

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 2 月 24 日(24.02.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/021640 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/063926
- (22) 国際出願日: 2010 年 8 月 18 日(18.08.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-190713 2009 年 8 月 20 日(20.08.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 荒井 健樹 (ARAI, Tateki) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 武田 理 (TAKEDA, Osamu) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 伊豆 博幸 (IZU, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 向井 博之 (MUKAI, Hiroyuki) [JP/JP];

〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号
タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).

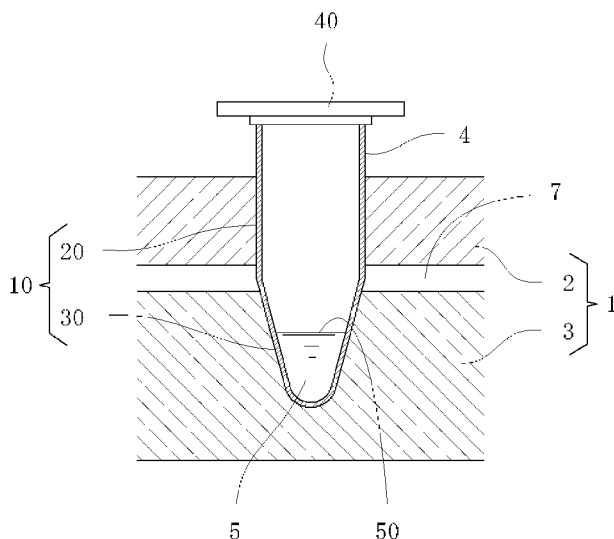
- (74) 代理人: 特許業務法人みのり特許事務所 (MINORI Patent Profession Corporation); 〒6040835 京都府京都市中京区御池通高倉西入高宮町 2 〇 〇 番地 千代田生命京都御池ビル 8 階 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,

[続葉有]

(54) Title: TEMPERATURE CYCLING DEVICE

(54) 発明の名称: 温度サイクル装置

[図6]



(57) Abstract: Disclosed is a temperature cycling device which is useful in performing the reaction of a biological sample used, for example, in the field of a molecular biological study, and particularly the amplification of nucleic acid. Specifically disclosed is a temperature cycling device for incubating a reaction solution (5), the device [1] being provided with a heat block (1) for holding and heating a reaction container (4) that accommodates the reaction solution (5), the heat block (1) being configured by two layers of a lower heat block (3) and an upper heat block (2), the device [2] being further provided with a temperature control means for controlling the temperature of the lower heat block (3) and the upper heat block (2) independently of each other, and maintaining the temperature of the upper heat block (2) higher than the temperature of the lower heat block (3) when the reaction solution (5) is incubated. As a result, water and other components in the reaction solution (5) do not coagulate in the reaction container (4), and temperature variations depending on the installation position of the reaction container (4) do not occur, thereby enabling the performance of a PCR and other enzyme reactions with good repro-

ducibility.

(57) 要約:

[続葉有]



BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, —
SN, TD, TG).

明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

分子生物学研究分野等で使用される生物学的試料の反応、特に核酸の増幅を実施するために有用な温度サイクル装置を提供すること。反応液 5 をインキュベートするための温度サイクル装置であって、(1) 反応液 5 を収容する反応容器 4 を保持して加熱するためのヒートブロック 1 を備え、ヒートブロック 1 は、下層ヒートブロック 3 と上層ヒートブロック 2 との 2 つの層で構成され、更に、(2) 下層ヒートブロック 3 の温度と上層ヒートブロック 2 の温度とをそれぞれ独立に制御して、反応液 5 をインキュベートする際に、上層ヒートブロック 2 の温度を下層ヒートブロック 3 の温度より高く維持する温度制御手段を備える。これにより、反応液 5 中の水分やその他の成分の反応容器 4 内での凝結が起こらず、更に反応容器 4 の設置位置による温度ムラが生じないことから、PCR やその他の酵素反応を再現性よく実施することができる。

明 細 書

発明の名称： 温度サイクル装置

技術分野

[0001] 本発明は、分子生物学研究分野等で使用される生物学的試料の反応、特に核酸の増幅を実施するために有用な温度サイクル装置に関する。

背景技術

[0002] 分子生物学の研究においては、試料の分析等に種々の化学反応、例えば酵素反応が利用される。当該反応に供する試料の量に限りがある場合には、微量の試料で反応を実施できることが好適である。

[0003] 核酸増幅反応は、鋳型となる核酸に相補的及び／又は同一の配列を有する核酸の合成を反復する方法であり、PCR法、LCR法、NASBA法、ICAN法、SDA法、LAMP法といった、原理の異なる複数の方法が開発されている。これらはそれぞれに異なる特徴を有しており、目的等に応じて使い分けされているが、PCR法は最も多くの場面で利用されている。

[0004] PCR法は鋳型となる核酸、一对のオリゴヌクレオチドプライマー、耐熱性DNAポリメラーゼを含有する反応液を「二本鎖核酸の変性」、「オリゴヌクレオチドプライマーの鋳型核酸へのアニーリング」、「鋳型核酸に相補的な核酸の合成」が順次起こるような温度サイクルに供することで実施される。この目的のために、反応液の温度を経時的に、かつ自動で変化させる反応装置（サーマルサイクラー）が開発された。

[0005] 通常、PCRは微量（10～200 μ L程度）の反応液で実施される。容量の大きな反応容器が使用された場合に、反応容器部位間で温度差があると低温の部位、例えば反応液と接触していない反応容器上部の壁面に水蒸気の凝結が生じ、増幅効率の低下や試料間での増幅効率のバラツキの原因となる。この問題を解決し、より正確な温度サイクルを実現するため、試料を収容する反応容器の上面を加熱された部材で覆う機構を有する装置（特開平6-233670号公報）や循環する空気により前記反応容器全体を加熱／冷却

する装置（特表 2000-511435 号公報）が開発されてきた。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開平 6-233670 号公報

特許文献2：特表 2000-511435 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 後者の装置は反応容器周辺に空気が循環するための空間、空気の温度制御と循環のための手段を設けた複雑な構成が必要となるうえ、熱伝導に優れた反応容器（例えばガラス製容器）を使用する必要がある。これに対して前者の装置はヒートブロックとカバーとを主な構成要素とする単純な構成であり、生物化学分野で汎用されているマイクロチューブやマイクロタイタープレートを使用することができる。しかしながら、ヒートブロックとカバーとの間に空隙が生じるため、反応容器のこの部位の温度が低下して水蒸気等の凝結が起こりうる。また、反応容器を設置する場所により、例えばヒートブロックの中央部に設置した場合と、ヒートブロックの端部に設置した場合とでは、温度差が生じてしまう。そのため、PCR や酵素反応を行った場合、反応容器を設置する位置によって反応にムラができるという問題が生じる。更に反応容器の上面をカバーで覆うことにより、標的核酸の増幅に伴うシグナルの発生を増幅中に検出する核酸検出方法（リアルタイムPCR）では当該シグナルの検出に問題が生じる。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、反応液のインキュベーションに使用されるヒートブロックを上層ヒートブロックと下層ヒートブロックとで構成される 2 層構造とし、上層ヒートブロックの温度を下層ヒートブロックの温度より高く調節することで反応液由来の水蒸気等の凝結が妨げられ、再現性よく PCR を実施できることを見出した。

