

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710135982.5

[51] Int. Cl.

C12M 1/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 8 日

[11] 公开号 CN 101012437A

[22] 申请日 2005.4.11

[21] 申请号 200710135982.5

分案原申请号 200510064516.3

[30] 优先权

[32] 2004.4.9 [33] JP [31] 116173/2004

[71] 申请人 太阳诱电株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 楸原直人 石黑隆

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 杨宏军

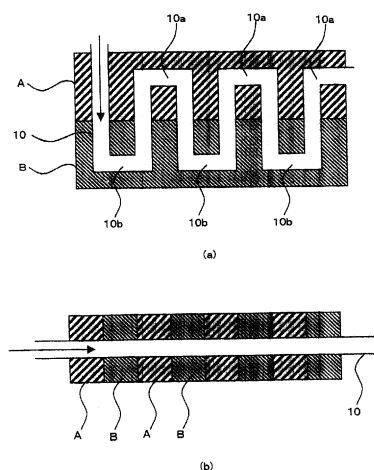
权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图 17 页

[54] 发明名称

核酸分析用盘片

[57] 摘要

本发明提供一种核酸分析用盘片，是在被旋转驱动的盘片上设置有形成了预制沟、进行信息读取或写入的信息记录区域、及形成了流过含有核酸的分析用样品的流路的样品分析区域的核酸分析用盘片，其特征为，该盘片被构成为使对所述信息记录区域进行信息读取或写入的方向与对所述样品分析区域进行光学检测的方向隔着所述盘片相对向。



1. 一种核酸分析用盘片, 是在被旋转驱动的盘片上设置有形成了预制沟、进行信息读取或写入的信息记录区域、及形成了流过含有核酸的分析用样品的流路的样品分析区域的核酸分析用盘片, 其特征为, 该盘片被构成为使对所述信息记录区域进行信息读取或写入的方向与对所述样品分析区域进行光学检测的方向隔着所述盘片相对向。

2. 如权利要求 1 所述的核酸分析用盘片, 其特征为, 所述流路至少部分具有锯齿形图案, 该锯齿形图案边锯齿状弯曲前进, 边沿所述盘片的圆周方向行进。

3. 如权利要求 2 所述的核酸分析用盘片, 其特征为, 所述流路的一部分上分别形成有供给用液体储存部及收容用液体储存部, 所述供给用液体储存部比所述收容用液体储存部及具有所述锯齿形图案的流路更靠近圆周内侧。

4. 如权利要求 1 所述的核酸分析用盘片, 其特征为, 所述信息记录区域具有光信息记录介质的记录结构。

5. 如权利要求 1 所述的核酸分析用盘片, 其特征为, 所述信息记录区域具有记录层、及位于其背面侧的反射层, 所述样品分析区域具有所述流路及位于其背面侧的反射层, 相对于对应的反射层, 所述记录层和所述流路分别位于反向侧。

6. 如权利要求 1 所述的核酸分析用盘片, 其特征为, 所述信息记录区域设置在盘片的圆周内侧, 所述样品分析区域设置在盘片的圆周外侧。

7. 如权利要求 1 所述的核酸分析用盘片, 其特征为, 在与所述信息记录区域的预制沟形成面相同的平面上形成所述流路的凹部, 以密封部件封闭该凹部的开口部, 形成所述流路。

8. 如权利要求 1 所述的核酸分析用盘片, 其特征为所述盘片具有下述结构: 在一侧表面形成了所述信息记录区域的预制沟、记录层、反射层的基板, 及在该基板的反射层形成面上直接或通过保护层形成

的密封部件，该密封部件的内侧面形成有所述流路的凹部。

9. 如权利要求 1 所述的核酸分析用盘片，其特征为，在所述样品分析区域中，设置有记录了可通过所述光学检测装置读取的信息的预制槽或预制沟。

核酸分析用盘片

本申请是申请日为 2005 年 4 月 11 日、申请号为 200510064516.3、发明名称为核酸分析方法、分析装置及分析用盘片的申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及一种核酸分析方法、分析装置及分析用盘片，该分析方法为：使含核酸的分析用样品流过以重复模式改变温度的流路，并以光学方法检测样品中经 PCR 扩增的核酸浓度等。

背景技术

聚合酶链式反应（PCR）法为选择性扩增样品中微量存在的特定 DNA 的方法，通过此方法扩增的 DNA 可作为单一的化学物质进行分析或利用。分析和利用由此分离的 DNA 的技术不仅被应用于科学研究和医疗领域，也被广泛应用于全体工业界。

作为应用 PCR 方法的分析方法，已知的实时（real time）PCR 方法为通过 PCR 选择性扩增作为定量目标的 DNA、并基于得到的扩增曲线间接测定样品中所含 DNA 的最初含量的方法。该方法伴有利用逆转录酶由具有特定序列的 RNA 定量合成互补 DNA 的反应，因而也作为测定样品中 RNA 量的方法进行利用。

实时 PCR 方法被广泛用作具有可重复性、提高了定量性的测定方法，并且也用作无需繁琐操作的简便的 DNA 或 RNA 定量方法。其应用领域并非局限于核酸浓度测定法，也被用作有效检测及鉴定基因多态性的方法，所谓基因多态性已知为人类基因的单核苷多态性（Single Nucleotide Polymorphism; SNP），使与疾病相关的基因功能产生个体差异。

不局限于 PCR，比较慢的反应也可利用简单的方法对其发展过程进行经时追踪。即，在反应过程中从反应容器内取出部分样品，通过对取出的样品进行逐一分析以追踪该反应的发展过程的方法；或在多个容器中分别注入同一反应液，使这些容器分别处于同一反应条件

下，并在特定时刻逐一停止不同容器中的反应，以此获得同一反应的时间系列样品，并对该时间系列的样品进行逐个分析以追踪该反应进行过程的方法。但前一种方法需要进行取样，后一种方法不能在同一容器中进行分析，两者都不能在封闭的体系中检测最初至最后的反应过程。另外，被取样、测定的样品也无法用于其后的反应。

为得到实时 PCR 方法中定量所需的 DNA 扩增曲线，必须对反应进行过程进行经时追踪以获得反应样品溶液中与 DNA 含量相关的信息，此时，为提高定量性、反应体系的稳定性、测定装置的简易性等，优选在整个反应过程中保持反应体系的同一性和同质性，另外，还优选尽量减少必需的反应样品溶液量。

因此，期望不采用上述的简单方法，而是使最初至最后的反应全过程在密闭的体系中进行，关于此问题，例如在专利文献 1 及 2 中作为用于由荧光监测 DNA 扩增的系统和方法，公开了可在监测反应进程的同时迅速控制 PCR 样品的装置。

根据 PCR 方法的原理，可将 PCR 的 1 个全反应过程分为 3 个阶段进行说明。即，作为目标的模板 DNA 解离为单链 DNA 的过程；此单链 DNA 与寡聚核苷酸（引物 DNA）形成双链结构的过程，该寡聚核苷酸具有可与从模板 DNA 中选择的特定序列形成双链的能力；以及以形成了双链的引物 DNA 的末端部分作为起始点的 DNA 延长反应过程。通过使反应样品溶液处于最适合各反应过程的温度下来依次进行上述三阶段的反应，也可将此温度循环定义为 PCR 温度循环。通过重复 PCR 温度循环进行 DNA 的复制合成，使目标 DNA 以指数函数扩增。由此，由于 PCR 产物的扩增倾向特性与样品中含有的 DNA 的最初量密切相关，因此优选在每个 PCR 温度循环中，反应达到平台期（plateau）后进行测定。

关于此问题，例如，除了专利文献 1 及 2，还在专利文献 3 中公开了一种装置，该装置可在使用空气作为导热介质的快速热循环中添加生物学样品。

另外，在专利文献 4 中公开了一种采用流式 PCR 的方法及装置。

在采用通常方法的 PCR 中,反应样品溶液被固定在 1 个反应容器内,并处于经时 PCR 温度循环中。与此相反,在流式 PCR 方法中,反应样品溶液在毛细管内沿流路移动,并且,该毛细管被配置成沿流路与反复改变温度的导热作用体物理性接触。即,通过使此毛细管沿流路与反复改变温度的导热作用体进行物理性接触,使以限定流速在毛细管内的空间中移动的反应样品溶液基于移动所需的经过时间被赋予 PCR 必须的温度循环。

因此,在流式 PCR 中对反应样品溶液赋予 PCR 温度循环的方法与通常的方法不同,因此不能使用现有的 PCR 装置来构造该装置的基本结构。因此,期待提供一种可在产业中廉价使用、并且可信性高的流式 PCR 装置。

为了使上述流式 PCR 之类将毛细管作为反应管的反应测定装置具有紧凑结构,期望将反应管固定于任一种基板上,并且,希望将该类毛细管内的反应体系与可通过光学检测装置直接观察反应样品溶液中含有物质质量的变化检测体系一同构成。

作为此类结构,在专利文献 5 中公开了一种结构,该结构在盘状基板上从该盘片中心呈放射状地形成多条流路,通过旋转该盘片使形成放射状的多条流路依次在一个检测系统中进行测定。

另外,专利文献 6 中还公开了一种装置及方法,该装置用于在机器内搭载的具有信息科学的超微量液体元件工学系统中,利用向心加速推进液体移动。

专利文献 1: 特表 2000-512138 号公报

专利文献 2: 特表 2000-509608 号公报

专利文献 3: 特表 2000-511435 号公报

专利文献 4: 特开平 6-30776 号公报

专利文献 5: 特表 2003-149253 号公报

专利文献 6: 特表 2002-503331 号公报

发明内容

如上述说明所述，在目前的 PCR 方法中，反应样品溶液固定于 1 个反应容器中，处于经时重复的 PCR 温度循环内。此时，在逐次经时进行的反应过程中，反应初期阶段观察到的信息不能通过观察进行至反应后期阶段的同一反应体系来获得。因此在目前的实时 PCR 方法中，关于反应进行过程中的反应样品溶液中的 DNA 量的信息，是通过与该反应体系的进程同步发挥功能的检测系统进行测定的。

通常，该类检测系统中，预先在反应试样溶液中混合可通过与双链 DNA 结合而增大荧光强度的荧光色素，将其作为在 PCR 进行过程中直接或迅速地进行应答的检测用试剂使用，相反，难以利用间接或缓慢应答的该类检测用试剂。

另外，在 PCR 方法中，DNA 在上述说明的每个 PCR 温度循环中进行复制，为进行可忠实反映其扩增效率的测定，以适当的时机检测在 PCR 温度循环中动态形成的双链 DNA - 荧光色素复合物是很重要的。最佳时机根据样品、模板 DNA 量、引物、温度循环等 PCR 条件不同而各异，并且也根据每个 PCR 温度循环不同而不同，但目前的 PCR 中，如上所述，由于采用逐次经时进行的反应体系，因此无法将获得的信息反馈至反应体系或检测系统而加以利用。并且，也无法在反应进行后测定几种不同的性质。

上述专利文献 1、专利文献 2、专利文献 3 中公开的实时 PCR 的方法及装置利用现有的 PCR 方法，不是从本质上解决上述问题的技术。

与此相反，流式 PCR 的方法中，如上所述，反应样品溶液在流路的空间中移动，基于移动所需的经过时间赋予 PCR 温度循环。此时，存在于从流路的起点至终点的各不同距离的反应样品溶液，对应于其距离，成为 PCR 整个反应过程中从初期到后期的各个不同反应阶段的反应样品溶液。因此，通过在多个部位观察稳态移动的 PCR 反应样品溶液，可以在同一时间观察到在流路中进行的 PCR 反应过程。

通过利用在实时 PCR 中组合具有此类特征的流式 PCR 方法得到的流式实时 PCR，不必利用能够与该反应的进程同步发挥功能的检测

系统测定有关反应进行过程中反应样品溶液中的 DNA 量的信息，可以消除如上述说明的缺点。

另外，在作为测定装置使用时，当反应体系和检测系统及连接它们的控制系统的任一功能在反应中出现故障时，不得不中断操作，或在检测系统出现故障的情况下进行温度循环时，关于此期间反应的信息可能丢失而无法取回。另外，通常检测系统的输出和灵敏度会随时间发生变化，因此当装置开始工作时输出和灵敏度的变化显著，而装置稳定后其输出和灵敏度也不能说完全没有变化，输出和灵敏度的漂移现象时常发生。

而通过流式实时 PCR 方法，可以同时连续进行需要比较的测定，可以省去由如上所述的装置系统的故障引起的测定时间的浪费。

虽然在实时 PCR 中利用流式 PCR 方法的原理有很大优点，但与此技术相关的报告较少，尤其是期望得到一种在流路中多个部位的正确位置上有效地测定关于沿流路移动的反应样品溶液中 DNA 量的信息的技术，但目前仍然缺少用于该目的的现有技术。

上述专利文献 4 中记述了可通过紫外线照射等检测毛细管中反应的进行情况的方法，但是在毛细管的哪个部位进行测定、测定一个部位还是测定多个部位等等都没有明确记载，也未公开需要测定反应的何种参数而如何解决。另外，专利文献 5 中公开了一种利用一个检测体系检测多条流路的方法，但是，并未公开在多个部位测定同一流路的技术。另外，未形成适用于流式 PCR 方法的装置。

另外，用于流式反应的装置中，不能缺少用于产生稳态反应样品液流的输液系统，但为了实现测定装置的紧凑化，不采用输液泵等的装置比较有利。

在上述专利文献 6 中公开了在旋转的盘状基板上配置毛细管、为推动液体移动而使用向心加速的超微量液体元件工学系统的相关技术。但是，向心加速主要用于推进液体移动至反应液储存处，未公开为了产生反应样品溶液的稳态液流而利用向心加速的技术。另外，也没有记载沿流式反应的通路进行光学测定的方法，也未公开适用于利

