1温度がアニーリング及び伸長温度、第2温度がDNAの熱変性温度に対応する。一般に、PCR酵素を活性化させる温度は、熱変性温度と同程度である。したがって、第3処理を行うことによって、通常のPCRの熱サイクルに加えて、PCRのホットスタートを行うことができる熱サイクルを実現できる。

【0012】

(2) 上述の熱サイクル装置において、前記制御部は、前記第4処理の後に、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置が前記第1の配置で第3時間を経過した場合に、前記装着部、前記第1加熱部及び前記第2加熱部の配置を、前記第1の配置から前記第2の配置へと切替えるように前記駆動機構を制御する第5処理と、前記第4処理とを所定回数繰り返して行なってもよい。

## 【 0 0 1 3 】

第 4 処理では第 2 の配置で第 2 時間を経過するまで反応液が第 2 温度に保持され、第 5 処理では第 1 の配置で第 3 時間を経過するまで反応液が第 1 温度に保持される。したがって、P C R に適した熱サイクルを所定回数繰り返して行うことができる。

## 【 0 0 1 4 】

( 3 ) 上述の熱サイクル装置において、前記制御部は、さらに、前記第 1 加熱部を前記第 1 温度よりも低い第 3 温度に制御し、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第 1 の配置で第 4 時間を経過させる第 6 処理と、前記第 6 処理及び前記第 2 処理の後に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置を、前記第 1 の配置から前記第 2 の配置へと切換えるように前記駆動機構を制御する第 7 処理と、を行い、前記第 7 処理の後に、前記第 3 処理を行なってもよい。

10

## 【 0 0 1 5 】

第 7 処理では反応液が第 1 温度よりも低い第 3 温度に保持される。第 3 温度としては、R T - P C R ( 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 ) における逆転写反応が進行する温度とすることができる。したがって、第 3 処理に先立って第 7 処理を行うことによって、P C R の前に逆転写反応を行うことができるので、R T - P C R に適した熱サイクル装置を実現できる。

## 【 0 0 1 6 】

( 4 ) 本形態に係る熱サイクル装置の制御方法は、熱サイクル装置の制御方法であって、前記熱サイクル装置は、ホットスタート P C R 酵素を含む反応液と、前記反応液とは比重が異なり、かつ、前記反応液とは混和しない液体とが充填され、対向する内壁に前記反応液が近接して移動する流路を含む反応容器を装着する装着部と、前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記流路の第 1 領域を加熱する第 1 加熱部と、前記装着部に前記反応容器が装着された場合に、前記第 1 領域とは異なる前記流路の第 2 領域を加熱する第 2 加熱部と、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置を、前記装着部に前記反応容器を装着した場合に、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第 1 領域内となる第 1 の配置と、重力の作用する方向における前記流路の最下点の位置が前記第 2 領域内となる第 2 の配置との間で切換える駆動機構と、を含み、前記制御方法は、前記第 1 加熱部を第 1 温度に制御する第 1 処理を行うことと、前記第 2 加熱部を前記第 1 温度よりも高い第 2 温度に制御する第 2 処理を行うことと、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第 2 の配置で第 1 時間を経過させる第 3 処理を行うことと、前記第 3 処理の後に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置が前記第 2 の配置で第 2 時間を経過した場合に、前記装着部、前記第 1 加熱部及び前記第 2 加熱部の配置を、前記第 2 の配置から前記第 1 の配置へと切換えるように前記駆動機構を制御する第 4 処理を行うことと、を含む。

20

30

## 【 0 0 1 7 】

本形態によれば、装着部、第 1 加熱部及び第 2 加熱部の配置を切り換えることで、反応容器が第 1 の配置に保持された状態と、反応容器が第 2 の配置に保持された状態とを切り換えることができる。第 1 の配置は、反応容器を構成する流路の第 1 領域が、重力の作用する方向における流路の最下部に位置する配置である。第 2 の配置は、反応容器を構成する流路の第 2 領域が、重力の作用する方向における流路の最下部に位置する配置である。すなわち、反応液の比重が相対的に大きい場合には、重力の作用によって第 1 の配置においては反応液を第 1 領域に、第 2 の配置においては反応液を第 2 領域に保持できる。第 1 領域は第 1 加熱部によって加熱され、第 2 領域は第 2 加熱部によって加熱されるので、第 1 領域と第 2 領域とは異なる温度とすることができる。したがって、第 1 の配置又は第 2 の配置に反応容器を保持する間、反応液を所定の温度に保持できるので、加熱時間を容易に制御可能な熱サイクル装置の制御方法を提供できる。また、第 3 処理及び第 4 処理では反応液が第 2 温度に保持され、第 4 処理の後に反応液が第 2 温度よりも低い第 1 温度に保持される。この熱サイクル装置を P C R に適用する場合には、第 1 温度がアニーリング及び伸長温度、第 2 温度が D N A の熱変性温度に対応する。一般に、P C R 酵素を活性化さ

40

50

せる温度は、熱変性温度と同程度である。したがって、第3処理を行うことによって、通常のPCRの熱サイクルに加えて、PCRのホットスタートを行うことができる熱サイクルを実現できる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】実施形態に係る熱サイクル装置1の斜視図。

【図2】実施形態に係る熱サイクル装置1の本体10の分解斜視図。

【図3】図1のA-A線における垂直断面図。

【図4】実施形態に係る熱サイクル装置1に装着される反応容器100の構成を表す断面図。

10

【図5】実施形態に係る熱サイクル装置1の機能ブロック図。

【図6】図6(A)は、第1の配置における図1(A)のA-A線を通り回転軸Rに垂直な面における断面を模式的に示す断面図、図6(B)は、第2の配置における図1(A)のA-A線を通り回転軸Rに垂直な面における断面を模式的に示す断面図。

【図7】本実施形態に係る熱サイクル装置1の制御方法の第1具体例を説明するためのフローチャート。

【図8】本実施形態に係る熱サイクル装置1の制御方法の第2具体例を説明するためのフローチャート。

【図9】第1実施例における反応液140の組成を示す表。

【図10】フォワードプライマー(F primer)、リバースプライマー(R primer)、プローブ(Probe)の塩基配列を示す表。

20

【図11】第1実施例における、熱サイクル処理のサイクル数と測定される輝度との関係を示すグラフ。

【図12】第2実施例における反応液140の組成を示す表。

【図13】第2実施例における、熱サイクル処理のサイクル数と測定される輝度との関係を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明の好適な実施形態について図面を用いて詳細に説明する。なお、以下に説明する実施形態は、特許請求の範囲に記載された本発明の内容を不当に限定するものではない。また以下で説明される構成の全てが本発明の必須構成要件であるとは限らない。

30

【0020】

1. 本実施形態に係る熱サイクル装置の全体構成

図1は、本実施形態に係る熱サイクル装置1の斜視図である。図2は、本実施形態に係る熱サイクル装置1の本体10の分解斜視図である。図3は、図1のA-A線における垂直断面図である。図3において、矢印gは重力の作用する方向を表す。

【0021】

本実施形態に係る熱サイクル装置1は、ホットスタートPCR酵素を含む反応液140と、反応液140とは比重が異なり、かつ、反応液140とは混和しない液体130とが充填され、対向する内壁に反応液140が近接して移動する流路110を含む反応容器100(詳細は「2. 本実施形態に係る熱サイクル装置に装着される反応容器の構成」の項で後述される)を装着する装着部15と、装着部15に反応容器100が装着された場合に、流路110の第1領域111を加熱する第1加熱部21と、装着部15に反応容器100が装着された場合に、第1領域111とは異なる流路110の第2領域112を加熱する第2加熱部22と、装着部15、第1加熱部21及び第2加熱部22の配置を、装着部15に反応容器100を装着した場合に、重力の作用する方向における流路110の最下点の位置が第1領域111内となる第1の配置と、重力の作用する方向における流路110の最下点の位置が第2領域112内となる第2の配置との間で切替える駆動機構30と、駆動機構30、第1加熱部21及び第2加熱部22を制御する制御部40と、を含む。

40

50

## 【 0 0 2 2 】

図 1 に示される例では、熱サイクル装置 1 は、本体 1 0 と駆動機構 3 0 とを含んで構成されている。図 2 に示されるように、本体 1 0 は、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 を含んで構成されている。