[0009] すなわち、本発明は、反応液をインキュベートするための温度サイクル装置であって、（１）反応液を収容する反応容器を保持して加熱するためのヒートブロックを備え、ヒートブロックは、下層ヒートブロックと上層ヒートブロックとの２つの層で構成され、
更に、

（２）下層ヒートブロックの温度と上層ヒートブロックの温度とをそれぞれ独立に制御して、反応液をインキュベートする際に、上層ヒートブロックの温度を下層ヒートブロックの温度より高く維持する温度制御手段を備えることを特徴とする温度サイクル装置に、関する。

[0010] 本発明は、上層ヒートブロック及び下層ヒートブロックの２層で構成されたヒートブロックを備えた温度サイクル装置を提供する。

[0011] 前記ヒートブロックは、インキュベートされる反応液を収容した容器（反応容器）を保持できるくぼみ（ウェル）が形成された構造物である。前記ウェルは使用する反応容器に応じた形状とすればよく、例えば、マイクロチューブ及び／又はマイクロタイタープレート（９６穴、３８６穴等）やキャピラリーを保持できるよう設計される。当該反応容器としては、１ウェルに保持される反応容器あたりに１０～２０００ μ Lの容量のものが使用される。また、好ましくは、反応容器内の水分等が蒸発して反応容器外へ出ることを防止するため、反応容器はキャップやシールを付されたうえで本発明の装置に収納される。

[0012] ヒートブロックは熱伝導率に優れた材質のものであることが望ましく、通常は熱伝導率のよい金属製（例えば、アルミニウム、銅合金など）のヒートブロックが使用される。上層ヒートブロック及び下層ヒートブロックを同じ材質にする構成、異なる材質にする構成、どちらの構成も本発明に適用できる。

[0013] ヒートブロックは、反応容器が上層ヒートブロックを貫通して下層ヒートブロックに接触するようにして保持される構造に形成される。従って、通常は上層ヒートブロックの厚さは０．５～１ｃｍの範囲、好ましくは０．６～

0. 8 cmの範囲に設計される。下層ヒートブロックの厚さは、上層ヒートブロックと組み合わせた際に反応容器を収容できる範囲であれば特に限定はない。好適には、上層ヒートブロックと下層ヒートブロックとの2層で構成されたヒートブロックが、反応容器のほぼ上端まで（例えば、反応容器の全高の70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは85%以上）ウェル内に収納できる構造であることが好ましい。

[0014] 前記ヒートブロックは、上層ヒートブロック及び下層ヒートブロックの2層の温度をそれぞれ独立して制御可能な温度制御手段を備えている。当該温度制御手段は、下層ヒートブロックの温度を変更及び維持するための第一温度手段と、上層ヒートブロックの温度を変更および維持するための第二温度手段と、これらの温度手段を独立に制御して経時的に両層の温度を変化させる制御手段からなる。また、制御手段は実行すべき温度プロファイルに関する情報を記憶しかつその実行を指示するコンピューターと、温度制御のためにヒートブロックの両層の実温度データを取得するセンサーとを含む。すなわち、前記コンピューターは入力された温度プロファイル情報とヒートブロックの両層の実温度データとに基づいてヒートブロックの両層の温度を前記プロファイルのとおりに制御する。なお、本発明の実施態様の一つとして、コンピューターを搭載することなく、適切なインターフェースを介して第一温度手段、第二温度手段及びセンサーを外部のコンピューターに接続することによりヒートブロックの両層の独立した温度制御を実施し得る装置を挙げることができる。

[0015] 前記センサーとしては、例えば電気抵抗の温度変化を利用した抵抗温度検出器を使用できる。センサーは、上層ヒートブロックおよび下層ヒートブロックのそれぞれに備えられ、両層の温度を独立して計測することを可能とする。更に、両層に複数のセンサーを配置してもよい。

[0016] 第一温度手段および第二温度手段には公知のヒーターやクーラーが使用できるが、好適にはペルチェ素子が使用される。また、ヒートブロック冷却時の放熱を促すため、ヒートシンクや冷却用ファンを装置に備えることもでき

る。第一温度手段は、上層ヒートブロックの温度制御を妨げないように、下層ヒートブロックの下面又は下面と面一になるようにヒートブロック内部に設けられることが好ましい。また、第二温度手段は、下層ヒートブロックの温度制御を妨げないように、上層ヒートブロックの上面又は上面と面一になるようにヒートブロック内部に設けられていることが好ましい。

[0017] この2層構造のヒートブロックおよび温度制御手段を備えた温度サイクル装置において、反応液のインキュベートは、実質的には反応容器の下部を保持する下層ヒートブロックが行う。温度制御手段は、所定の温度プロファイル情報を用いて下層ヒートブロックにより反応液をインキュベートする。その際、温度制御手段は、上層ヒートブロックの温度を制御して、下層ヒートブロックより高い温度に維持する。すなわち、上層ヒートブロックは、下層ヒートブロックにより反応液がインキュベートされている間、インキュベート温度より高い温度で反応容器の上部を加熱する。

[0018] 上記のように、反応液のインキュベートの際に上層ヒートブロックの温度を下層ヒートブロックの温度より高く維持する温度サイクル装置において、上層ヒートブロックが下層ヒートブロックによる温度プロファイル通りの反応液のインキュベートを妨げないのであれば、両層を接触させてヒートブロックを構成してもよい。しかしながら、一般的には両層はともに熱伝導率の高い材質で構成されるため、両層を接触させると、上層ヒートブロックの熱が下層ヒートブロックに急速に伝わり、下層ヒートブロックの温度を温度プロファイル通りに制御できない虞がある。そこで、温度サイクル装置は、上層ヒートブロックおよび下層ヒートブロック間の熱伝導を防止するため熱伝導防止手段を備えることが好ましい。これによって、反応液のインキュベートの際に、上層ヒートブロックから下層ヒートブロックへの熱伝導を防止または緩和し、下層ヒートブロックの温度が温度プロファイル通りに制御され、適切に反応液がインキュベートされることを確保する。

[0019] 熱伝導防止手段としては、具体的には、上層ヒートブロックの下面及び／又は下層ヒートブロックの上面に熱伝導を妨げるためのコーティング（例え

ば、シリコン、テフロン（登録商標））を施す構成がある。また、上層ヒートブロック及び下層ヒートブロックの２層の間に、熱伝導を妨げるために断熱材（例えば、シリコン、ポリウレタン（耐熱性））を配置する構成としてもよい。また、上層ヒートブロック及び下層ヒートブロックの２層の間に、両層間の熱伝導を妨げる目的で空間を保持するような構成としてもよい。

[0020] 但し、断熱材または空間を設けたことにより、両層間の間隔（断熱材の厚さ、または空間の高さ）が大きすぎる場合、反応液をインキュベートする際に、保持された反応容器の両層間の部位の温度が、反応液の温度より低くなり、反応液の成分が凝結する温度に達する恐れがある。そのため、両層の間隔は、反応液のインキュベートの際に反応容器の両層間の部位の温度が、反応液由来の凝結が起こらない温度（露点温度）より高い温度、または反応液より高い温度に維持される範囲内でなければならない。よって、両層間の間隔は、下層ヒートブロックによる温度プロファイル通りのインキュベートを確保でき、かつ、反応容器の両層間の部位における反応液の凝結防止を確保できる最低限必要な間隔でよく、例えば反応容器の全高の１５％以下であることが好ましい。