用向心加速的流式 PCR 的结构。另外，热源配置于基板上。

因此，本发明的目的为提供一种方法或结构体，可在随移动所需的经过时间进行反应的流式反应中，在流路的多个测定点对反应样品溶液状态的变化进行同时连续、而且不间断的光学测定；还提供一种可以更简便并且更快速地进行追踪反应进行过程的分析操作的核酸分析方法、分析装置及分析用盘片。

为实现上述目的，本发明的核酸分析方法的特征为，将含有核酸的分析样品流过以重复模式改变温度的流路，在上述流路的多个位置进行光学检测。

通过本发明的核酸分析方法，可随移动所需的经过时间，改变以限定流速在流路内移动的含有核酸的分析用样品的温度，并赋予反应样品溶液必需的温度循环。

另外，通过本发明的核酸分析方法，在上述流路中对含有核酸的分析用样品进行 PCR 反应时，通过在上述流路的多个部位进行光学检测，例如在流路的开始部分显示 PCR 循环数较少的状态的扩增状态，在流路的结束部分显示 PCR 循环数较多的状态的扩增状态，因此通过一次性在各个部位进行检测，将该检测结果作为利用一个样品在 PCR 的经时过程中的检测结果，可以用一个样品大致同时地检测出 DNA 的扩增过程。

结果，即使在实时 PCR 之类需要正确获得扩增倾向时，也不必沿反应过程进行经时测定，也不需多个样品。另外，因为同时进行检测，所以使测定条件一定，可提高测定精度。另外，通过固定各循环的测定点，即使在未达到平台期的状态下，也可以固定各循环的条件，可正确地获得扩增倾向。当然，通过预先求得到达各循环平台期的位置，可以在各循环的测定点到达平台期的状态下进行测定，从而可以更正确地获得扩增倾向。另外，也可以使用应答缓慢的试剂作为上述检测用试剂，此时，在 PCR 结束时，可通过在该检测用试剂的应答时间经过后进行光学测定来获得平台期状态的结果。

在本发明的分析方法中，上述含核酸的分析用样品优选包含 DNA

聚合酶、引物 DNA、以及 dNTP，可根据需要添加模板 DNA、检测物质。由此，通过使在上述流路内移动的该样品通过以规定的重复模式进行温度变化的流路，可顺次赋予用于解离过程的高温状态、双链形成过程及 DNA 延长反应过程适宜的低温状态、及 PCR 的温度循环。另外，通过将微小的毛细管作为 PCR 的反应管，使导热作用体和反应液的热容量比充分增大，可以使反应液温度迅速改变。

另外，在本发明的分析方法中，通过对在上述流路的多个部位生成的 PCR 产物进行光学检测，可以获得随移动的经过距离顺次赋予的每个温度循环的 DNA 量的相关信息。由此，可得到利用 PCR 合成的 DNA 的扩增曲线，另外，基于使用已知量的模板 DNA 绘制的对照标准曲线，可求得样品中的 DNA 初始浓度。

另外，上述光学检测优选如下进行：用光照射上述流路应检测的部位，并检测由照射光引发的透射光、反射光、或发射光。由此，可以采用比较简单的装置进行迅速的检测。

另外，在上述多个部位的检测优选在上述分析用样品通过上述温度为非高温部分的部位进行。由此，也可以使用例如嵌合剂（intercalator）等进行最适温度为非高温的检测。

而且，上述流路至少部分具有锯齿形（zigzag）图案，优选将该流路形成为使从锯齿形图案的折返部至下一个折返部的流路通过不同的温度区域。由此，容易形成通过区域，以便按规定的重复模式改变上述含有核酸的分析用样品的温度。

而且，优选将上述流路形成在被旋转驱动的盘片上，在盘片上形成同心状的高温区域和低温区域，并形成上述锯齿形图案，使从折返部至下一个折返部的流路通过形成同心状的上述高温区域和上述低温区域。由此，利用盘片旋转产生的离心力可使样品流入流路，并且容易使该样品沿流路反复通过低温区域和高温区域。

另外，优选在上述盘片上设置信息记录区域和样品分析区域，利用上述信息记录区域进行信息的读取或写入，在上述样品分析区域中，设置上述流路以进行光学检测。由此，可读取记录在信息记录区

域的信息，进行分析条件等的控制，另外，分析结果等也可记录在信息记录区域。

另外，优选在隔着上述盘片而相对的方向分别对上述信息记录区域进行信息的读取或写入、和对上述样品分析区域进行光学检测。由此，可以将对信息记录区域进行信息的读取或写入的装置和对分析区域进行光学检测的装置设置在夹着盘片的正反两侧，容易构成装置，而且作为对信息记录区域进行信息的读取或写入的装置，可以采用已有的光信息记录介质的驱动器结构，可降低制造成本。

另一方面，本发明的核酸分析用装置的特征为，该装置具有以下部分：使上述含有核酸的分析用样品流过流路时，控制通过区域的温度来以重复模式改变温度的温度控制装置，及对在上述流路中流动的上述含有核酸的分析用样品进行光学检测的光学检测装置，并将该装置构成为在上述流路的多个部位利用上述光学检测装置进行检测。

通过本发明的核酸分析装置，可如下所述地进行分析：使含有核酸的分析用样品流入流路，使之通过由上述温度控制装置形成的温度控制区域，在上述流路的多个部位对在该流路中流动的含核酸的分析用样品进行分析。

在本发明的核酸分析装置中，上述光学检测装置优选具有对上述流路的应检测部位进行光照射的照射装置、及检测由照射的光产生的透射光、反射光、或发射光的受光装置。由此，可以利用比较简易的装置进行迅速的检测。

另外，优选将该装置构成为在上述含有核酸的分析用样品通过上述非高温部分的部位进行上述多个部位的检测。由此，也可以使用例如嵌合剂（intercalator）等进行最适温度并非高温的检测。

另外，上述装置优选构成为：上述流路至少部分具有锯齿形图案，利用上述温度控制装置，使该锯齿形图案的折返部分至下一个折返部分的流路可通过由上述温度控制装置形成的温度控制区域。由此，可以容易地形成通过区域，以规定的重复模式改变温度。

另外，优选将上述流路形成在被旋转驱动的盘片上，且此盘片上

高温区域与低温区域形成同心状，上述锯齿形图案形成为使折返部分至下一个折返部分的流路通过形成同心状的上述高温区域与上述低温区域。由此，可利用盘片旋转产生的离心力使样品流入流路，并且容易沿流路反复形成低温区域和高温区域。

另外，优选在上述盘片上设置信息记录区域和样品分析区域，在上述信息记录区域，对向设置进行信息的读取或写入的光信息记录介质的读取或写入装置，在上述样品分析区域，对向设置对上述流路的规定部位进行光照射、及检测该透射光、反射光、或发射光的上述光学检测装置。由此，可读取信息记录区域中记录的信息，及控制分析条件等，还可将分析结果记录在信息记录区域。

另外，优选将该装置构成为使对上述信息记录区域进行信息的读取或写入、及对上述样品分析区域进行的光学检测隔着上述盘片对向地进行。由此容易构成装置，并可采用现有的光信息记录介质的驱动器结构作为对信息记录区域进行信息的读取或写入的装置，以降低制造成本。

另外，本发明的核酸分析用盘片为，在被旋转驱动的盘片上设置有进行信息读取或写入的信息记录区域、及形成了含核酸的分析用样品流入的流路的样品分析区域的核酸分析用盘片，其特征为，对上述信息记录区域进行信息的读取或写入的方向，与对上述样品分析区域进行光学检测的方向形成为包夹上述盘片相对置的结构。

利用本发明的核酸分析用盘片，可以读取记录在信息记录区域的信息，控制分析条件等，另外，可以将分析结果记录在信息记录区域。另外，对上述信息记录区域进行信息的读取或写入的方向，与对上述样品分析区域进行光学检测的方向形成为包夹上述盘片相对向的结构，从而容易构成分析装置。

在本发明的核酸分析用盘片中，优选如下构成：上述流路至少部分含有沿上述盘片的圆周方向行进的锯齿形图案，并通过配置于盘片外部的温度控制装置，沿位于上述锯齿形图案的圆周内侧的折返部的列或位于圆周外侧的折返部的列的任意一方形成高温区域，沿其它任

意方向形成低温区域。由此，可以利用盘片旋转产生的离心力使样品流入流路，并可容易地沿流路反复形成低温区域和高温区域。

另外，在上述流路的一部分分别形成有供给用液体储存部、及收容用液体储存部，上述供给液体储存部优选设置在比上述收容用液体储存部及具有上述锯齿形图案的流路更靠近圆周内侧的位置。由此，通过旋转盘片时产生的离心力，可将从注入口注入上述供给用液体储存部的样品沿流路流动，并通过上述具有锯齿形图案的流路，流入上述收容用液体储存部。

另外，上述信息记录区域优选具有光信息记录介质的记录结构。由此，可采用现有的光信息记录介质的驱动器结构作为对信息记录区域的信息进行读取或写入的装置，以降低制造成本。

另外，上述信息记录区域具有记录层、及位于其背面侧的反射层，上述样品分析区域具有上述流路、及位于其背面侧的反射层，相对于对应的反射层，优选使上述记录层和上述流路位于相反一侧。由此，读取或写入装置和上述光学检测装置发出的光被对应的反射层反射，并可通过各自的装置接收光，因此容易构成装置。

另外，优选将上述信息记录区域设置于圆周内侧，将上述样品分析区域设置于圆周外侧。由此，可直接使用现有的光信息记录介质的驱动器。

另外，优选在与上述信息记录区域的预制沟（pre-groove）形成面相同的平面上形成上述流路的凹部，并且将该凹部的开口部分由密封部件进行密封以形成上述流路。由此，在盘片上形成预制沟时，可同时形成流路的凹部，从而简化制造工序。

或者，上述盘片优选具有基板及密封部件，该基板的一侧表面上形成了上述信息记录区域的预制沟、及记录层、反射层，该密封部件直接或隔着保护层形成在此基板的上述反射层形成面上，并在此密封部件的内面形成上述流路的凹部。由此，即使盘片基板的形状相同，仅改变密封部件的形状，即可改变流路的形状，从而可以根据用途容易地制作多种分析用盘片。

或者,在上述样品分析区域中,优选设置通过上述光学检测装置记载了可读取的信息的预制槽(pre-pit)或预制沟。由此,通过光学检测装置等对预制槽或预制沟进行读取,例如可以对位样品投入口或分析部位、可确认设置了多条流路时的流路编号、及检测盘片旋转速度等。

通过本发明,可取得流式反应流路保存反应过程的功能,并可以利用光学检测系统对保存于流路内的反应过程同时连续且持续地进行扫描,进行一次性测定。因此,不必采用通过在反应体系进行的同时发挥功能的检测系统进行测定的方法,使多次光学测定成为可能,并可进行提高了精度或变更了光学条件的测定。

通过在核酸分析中利用本发明,可简化PCR的动力学分析或反应开始时的模板DNA浓度的定量。即,通过缩短从光学测定开始至结束的时间,缓和对光学检测系统的稳定性要求。并且,可以利用一个光学检测系统实现多个条件下的光学测定。而且,可使对PCR进程应答缓慢的检测用试剂的使用成为可能,使检测用试剂、光学测定的选择更为灵活。

另外,在利用本发明的核酸分析用盘片时,由于在与基板的旋转中心同中心的圆的圆周上存在一个连续流路上的多个测定点,因此可通过基板的旋转,在该光学系统固定的情况下直接连续地测定在一个连续流路上的多个测定点。另外,通过基板的旋转使光学检测系统固定的定点观察成为可能。

因此通过本发明,可直接利用现有光信息记录介质的驱动或检测系统的部分结构,以构成用于实施上述方法的核酸分析装置或核酸分析用盘片。

附图说明

图1为示出本发明的核酸分析方法中流路的例子的说明图。

图2为示出本发明的核酸分析方法中样品检测部位的例子的说明图。

图 3 为示出本发明核酸分析装置的一个实施方案的简要结构的说明图。

图 4 为示出本发明的核酸分析用盘片的一个实施方案的平面图。

图 5 为同一核酸分析用盘片的流路的放大说明图。

图 6 为示出同一核酸分析用盘片的截面结构的模式图。

图 7 为示出本发明的核酸分析装置中使用的光学检测装置的例子的说明图。

图 8 为示出本发明的核酸分析装置中使用的流路检测装置之一例的说明图 (a) 和光学检测元件 97 的正面观察图 (b)。

图 9 为示出本发明的核酸分析用盘片的其它例子的截面模式图。

图 10 为示出本发明的核酸分析用盘片其它例子的截面模式图。

图 11 为示出本发明的核酸分析用盘片其它例子的截面模式图。

图 12 为按制造工序示出本发明的核酸分析用盘片其它例子的说明图。

图 13 为按制造工序示出本发明的核酸分析用盘片其它例子的说明图。

图 14 为按制造工序示出本发明的核酸分析用盘片其它例子的说明图。

图 15 为示出在本发明的核酸分析用盘片中, 设置预制槽信息的其它例子的说明图。

图 16 为示出在本发明的核酸分析用盘片中, 设置伺服信号的其它例子的说明图。

图 17 为示出本发明的实施例中通过流式实时 PCR 扩增质粒 DNA 的特定序列、测定得到的荧光强度结果的图表。

附图标记

10 流路

10a、10b 折返部分

11 注入口

12 供给用液体储存部

- 13 锯齿形部分
- 14 收容用液体储存部
- 15 空气出口
- 16 测定点
- 20、20a、20b、20c 光学检测装置
- 21 光源
- 22、23 分光装置
- 24 检测器
- 25 分束器
- 30 分析装置
- 40 旋转装置
- 50、50a、50b、50c 盘片
- 51 插通孔
- 52 信息记录区域
- 53 样品分析区域
- 54 基板
- 55 预制沟
- 56 凹部
- 56a 沟槽部
- 57 光吸收层
- 58、58a 反射层
- 59 顶涂层
- 60 密封部件
- 61 聚乙烯层叠层膜
- 61a 孔
- 62 预制槽
- 63 定位用伺服信号
- 70 温度控制装置
- 71 高温加热部