## 【 0 0 2 3 】

装着部 1 5 は、反応容器 1 0 0 を装着する構造である。図 1 及び図 2 に示される例では、熱サイクル装置 1 の装着部 1 5 は、挿入口 1 5 1 を有し、挿入口 1 5 1 から反応容器 1 0 0 を差し込んで装着するスロット構造である。図 2 に示される例では、装着部 1 5 は、第 1 加熱部 2 1 の第 1 ヒートブロック 2 1 b 及び第 2 加熱部 2 2 の第 2 ヒートブロック 2 2 b を貫通する穴に反応容器 1 0 0 を差し込む構造となっている。第 1 ヒートブロック 2 1 b 及び第 2 ヒートブロック 2 2 b については後述する。本体 1 0 に設けられる装着部 1 5 の数は複数であってもよく、図 1 及び図 2 に示される例では、1 0 個の装着部 1 5 が本体 1 0 に設けられている。また、図 2 及び図 3 に示される例では、装着部 1 5 が第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の一部として構成されているが、駆動機構 3 0 を動作させた場合に両者の位置関係が変化しない限り、装着部 1 5 と第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 とは別の部材として構成されていてもよい。

## 【 0 0 2 4 】

なお、本実施形態においては、装着部 1 5 がスロット構造である例を示したが、装着部 1 5 は反応容器 1 0 0 を保持できる構造であればよい。例えば、反応容器 1 0 0 の形状に合わせた窪みに反応容器 1 0 0 をはめ込む構造や、反応容器 1 0 0 を挟んで保持する構造を採用してもよい。

## 【 0 0 2 5 】

第 1 加熱部 2 1 は、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 を装着した場合に、反応容器 1 0 0 の流路 1 1 0 の第 1 領域 1 1 1 を加熱する。図 3 に示される例では、第 1 加熱部 2 1 は、本体 1 0 において、反応容器 1 0 0 の第 1 領域 1 1 1 を加熱する位置に配置されている。

## 【 0 0 2 6 】

第 1 加熱部 2 1 は、熱を発生させる機構と、発生した熱を反応容器 1 0 0 に伝える部材とを含んでもよい。図 2 に示される例では、第 1 加熱部 2 1 は、熱を発生させる機構としての第 1 ヒーター 2 1 a と、発生した熱を反応容器 1 0 0 に伝える部材としての第 1 ヒートブロック 2 1 b を含んで構成されている。

## 【 0 0 2 7 】

熱サイクル装置 1 においては、第 1 ヒーター 2 1 a はカートリッジヒーターであり、導線 1 9 によって図示しない外部電源に接続される。第 1 ヒーター 2 1 a としてはこれに限らず、カーボンヒーター、シートヒーター、IHヒーター（電磁誘導加熱器）、ペルチェ素子、加熱液体、加熱気体などを使用できる。第 1 ヒーター 2 1 a は第 1 ヒートブロック 2 1 b に挿入されており、第 1 ヒーター 2 1 a が発熱することで第 1 ヒートブロック 2 1 b が加熱される。第 1 ヒートブロック 2 1 b は、第 1 ヒーター 2 1 a から発生した熱を反応容器 1 0 0 に伝える部材である。熱サイクル装置 1 においては、第 1 ヒートブロック 2 1 b は、アルミニウム製のブロックである。カートリッジヒーターは温度制御が容易であるので、第 1 ヒーター 2 1 a をカートリッジヒーターとすることで、第 1 加熱部 2 1 の温度を容易に安定させることができる。したがって、より正確な熱サイクルを実現できる。

## 【 0 0 2 8 】

ヒートブロックの材質は熱伝導率、保温性、加工しやすさ等の条件を考慮して適宜選択できる。例えば、アルミニウムは熱伝導率が高いので、第 1 ヒートブロック 2 1 b をアルミニウム製とすることで、反応容器 1 0 0 を効率よく加熱できる。また、ヒートブロックに加熱ムラが生じにくいので、精度の高い熱サイクルを実現できる。また、加工が容易なので第 1 ヒートブロック 2 1 b を精度よく成型でき、加熱の精度を高めることができる。したがって、より正確な熱サイクルを実現できる。なお、ヒートブロックの材質は、例えば銅合金を使用してもよく、複数の材質を組み合わせてもよい。

## 【 0 0 2 9 】

第1加熱部21は、装着部15に反応容器100を装着した場合に、反応容器100に接触していることが好ましい。これによって、第1加熱部21によって反応容器100を加熱した場合に、第1加熱部21と反応容器100とが接触しない構成よりも第1加熱部21の熱を反応容器100に安定して伝えることができるので、反応容器100の温度を安定させることができる。本実施形態のように、装着部15が第1加熱部21の一部として形成されている場合には、装着部15が反応容器100と接触することが好ましい。これによって、第1加熱部21の熱を反応容器100に安定して伝えることができるので反応容器100を効率よく加熱できる。

#### 【0030】

第2加熱部22は、装着部15に反応容器100を装着した場合に、第1領域111よりも挿入口151に近い反応容器100の流路110の第2領域112を、第1の温度とは異なる第2の温度に加熱する。図3に示される例では、第2加熱部22は、本体10において、反応容器100の第2領域112を加熱する位置に配置されている。第2加熱部22は、第2ヒーター22a及び第2ヒートブロック22bを含む。本実施形態における第2加熱部22の構成は、加熱される反応容器100の領域及び加熱する温度が第1加熱部21と異なる以外は、第1加熱部21と同様である。なお、第1加熱部21と第2加熱部22とで異なる加熱機構を採用してもよい。また、第1ヒートブロック21bと第2ヒートブロック22bとが異なる材質であってもよい。

#### 【0031】

第1加熱部21及び第2加熱部22は、装着部15に反応容器100を装着した場合に、流路110に対して、反応液140が移動する方向に温度勾配を形成する温度勾配形成部として機能する。ここで、「温度勾配を形成する」とは、所定の方向に沿って温度が変化する状態を形成することを意味する。したがって、「反応液140が移動する方向に温度勾配を形成する」とは、反応液140が移動する方向に沿って温度が変化する状態を形成することを意味する。「所定の方向に沿って温度が変化する状態」は、例えば、所定の方向に沿って温度が単調に高く又は低くなっているもよいし、所定の方向に沿って、温度が高くなる変化から低くなる変化へ、又は、低くなる変化から高くなる変化へ、途中で変化していてもよい。熱サイクル装置1の本体10においては、第1加熱部21が装着部15の挿入口151から相対的に遠い側、第2加熱部22が装着部15の挿入口151から相対的に近い側に配置されている。

#### 【0032】

また、第1加熱部21と第2加熱部22とは、互いに離間して本体10に設けられている。これによって、互いに異なる温度に制御された第1加熱部21と第2加熱部22とが互いに影響を及ぼしにくくなるので、第1加熱部21及び第2加熱部22の温度が安定しやすくなる。第1加熱部21と第2加熱部22との間にスペーサーを設けてもよい。熱サイクル装置1の本体10においては、第1加熱部21及び第2加熱部22は、その周囲を固定部材16、フランジ17及びフランジ18で固定されている。フランジ18は軸受31で支持されている。なお、所望の反応精度が確保できる程度に温度勾配が形成される限り、加熱部の数は2以上の任意の数であってもよい。

#### 【0033】

第1加熱部21及び第2加熱部22の温度は、図示しない温度センサー及び後述される制御部40によって制御されてもよい。第1加熱部21及び第2加熱部22の温度は、反応容器100が所望の温度に加熱されるように設定されることが好ましい。第1加熱部21及び第2加熱部22の温度の制御の詳細については、「3. 熱サイクル装置の制御例」の項で詳述される。なお、第1加熱部21及び第2加熱部22の温度は、反応容器100の第1領域111及び第2領域112が所望の温度に加熱されるように制御されていればよい。例えば、反応容器100の材質や大きさを考慮することで、第1領域111及び第2領域112の温度をより正確に所望の温度に加熱できる。本実施形態においては、温度センサーによって第1加熱部21及び第2加熱部22の温度を測定する。本実施形態の温度センサーは熱電対である。なお、温度センサーとしてはこれに限らず、例えば測温抵抗

10

20

30

40

50



体やサーミスタを使用してもよい。

【 0 0 3 4 】

駆動機構 3 0 は、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置を、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 を装着した場合に、重力の作用する方向における流路 1 1 0 の最下点の位置が第 1 領域 1 1 1 内となる第 1 の配置と、重力の作用する方向における流路 1 1 0 の最下点の位置が第 2 領域 1 1 2 内となる第 2 の配置との間で切換える。本実施形態においては、駆動機構 3 0 は、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 を、重力の作用する方向に対して垂直な成分を有し、かつ、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 を装着した場合に流路 1 1 0 を反応液 1 4 0 が移動する方向に対して垂直な成分を有する回転軸 R の周りに回転させる機構である。