[0021] なお、上層ヒートブロックの温度は、反応液がインキュベートされている間、下層ヒートブロックによる温度プロファイル通りのインキュベーションが確保できる範囲内で、下層ヒートブロックよりも高い温度に維持されるように設定されればよい。そして、必ずしも下層ヒートブロックの温度プロファイルに応じて逐次温度を変化させる必要はない。上層ヒートブロックの温度は下層ヒートブロックの温度よりも３℃以上、好ましくは５℃以上高くなるよう設定される。例えば、下層ヒートブロックの温度が４０～１００℃の範囲では上層ヒートブロックが６０～１２０℃、好ましくは１０５～１２０℃に維持され、下層ヒートブロックの温度が４０℃以下では上層ヒートブロックの温度が４５～６０℃に維持される装置が例示される。通常、上層ヒートブロックの温度の上限は１１５～１２０℃である。

[0022] 上記構成のヒートブロックを備えた装置を使用した反応液のインキュベ-

ションにおいては、インキュベート温度が高温（例えば70℃以上）に達した場合であっても、反応容器上部の温度は反応容器中の反応液の温度より高く維持されることから、反応液中の水分又はその他の成分が反応容器上部に凝結することはない。従って反応液中の成分の濃度が所望の反応に起因するもの以上に変化することが防止され、再現性よく反応がおこる。

[0023] 本発明の装置では、下層ヒートブロックが温度制御された上層ヒートブロックで覆われることから、周辺温度による下層ヒートブロックの温度下降が軽減され、下層ヒートブロック全体の温度が均一化され、ヒートブロックの位置の違い（例えば中心部と周辺部間の位置の違い）に起因する温度ムラが抑制される。従って、ヒートブロック上の反応位置の違いによる反応効率のバラつきを防止できる。

[0024] 本発明の装置には、従来の温度サイクル装置に備えられていた、反応容器上面を覆って加熱するための温度手段を有するカバーは必ずしも必要ではない。しかし反応容器キャップの脱落や反応容器シールの剥離を防止するためのカバーを備えていてもよい。更にこのカバーは、上層ヒートブロックが本発明において果たしている機能を強化もしくは補完する目的で、その温度を上層ヒートブロックの温度と同程度に維持するための温度手段ならびにその制御手段を備えていてもよい。また、カバーによってウェル内に保持されている反応容器を下方に押し付けて、反応容器の下部と下層ヒートブロックとの密着性を高め、下層ヒートブロックの熱が反応容器に伝わり易いようにしてもよい。反応液の由来のシグナル（例えば蛍光）を光学的に検出する検出手段（例えば、分光蛍光光度計）を備えた装置の場合には、例えば光透過性のカバーやシグナルを通過させるための開口部を設けたカバーを使用すればよい。

[0025] 通常、本発明の装置は、上記各構成要素が筐体内に収納された装置とすることができる。当該装置は、前記ヒートブロック、温度制御手段を備える他、任意にコンピューターもしくは外部コンピューターとの接続に使用されるインターフェース、実行すべき温度プロファイルを入力するための入力手段

（例えばキーボード）、温度プロファイルやその実行状況を表示する表示装置（例えば液晶ディスプレイ）を有していてもよい。更に、反応液の発する蛍光等のシグナルをモニターするための光学装置（グラスファイバー、CCDカメラ、レンズ、フィルター等）を搭載していてもよい。

[0026] 本発明の装置は、反応液のインキュベートの際に、反応液を収納する反応容器の上部、特にキャップやシールの内面側の結露が防止されることから、結露によって反応液に由来するシグナルの検出が阻害されることはなく、シグナルの検出が容易である。すなわち、本発明の装置は、反応容器中の反応の進行を光学的、経時的に検出する、特に反応容器の上方から検出する検出手段を備えた場合、有用である。

発明の効果

[0027] 本発明の装置を使用した場合には、反応液中の水分やその他の成分の反応容器内での凝結が起こらない。また、反応容器を設置する位置による温度のムラも防げることから、PCRやその他の酵素反応を再現性よく実施することができる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]本発明の装置の一実施形態を示す斜視図である。

[図2]本発明の装置の上層ヒートブロックの構成を示す図であって、図2Aは平面図であり、図2Bは正面図である。

[図3]本発明の装置の下層ヒートブロックの構成を示す正面図である。

[図4]本発明の装置において、上層ヒートブロックと下層ヒートブロックとの構成を示す図である。

[図5]本発明の装置において、上層ヒートブロックと下層ヒートブロックとによって構成されたヒートブロックに反応容器を収納して保持した状態を示す断面図である。

[図6]本発明の装置において、上層ヒートブロックと下層ヒートブロックとによって反応容器を保持する際に、両層間に空間を設けた場合の構成を示す図である。

[図7]本発明の装置において、上層ヒートブロックと下層ヒートブロックとによって反応容器を保持する状態を示す図であって、図7Aは両層を接触させた場合の構成を示し、図7Bは両層間に断熱材を設けた場合の構成を示す。

[図8]本発明の装置において、上層ヒートブロックと下層ヒートブロックとによって反応容器を保持する他の構成を示した図である。

[図9]反応性確認実験で用いた各装置の構成を示す図である。

[図10]反応性確認実験で用いた96穴プレートの反応位置を示す図である。

[図11]反応性確認実験で用いた各装置によるPCR反応後の電気泳動写真である。

発明を実施するための形態

[0029] 以下、本発明に係る温度サイクル装置の詳細な構成について、図面を参照して説明する。なお、本発明は、以下の実施例の範囲のみに何ら限定されるものではない。

[0030] 本願発明に係る温度サイクル装置は、図1に示されるように、反応容器4を加熱するためのヒートブロック1を備える。ヒートブロック1には、反応容器4を収納して保持するため複数のウェル10が形成される。本実施例におけるヒートブロック1は、8行×12列の96穴用ヒートブロックである。このヒートブロック1は、上層ヒートブロック2と下層ヒートブロック3との2つの層で構成される。

[0031] 上層ヒートブロック2は、図2に示されるように、ヒートブロック1のウェル10の一部を構成する貫通孔20が形成されている。貫通孔20は、図2Bに示されるように、上層ヒートブロック2を上下に貫通し、反応容器4の上部の周側面の形状に対応する形状に形成され、反応容器4が挿通可能である。

[0032] この上層ヒートブロック2は、上層ヒートブロック2の温度を変更および維持するためのヒーター21と、上層ヒートブロック2の温度を観測するための温度センサー22とを備える。ヒーター21および温度センサー22は、上層ヒートブロック2の温度制御に適した位置に設置される。本実施例で

は、ヒーター２１は、上層ヒートブロック２の上面で、幅方向の両端のそれぞれに設置される。そして、温度センサー２２は、上層ヒートブロック２の上面で、長さ方向の一端に設置される。なお、ヒーター２１及び／または温度センサー２２を、上層ヒートブロック２の上面に配置するのではなく、上層ヒートブロック２の側面に設置してもよい。また、上層ヒートブロック２に、ヒーター２１及び／または温度センサー２２を収納するための収納凹部（図示せず）を形成し、これら２１、２２を、収納凹部に収納して、上層ヒートブロック２内部に設置してもよい。

[0033] ヒーター２１および温度センサー２２は、制御部９に接続される。これによって、上層ヒートブロック２の温度を所望の温度に制御し、経時的に変化させることができる。

[0034] さらに、上層ヒートブロック２の四角には、下層ヒートブロック３へ取付けおよび位置決めをするため、上下に貫通する位置決め穴２３が形成されている。

[0035] 下層ヒートブロック３は、図３に示されるように、ヒートブロック１のウェル１０の一部を構成する凹部３０が形成される。凹部３０は、反応容器４の下部の形状に対応する形状に形成される。