- 72 低温加热部
- 90 流路的检测装置
- 91 激光光源
- 92 多重透镜
- 93 半反射镜
- 95 物镜
- 96 聚光镜
- 97 光学检测元件
- 101 衍射光栅
- 102 主光束
- 103 衍射光束
- 104 消除滤镜 (cut-off filter)
- 110 读取或写入装置
- 120 信息信号·视觉显示文字
- A 高温区域
- B 低温区域
- C 线
- L1、L2 线

具体实施方式

本发明中含核酸的分析用样品中可混合通常的核酸分析用试剂。因此, 为了通过上述 PCR 进行核酸分析, 只要含有通常使用的 PCR 用试剂即可, 具体为将下列成分在水溶液中混合: 用于扩增目的的模板 DNA, 特征为最适温度为高温的、作为合成与模板互补的 DNA 的酶的耐热性 DNA 聚合酶, 可与从上述模板 DNA 上选择的 2 处特定序列分别形成双链的 2 种引物 DNA, 以及作为 DNA 聚合酶底物的核苷酸。

另外, 采用本发明中的核酸分析方法进行实时 PCR 时, 作为含核酸的分析用样品可进一步含有如下物质: 通过与双链 DNA 相结合增

大荧光强度的色素（荧光色素）；或设计成在附近配置有色素·淬灭基团、利用 DNA 的延长反应引发色素·淬灭基团的离解的核酸探针；或为了通过供体色素与受体色素被分别加成而得到的两种核酸探针在相邻的区域发生杂交，以产生色素间的荧光共振能量转移现象而设计的核酸探针。与含核酸的分析用样品相混合的荧光色素或核酸探针并无特别限制，可根据用途进行选择。例如，作为荧光色素，可以举出优选使用的 SYBR Green I（Molecular Probes）。另外，作为上述核酸探针，可以举出优选使用的具有随机序列的 TaqMan 探针（Roche）、Hybridization Probes（Roche）等。利用本发明中的核酸分析方法进行定量的模板 DNA 的来源或碱基序列没有特别限制，可采用从人类的血液、尿、唾液、精液、乳汁等中提取的物质，并且也可为来源于人以外的生物的物质。

混合于本发明中的含核酸的分析用样品中的耐热性 DNA 聚合酶并无特别限制，根据用途可使用各种耐热性 DNA 聚合酶。例如当扩增的 DNA 不足 3k 碱基时，优选使用作为标准的 pol I 型 Taq DNA 聚合酶的 TaKaRa Taq（TaKaRa）、Gene Taq（NIPPONGENE）等。另外，进行正确的 PCR 时可以举出优选使用的 α 型 DNA 聚合酶的 KOD plus、Pfu DNA 聚合酶、Pfu Turbo DNA 聚合酶（TOYOBO）、PLATINUM Pfx DNA 聚合酶（Invitrogen）、Pyrobest DNA 聚合酶（TaKaRa）、ProofStart DNA 聚合酶（Qiagen）、Pwo DNA 聚合酶（Roche）、Advantage HF2（Clontech）等。另外，当扩增超过 20k 碱基的长链 DNA 时，可以使用通过一同使用 Taq DNA 聚合酶和具有 3'→5' 外切酶活性的耐热性 DNA 聚合酶或使用缓冲液使富含 GC 的序列的扩增达到最佳化，使长链 DNA 的扩增成为可能的产品，可以举出优选使用的 KOD Dash、EXL DNA 聚合酶（TOYOBO）、Expand 20kb PCR System（Roche）、PLATINUM Taq DNA 聚合酶 High Fidelity、Elongase Enzyme Mix、ThermalAce DNA 聚合酶（Invitrogen）、Advantage Genomic and -GC Genomic（Clontech）、TaKaRa LA Taq with GC buffer（TaKaRa）等。

DNA 的光学检测方法可以使用下述的方法。

例 1: 使用通过与双链结合增强荧光的色素的方法

PCR 试剂可使用例如 Roche Diagnostic 社的 PCR 试剂盒(商品名“LC DNA Master SYBR Green I 试剂盒”)。该试剂盒包含 TaqDNA 聚合酶、反应缓冲液、dNTP, 并含有 SYBRGreenI 作为检测试剂。该试剂盒为 10 倍浓缩, 例如 PCR 溶液总量为 20 μ l 时加 2 μ l 即可。对于模板 DNA, 例如当 PCR 溶液的总量为 20 μ l 时其含量只要为 10 ~ 100ng 即可, 将引物 DNA 调整至终浓度为 0.1 ~ 1 μ M 即可。另外, 只要将引物 DNA 设计成能够使 PCR 中的模板 DNA 内的扩增区域在 50 ~ 1000 碱基之间即可。另外使用该试剂盒中附带的 $MgCl_2$ 原液(stock), 调整 $MgCl_2$ 的浓度为 1 ~ 5mM, 最后溶液的总量以纯水进行调节。

使用输液装置将上述配置的反应溶液输送至流路中。流路和温度设定优选参照 Kopp 等的文献(Science 280,1046-1048(1998))中所述的方法。输液的最佳流速有时根据流路的内径等不同而各异, 优选 10 秒 ~ 1 分钟通过 1 个温度循环。

上述高温区域的设定温度, 根据模板 DNA 的长度或序列不同而不同, 通常数百碱基的模板 DNA 时加热至 90 ~ 99 $^{\circ}C$, 优选至 92 ~ 97 $^{\circ}C$ 。另一方面, 上述的 2 个低温区域内, 一个低温区域 B1 的设定温度根据与引物 DNA 的离解温度不同而不同, 使用 15 ~ 30 碱基的引物 DNA 时为 55 ~ 70 $^{\circ}C$ 。另一个低温区域 B2 的设定温度优选设定在作为聚合酶的最适温度的 70 $^{\circ}C$ ~ 75 $^{\circ}C$ 。本发明中, 上述高温区域优选如下形成: 通过在该流路的外部设置加热装置, 使在流路内移动的反应液能够加热至上述 DNA 的解离温度或该温度以上; 上述低温区域 B1、B2 优选如下形成: 通过在该流路的外部设置温度控制装置, 可以将流路内移动的反应液控制在上述 DNA 的解离温度或该温度以下。因此, 通过各设定温度的区域的时间之比优选使高温区域: 低温区域的比值为 1: 2 ~ 1: 3, 低温区域内的 2 个温度设定区域 B1、B2 的比值 B1: B2 优选为 1: 2 ~ 1: 3。

以上述条件进行 PCR 后, 可通过荧光测定进行检测。激发波长优选为 SYBRGreenI 具有吸收的波长, 可使用 LED (470nm), 也可使用棱镜等从白色光源中分离, 而检测波长优选为 510~550nm。通过选择荧光色素不仅可采用 LED 作为光源、还可采用青紫色 LD (405nm)、红色 LD (635nm) 等。

边利用上述基板旋转装置旋转基板, 边在流路上的测定点处照射激发光, 通过使用检测装置检测发出的荧光, 可测定流路上 PCR 反应的过程。流路上的测定点只要为 1 个循环中的低温区域即可, 可以是任意位置。但测定优选在全部循环结束后、从停止输液开始将反应溶液培养至少与通过高温区域-低温区域的 1 个循环相同的时间。

例 2: TaqMan 法

试剂使用 PCR 用试剂盒 (商品名 “TaqMan Universal PCR Master MixHybridization Probes 试剂盒”; Roche Diagnostic 社制), 使用 TaqMan Probe 作为检测试剂, 试剂的调制可通过试剂盒附带的方法进行。反应条件与例 1 相同。检测可通过荧光测定进行, 具体可使用与例 1 同样的方法进行检测。另外, 本例中可通过使用几种序列和色素不同的 TaqMan Probes 同时进行多个反应, 并进行检测。结合于 TaqMan Probes 的色素可从公知的例如 FAM、Cy3、Texas Red、Cy5 中选择, 激发波长分别为 450~495、500~550、565~590、630~650nm, 检测波长为 510~527、565~590、606~650、670~750nm。激发光可使用对应各波长的 LED, 也可使用棱镜等从白色光源中分离。在进行激发、检测波长不同的多个测定时, 可边改变检测系统的设定, 边多次进行下述检测方法, 即边利用上述基板旋转装置旋转基板, 边在流路上的测定点照射激发光, 通过检测装置检测发出的荧光。

在本发明的核酸分析方法中, 使上述含有核酸的分析用样品流入交替反复通过高温区域和低温区域的流路。作为此流路, 可以例如图 1(a) 所示采用以下结构: 沿锯齿形形状折返的流路 10、及沿该流路 10 的一侧折返部分 10a 的列设置的高温区域 A, 和沿另一侧折返部分 10b 的列设置的低温区域 B。但是, 也可以如图 1(b) 所示, 在例如

直线状延伸的流路 10 处交替形成高温区域 A 和低温区域 B。

此时，流路的高温区域 A 优选被设定为 90~99℃。低温区域 B 优选设定为 50~80℃，两个温度更加优选设定为 55~60℃、65℃~75℃。

流路也可进一步划分为 3 个、4 个或 4 个以上的温度领域。

另外，流路也可通过温度随时间升降的区域以进行温度循环。

通过使上述含有核酸的分析用样品通过上述流路，在高温区域发生双链 DNA 的离解，在低温区域中发生单链模板 DNA 和引物的结合及模板 DNA 和从引物的复合体的引物 3'末端开始的由 DNA 聚合酶引发的延长反应。

因此，在上述流路的多个部位，例如图 2 中沿着通过各循环的低温区域 B 的线 L1，利用光学检测装置 20 进行检测，从而对上述流路内的上述含有核酸的分析用样品的反应进行过程进行连续检测。

另外，图 2 中沿着从上述流路的高温区域 A 至低温区域 B、或从低温区域 B 至高温区域 A 移动的线 L2，以规定间隔在多个部位利用光学检测装置 20 进行检测，此时，流路内的上述含有核酸的分析用样品升至高温的同时，可检测到 DNA 离解的状态，可以研究由 PCR 扩增的 DNA 的温度曲线（profile）。

光学检测系统优选利用与普通的分光光度计、荧光光度计同样的光学系统进行检测，也可进一步举出使用激光头进行检测的例子。作为光学系统的光源，可举出例如氙灯或卤素灯、及半导体激光等。而作为光学系统的受光器可举出例如光电倍增管或 CCD、光电二极管等。作为分光装置可由棱镜或滤镜、光栅、狭缝、分束器、透镜、反射镜等构成。吸光度的测定可在测定点使光通过，也可使光反射。荧光的检测只要在效率较好的任意位置配置受光器即可。浑浊度的测定基本上与吸光度的测定相同。

另外，优选将样品通过 1 个循环的高温区域和低温区域的时间调整至使各循环的反应均到达平台期。此调整可通过改变样品的流速、或流路的长度来进行。另外，也可监测各循环中的反应状态以控制上

述样品的流速。

通过使流路通过光学检测系统的下方可对多个点进行检测，因此可举出移动形成该流路的毛细管或基板的方法和移动光学检测系统的方法，可使用任一种或两种方法。

该流路的移动装置例如可举出使用电动机与螺杆、或电动机与传送带的普通运送装置。更加优选通过旋转流路使该多个点的测定成为可能，作为旋转装置例如可举出在步进电动机、或光碟驱动器中采用的主轴马达伺服(Spindle Servo)装置。使用光碟驱动器的主轴马达伺服装置时，需要使用形成了用于进行伺服的导轨的基板。形成了该导轨的基板可与形成了流路的基板相同，也可不同。光学检测系统通常难以移动，但是在极少的情况下也可利用普通的运送装置进行移动，作为小型的光学检测系统，可举出优选使用的光碟驱动器的激光头。

本发明的核酸分析方法可利用于例如环境监测、食品检测、农业检测、法医学、个人识别检测、动物识别检测等用途。

图3为示出用于实施本发明的核酸分析方法的分析装置之一例的简略结构图。如同图(a)所示，此分析装置30由下述部分构成：旋转装置40，通过此旋转装置40被旋转驱动的盘片50，及配置于此盘片50上方、用于形成高温区域和低温区域的温度控制装置70，配置于上述盘片50下方的偏向内周部分的光信息记录介质的读取或写入装置110，及配置于上述盘片50上方的偏向外周部分的光学检测装置20。

如同图(b)所示，温度控制装置70具有高温加热部71、及低温加热部72。高温加热部71和低温加热部72被配置成同心状，使高温加热部71处于内周、低温加热部72处于外周。作为温度控制装置70，优选使用例如电热丝、半导体式制冷元件(Peltier device)、灯管加热器(lamp heater)等。

图4中示出盘片50之一例。该盘片50的中心处具有旋转轴的插通孔51，在圆周内侧设置有信息记录区域52、在圆周外侧设置有样品分析区域53。在样品分析区域53中形成多条流路10。在此实施方

案中，将总计 15 条流路 10 配置成放射状，各流路被赋予 1~15 的 ID 编号，确认此 ID 编号 1~15，可对应各自的流路注入各样品。另外，为了使光学检测装置 20 能够识别上述多条流路的 ID 编号，使 ID 编号 15 的流路 10 和 ID 编号 1 的流路 10 的间隔大于其他的流路间隔。另外，盘片 50 被赋予了盘片识别编号 120。