10

【 0 0 3 5 】

「重力の作用する方向に対して垂直な成分を有する」方向は、「重力の作用する方向に対して平行な成分」と「重力の作用する方向に対して垂直な成分」とのベクトル和で表した場合における、重力の作用する方向に対して垂直な成分を有する方向である。

【 0 0 3 6 】

「流路 1 1 0 を反応液 1 4 0 が移動する方向に対して垂直な成分を有する」方向は、「流路 1 1 0 を反応液 1 4 0 が移動する方向に対して平行な成分」と「流路 1 1 0 を反応液 1 4 0 が移動する方向に対して垂直な成分」とのベクトル和で表した場合における、流路 1 1 0 を反応液 1 4 0 が移動する方向に対して垂直な成分を有する方向である。

【 0 0 3 7 】

本実施形態に係る熱サイクル装置 1 においては、駆動機構 3 0 は、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 を、同一の回転軸 R の周りに回転させている。また、本実施形態においては、駆動機構 3 0 は図示しないモーター及び駆動軸を含み、駆動軸と本体 1 0 のフランジ 1 7 とが接続されて構成されている。駆動機構 3 0 のモーターを動作させると、駆動軸を回転軸 R として本体 1 0 が回転される。本実施形態においては、回転軸 R の方向に沿って 1 0 個の装着部 1 5 が並設されている。なお、駆動機構 3 0 としては、モーターに限らず、例えばハンドル、ぜんまい等を採用できる。

20

【 0 0 3 8 】

熱サイクル装置 1 は測定部 5 0 を含んでもよい。測定部 5 0 は、所定の波長の光の強度を測定する。本実施形態においては、測定部 5 0 として蛍光検出器を採用している。これによって、例えば、特定の DNA と相補的に結合することによって所定の波長の光の強度が変化する蛍光プローブを反応液 1 4 0 に含ませることで、リアルタイム PCR のような蛍光測定を伴う用途に熱サイクル装置 1 を使用できる。測定部 5 0 の数は測定が問題なく行える限り任意である。図 1 に示される例では、1 個の測定部 5 0 をスライド 5 2 に沿って移動させて蛍光測定を行う。

30

【 0 0 3 9 】

測定部 5 0 の位置は、第 2 加熱部 2 2 に近い側よりも第 1 加熱部 2 1 に近い側が好ましい。これによって、反応容器 1 0 0 を装着部 1 5 に装着する際に作業の障害となりにくくなる。また、測定部 5 0 は、反応容器 1 0 0 の第 1 領域 1 1 1 を含む領域からの光を測定するように設けられていてもよい。第 1 加熱部 2 1 の温度を PCR のアニーリング及び伸長温度（アニーリング及び伸長反応が進行する温度）にした場合に、特定の DNA の量に相関する所定の波長の光の強度をより正確に測定できる。したがって、リアルタイム PCR において適切な蛍光測定ができる。また、後述される蓋（封止部 1 2 0）付きの反応容器 1 0 0 を用いる場合には、蓋に近い側となる第 2 領域 1 1 2 よりも、蓋から遠い側となる第 1 領域 1 1 1 の方が、測定部 5 0 と反応液 1 4 0 との間に存在する部材が少ないので、より適切な蛍光測定ができる。

40

【 0 0 4 0 】

上述のように、熱サイクル装置 1 をリアルタイム PCR に用いる場合には、PCR に必要な熱サイクルを反応液 1 4 0 に施す期間中においては、測定部 5 0 を第 1 加熱部 2 1 に近い側に設け、第 1 加熱部 2 1 を PCR のアニーリング及び伸長温度（5 0 ～ 7 5 程

50

度)にすることが好ましい。この場合、挿入口151に近い第2加熱部22をPCRのアニーリング及び伸長温度よりも高い熱変性温度(90 ~ 100 程度)にする。

#### 【0041】

熱サイクル装置1は、制御部40を含む。制御部40は、第1加熱部21、第2加熱部22及び駆動機構30を制御する。制御部40は、さらに測定部50を制御してもよい。制御部40による制御例については、「3. 熱サイクル装置の制御例」の項で詳述される。制御部40は、専用回路によって実現して後述される制御を行うように構成されていてもよい。また、制御部40は、例えばCPU(Central Processing Unit)がROM(Read Only Memory)やRAM(Random Access Memory)等の記憶装置に記憶された制御プログラムを実行することによってコンピューターとして機能し、後述される制御を行うように構成されていてもよい。この場合、記憶装置は、制御に伴う中間データや制御結果などを一時的に記憶するワークエリアを有していてもよい。また、制御部40は、時間を計測するためのタイマーを有していてもよい。また、制御部40は、上述した図示しない温度センサーの出力に基づいて第1加熱部21及び第2加熱部22を所望の温度に制御してもよい。

10

#### 【0042】

熱サイクル装置1は、反応容器100を第1加熱部21及び第2加熱部22に対して所定の位置に保持する構造を含むことが好ましい。これによって、第1加熱部21及び第2加熱部22によって反応容器100の所定の領域を加熱できる。より具体的には、反応容器100を構成する流路110の、第1領域111を第1加熱部21によって、第2領域112を第2加熱部22によって、加熱できる。本実施形態においては、第1ヒートブロック21b及び第2ヒートブロック22bに設けられた貫通孔(装着部15の直径)の大きさを適切に設定することによって、第1加熱部21及び第2加熱部22に対して反応容器100を所定の位置に保持している。

20

#### 【0043】

第1ヒートブロック21bは、フィン210を有する構造であってもよい。これによって、第1加熱部21の表面積が大きくなるので、第1加熱部21の温度を高い温度から低い温度に変更する場合に要する時間が短くなる。

#### 【0044】

熱サイクル装置1は、第1加熱部21及び第2加熱部22に対して送風するファン50を含んでいてもよい。送風することによって、第1加熱部21と第2加熱部22との間での熱の移動を抑制できる。したがって、互いに異なる温度に制御された第1加熱部21と第2加熱部22とが互いに影響を及ぼしにくくなるので、第1加熱部21及び第2加熱部22の温度が安定しやすくなる。

30

#### 【0045】

### 2. 本実施形態に係る熱サイクル装置に装着される反応容器の構成

図4は、本実施形態に係る熱サイクル装置1に装着される反応容器100の構成を表す断面図である。図4において、矢印gは重力の作用する方向を表す。

#### 【0046】

反応容器100は、ホットスタートPCR酵素を含む反応液140と、反応液140とは比重が異なり、かつ、反応液140とは混和しない液体130(以下、「液体130」という)とが充填され、反応液140が対向する内壁に沿って移動する流路110を含む。本実施形態においては、液体130は、反応液140よりも比重が小さく、かつ、反応液140とは混和しない液体である。ホットスタートPCR酵素とは、所定の温度環境に置かれることで酵素活性が増加する(活性化する)PCR酵素を意味する。一般に、ホットスタート酵素が活性化する温度は室温よりも高く、DNAの熱変性温度と同程度である。ホットスタートPCR酵素は公知の酵素を使用でき、例えば、ホットスタート用のTaqポリメラーゼ(「Taq」は登録商標)、抗体等で活性が抑制されているホットスタート酵素が挙げられる。なお、液体130として、例えば、反応液140とは混和せず、かつ、反応液140よりも比重が大きい液体を採用してもよい。図4に示される例では、反

40

50

応容器 100 は流路 110 及び封止部 120 を含む。流路 110 には、反応液 140 と、液体 130 とが充填され、封止部 120 によって封止されている。

【0047】

流路 110 は、対向する内壁に沿って反応液 140 が移動するように形成されている。ここで、流路 110 の「対向する内壁」とは、流路 110 の壁面の、向かい合う位置関係にある 2 つの領域を意味する。「沿って」とは、反応液 140 と流路 110 の壁面との距離が近い状態を意味し、反応液 140 が流路 110 の壁面に接触する状態を含む。したがって、「対向する内壁に沿って反応液 140 が移動する」とは、「流路 110 の壁面の、向かい合う位置関係にある 2 つの領域の両方に対して距離が近い状態で、反応液 140 が移動する」ことを意味する。換言すれば、流路 110 の対向する 2 つ内壁間の距離は、反応液 140 が該内壁に沿って移動する程度の距離である。