[0036] 下層ヒートブロック３は、下層ヒートブロック３の温度を変更および維持するためのペルチェ素子３１と、下層ヒートブロック３の温度を観測するための温度センサー３２とを備える。ペルチェ素子３１は下層ヒートブロック３の下面に配置され、温度センサー３２は下層ヒートブロック３の中心部に埋込み配置される。

[0037] 下層ヒートブロック３のペルチェ素子３１および温度センサー３２は、上層ヒートブロック２のヒーター２１および温度センサー２２と同様に、制御部９に接続される。これによって、下層ヒートブロック３の温度を制御し、経時的に変化させることができる。本発明の温度サイクル装置は、上記構成によって、上層ヒートブロック２の温度と下層ヒートブロック３の温度とをそれぞれ独立に制御する。

- [0038] さらに、下層ヒートブロック 3 は、上層ヒートブロック 2 の位置決めをするための位置決めシャフト 33 を備える。シャフト 33 は、下層ヒートブロック 3 の上面の四角に設けられる。各シャフト 33 の下端には、上層ヒートブロック 2 を下層ヒートブロック 3 に取り付けたときに、二層の間に空間を設けるためのスペーサ 6 が配置されている。
- [0039] 図 4 に示されるように、各位置決めシャフト 33 が各位置決め穴 23 に嵌め込まれるように上層ヒートブロック 2 を下層ヒートブロック 3 の上に配置することで、上層ヒートブロック 2 を下層ヒートブロック 3 へ取り付ける。これによって、下層ヒートブロック 3 に対する上層ヒートブロック 2 の位置決めがなされる。すなわち、図 5 に示すように、下層ヒートブロック 3 に形成された各凹部 30 の真上に、対応する上層ヒートブロック 2 の貫通孔 20 が配置され、これらが同一鉛直線状になるように位置決めされ、貫通孔 20 と凹部 30 とによって反応容器 4 を保持するためのウェル 10 が構成される。このとき、上層ヒートブロック 2 と下層ヒートブロック 3 との間にスペーサ 6 が介在するので、両層 2、3 間に空間 7 が設けられる。こうして、図 1 に示されるように、上層ヒートブロック 2 と下層ヒートブロック 3 とによってヒートブロック 1 が構成され、反応液 5 が収容された反応容器 4 がウェル 10 に収納される。
- [0040] 上記のように構成されたヒートブロック 1 のウェル 10 に、反応液 5 が収容され、キャップ 40 が付された反応容器 4 が収納されて保持される状態を 6 図に示す。反応容器 4 をウェル 10 に収納すると、反応容器 4 の下部は下層ヒートブロック 3 の凹部 30 に嵌め込まれて、密着する。そして、反応容器 4 の上部の周側面は上層ヒートブロック 2 の貫通孔 20 に密着する。反応容器 4 のキャップ 40 は、貫通孔 20 に挿入されず、上層ヒートブロック 2 の上方に位置する。
- [0041] 反応容器 4 内の反応液 5 は、反応液 5 をインキュベートする下層ヒートブロック 3 内に位置する。この際、反応液 5 の液面 50 は、下層ヒートブロック 3 の上面と同じ位置、または図 6 に示されるように、下層ヒートブロック

3の上面より低い位置にあることが好ましい。

[0042] 両層2、3間の空間7の高さは、両層2、3間の熱伝導を妨げ、下層ヒートブロック3の温度プロファイル通りの温度制御を確保し、かつ、インキュベートの際に反応容器4の両層2、3間の部位における凝結防止を確保できる高さであればよい。また、上層ヒートブロック2の下面及び／または下層ヒートブロック3の上面に熱伝導を妨げるため、テフロンなどのコーティングを施す場合、両層2、3間に空間7を設けず、図7Aに示すように、両層2、3を接触させてもよい。また、上層ヒートブロック2が下層ヒートブロック3による温度プロファイル通りの反応液5のインキュベートを妨げない場合は、コーティングを施すことなく、上層ヒートブロック2と下層ヒートブロック3とを接触させてヒートブロック1を構成してよい。また、図7Bに示すように両層2、3間に熱伝導を妨げるために断熱材8を設けるようにしてもよい。

[0043] また、図8A、8B、8Cに示すように、反応容器4がその周側面のほぼ上端までヒートブロック1に収納される構成でもよい。

[0044] 温度サイクル装置は、上記のようにヒートブロック1により反応容器4を保持した状態で、反応容器内4の反応液5のインキュベートを行う。具体的には、温度サイクル装置が、制御部に入力された温度プロファイル通りに下層ヒートブロック3の温度を制御し、下層ヒートブロック3によって反応容器4の下部全体を加熱し、反応液5のインキュベートを行う。そして、温度サイクル装置は、下層ヒートブロック3が反応液5をインキュベートしている間、上層ヒートブロック2の温度を制御し、下層ヒートブロック3より高い温度に維持することで反応容器4の上部の周側面を加熱し、反応容器4内で反応液5に由来する凝結を防止する。

[0045] 例えば、本装置を用いてPCRにより核酸を増幅する場合に、下層ヒートブロック3の温度を、熱変性の段階では95℃で30秒、アニーリングの段階では55℃で30秒、伸長反応の段階では72℃で1分と設定する。この場合、上層ヒートブロック2の温度を、下層ヒートブロック3の温度の上限

値（すなわち、 95°C ）より高い一定温度、例えば 105°C に維持されるように設定する。

[0046] また、上層ヒートブロック 2 にヒーター 21 の代わりにペルチェ素子を設置、下層ヒートブロック 3 の温度変化に応じて、上層ヒートブロック 2 の温度を逐次変化させるようにしてもよい。例えば、下層ヒートブロック 3 の温度設定が上記と同じ場合に、上層ヒートブロック 2 の温度を、熱変性の段階では 105°C で 30 秒、アニーリングの段階では 65° で 30 秒、伸長反応の段階では 82°C で 1 分と設定する。こうして、上層ヒートブロック 2 の温度を、下層ヒートブロック 3 の温度変化に応じて逐次変化させながらも、常に下層ヒートブロック 3 の温度より高い温度に維持する構成でもよい。

[0047] [反応性確認実験]

本発明の装置の反応性を確認するため、上層ヒートブロック 2 を図 9 I ~ I V に示される位置に設けた構成の装置を用いた。尚、図 9 中、I は本発明の上記実施例における図 6 に示す装置、I I は上層ヒートブロック 2 を反応容器最上部に位置させ、上層ヒートブロック 2 と下層ヒートブロック 3 との間に反応容器 4 の全高の 30 % の空間 7 を設けた装置、I I I は上層ヒートブロック 2 が反応容器 4 を保持せず、反応容器 4 のキャップ 40 上に配置された装置、I V は上層ヒートブロック 2 を使用しない装置を示す。

[0048] 各装置の増幅効率の確認は、以下に記載のラムダ DNA（タカラバイオ社製）を鋳型とした増幅鎖長 8 k b p の PCR 増幅反応により行った。

[0049] 反応は、T a K a R a T a q H o t S t a r t V e r s i o n（タカラバイオ社製）を使用し、取扱説明書に記載の一般的な PCR 反応液量の 1 / 2 量（トータル反応液量 $25\mu\text{L}$ ）で行った。鋳型として $2.5\text{ng}/\mu\text{L}$ ラムダ DNA $0.5\mu\text{L}$ 、プライマー F（配列番号 1）及びプライマー R（配列番号 2）は $10\text{pmol}/\mu\text{L}$ 濃度のものを各 $0.5\mu\text{L}$ ずつ使用した。上記調製した反応液 5 は、 $25\mu\text{L}$ ずつ 0.2mL 反応チューブ（ 0.2mL 8 - s t r i p t u b e , i n d i v i d u a l F l a t C a p s