如图 5 所示，各流路 10 具有以下部分：设置在其一端的样品注入口 11，供给用液体储存部 12，沿盘片 50 的半径方向、多次往返内侧和外侧的锯齿形部 13，收容用液体储存部 14，及设置在另一端的空气出口 15。注入口 11 及供给用液体储存部 12 与收容用液体储存部 14 相比更靠近圆周内侧。另外，图 5 中上述空气出口 15 与样品的注入口 11 被设置于同一圆周上，也可比注入口 11 更靠近内侧。

因此，当盘片 50 旋转时，从注入口 11 注入到供给用液体储存部 12 的样品，在离心力的作用下流入流路 10 的锯齿形部 13，并流入收容用液体储存部 14。该流速可通过控制盘片 50 的旋转速度或改变流路 10 的形状进行调整。例如通过将流路 10 的锯齿形部 13 的折返部分的截面积设定为比其他部分大，可以实现平稳的流动，或者也可以将一部分设定为比其他部分窄，设定流动开始时的临界值。因此上述高温区域 A、低温区域 B 形成横切上述锯齿形部 13 的流路，相对于基板旋转中心形成同心圆状。

如图 6 所示，盘片 50 具有聚碳酸酯等透明的基板 54。该基板 54 上的信息记录区域 52 中形成有预制沟 55，在样品分析区域 53 中形成有流路 10 的凹部 56。并且，在形成了预制沟 55 及凹部 56 的基板 54 的表面上，形成了由含有机色素的感光色素膜构成的光吸收层 57。并且，在此光吸收层 57 上形成了由 Au 等金属构成的反射层 58。并且，在信息记录区域 52 的整个面、与样品分析区域 53 的凹部 56 以外的部分形成由紫外线固化性树脂等构成的顶涂层 59。最后，使用由聚乙烯膜等构成的密封部件 60 进行被覆，封闭凹部 56，形成流路 10。

在上述盘片 50 中，信息记录区域 52 具有光信息记录介质的记录结构，通过配置于盘片 50 下方的读取或写入装置 110 进行信息的读

取或写入。另外，在样品分析区域 53 的流路 10 内流动的样品由光学检测装置 20 进行检测。因此，信息记录区域 52 的读取、写入方向，与样品分析区域 53 的光学检测方向位于隔着反射层 58 的相对侧，从而使读取或写入装置 110 及光学检测装置 20 的配置变得容易，作为读取或写入装置 110，可使用公知的光信息记录介质的驱动器结构，可降低制造成本。

如图 7 示出光学检测装置 20 的各种例子。同图 (a) 的光学检测装置 20a 中形成了如下结构：光源 21 发出的光经由分光装置 22 从盘片 50 的一侧对流路 10 的测定点 16 进行照射，透过至盘片 50 的相反面的透射光经由分光装置 23 于检测器 24 处被接收。

同图 (b) 的光学检测装置 20b 形成了如下结构：从配置于盘片 50 的一侧的光源 21，通过分光装置 22、分束器 25，对流路 10 的测定点 16 进行光照射，被形成在流路 10 的背面侧的反射层 58 反射的光，经分束器 25 以直角方向射出，通过分光装置 23 于检测器 24 处被接收。

同图 (c) 的光学检测装置 20c 形成了如下结构：从配置于盘片 50 的一侧的光源 21，通过分光装置 22，对流路 10 的测定点 16 进行光照射，样品中的特定成分接受光照而发光，此发射光通过分光装置 23 于检测器 24 处被接收。

图 8 (a) 示出流路的检测装置 90 之一例。该流路的检测装置 90 中，通过激光驱动电路（图中未显示）从 635nm 波长的激光光源 91 发射激光，该激光通过多重透镜 92、半反射镜 93、准直仪（图中未显示），进一步通过物镜 95，对流路（图中未显示）的测定点 16 处进行照射。流路中的分析用样品溶液中添加有经荧光色素 Cy5 修饰的 TaqMan 探针，因此当模板 DNA 存在时，利用 635nm 的激光可产生 670~750nm 的荧光。因此，被设置于流路的背面侧的反射层（图中未显示）反射的 635nm 的原始激光和由流路产生的 670~750nm 的荧光，通过物镜 95、准直仪（图中未显示）导入半反射镜 93 中，在半反射镜 93 处 90 度反射后，在衍射光栅 101 处使相位一致的 635nm 的

原始激光分成多束，通过聚光透镜 96 在光学检测元件 97 处聚光。

图 8 (b) 中示出在光学检测元件 97 上成像的主光束 102 及经衍射光栅 101 衍射得到的衍射光束 103 的像。主光束的像由原始的 635nm 的激光和 670 ~ 750nm 的荧光的混合光成像而成。而衍射光束只由原始的 635nm 的激光本身成像而成。在主光束成像的位置，于光学检测元件前面配置有不允许 650nm 或 650nm 以下波长的光通过的消除滤镜 104，因此可在主光束成像的点处检测荧光本身的光量。

因此，将由光学检测元件 97 得到的主光束·衍射光束的光量转变为电信号，通过放大电路（图中未显示）放大后，以主光束发出的信号测定荧光量，并利用衍射光束发出的信号进行焦点跟踪（focus tracking）等伺服操作。

利用如上所述的核酸分析装置 30，在盘片 50 的各流路 10 的注入口 11 处注入含有核酸的分析用样品，储存在供给用液体储存部 12 后，通过旋转装置 40 旋转盘片 50，使样品从供给用液体储存部 12 流入流路 10，使样品流过锯齿形部 13。此时，使样品反复通过利用温度控制装置 70 形成的高温区域 A 和低温区域 B，以实现 PCR 对 DNA 的扩增。

另外，最初流入流路 10 的样品到达收容用液体储存部 14 时，利用光学检测装置 20，沿盘片 50 周围的线 C（参照图 4）进行 DNA 检测。光学检测装置 20 在每个经过高温区域 A 和低温区域 B 的循环中，在低温区域 B 的特定部位进行 DNA 检测，利用未图示的计算机，基于该值求得各测定点的 DNA 浓度。

结果可求出经过高温区域 A 和低温区域 B 的循环重叠时的 DNA 扩增曲线。此扩增曲线中，作为检测对象的 DNA 样品中的初期浓度越高曲线上升越快，因此通过分析上述扩增曲线，可求得样品中目标 DNA 的初期浓度，能够定量目标 DNA。

另外，读取或写入装置 110 读取记载于信息记录区域 52 内的信息，正确地推算样品的注入口 11 的位置，或结合用光学检测装置 20 得到的检测值与对应的流路 10 的 ID 编号，有助于监测流路 10 的各

测定点的测定值，计算盘片 50 的最佳转速，并将控制信号传送至旋转装置 40。另外，每个流路 10 的样品结束 DNA 定量后，可将该结果写入信息记录区域 52。

另外，利用此分析装置，通过在样品流入流路 10、并流入收容用溶液储存部 14 的时刻进行检测，可一次性测定每循环中的 DNA 浓度，从而可有效地进行测定操作。

图 9 示出本发明中使用的核酸分析用盘片的其它例子。

该盘片 50a 具有聚碳酸酯等构成的透明基板 54。该基板 54 上的信息记录区域 52 中形成有预制沟 55，在样品分析区域 53 中形成有流路 10 的凹部 56。并且，在形成预制沟 55 及凹部 56 的基板 54 的表面上，形成了由含有机色素的感光色素膜构成的光吸收层 57。并且，在信息记录区域 52 中，在此光吸收层 57 上形成了由 Au 等金属构成的反射层 58，在此反射层 58 上形成顶涂层 59。而在样品分析区域 53 中，使用由聚乙烯膜等构成的密封部件 60 进行被覆，封闭凹部 56，形成流路 10。另外，在样品分析区域 53 的基板 54 的反面侧形成反射层 58a

在上述盘片 50a 中，信息记录区域 52 具有光信息记录介质的记录结构，通过配置于盘片 50a 下方的读取或写入装置 110 进行信息的读取或写入。另外，流入样品分析区域 53 的流路 10 的样品由光学检测装置 20 进行检测。因此，信息记录区域 52 的读取、写入方向与样品分析区域 53 的光学检测方向在隔着反射层 58 的相对侧，使读取或写入装置 110 及光学检测装置 20 的配置变得容易。

图 10 中示出本发明使用的核酸分析用盘片的其他例子。

该盘片 50b，在透明基板 54 的几乎整个表面上形成预制沟 55，在形成该预制沟 55 的表面上形成由含有机色素的感光色素膜构成的光吸收层 57。然后，在光吸收层 57 上形成反射层 58。在该反射层 58 上通过丝网印刷形成具有沟槽部 56a 的顶涂层 59。再在其上被覆由聚乙烯膜等构成的密封部件 60，封闭沟槽部 56a 形成流路 10。另外，在反射层 58 与顶涂层 59 之间以旋涂法使保护反射层 58 的保护膜(图

中未显示)成膜。

通过该盘片 50b,隔着反射层 58,在下方形成信息记录区域 52,在上方形成样品分析区域 53,从而可扩大信息记录区域 52。另外,只改变形成丝网(screen)的流路图案即可改变样品分析区域 53 的流路 10 的形状,可降低成本。

图 11 中示出本发明使用的核酸分析用盘片的其他例子。

该盘片 50c,在透明基板 54 的几乎整个表面上形成预制沟 55,在形成该预制沟 55 的表面上形成由含有机色素的感光色素膜构成的光吸收层 57。然后,在此光吸收层 57 上形成反射层 58,在反射层 58 上形成顶涂层 59。另一方面,制备经叠层转印或压纹(emboss)加工等形成了凹部 56 的由聚乙烯膜等构成的密封部件 60。将此密封部件 60 热封在顶涂层 59 上,形成流路 10。

利用该盘片 50c,隔着反射层 58,在下方形成信息记录区域 52,在上方形成样品分析区域 53,因此可扩大信息记录区域 52。另外,只改变在密封部件 60 的下面形成的凹部 56 就可以改变样品分析区域 53 的流路 10 的形状。图 12 中一并示出本发明中使用的核酸分析用盘片的其它例子及其制造步骤。图中左侧为制造步骤,右侧为盘片的截面模式图。

首先,与上述图 6 所示的例子相同,在基板 54 的一侧表面形成预制沟 55 及凹部 56,在其上形成光吸收层 57(步骤 S1)。

然后,阴极真空喷镀 Au,形成反射层 58(步骤 S2)。

然后,在信息记录区域 52 上进行丝网印刷形成顶涂层 59(步骤 S3),并通过紫外线照射进行固化(步骤 S4)。

然后,在 PET 膜的内侧面被覆聚乙烯层经叠层而成的聚乙烯层叠层膜 61,进行热封(步骤 S5)。结果封闭凹部 56 的开口,形成流路 10。另外,在聚乙烯层叠层膜 61 上形成注入口等孔 61a。作为上述叠层膜,也可使用聚碳酸酯膜等。

图 13 中一并示出本发明中使用的核酸分析用盘片的其它例子及其制造步骤。图中左侧为制造步骤,右侧为盘片的截面模式图。

首先，与上述图 10 及图 11 所示的例子相同，在基板 54 的整个表面形成预制沟 55，在其上形成光吸收层 57（步骤 S1）。

然后，阴极真空喷镀 Au，形成反射层 58（步骤 S2）。

然后，进行丝网印刷形成顶涂层 59（步骤 S3），并通过紫外线照射进行固化（步骤 S4）。此时利用未涂布顶涂层 59 的部分形成流路 10 的凹部 56。

然后，在顶涂层 59 上被覆与上述相同的聚乙烯层叠层膜 61，进行热封（步骤 S5）。结果封闭凹部 56 的开口形成流路 10。另外，在聚乙烯层叠层膜 61 上形成注入口等孔 61a。

图 14 中一并示出本发明中使用的核酸分析用盘片的其它例子及其制造步骤。图中左侧为制造步骤，右侧为盘片的截面模式图。

首先，与上述图 10 及图 11 所示的例子相同，在基板 54 的整个表面形成预制沟 55，在其上形成光吸收层 57（步骤 S1）。

然后，阴极真空喷镀 Au，形成反射层 58（步骤 S2）。

然后，在信息记录区域 52 上进行丝网印刷形成顶涂层 59（步骤 S3），并通过紫外线照射进行固化（步骤 S4）。

然后，在样品分析区域 53 上被覆与上述相同的聚乙烯层叠层膜 61，进行热封（步骤 S5）。此时在聚乙烯层叠层膜 61 的内侧面形成凹部 56，通过将聚乙烯层叠层膜 61 热封，形成流路 10。另外，在聚乙烯层叠层膜 61 上形成注入口等孔 61a。

图 15 示出作为在本发明中使用的核酸分析用盘片的其他例子，是在形成流路 10 的样品分析区域 53 中，赋予预制槽信息的例子。该预制槽 62 可以和流路 10 重叠，也可以不重叠，预制槽 62 的列并非螺旋状，而是以同心圆状设置有多个相同信号的轨道。

通过设置该类预制槽信息，可将光学检测装置 20 发出的激光头的焦点跟踪等伺服、或流路信息（每个流路的截面构造·折返次数·注入体积等信息）、注意事项等传送至驱动器。

另外，可在流路形成工序内同时形成条形码信息，通过与该流路信息整合，可以进行双检验（double check）。

另外,也可以设置预制沟以代替预制槽 62。

图 16 中示出作为本发明使用的核酸分析用盘片的其它例子,是在每个流路 10 内设置定位用伺服信号 63 的例子。该定位用伺服信号 63 可在形成流路 10 的工序内同时形成。定位用伺服信号 63 可通过光耦合器等进行读取。

[实施例]

下面举出实施例对本发明进行具体说明,但本发明的范围并不局限于这些实施例。

[实施例 1]