10

【0048】

反応容器 100 の流路 110 がこのような形状であると、流路 110 内を反応液 140 が移動する方向を規制できるので、流路 110 内を反応液 140 が移動する経路をある程度規定できる。これによって、流路 110 内を反応液 140 が移動する所要時間を、ある程度の範囲に制限できる。したがって、流路 110 の対向する 2 つ内壁間の距離は、流路 110 内を反応液 140 が移動する時間のバラツキによって生じる、反応液 140 に対して施される熱サイクル条件のバラツキが、所望の精度を満たせる程度、すなわち、反応の結果が所望の精度を満たせる程度であることが好ましい。より具体的には、流路 110 の対向する 2 つの内壁間の反応液 140 が移動する方向に対して垂直な方向における距離が、反応液 140 の液滴が 2 つ以上入らない程度であることが望ましい。

20

【0049】

図 4 に示される例では、反応容器 100 の外形は円錐台状であり、中心軸に沿う方向（図 4 における上下方向）を長手方向とする流路 110 が形成されている。流路 110 の形状は、流路 110 の長手方向に対して垂直な方向の断面、すなわち流路 110 のある領域における反応液 140 が移動する方向に対して垂直な断面（これを流路 110 の「断面」とする）が円形となる円錐台状である。したがって、反応容器 100 においては、流路 110 の対向する内壁は、流路 110 の断面の中心を挟んで対向する流路 110 の壁面上の 2 点を含む領域である。また、「反応液 140 が移動する方向」は、流路 110 の長手方向となる。

30

【0050】

なお、流路 110 の形状は錐台状に限られず、例えば、柱状であってもよい。また、流路 110 の断面の形状は円形に限らず、多角形や楕円形など、対向する内壁に沿って反応液 140 が移動できる限り任意である。例えば、反応容器 100 の流路 110 の断面が多角形の場合には、「対向する内壁」は、流路 110 に内接する断面が円形の流路を仮定した場合に、該流路の対向する内壁であるものとする。すなわち、流路 110 に内接する、断面が円形の仮想流路の対向する内壁に沿って反応液 140 が移動するように流路 110 が形成されていけばよい。これによって、流路 110 の断面が多角形の場合にも、第 1 領域 111 と第 2 領域 112 との間を反応液 140 が移動する経路をある程度規定できる。したがって、反応液 140 が第 1 領域 111 と第 2 領域 112 との間を移動する所要時間を、ある程度の範囲に制限できる。

40

【0051】

反応容器 100 の第 1 領域 111 は、第 1 加熱部 21 によって加熱される、流路 110 の一部の領域である。第 2 領域 112 は、第 2 加熱部 22 によって加熱される、第 1 領域 111 とは異なる流路 110 の一部の領域である。図 4 に示される例では、第 1 領域 111 は、流路 110 の長手方向における一方の端部を含む領域であり、第 2 領域 112 は、流路 110 の長手方向における他方の端部を含む領域である。図 4 に示される例では、流路 110 のうち封止部 120 に相対的に遠い側の端部を含む点線で囲まれた領域が第 1 領域 111 であり、流路 110 のうち封止部 120 に相対的に近い側の端部を含む点線で囲まれた領域が第 2 領域 112 である。本実施形態に係る熱サイクル装置 1 は、第 1 加熱部

50

2 1 が反応容器 1 0 0 の第 1 領域 1 1 1 を加熱し、第 2 加熱部 2 2 が反応容器 1 0 0 の第 2 領域 1 1 2 を加熱することによって、反応容器 1 0 0 の流路 1 1 0 に対して、反応液 1 4 0 が移動する方向に温度勾配を形成する。

【 0 0 5 2 】

流路 1 1 0 には、液体 1 3 0 と、反応液 1 4 0 とが充填されている。液体 1 3 0 は、反応液 1 4 0 とは混和しない、すなわち混ざり合わない性質であるため、図 4 に示されるように、反応液 1 4 0 は液体 1 3 0 の中に液滴の状態で保持されている。反応液 1 4 0 は、液体 1 3 0 よりも比重が大きいため、流路 1 1 0 の重力の作用する方向における最下部の領域に位置している。液体 1 3 0 としては、例えば、ジメチルシリコンオイル又はパラフィンオイルを使用できる。反応液 1 4 0 は、反応に必要な成分を含む液体である。例えば、反応がホットスタートを含む P C R である場合には、反応液 1 4 0 には、増幅対象となる D N A、D N A を増幅するために必要なホットスタート D N A ポリメラーゼ（ホットスタート P C R 酵素）、プライマー、特定の D N A と相補的に結合することによって所定の波長の光の強度が変化する蛍光プローブ等が含まれる。また例えば、反応がホットスタートを含む R T - P C R である場合には、反応液 1 4 0 には、逆転写酵素、逆転写の鋳型となる R N A、逆転写された c D N A を増幅するために必要なホットスタート D N A ポリメラーゼ（ホットスタート P C R 酵素）、プライマー、特定の D N A と相補的に結合することによって所定の波長の光の強度が変化する蛍光プローブ等が含まれる。例えば、液体 1 3 0 としてオイルを用いて P C R を行う場合には、反応液 1 4 0 は上述の成分を含む水溶液であることが好ましい。

【 0 0 5 3 】

3 . 熱サイクル装置の制御例

図 5 は、本実施形態に係る熱サイクル装置 1 の機能ブロック図である。制御部 4 0 は、第 1 加熱部 2 1 に対して制御信号 S 1 を出力することによって第 1 加熱部 2 1 の温度を制御する。制御部 4 0 は、第 2 加熱部 2 2 に対して制御信号 S 2 を出力することによって第 2 加熱部 2 2 の温度を制御する。制御部 4 0 は、駆動機構 3 0 に対して制御信号 S 3 を出力することによって駆動機構 3 0 を制御する。制御部 4 0 は、測定部 5 0 に対して制御信号 S 4 を出力することによって測定部 5 0 を制御する。

【 0 0 5 4 】

次に、本実施形態に係る熱サイクル装置 1 の制御例について説明する。以下では、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 を、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 を装着した場合に、重力の作用する方向における流路 1 1 0 の最下点の位置が第 1 領域 1 1 1 内となる第 1 の配置と、重力の作用する方向における流路 1 1 0 の最下点の位置が第 2 領域 1 1 2 内となる第 2 の配置との間で回転させる制御を例にとり説明する。

【 0 0 5 5 】

図 6 ( A ) は、第 1 の配置における、図 1 ( A ) の A - A 線を通り回転軸 R に垂直な面における断面を模式的に示す断面図、図 6 ( B ) は、第 2 の配置における図 1 ( A ) の A - A 線を通り回転軸 R に垂直な面における断面を模式的に示す断面図である。図 6 ( A ) 及び図 6 ( B ) において、白抜き矢印は本体 1 0 の回転方向、矢印 g は重力の作用する方向を表す。

【 0 0 5 6 】

図 6 ( A ) に示されるように、第 1 の配置は、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 が装着された場合に、第 1 領域 1 1 1 が重力の作用する方向における流路 1 1 0 の最下部に位置する配置である。図 6 ( A ) に示される例では、第 1 の配置では、液体 1 3 0 よりも比重が大きい反応液 1 4 0 は第 1 領域 1 1 1 に存在する。また、図 6 ( B ) に示されるように、第 2 の配置は、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 が装着された場合に、第 2 領域 1 1 2 が重力の作用する方向における流路 1 1 0 の最下部に位置する配置である。図 6 ( B ) に示される例では、第 2 の配置では、液体 1 3 0 よりも比重が大きい反応液 1 4 0 は第 2 領域 1 1 2 に存在する。

【 0 0 5 7 】

このように、駆動機構 30 が、装着部 15、第 1 加熱部 21 及び第 2 加熱部 22 を、第 1 の配置と、第 1 の配置とは異なる第 2 の配置との間で回転させることによって、反応液 140 に対して熱サイクルを施すことができる。