反応チューブ4を各装置にセットし、下層ヒートブロック3の温度を、94℃で1分間加温後、94℃で30秒－65℃で10分のサイクルを30回繰り返す温度設定にて反応を行った。上層ヒートブロック2の温度は107℃で行った。尚、図10に反応に用いた96穴プレートの模式図を示す。図中、斜線で示した場所は反応位置を示す。

[0050] 反応終了後、図10に記載の1列、6列及び12列のA行～H行までの反応液をそれぞれ抜き出し、1%アガロースゲル（Agarose L03「TAKARA」、タカラバイオ社製）／TAEバッファーに反応液各々3μLをアプライした。マーカーとしてλ-Hind III digest（タカラバイオ社製）を使用し、Mupid-2 plus（アドバンス社製）にて電気泳動を行った。その結果を図11に示す。すなわち、図11は各装置の96穴プレート内の位置によるPCRの反応性を示す電気泳動写真である。図中、例えば1列のA行の装置I～IVの反応後の結果は、A-1と記載した場所の下側の装置番号の箇所の電気泳動写真である。また、Mはマーカーの電気泳動写真を示す。

[0051] 図11から明らかなように、装置IIでは1列のD～H行と6列のG行とH行、装置IIIでは12列のF～H行、装置IVでは全ての行列において、わずかな増幅が認められるだけか全く増幅していなかった。これらの結果は、反応容器4内の凝結を防止できなかった、または、下層ヒートブロック3に温度ムラが生じたことが原因であると考えられる。これに対して、本発明の装置Iは、96穴プレート内の全ての位置において、良好な増幅結果が得られた。これは、上層ヒートブロック2が、反応容器内の反応液に由来する凝結を防止し、また、下層ヒートブロック3の温度ムラを抑制したことによるものであると考えられる。すなわち、本発明の装置Iでは、上層ヒートブロック2が、反応液5の濃度を所望の反応に起因するもの以上に変化することを防止して、反応液の濃度変化による核酸の増幅効率の低下を防止している。さらに、上層ヒートブロック2が、ヒートブロック1上の反応位置の違いによる温度ムラを防止し、反応位置の違いによる核酸の増幅効率の低下

を防止している。以上により、本発明の温度サイクル装置では、96穴プレート内で安定した再現性のあるPCRが可能であることが明らかとなった。

[0052] 本発明の温度サイクル装置は、核酸の増幅の他に、逆転写反応などの酵素反応にも適当することができる。

産業上の利用可能性

[0053] 本発明により、反応液中の水分やその他の成分の反応容器内での凝結がなく、また、反応容器を設置する位置による温度のムラも防ぐことが可能な温度サイクル装置が提供される。本発明の装置は、分子生物学研究分野等で使用される生物学的試料の反応、特に核酸の増幅を実施するために非常に有用である。

符号の説明

- [0054]
- 1 ヒートブロック
 - 2 上層ヒートブロック
 - 20 貫通孔
 - 21 ヒーター
 - 22 温度センサー
 - 23 位置決め穴
 - 3 下層ヒートブロック
 - 30 凹部
 - 31 ペルチェ素子
 - 32 温度センサー
 - 33 位置決めシャフト
 - 4 反応容器
 - 40 キャップ
 - 5 反応液
 - 50 液面
 - 6 スペーサ
 - 7 空間

8 断熱材

9 制御部

配列表フリーテキスト

[0055] SEQ ID NO:1; Primer F to amplify lambda DNA.

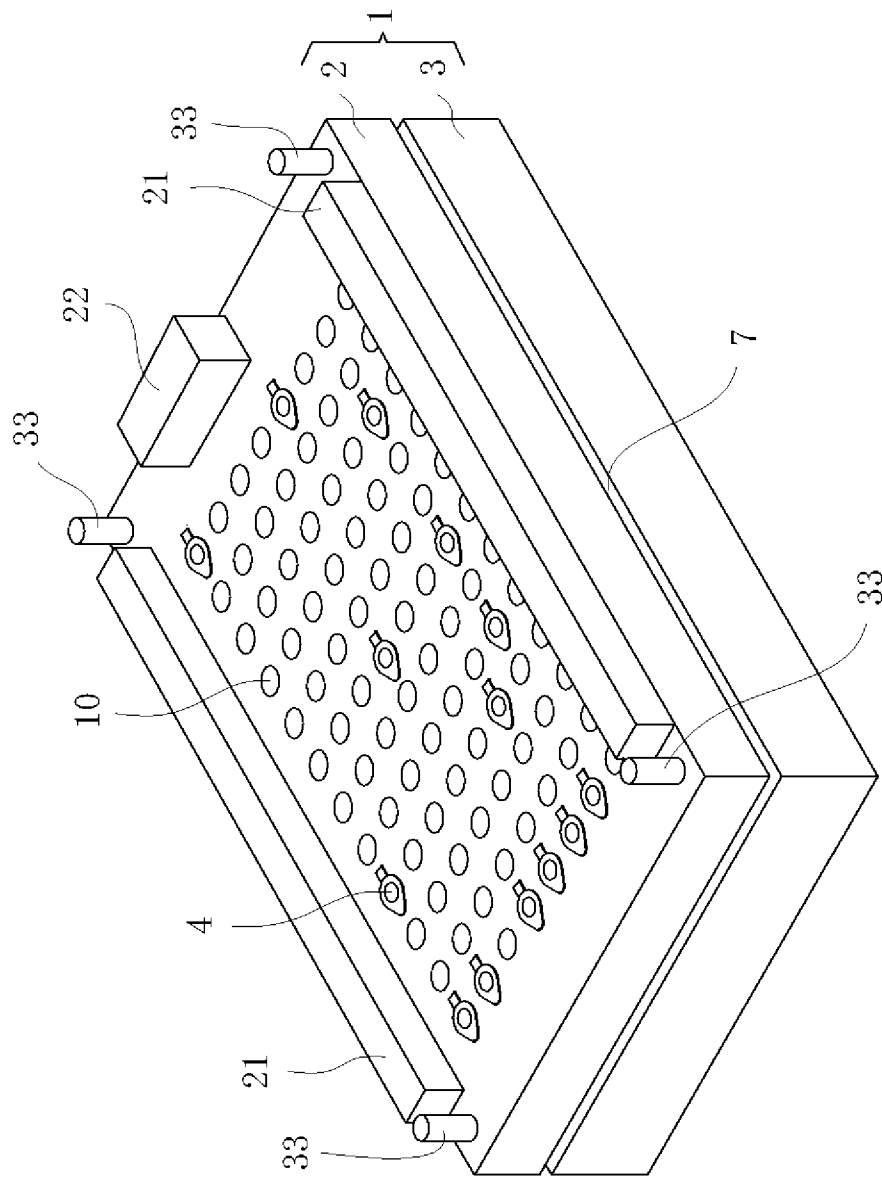
SEQ ID NO:2; Primer R to amplify lambda DNA.