上述图 4 及图 16 所示的盘片在下述条件下进行制造。

利用喷射成形法成形厚度为 1.2mm、外径 120mm ϕ 、内径 15mm ϕ 的聚碳酸酯形成的基板 54,其中,盘片的直径从 46mm 到 76mm,在其表面形成有宽 0.8 μ m、深 0.08 μ m、间距 1.6 μ m 的螺旋状数据记录用预制沟 55,在其外周部分形成了图 4、图 16 所示的流路 10 及信息信号·视觉显示文字 120。该聚碳酸酯形成的基板 54 的洛氏硬度 ASTM D785 等同于 M75 铅笔硬度 HB,热变形温度 ASTM D648 为 4.6kg/cm²、121℃。

作为用于形成光吸收层 57 的有机色素,将 0.65g 1, 1'-二丁基-3, 3, 3', 3'-四甲基-4,5,4',5'-二苯并靛二羰菁高氯酸盐(dibenzoindo dicarbocyanine perchlorate)(日本感光色素研究所制,产品编号 NK3219),溶解于 10cc 二丙酮醇溶剂中,采用旋涂法将其涂布在上述基板 54 的表面,形成由膜厚为 130nm 的感光色素膜构成的光吸收层 57。由此光吸收层 57 的复数折射率的实数部 n_{abs} 和该膜厚 d_{abs} 与再生光的波长 λ 得到的 $\rho = n_{abs}d_{abs} / \lambda$ 为 0.45,另外上述复数折射率的虚部 k_{abs} 为 0.05。

然后,在该盘片的直径 45~118mm ϕ 的整个区域内以阴极真空电镀法形成膜厚 80nm 的 Au 膜,形成反射层 58。在此反射层 58 上,在盘片的直径从 40mm 到 80mm 的区域内对紫外线固化性树脂进行丝网

印刷,并使其经紫外线照射而固化,形成膜厚为 $10\mu\text{m}$ 的顶涂层59。该顶涂层59固化后的洛氏硬度ASTM D785为M90,热变形温度ASTM D648为 $4.6\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 135°C 。而且,在该顶涂层59和反射层58上,在 140°C 下热封聚乙烯层叠层膜61,该叠层膜61由 $50\mu\text{m}$ 透明PET膜构成,该PET膜带有切割成环状的层厚为 $30\mu\text{m}$ 的聚乙烯层,从而形成在内周部具有采用激光的信息记录区域(CD-R区域)52、在外周部具有流路10等的样品分析区域53的混合型盘片。

下面,说明上述检测用流路10的形状。该检测用流路在上述盘片的喷射成形时,利用在金属模型中形成的高 $50\mu\text{m}$ 的凸部而形成在该盘片的外周部。利用该凸部形成的该检测用流路具有以下部分:样品的注入口11,供给用液体储存部12,沿盘片50的半径方向多次往返于内侧和外侧的锯齿形部(反应用锯齿形流路)13,收容用液体储存部14,在另一端设置的空气出口15。该流路10的宽度及深度均为 $50\mu\text{m}$ 。样品的注入口11及空气出口15形成在盘片的半径为 33mm 的同一圆周上,形成直径 $400\mu\text{m}$ 的圆形形状。供给用液体储存部12及收容用液体储存部14均形成直径 10mm 的圆形形状,供给用液体储存部12的中心形成在上述基板的半径 40mm 处,而收容用液体储存部14的中心形成在上述基板的半径 53mm 处。而锯齿形部13的中心位于上述基板的半径 53mm 处,形成在纵 10mm (半径方向)、横 6.5mm (圆周方向)的长方形范围内。锯齿形部13的流路10也由与上述相同形状的沟槽构成,在该长方形的范围内形成纵向往返30.5。在直径 120mm 的上述盘片的同一圆周上,每旋转 22.5° 形成一条流路,共计形成15条。其中,流路10之间的1个部位分离 45° ,由此可以利用光学检测装置20识别流路10的ID。

然后,说明上述检测用流路的上述反应用锯齿形流路的温度分布。利用与上述基板成同心圆的内径 98mm 、外径 110mm 的环状红外线加热器,将该环状红外线加热器正下方的区域加热至 65°C 。另外,利用与上述基板成同心圆的内径 110mm 、外径 116mm 的环状红外线加热器,将该环状红外线加热器正下方的区域加热至 95°C 。存在与上

述两个环状红外线加热器正下方的区域包含形成该反应用锯齿形流路的上述长方形范围。

[实施例 2]

本实施例中说明用于在上述检测用流路中进行反应的试剂溶液。

反应试剂:

聚合酶(0.05 unit / μ l TaqDNA 聚合酶(商品名“ExTaq 聚合酶”, 反应缓冲液(商品名“2 $\times$ ExTaq 缓冲液”(均为 TaKaRa 社制)), PCR 基液(1 μ M 正向引物(GENEST 社制), 1 μ M 反向引物(GENEST 社制)、0.4mM dNTP), 模板 DNA(10ng / μ l 质粒 pUC (Promega 社制)), 荧光色素溶液(0.05 μ g / ml SYBR Green I (Molecular Probes 社制)))。

引物序列:

正向引物: 序列编号 1

反向引物: 序列编号 2

使用吸液管将 4 μ l 上述反应试剂(40ng 模板 DNA) 从上述样品注入口 11 注入, 将该反应试剂充填至上述供给用液体储存部 12 中。然后, 通过上述两个环状红外线加热器将上述两个环状红外线加热器正下方的区域加热至 65℃ 及 95℃。另外, 为将充填在供给用液体储存部 12 的该反应样品试剂输液并通过上述锯齿形部 13, 而使上述基板旋转, 施加离心力。使上述基板的转速为 2500rpm, 由此使该反应试剂用 20 秒通过锯齿形部 13 的 1 个往返部分(流速: 约 1mm 每秒)。

以 2500rpm 的转速旋转 20 分钟后, 停止该基板 30 秒。此后, 以 500rpm 的转速旋转该基板, 利用上述光学检测系统测定锯齿形部 13 的流路 10 在每一个往返中的荧光强度。

另外, 为进行比较, 也对从上述反应试剂中除去模板 DNA、或将模板 DNA 浓度稀释 100 倍时进行同样的测定。

图 17 为荧光强度和锯齿形部的往返次数之间的关系曲线。此结果由与作为定量目标物质的模板 DNA 的量(0、0.4、40ng) 密切相关的 DNA 扩增曲线获得。

另外，一般的流体流速和上述基板的转速之间的关系用下述公式 1 表示。

[公式 1]

$$u = d_H^2 \rho \omega^2 \bar{r} \Delta r / 32 \eta L$$

上述公式 1 中的符号含义如下。

u: 流速

d_H: 液压直径

ρ: 密度

ω: 角速度

r: 平均半径

Δr: 流路的起点和终点的半径差

η: 粘度

L: 流路总长

如上所述，液压直径为适应矩形流路的流体参数，可用下述公式 2 求得。

[公式 2]

$$d_H = 2wd / (w + d)$$

上述公式 2 中的符号含义如下。

w: 流路宽度

d: 流路深度

由此测定的结果在图 17 中示出。

[序列表自定义文本]

序列编号 1: 用于扩增质粒 pUC 上的特定序列的 PCR 用 DNA 正向引物。

序列编号 2: 用于扩增质粒 pUC 上的特定序列的 PCR 用 DNA 反向引物。

产业可利用性

根据本发明，可提供一种核酸分析方法，该方法利用流式反应的分析测定原理，使追踪反应进行过程的分析操作更为简单和快捷，另外，还提供一种核酸分析装置及分析用盘片，其紧凑地具有检测系统、反应系统、输出系统、驱动系统，并可以廉价地进行制造。

<110> 太阳诱电株式会社

<120> 核酸分析用盘片

<130> JP03-0148

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 质粒 pUC

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<223> PCR 引物

<400> 1

cgccagggtt ttcccagtca cgac

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 质粒 pUC

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<223> PCR 引物

<400> 2

cagtgggagg tccttgaagg caat

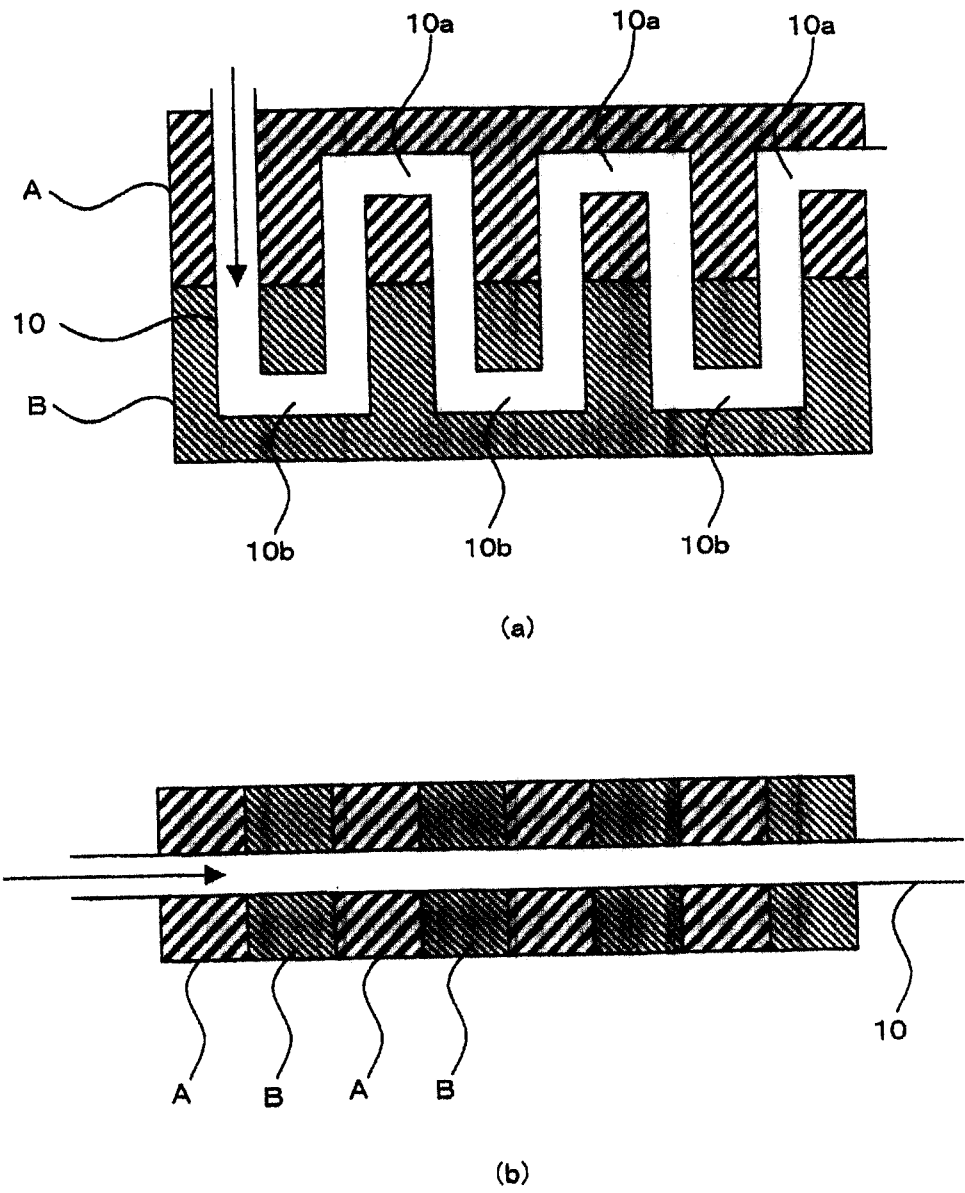


图 1

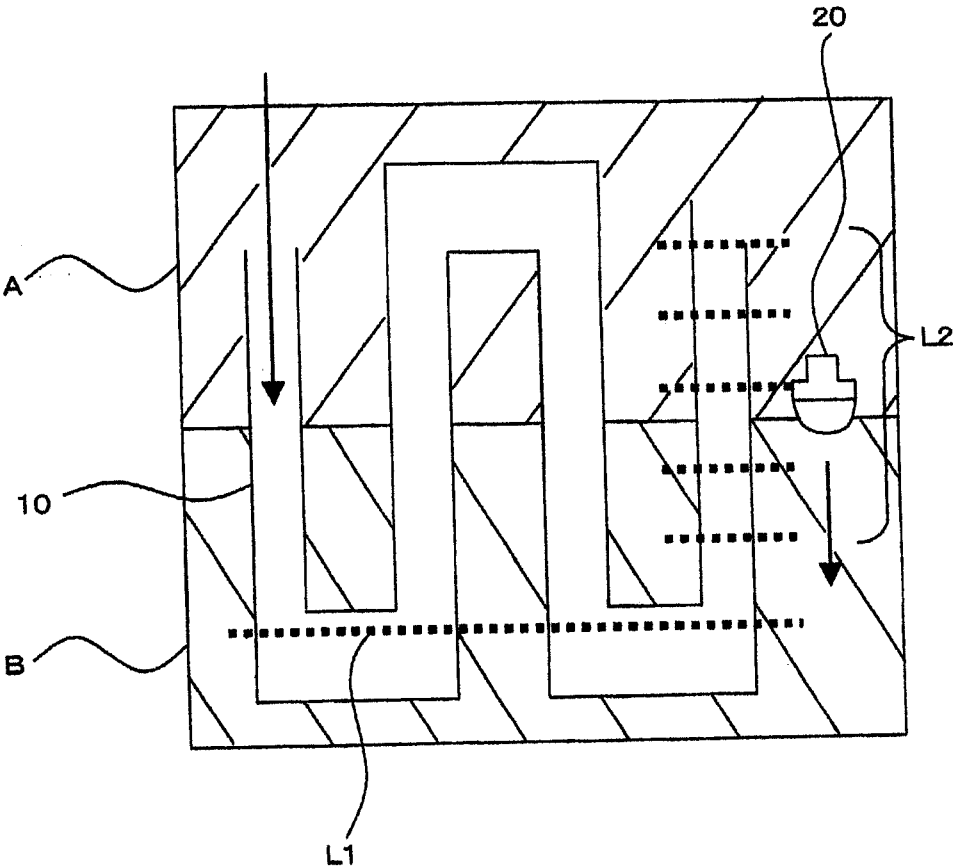
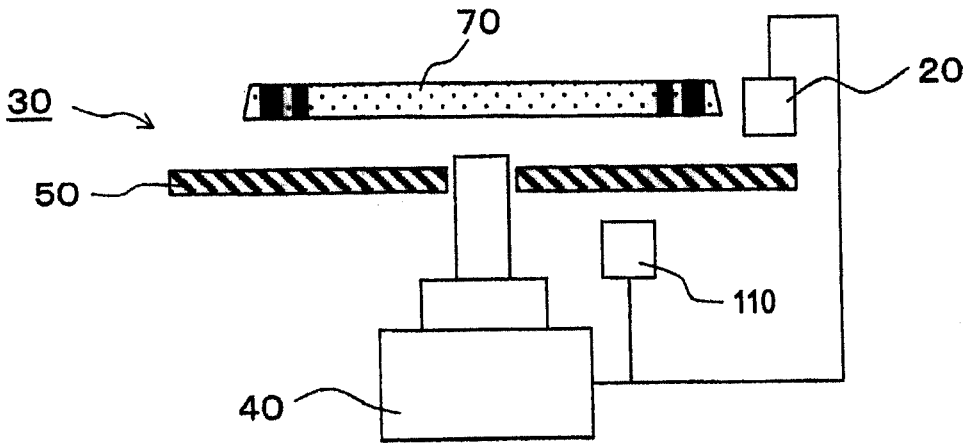
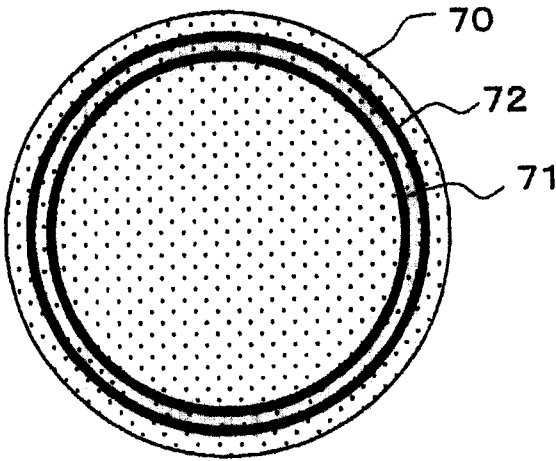