#### 【0058】

本実施形態によれば、装着部 15、第 1 加熱部 21 及び第 2 加熱部 22 の配置を切り換えることで、反応容器 100 が第 1 の配置に保持された状態と、反応容器 100 が第 2 の配置に保持された状態とを切り換えることができる。第 1 の配置は、反応容器 100 を構成する流路 110 の第 1 領域 111 が、重力の作用する方向における流路 110 の最下部に位置する配置である。第 2 の配置は、反応容器 100 を構成する流路 110 の第 2 領域 112 が、重力の作用する方向における流路 110 の最下部に位置する配置である。すなわち、反応液 140 の比重が液体 130 に比べて相対的に大きい場合には、重力の作用によって第 1 の配置においては反応液 140 を第 1 領域 111 に、第 2 の配置においては反応液 140 を第 2 領域 112 に保持できる。第 1 領域 111 は第 1 加熱部 21 によって加熱され、第 2 領域 112 は第 2 加熱部 22 によって加熱されるので、第 1 領域 111 と第 2 領域 112 とは異なる温度とすることができる。したがって、第 1 の配置又は第 2 の配置に反応容器 100 を保持する間、反応液 140 を所定の温度に保持できるので、加熱時間を容易に制御可能な熱サイクル装置 1 を提供できる。

#### 【0059】

駆動機構 30 は、第 1 の配置から第 2 の配置へと回転させる場合と、第 2 の配置から第 1 の配置へと回転させる場合とで、反対方向に装着部 15、第 1 加熱部 21 及び第 2 加熱部 22 を回転させてもよい。これによって、回転によって生じる導線 19 などの配線の擦れを低減するための特別な機構が不要となる。したがって、小型化に適した熱サイクル装置 1 を実現できる。また、第 1 の配置から第 2 の配置へと回転させる場合の回転数、及び、第 2 の配置から第 1 の配置へと回転させる場合の回転数は、1 回転未満（回転角度が 360° 未満）であることが好ましい。これによって、配線が擦れる程度を軽減できる。また、図 1 及び図 2 に示されるように、フランジ 18 が導線 19 を巻き取れる構成にしてもよい。

#### 【0060】

##### 3 - 1 . 熱サイクル装置の制御方法の第 1 具体例

次に、熱サイクル装置 1 の制御方法の第 1 具体例について、ホットスタート工程を含む 2 段階温度 PCR でリアルタイム測定を行う場合を例にとり説明する。なお、反応液 140 には、ホットスタート PCR 酵素及び特定の DNA と相補的に結合することによって所定の波長の光の強度が変化する蛍光プローブが含まれているものとする。図 7 は、本実施形態に係る熱サイクル装置 1 の制御方法の第 1 具体例を説明するためのフローチャートである。

#### 【0061】

図 7 において、まず、制御部 40 は、第 1 加熱部 21 の温度を第 1 温度に制御し（第 1 処理）、第 2 加熱部 22 の温度を第 1 温度よりも高い第 2 温度に制御する（第 2 処理）（ステップ S100）。本具体例においては、第 1 温度は PCR におけるアニーリング及び伸長温度である。「PCR におけるアニーリング及び伸長温度」は、核酸を増幅するための酵素の種類に依存する温度であるが、一般的には 50 以上 70 以下程度の範囲内である。本具体例においては、第 2 温度は PCR における熱変性温度である。「PCR における熱変性温度」は、核酸を増幅するための酵素の種類に依存する温度であるが、一般的には 90 以上 100 以下程度の範囲内である。

#### 【0062】

ステップ S100 の後に、制御部 40 は、装着部 15、第 1 加熱部 21 及び第 2 加熱部 22 の配置を第 1 の配置から第 2 の配置へと切替えるように駆動機構 30 を制御する（ステップ S102）。図 1 に示される熱サイクル装置 1 においては、装着部 15 に反応容器 100 を装着した直後には、装着部 15、第 1 加熱部 21 及び第 2 加熱部 22 の配置が第 1 の配置になっているので、ステップ S102 を行うことで、装着部 15、第 1 加熱部 2

1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置を第 2 の配置とする。

【 0 0 6 3 】

なお、ステップ S 1 0 0 の後でステップ S 1 0 2 の前に、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 を装着してもよい。また、装着部 1 5 への反応容器 1 0 0 の装着が、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置が第 2 の配置で行われる構成の場合には、ステップ S 1 0 2 を行わなくてもよい。装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置が第 2 の配置である場合には、反応液 1 4 0 は第 2 領域 1 1 2 に保持される。すなわち、反応液 1 4 0 は、第 2 温度に保持される。

【 0 0 6 4 】

ステップ S 1 0 2 の後に、制御部 4 0 は、制御部 4 0 は、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置が第 2 の配置で第 1 時間を経過させる第 3 処理を行う。なお、第 3 処理においては、第 1 加熱部 2 1 が第 1 温度となっていればよい。すなわち、第 3 処理は第 1 処理の後であれば、第 2 処理の前であっても、第 2 処理と同時にであってもよい。

【 0 0 6 5 】

より具体的には、ステップ S 1 0 2 の後に、制御部 4 0 は、ステップ S 1 0 2 が終了してから第 1 時間を経過したか否かを判定する（ステップ S 1 0 4）。本具体例において、第 1 時間は P C R 酵素の活性化に必要となる時間である。第 1 時間を経過していないと制御部 4 0 が判定した場合（ステップ S 1 0 4 で N O の場合）には、制御部 4 0 はステップ S 1 0 4 を繰り返す。

【 0 0 6 6 】

第 1 時間を経過したと制御部 4 0 が判定した場合（ステップ S 1 0 4 で Y E S の場合）には、制御部 4 0 は、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置が第 2 の配置で第 2 時間を経過した場合に、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置を、第 2 の配置から第 1 の配置へと切換えるように駆動機構 3 0 を制御する第 4 処理を行う。

【 0 0 6 7 】

より具体的には、まず、制御部 4 0 が、ステップ S 1 0 4 が終了してから第 2 時間を経過したか否かを判定する（ステップ S 1 0 6）。本具体例において、第 2 時間は、P C R のおける熱変性に必要となる時間である。第 2 時間を経過していないと制御部 4 0 が判定した場合（ステップ S 1 0 6 で N O の場合）には、制御部 4 0 はステップ S 1 0 6 を繰り返す。第 2 時間を経過したと制御部 4 0 が判定した場合（ステップ S 1 0 6 で Y E S の場合）には、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置を、第 2 の配置から第 1 の配置へと切換えるように駆動機構 3 0 を制御する（ステップ S 1 0 8）。装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置が第 1 の配置である場合には、反応液 1 4 0 は第 1 領域 1 1 1 に保持される。すなわち、反応液 1 4 0 は、第 1 温度に保持される。

【 0 0 6 8 】

第 3 処理及び第 4 処理では反応液 1 4 0 が第 2 温度に保持され、第 4 処理の後に反応液 1 4 0 が第 2 温度よりも低い第 1 温度に保持される。この熱サイクル装置 1 を P C R に適用する場合には、第 1 温度がアニーリング及び伸長温度、第 2 温度が D N A の熱変性温度に対応する。一般に、P C R 酵素を活性化させる温度は、熱変性温度と同程度である。したがって、第 3 処理を行うことによって、通常の P C R の熱サイクルに加えて、P C R のホットスタートを行うことができる熱サイクルを実現できる。さらに、第 2 処理の前に第 3 処理（第 1 時間を経過させる）を行うことで、第 2 処理の第 2 時間に影響を与えることなく、ホットスタートを含んだ熱サイクルを実現できる。

【 0 0 6 9 】

第 3 処理の後に、制御部 4 0 は、所定の波長の光の強度を測定するように測定部 5 0 を制御してもよい。より具体的には、ステップ S 1 0 6 の後に、測定部 5 0 が蛍光測定を開始する（ステップ S 1 1 0）。測定部 5 0 をスライド 5 2 上で移動させて、複数の反応容器 1 0 0 についての蛍光測定を行なってもよい。

【 0 0 7 0 】

10

20

30

40

50

第3処理の後に所定の波長の光の強度を測定するように測定部50を制御することによって、反応液140がアニーリング及び伸長温度に保持されている期間に、DNA配列に結合する蛍光プローブが発する波長の光の強度を測定できる。したがって、リアルタイムPCRに適した熱サイクル装置1を実現できる。

#### 【0071】

第4処理の後に、制御部40は、装着部15、第1加熱部21及び第2加熱部22の配置が第1の配置で第3時間を経過した場合に、装着部15、第1加熱部21及び第2加熱部22の配置を、第1の配置から第2の配置へと切換えるように駆動機構30を制御する第5処理と、第4処理とを所定回数繰り返して行なってもよい。