請求の範囲

- [請求項1] 反応液をインキュベートするための温度サイクル装置であって、
- (1) 前記反応液を収容する反応容器を保持して加熱するためのヒートブロックを備え、前記ヒートブロックは、下層ヒートブロックと上層ヒートブロックとの2つの層で構成され、
- 更に、
- (2) 前記下層ヒートブロックの温度と前記上層ヒートブロックの温度とをそれぞれ独立に制御して、前記反応液をインキュベートする際に、前記上層ヒートブロックの温度を前記下層ヒートブロックの温度より高く維持する温度制御手段を備えることを特徴とする温度サイクル装置。
- [請求項2] 前記反応液は核酸を含有し、前記下層ヒートブロックは前記反応液をインキュベートし、前記上層ヒートブロックは前記核酸の増幅効率の低下を防止することを特徴とする請求項1記載の温度サイクル装置。
- [請求項3] 前記下層ヒートブロックと前記上層ヒートブロックとの間の熱伝導を妨げるための熱伝導防止手段を備えたことを特徴とする請求項1または請求項2に記載の温度サイクル装置。
- [請求項4] 前記熱伝導防止手段は、前記下層ヒートブロックと前記上層ヒートブロックとの間に設けられた空間であることを特徴とする請求項3に記載の温度サイクル装置。
- [請求項5] 前記温度制御手段は、前記下層ヒートブロックの温度を変化および維持するための第一温度手段と、前記上層ヒートブロックの温度を変化および維持するための第二温度手段とを備え、前記第一温度手段は前記下層ヒートブロックの下側に設けられ、前記第二温度手段は前記下層ヒートブロックの上側に設けられていることを特徴とする請求項1から請求項4のいずれか1項に記載の温度サイクル装置。
- [請求項6] 前記温度制御手段は、前記上層ヒートブロックの温度を前記下層ヒ

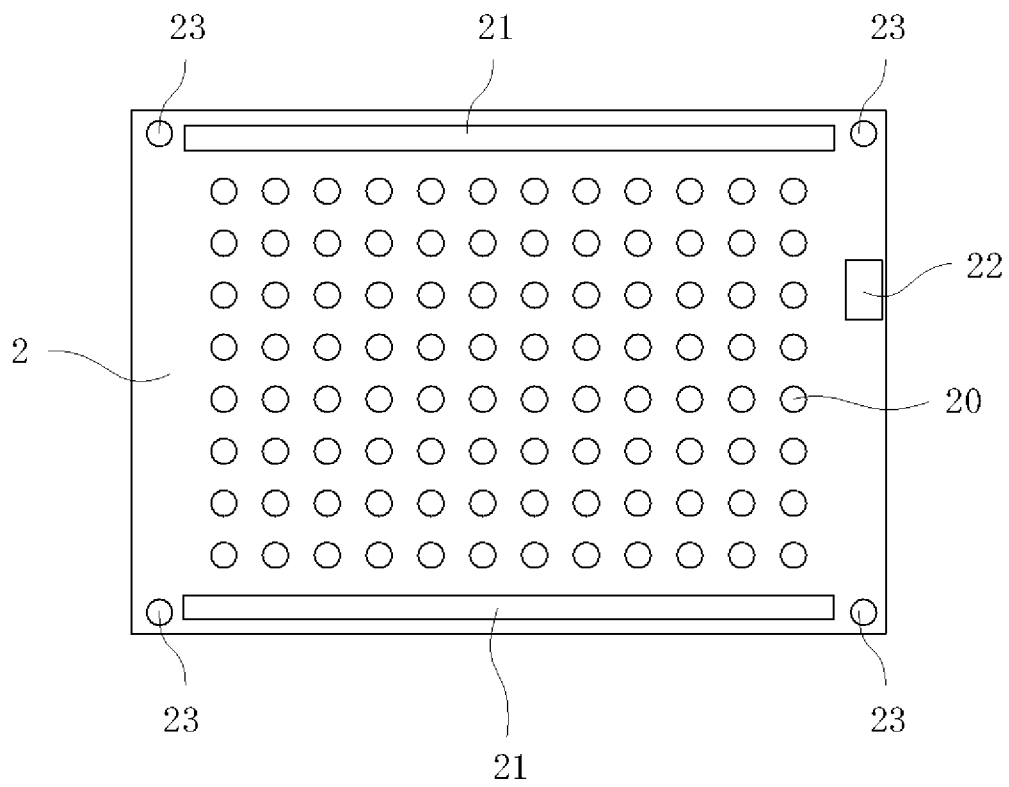
ートブロックの温度より 3℃以上高く維持することを特徴とする請求項 1 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の温度サイクル装置。

[図1]

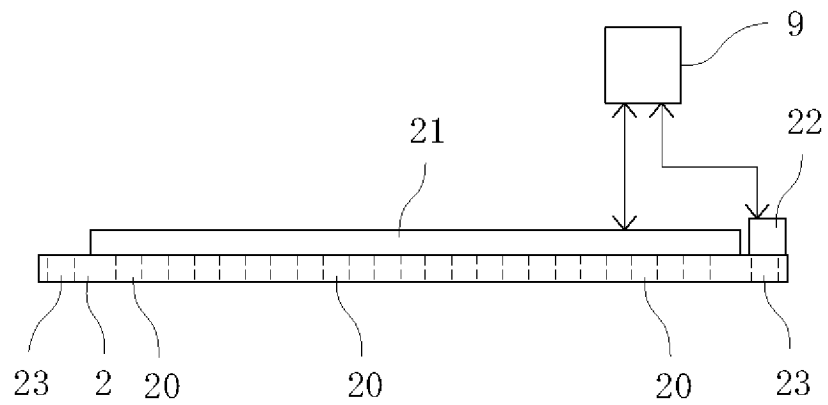


[図2]