图 2



(a)



(b)

图 3

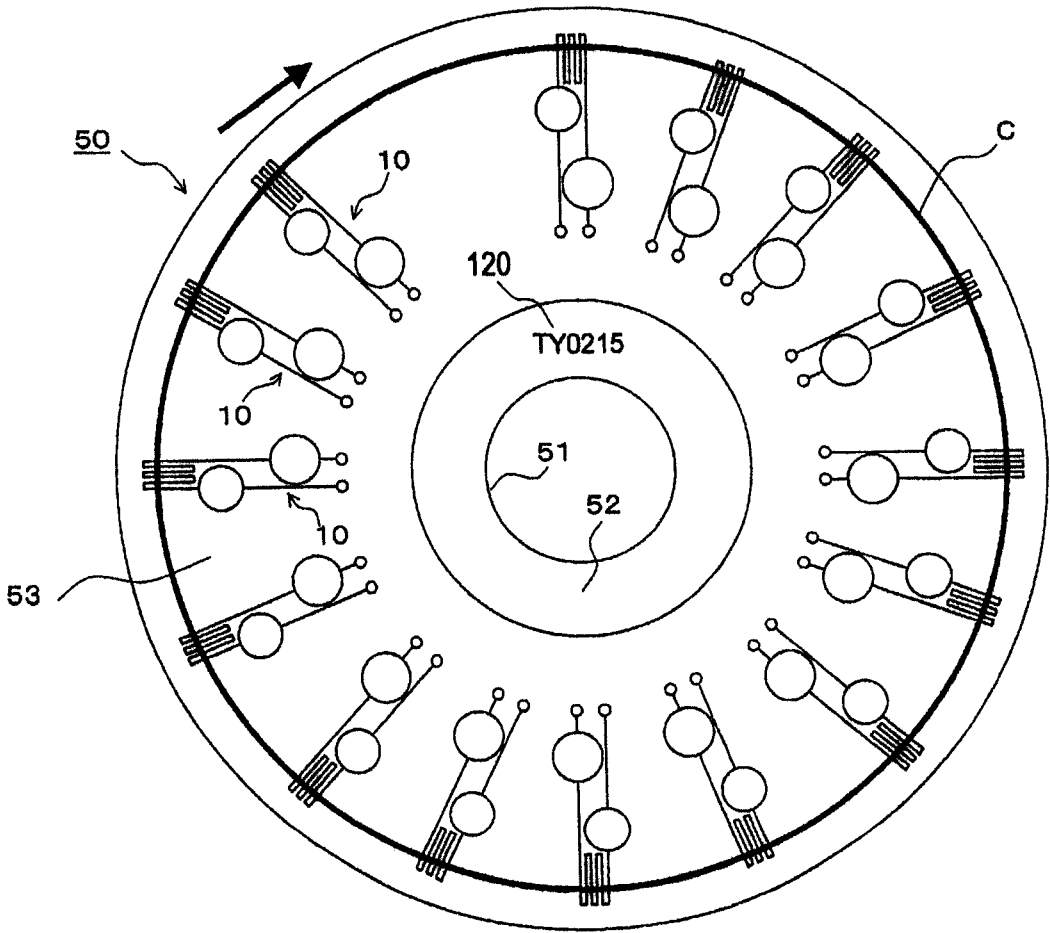


图 4

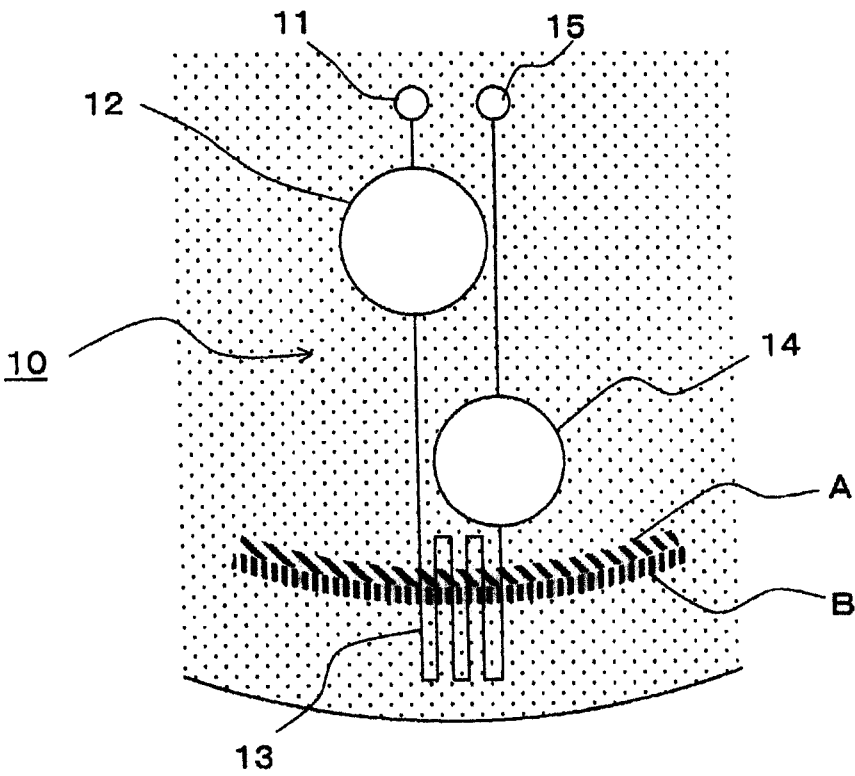


图 5

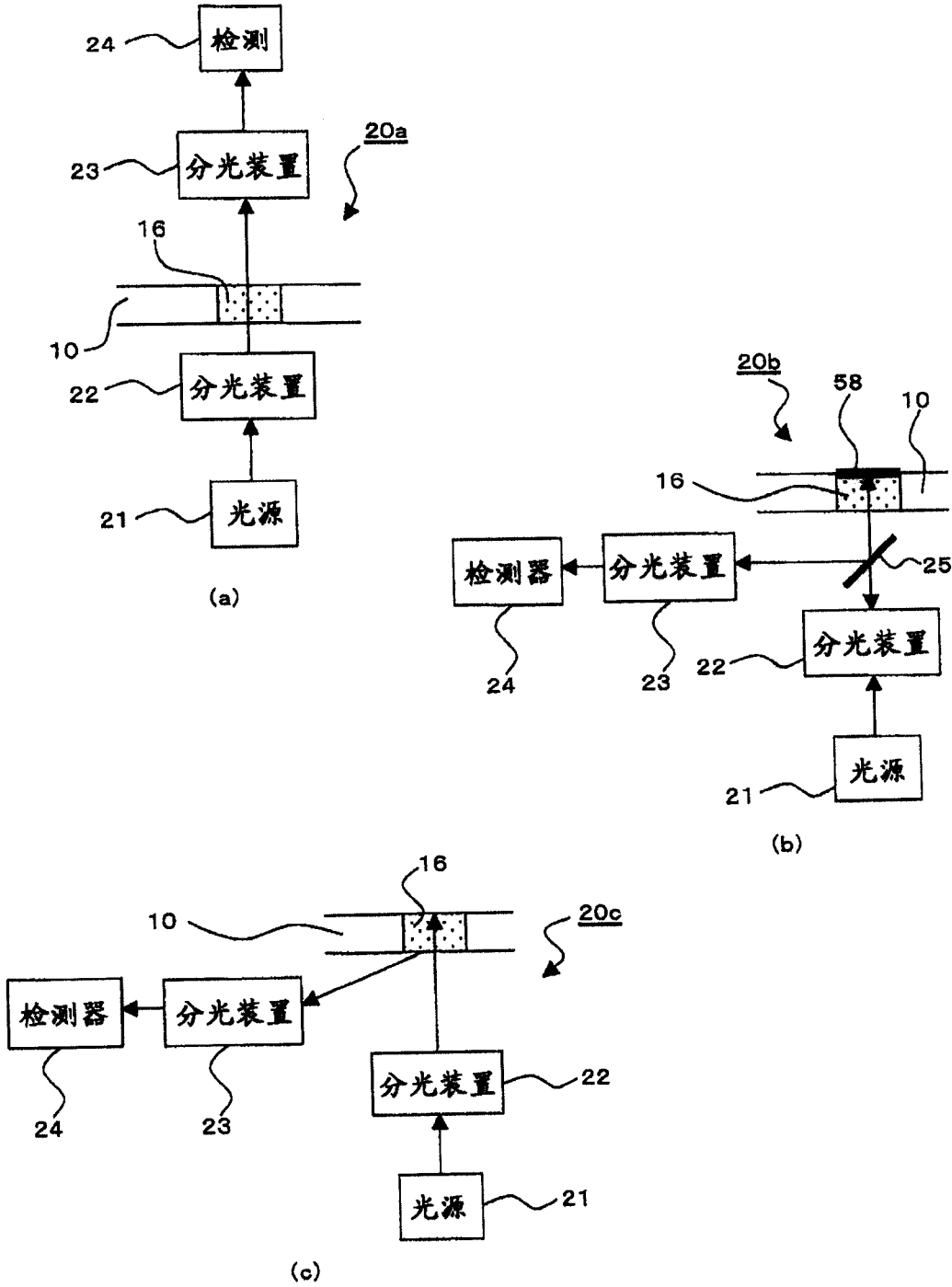


图 7

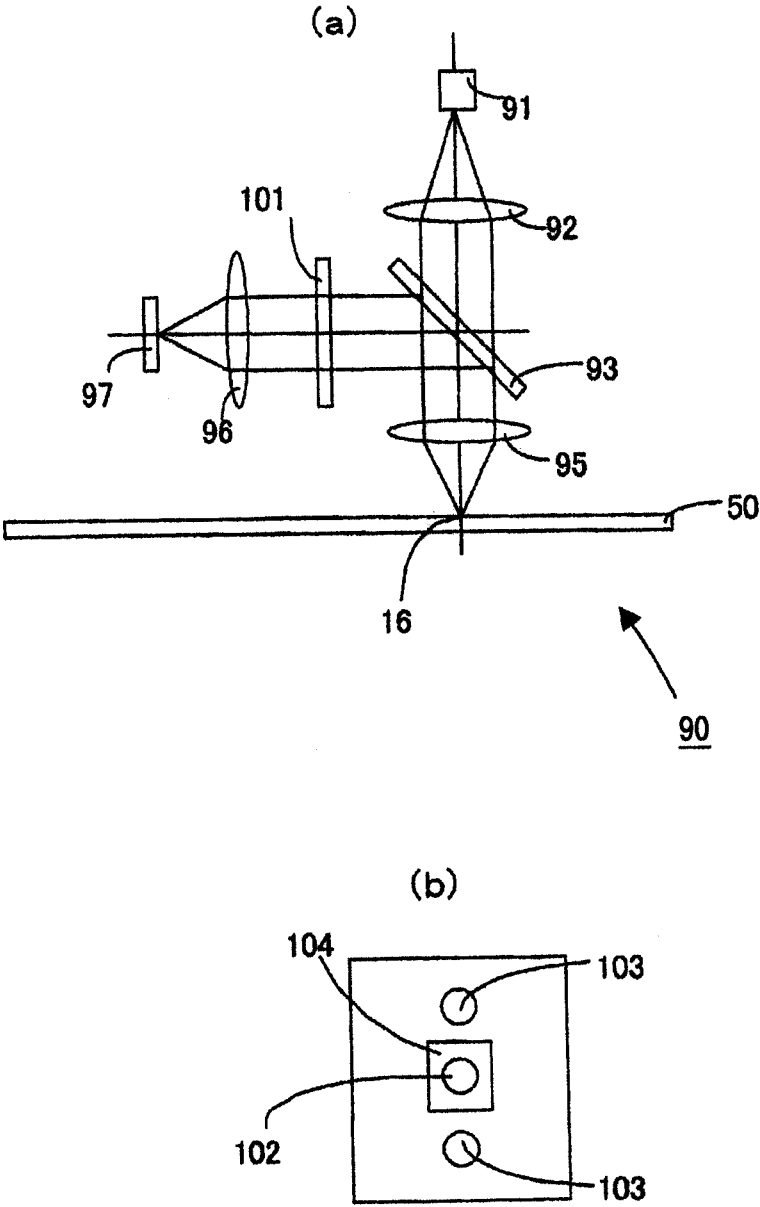


图 8