#### 【0072】

より具体的には、まず、ステップS110の後に、制御部40は、ステップS108が終了してから第3時間を経過したか否かを判定する(ステップS112)。本具体例において、第3時間はPCRにおけるアニーリング及び伸長に必要となる時間である。第3時間を経過していないと制御部40が判定した場合(ステップS112でNOの場合)には、制御部40はステップS112を繰り返す。第3時間を経過したと制御部40が判定した場合(ステップS112でYESの場合)には、制御部40は、所定のサイクル数に達したか否かを判定する(ステップS114)。

#### 【0073】

所定のサイクル数に達していないと制御部40が判定した場合(ステップS114でNOの場合)には、制御部40は、装着部15、第1加熱部21及び第2加熱部22の配置を第1の配置から第2の配置へと切換えるように駆動機構30を制御する(ステップS116)。ステップS116の後に、ステップS106からステップS114までを繰り返す。制御部40が所定のサイクル数に達したと判定した場合(ステップS114でYESの場合)には、処理を終了する。

#### 【0074】

第4処理では第2の配置で第2時間を経過するまで反応液140が第2温度に保持され、第5処理では第1の配置で第3時間を経過するまで反応液140が第1温度に保持される。このように、第5処理と第4処理(より具体的には、ステップS116とステップS106からステップS114)を繰り返すことによって、PCRに適した熱サイクルを所定回数繰り返して行うことができる。

#### 【0075】

### 3-2. 熱サイクル装置の制御方法の第2具体例

次に、熱サイクル装置1の制御方法の第2具体例について、ホットスタート工程を含むRT-PCRでリアルタイム測定を行う場合を例にとり説明する。図8は、本実施形態に係る熱サイクル装置1の制御方法の第2具体例を説明するためのフローチャートである。なお、図7に示される熱サイクル装置1の制御方法の第1具体例と同一の工程については同一の符号を付し、詳細な説明を省略する。

#### 【0076】

熱サイクル装置1の制御方法の第2具体例において、制御部40は、第1加熱部21を第1温度よりも低い第3温度に制御し、装着部15、第1加熱部21及び第2加熱部22の配置が第1の配置で第4時間を経過させる第6処理と、第6処理及び第2処理の後に、第1加熱部21を第1温度に制御し、装着部15、第1加熱部21及び第2加熱部22の配置を、第1の配置から第2の配置へと切換えるように駆動機構30を制御する第7処理と、を行い、第7処理の後に、第3処理を行う。

#### 【0077】

より具体的には、まず、制御部40は、第1加熱部21の温度を第3温度に制御する(ステップS200)。本具体例において、第3温度は逆転写酵素によって逆転写反応が進行する温度である。「逆転写酵素によって逆転写反応が進行する温度」は逆転写酵素の種類に依存する温度であるが、一般的には20以上70以下程度の範囲内であり、特に逆転写反応が進行する温度は、一般的には40以上50以下程度の範囲内である。ま

10

20

30

40

50

た、本具体例においては、初期動作時における装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置は第 1 の配置である。したがって、反応液 1 4 0 は第 1 領域 1 1 1 に保持される。すなわち、反応液 1 4 0 は第 3 温度に保持される。

【 0 0 7 8 】

なお、ステップ S 2 0 0 において、制御部 4 0 は、第 2 加熱部 2 2 の温度を逆転写酵素が失活しない温度に制御してもよい。「逆転写酵素が失活しない温度」は、逆転写酵素の種類に依存する温度であるが、一般的には 2 0 以上 7 0 以下程度の範囲内である。また、一般的には、7 0 を超える温度では、逆転写酵素が失活したり劣化しやすくなった。第 2 加熱部 2 2 の温度を逆転写酵素が失活しない温度に制御することによって、装着部 1 5 に反応容器 1 0 0 を装着する際に、逆転写酵素が失活するような高温に反応液 1 4 0 が曝されることがなくなる。

10

【 0 0 7 9 】

ステップ S 2 0 0 の後に、制御部 4 0 は、ステップ S 2 0 0 が終了してから第 4 時間を経過したか否かを判定する（ステップ S 2 0 2）。本具体例において、第 4 時間は逆転写反応に必要な時間である。第 4 時間を経過していないと制御部 4 0 が判定した場合（ステップ S 2 0 2 で N O の場合）には、制御部 4 0 はステップ S 2 0 2 を繰り返す。第 4 時間を経過したと制御部 4 0 が判定した場合（ステップ S 2 0 2 で Y E S の場合）には、制御部 4 0 は、第 1 加熱部 2 1 の温度を第 1 温度に制御し、第 2 加熱部 2 2 の温度を第 2 温度に制御する（ステップ S 2 0 4）。第 1 温度及び第 2 温度は、図 7 を用いて説明した熱サイクル装置 1 の制御方法の第 1 具体例と同様である。

20

【 0 0 8 0 】

ステップ S 2 0 4 の後に、制御部 4 0 は、装着部 1 5、第 1 加熱部 2 1 及び第 2 加熱部 2 2 の配置を第 1 の配置から第 2 の配置へと切替えるように駆動機構 3 0 を制御する（ステップ S 2 0 6）。したがって、反応液 1 4 0 は第 2 領域 1 1 2 に保持される。すなわち、反応液 1 4 0 は第 2 温度に保持される。

【 0 0 8 1 】

ステップ S 2 0 6 の後に、制御部 4 0 はステップ S 1 0 4 を行い、以降については、図 7 を用いて説明した熱サイクル装置 1 の制御方法の第 1 具体例と同一である。

【 0 0 8 2 】

このように、第 5 処理に先立って第 7 処理を行うことによって、P C R の前に逆転写反応を行うことができるので、R T - P C R に適した熱サイクル装置 1 を実現できる。

30

【 0 0 8 3 】

また、図 7 に示される熱サイクル装置 1 の制御方法の第 1 具体例と同様に、第 3 処理を行うことによって、通常の P C R の熱サイクルに加えて、P C R のホットスタートを行うことができる熱サイクルを実現できる。さらに、第 2 処理の前に第 3 処理（第 1 時間を経過させる）を行うことで、第 2 処理の第 2 時間に影響を与えることなく、ホットスタートを含んだ熱サイクルを実現できる。

【 0 0 8 4 】

また、図 7 に示される熱サイクル装置 1 の制御方法の第 1 具体例と同様に、第 5 処理と第 4 処理（より具体的には、ステップ S 1 1 6 とステップ S 1 0 6 からステップ S 1 1 4）を繰り返すことによって、P C R に適した熱サイクルを所定回数繰り返して行うことができる。

40

【 0 0 8 5 】

また、図 7 に示される熱サイクル装置 1 の制御方法の第 1 具体例と同様に、第 3 処理の後に所定の波長の光の強度を測定するように測定部 5 0 を制御することによって、反応液 1 4 0 がアニーリング及び伸長温度に保持されている期間に、特定の D N A の量に相関する所定の波長の光の強度を測定できる。したがって、リアルタイム P C R に適した熱サイクル装置 1 を実現できる。

【 0 0 8 6 】

4 . 実施例

50



以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されない。

【0087】

#### 4 - 1 . 第 1 実施例

第 1 実施例では、熱サイクル装置 1 を用いてホットスタートを含んだ 2 段階温度のリアルタイム PCR を行なった例について説明する。

【0088】

図 9 は、第 1 実施例における反応液 140 の組成を示す表である。図 9 において、「SuperScript III Platinum」は「SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (「Platinum」は登録商標)」であり、PCR 酵素が含まれている。プラスミドは、予め図 10 に示されるプライマーを用いて得られた PCR 反応産物をサブクローニングして、コピー数が既知のサンプルを作製した。サンプル A は  $10^5$  個、サンプル B は  $10^4$  個、サンプル C は  $10^3$  個、サンプル D は  $10^2$  個のプラスミドを加えた。

【0089】

図 10 は、インフルエンザ A 型 (InfA)、豚インフルエンザ A 型 (SW InfA)、豚インフルエンザ H1 型 (SW H1) 及びリボヌクレアーゼ P (RNase P) に対応するフォワードプライマー (F primer)、リバースプライマー (R primer)、プローブ (Probe) の塩基配列を示す表である。いずれも、「CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1)」(World Health Organization、2009 年 4 月 30 日改訂 1 版)に記載されている塩基配列と同一である。図 10 に示される 4 種類のプローブ (Probe) は、いずれも核酸の増幅に伴い測定される蛍光輝度が増加する。