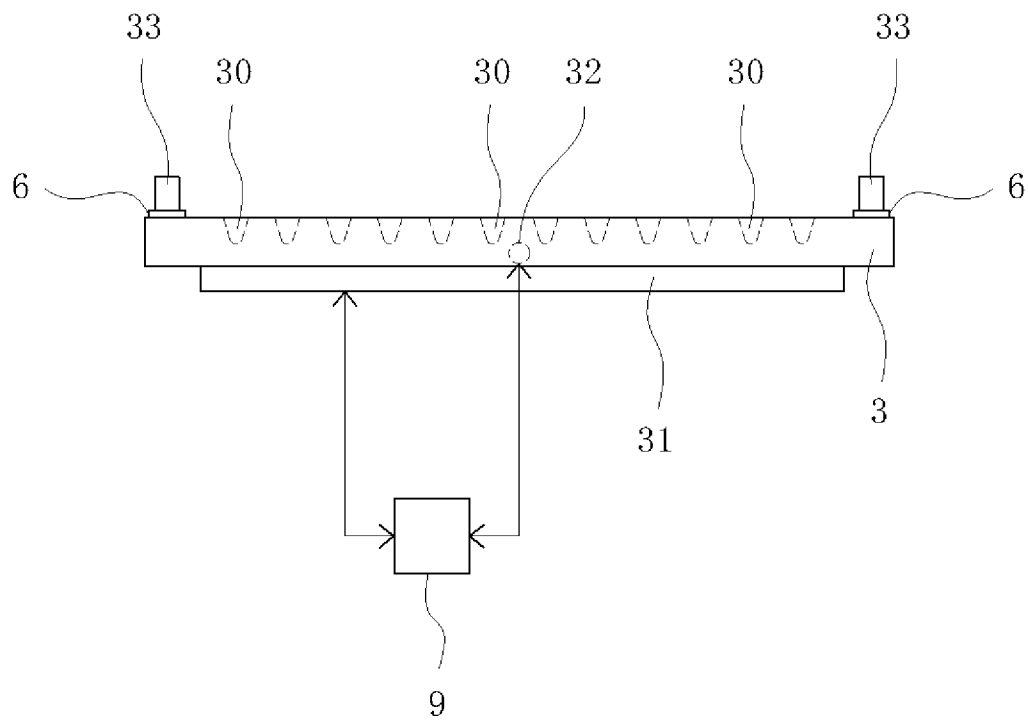
A



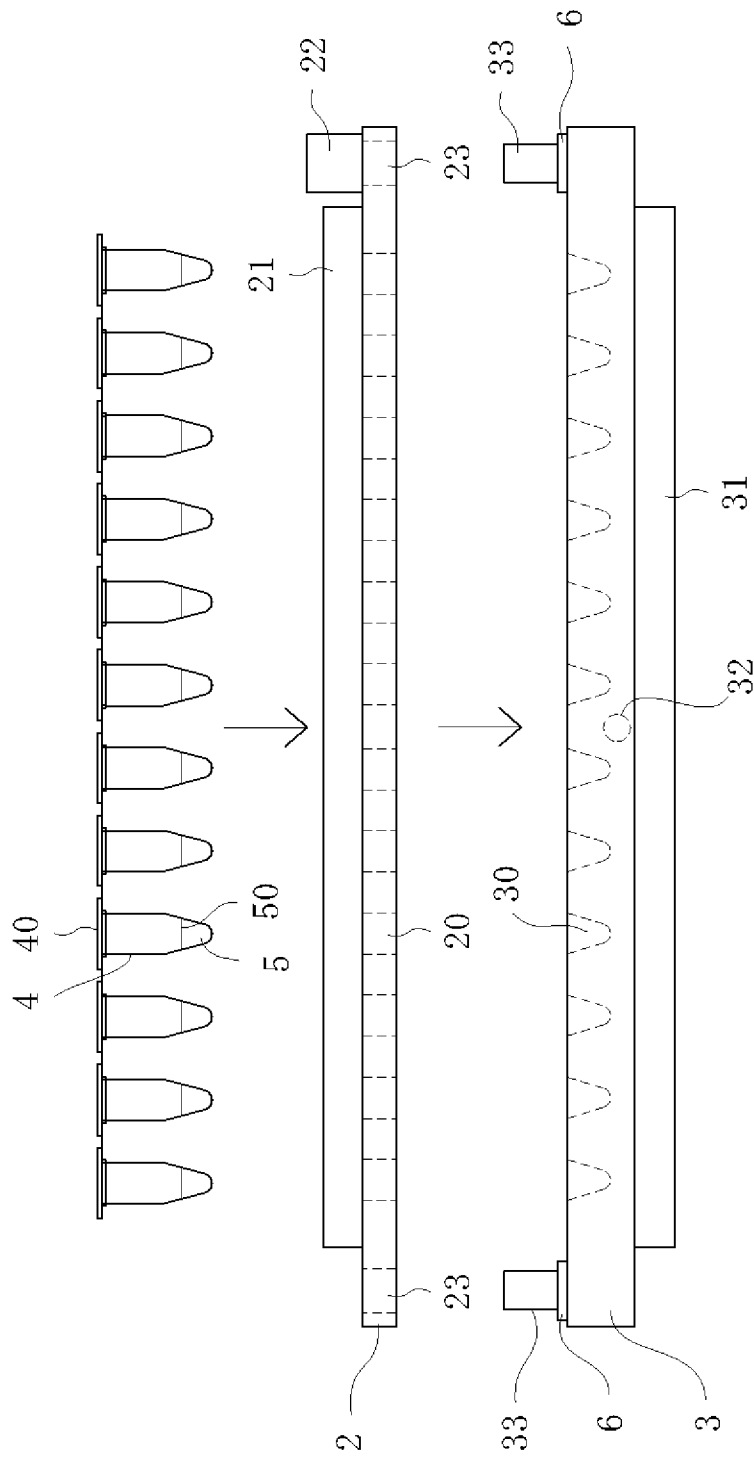
B



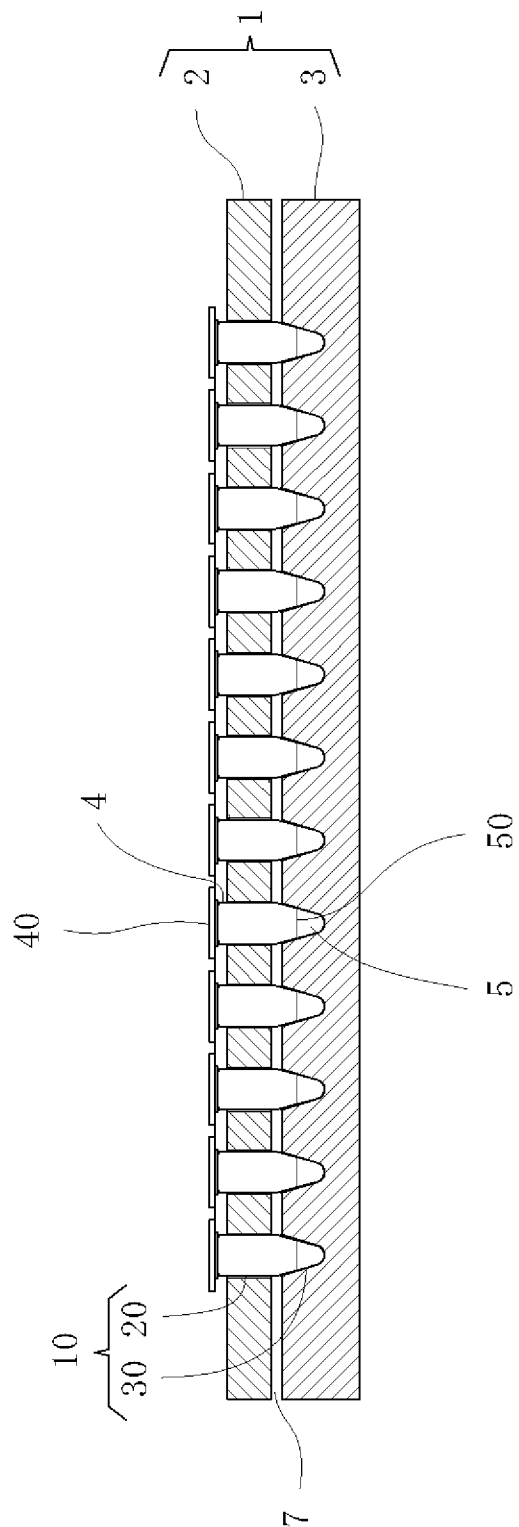
[図3]



[図4]