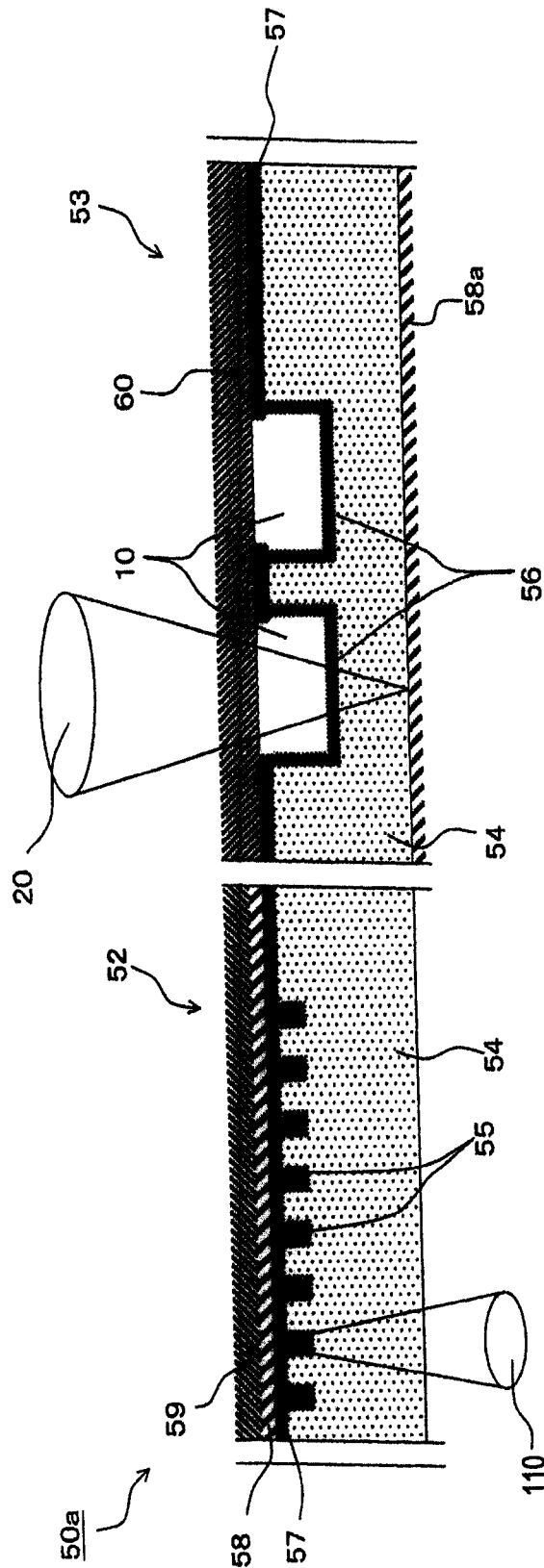


图 9

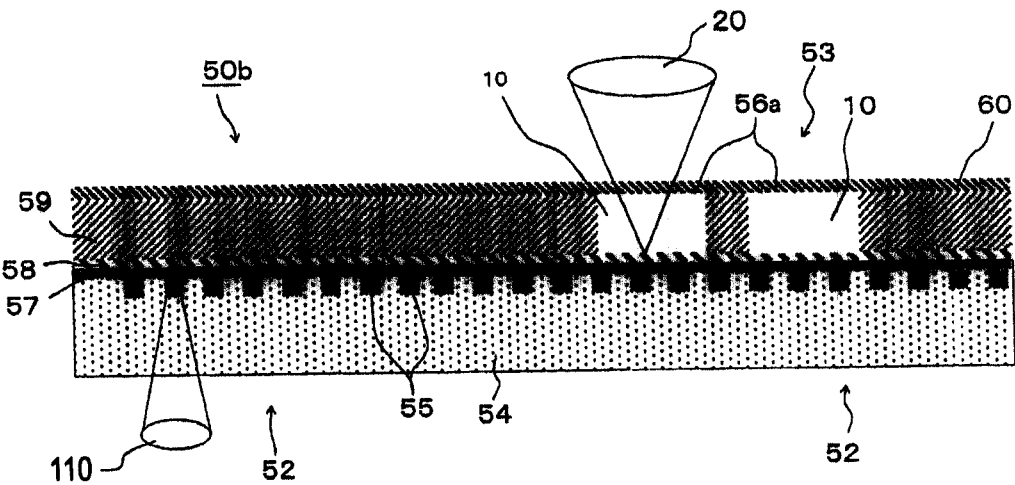


图 10

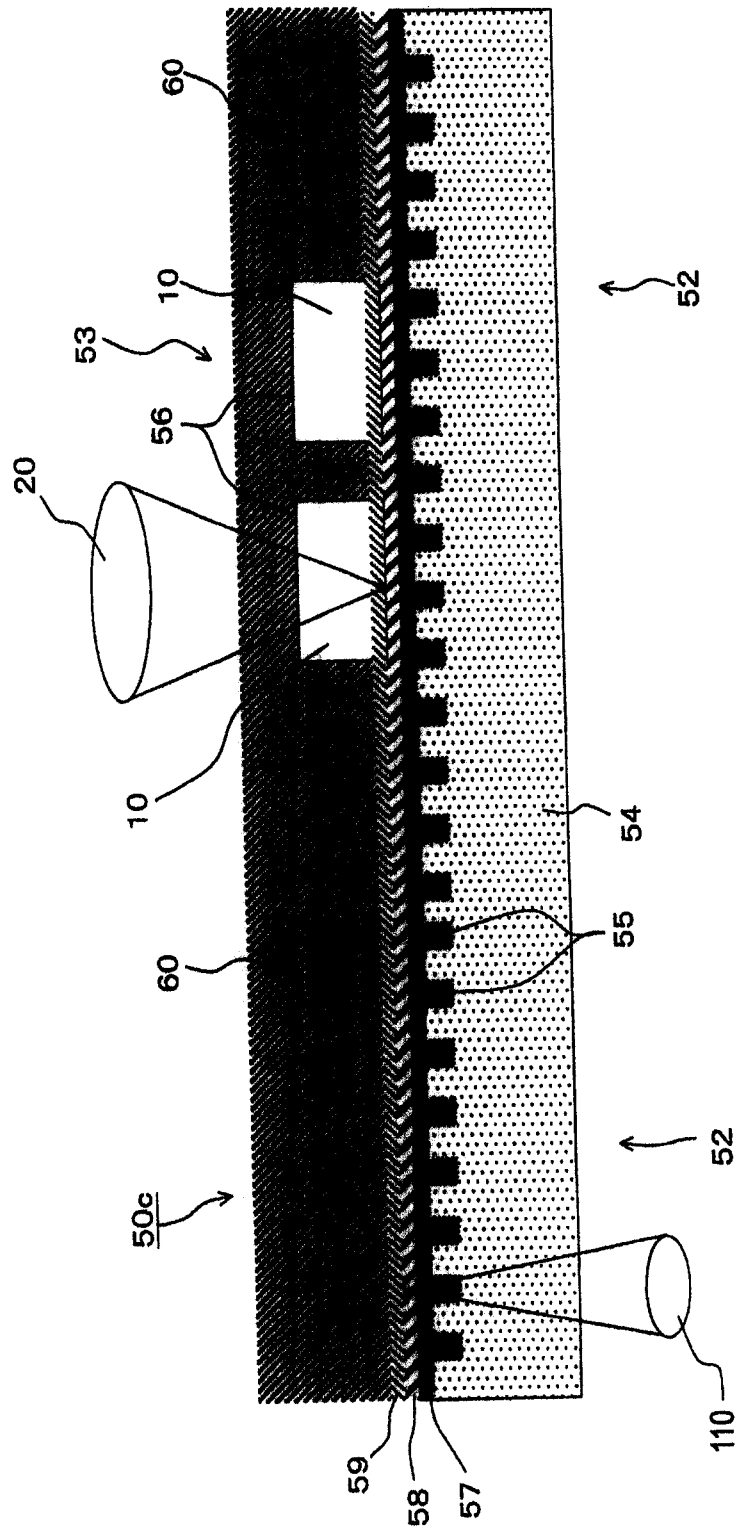


图 11

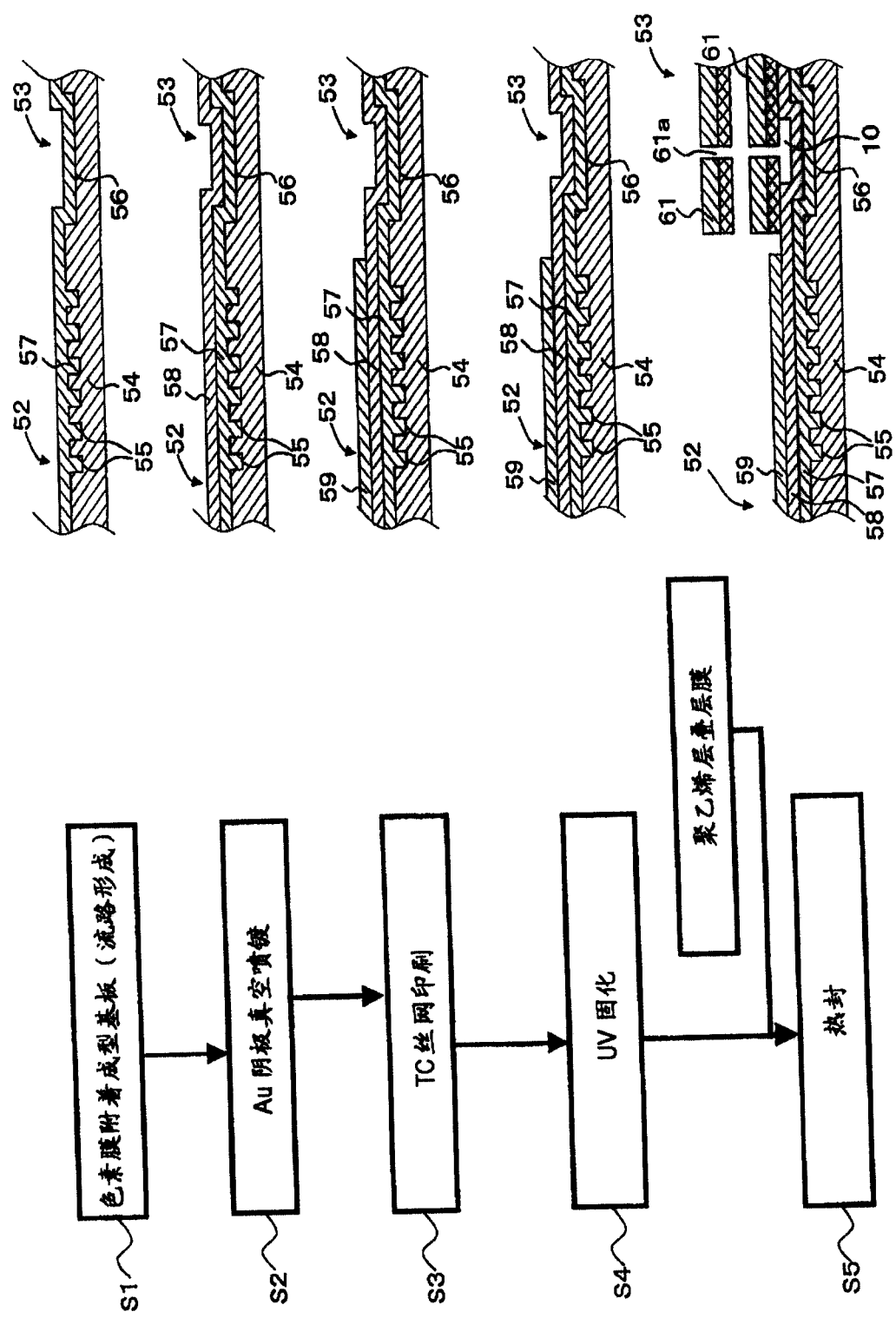


图 12

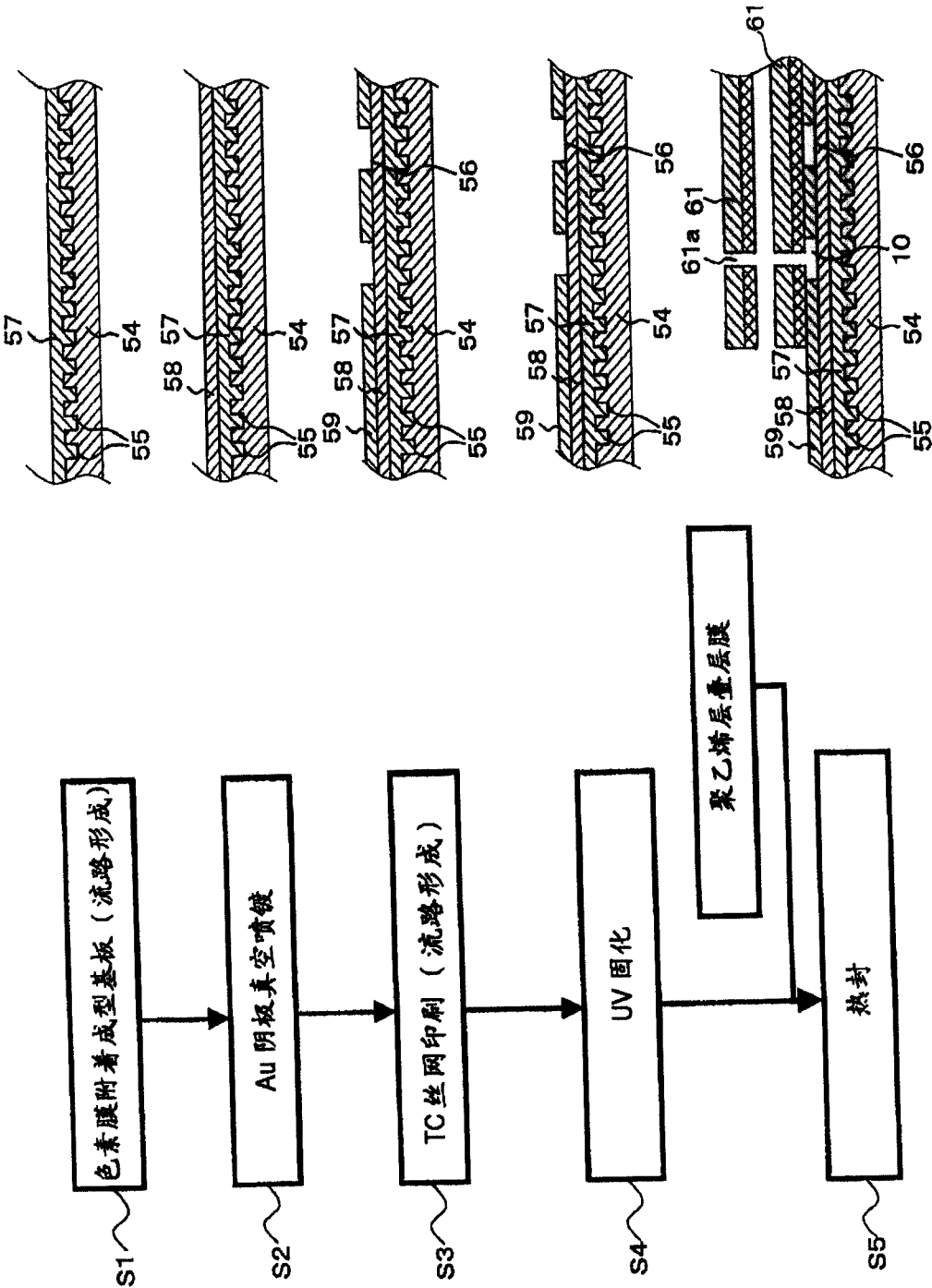