【0090】

実験手順は、図 7 に示されるフローチャートの通りであり、第 1 温度は 58、第 2 温度は 98、第 1 時間は 5 秒、第 2 時間は 10 秒、第 4 時間は 30 秒、熱サイクル処理のサイクル数は 50 回とした。また、装着部 15 に装着される反応容器 100 は 4 個 (サンプル A ~ サンプル D) とした。

【0091】

図 11 は、第 1 実施例における、熱サイクル処理のサイクル数と測定される輝度との関係を示すグラフである。図 11 の横軸は熱サイクル処理のサイクル数、縦軸は輝度の相対値を表す。

【0092】

図 11 に示されるように、サンプル A ~ サンプル D のいずれも、熱サイクル処理のサイクル数が 20 回 ~ 35 回程度となる辺りから輝度が大きく上昇していることが分かる。これによって、DNA が増幅されていることが確認された。また、図 11 から、相対的にプラスミドのコピー数が多いサンプルほど少ないサイクル数で輝度が大きく上昇し、反応液 140 に含まれるプラスミドの濃度が高いほど、輝度が上昇するサイクル数が早いことが確認された。

【0093】

このように、本実施形態に係る熱サイクル装置 1 を用いて、ホットスタートを含んだ 2 段階温度のリアルタイム PCR を行うことができることが確認された。

【0094】

#### 4 - 2 . 第 2 実施例

第 2 実施例では、熱サイクル装置 1 を用いてホットスタートを含んだ RT - PCR を行なった例について説明する。

【0095】

図 12 は、第 2 実施例における反応液 140 の組成を示す表である。図 12 において、「SuperScript III Platinum」は「SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (「Platinum」は登録商標)」であり、PCR 酵素と逆転写酵素が含まれている。RNA としては、ヒト鼻腔拭い液 (ヒトサンプル) から抽出した RNA

を用いた。なお、当該ヒトサンプルについては、市販のキット（「エスプラインインフルエンザ A & B - N（「エスプライン」は登録商標）」、富士レビオ株式会社製）を用いてイムノクロマトグラフィーを行った結果、インフルエンザ A 型が陽性であった。なお、イムノクロマトグラフィーにおける「A 型陽性」は、下記インフルエンザ A 型（InfA）を特異的に判別するものではない。図 12 におけるフォワードプライマー（F primer）、リバープライマー（R primer）、プローブ（Probe）の塩基配列は、図 10 に示されている塩基配列と同一である。

#### 【0096】

実験手順は、図 8 に示されるフローチャートの通りであり、第 1 温度は 58、第 2 温度は 98、第 3 温度は 45、第 1 時間は 5 秒、第 2 時間は 10 秒、第 3 時間は 60 秒、第 4 時間は 30 秒、熱サイクル処理のサイクル数は 50 回とした。また、装着部 15 に装着される反応容器 100 は 4 個（サンプル E ~ サンプル H）とした。

#### 【0097】

サンプル E は、インフルエンザ A 型（InfA）に対応するフォワードプライマー、リバープライマー及び蛍光プローブを含む。サンプル F は、豚インフルエンザ A 型（SW InfA）に対応するフォワードプライマー、リバープライマー及び蛍光プローブを含む。サンプル G は、豚インフルエンザ H1 型（SW H1）に対応するフォワードプライマー、リバープライマー及び蛍光プローブを含む。サンプル H は、リボヌクレアーゼ P（RNase P）に対応するフォワードプライマー、リバープライマー及び蛍光プローブを含む。

#### 【0098】

図 13 は、第 2 実施例における、熱サイクル処理のサイクル数と測定される輝度との関係を示すグラフである。図 13 の横軸は熱サイクル処理のサイクル数、縦軸は輝度の相対値を表す。

#### 【0099】

図 13 に示されるように、サンプル E ~ サンプル H のいずれも、熱サイクル処理のサイクル数が 20 回 ~ 30 回程度となる辺りから輝度が大きく上昇していることが分かる。これによって、RNA を鋳型として逆転写された cDNA が増幅されていることが分かる。サンプル H は内在性コントロールの実験であり、サンプル H で輝度が上昇していることから、ヒトサンプル由来の DNA（cDNA）が増幅されたことが確認できた。さらに、サンプル E ~ サンプル H で cDNA が増幅されたことから、ヒトサンプルには InfA、SW InfA、SW H1 の全ての RNA が含まれていたことがわかった。この結果は、イムノクロマトグラフィーの結果とも合致している。したがって、本実施形態に係る熱サイクル装置 1 を用いて、ホットスタートを含んだ 1 step RT-PCR を行うことができることが確認された。

#### 【0100】

なお、上述した実施形態及び変形例は一例であって、これらに限定されるわけではない。例えば各実施形態及び各変形例は、複数を適宜組み合わせることが可能である。

#### 【0101】

本発明は、上述した実施形態及び実施例に限定されるものではなく、さらに種々の変形が可能である。例えば、本発明は、実施形態で説明した構成と実質的に同一の構成（例えば、機能、方法及び結果が同一の構成、あるいは目的及び効果が同一の構成）を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成の本質的でない部分を置き換えた構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成と同一の作用効果を奏する構成又は同一の目的を達成することができる構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成に公知技術を付加した構成を含む。

#### 【符号の説明】

#### 【0102】

1 ... 熱サイクル装置、15 ... 装着部、16 ... 固定部材、17 ... フランジ、18 ... フランジ、19 ... 導線、21 ... 第 1 加熱部、21a ... 第 1 ヒーター、21b ... 第 1 ヒートブロック、22 ... 第 2 加熱部、22a ... 第 2 ヒーター、22b ... 第 2 ヒートブロック、30 ... 駆動

10

20

30

40

50

機構、31...軸受、40...制御部、50...測定部、52...スライド、100...反応容器、  
110...流路、111...第1領域、112...第2領域、130...液体、140...反応液、  
151...挿入口、210...フィン

【配列表フリーテキスト】

【0103】

配列番号1は、Inf Aのフォワードプライマーの配列である。

配列番号2は、Inf Aのリバースプライマーの配列である。

配列番号3は、Inf Aの蛍光プローブの配列である。

配列番号4は、SW Inf Aのフォワードプライマーの配列である。

配列番号5は、SW Inf Aのリバースプライマーの配列である。

配列番号6は、SW Inf Aの蛍光プローブの配列である。

配列番号7は、SW H1のフォワードプライマーの配列である。

配列番号8は、SW H1のリバースプライマーの配列である。

配列番号9は、SW H1の蛍光プローブの配列である。

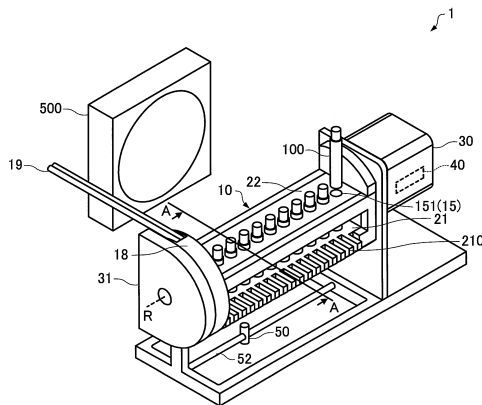
配列番号10は、RNase Pのフォワードプライマーの配列である。

配列番号11は、RNase Pのリバースプライマーの配列である。

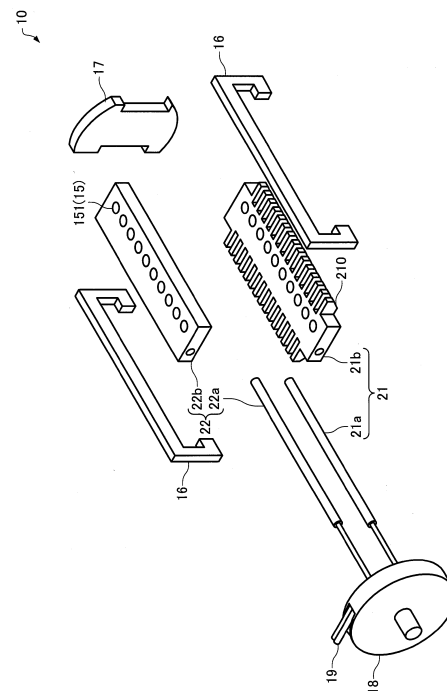
配列番号12は、RNase Pの蛍光プローブの配列である。

10

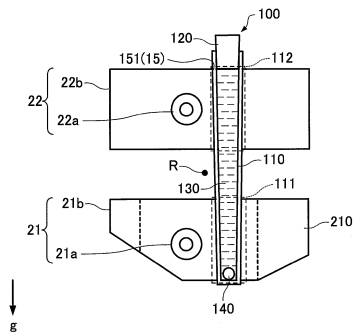
【図1】



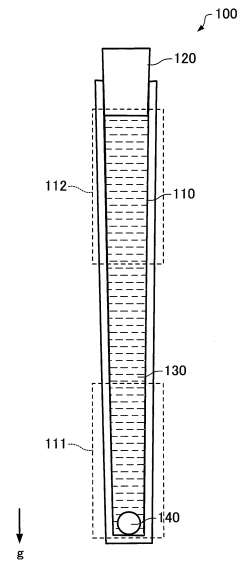
【図2】



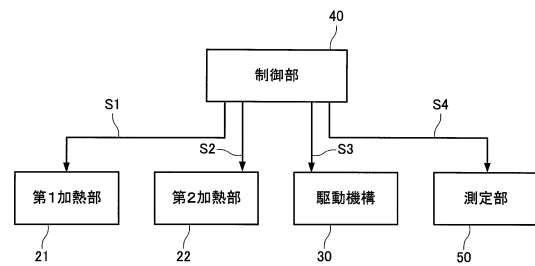
【図3】



【図4】

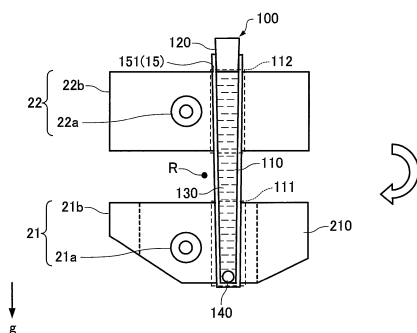


【図5】

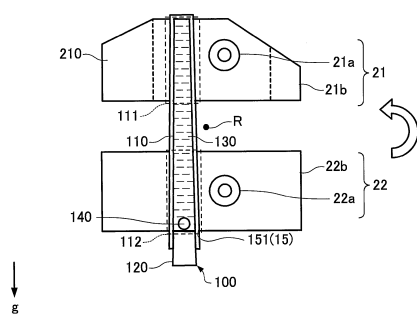


【図6】

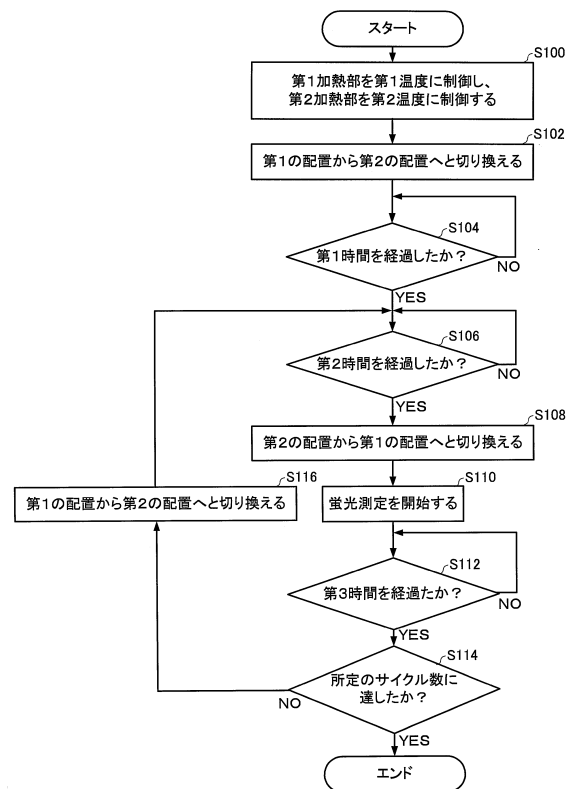
(A)



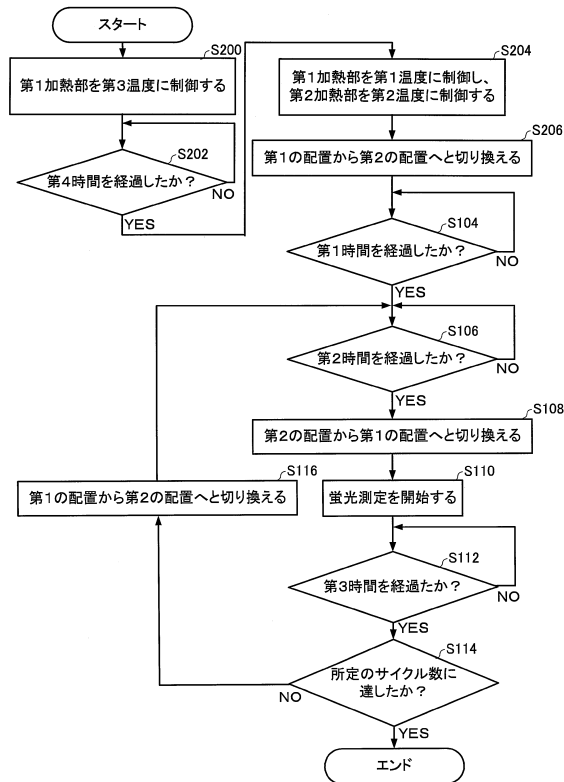
(B)



【図7】



【図 8】



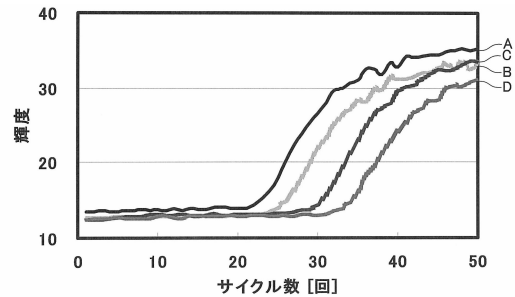
【図 9】

組成	保存濃度	最終濃度	液量 [μL]
SuperScript III Platinum			0.2
Buffer	2x	1x	5
F primer	40μM	0.8μM	0.2
R primer	40μM	0.8μM	0.2
Probe	10μM	0.2μM	0.2
Distilled Water			3.2
プラスミド			1
total			10

【図 10】

Infa F primer	5'- GAT ORA TCC TGT CAC CTC TGA C -3'
Infa R primer	5'- AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA -3'
Infa Probe	5'- TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG -3'
SW Infa F primer	5'- GCA CGG TGA GCA OTT ATY CTR AG -3'
SW Infa R primer	5'- GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC -3'
SW Infa Probe	5'- CYA CTG CAA GCC CAT ACA CAC AAG CAG CA -3'
SW H1 F primer	5'- GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA -3'
SW H1 R primer	5'- CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC -3'
SW H1 Probe	5'- CA GAA TAT ACA TCC RGT CAC AAT TGG ARA A -3'
RNaseP F primer	5'- AGA TTT GGA CCT GCG AGC G -3'
RNaseP R primer	5'- GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT -3'
RNaseP Probe	5'- TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG -3'

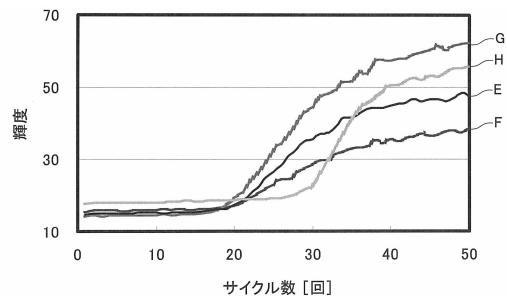
【図 11】



【図 12】

組成	保存濃度	最終濃度	液量 [μL]
SuperScript III Platinum			0.2
Buffer	2x	1x	5
F primer	40μM	0.8μM	0.2
R primer	40μM	0.8μM	0.2
Probe	10μM	0.2μM	0.2
Distilled Water			3.2
RNA			1
total			10

【図 13】



【配列表】

0006216494000001.app

---

フロントページの続き

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 福井 悟

審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特開 2 0 1 1 - 1 7 4 7 3 4 ( J P , A )  
特表 2 0 1 0 - 5 1 6 2 8 1 ( J P , A )  
特表 2 0 0 4 - 5 0 8 8 3 7 ( J P , A )  
特開 2 0 0 5 - 0 3 4 1 2 1 ( J P , A )  
特表 2 0 0 8 - 5 2 6 2 1 6 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12M1/00