图 13

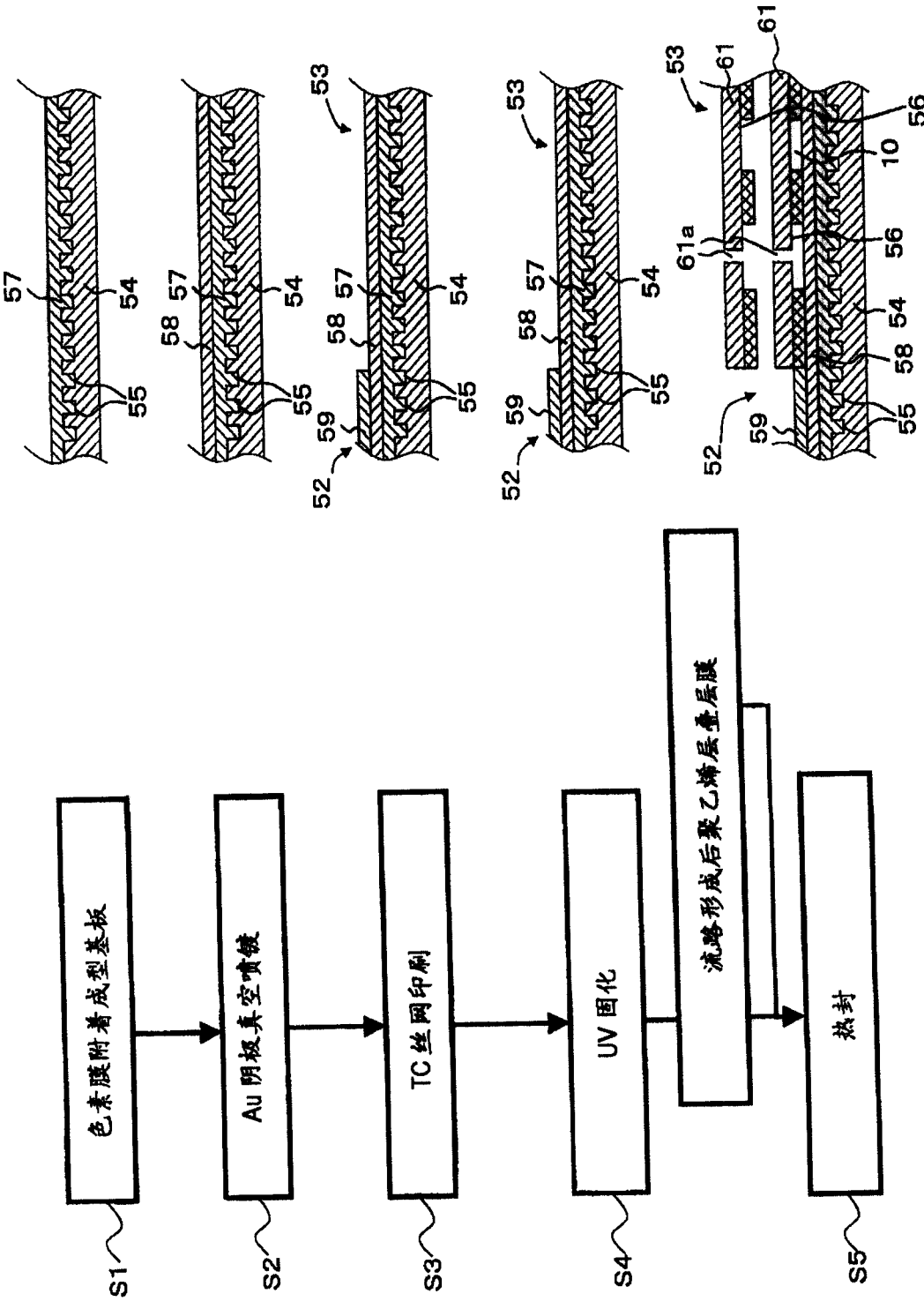


图 14

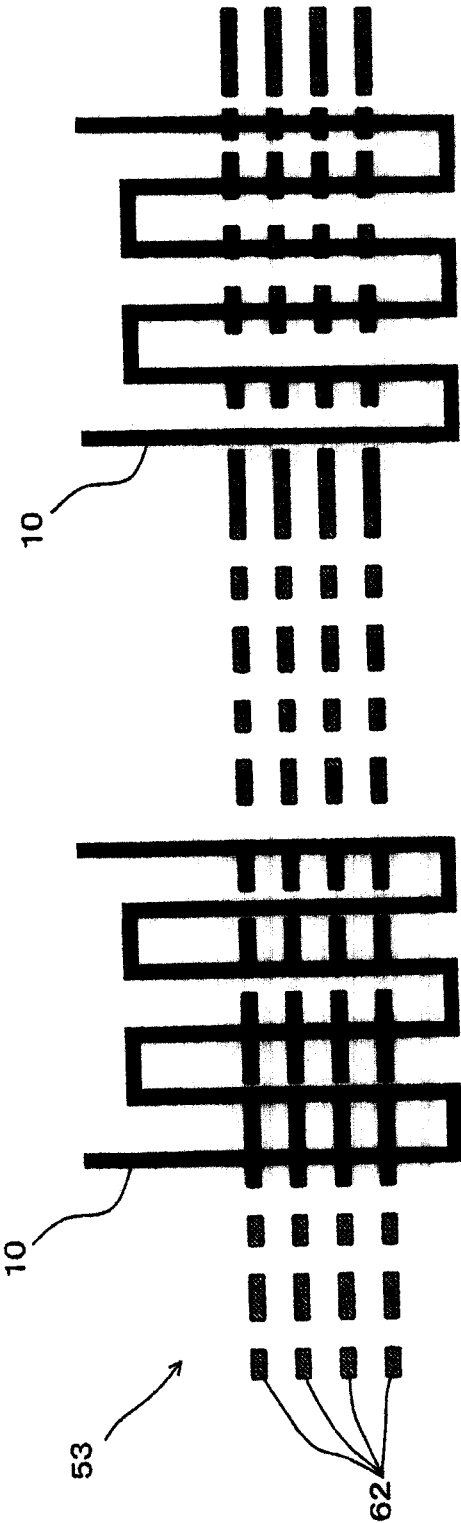


图 15

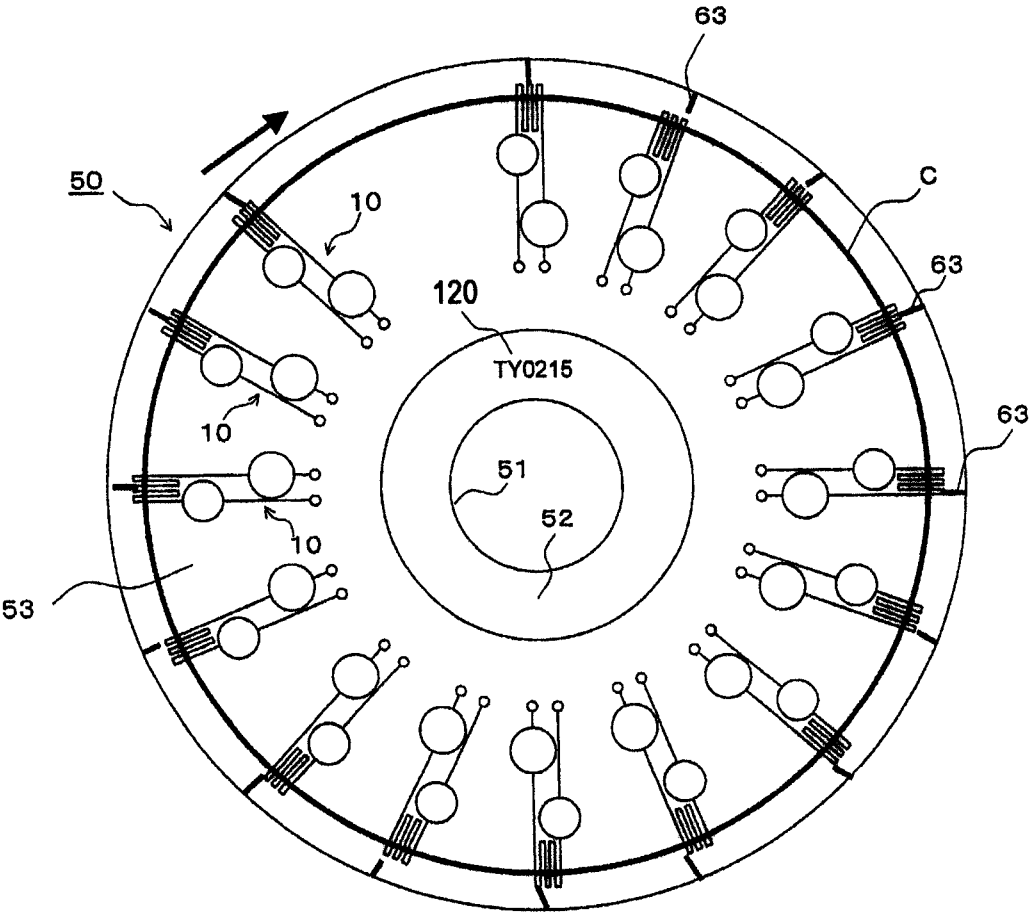


图 16

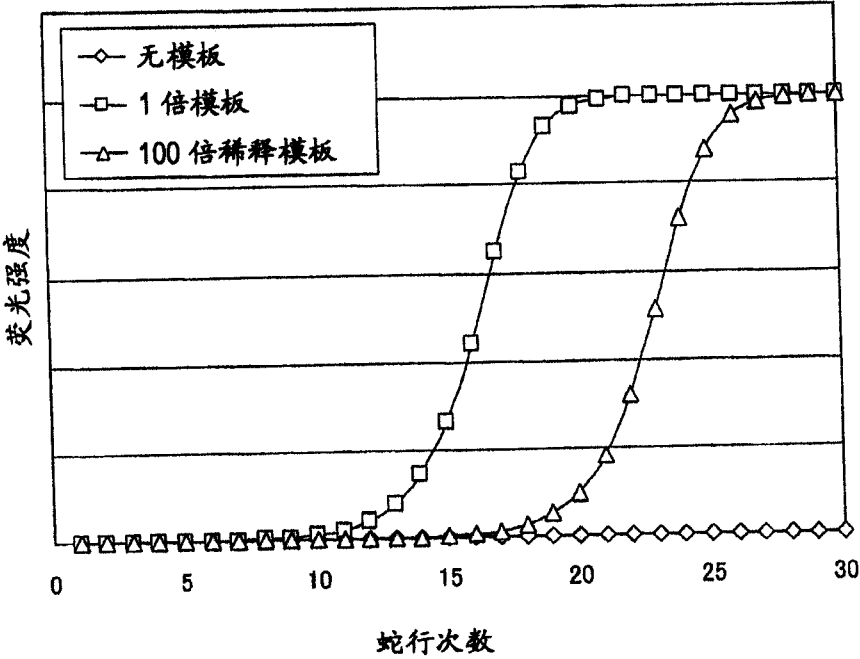


图 17