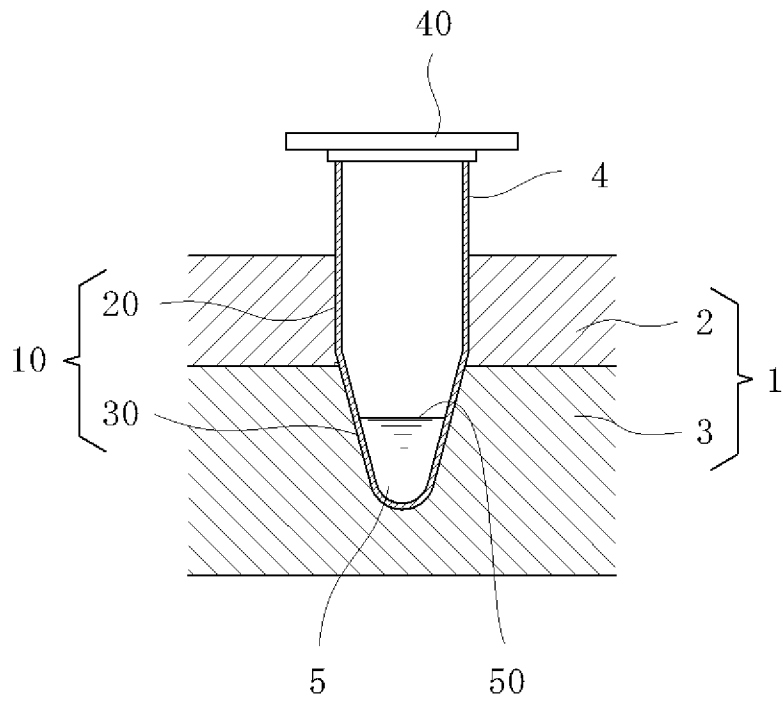


[図5]

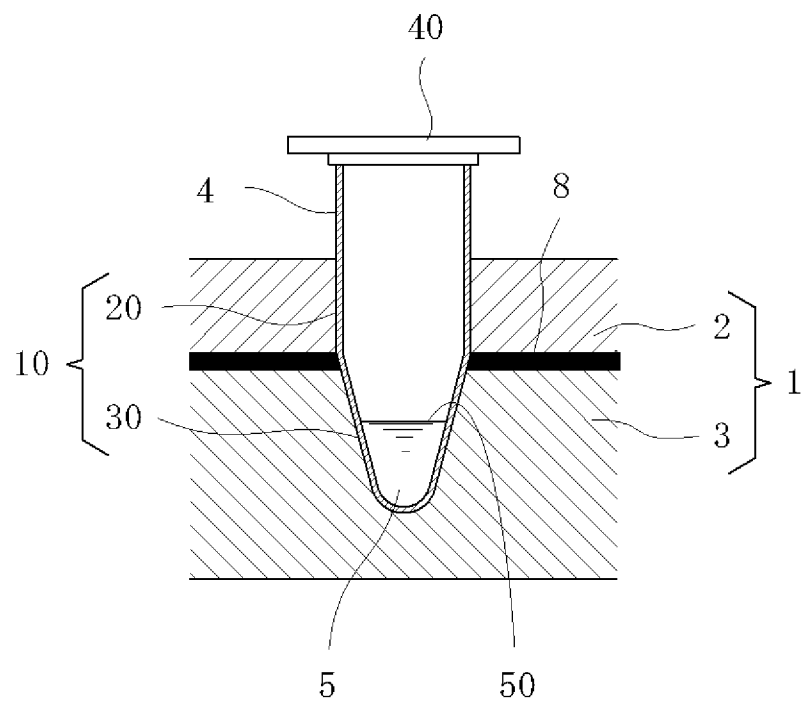


[図7]

A

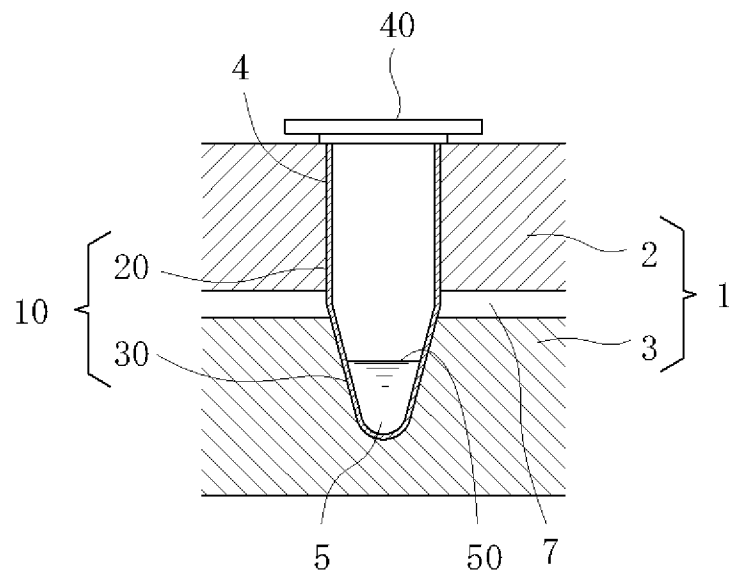


B

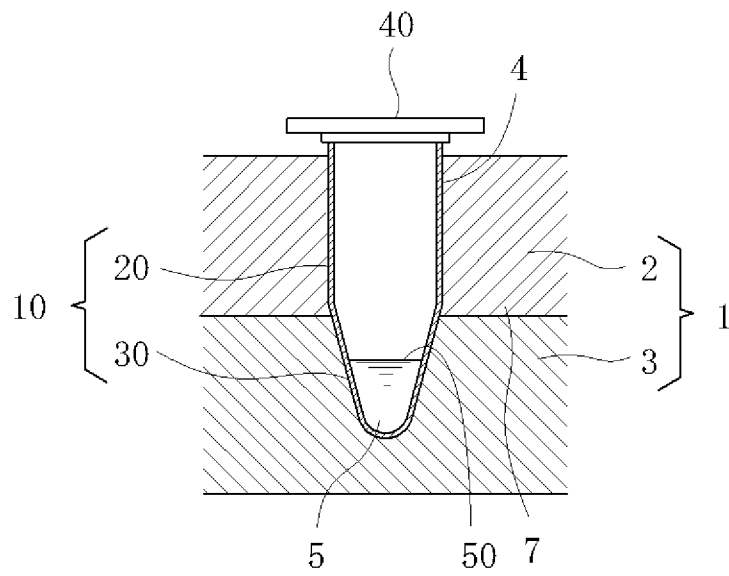


[図8]

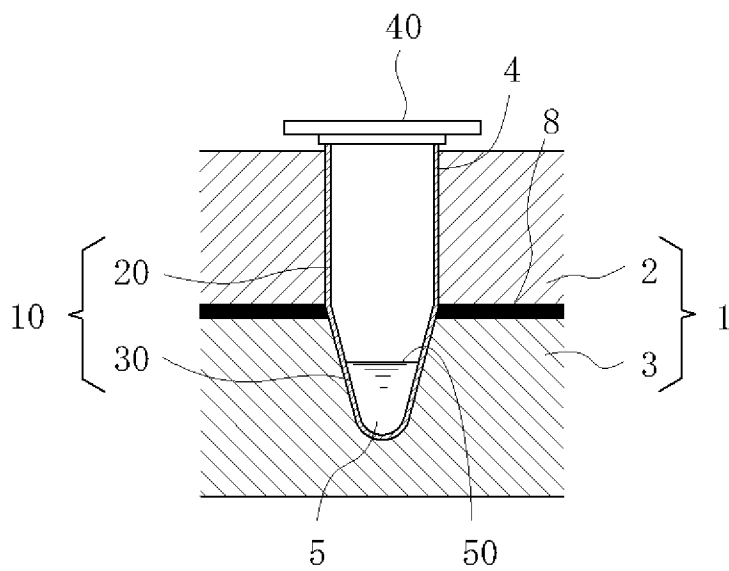
A



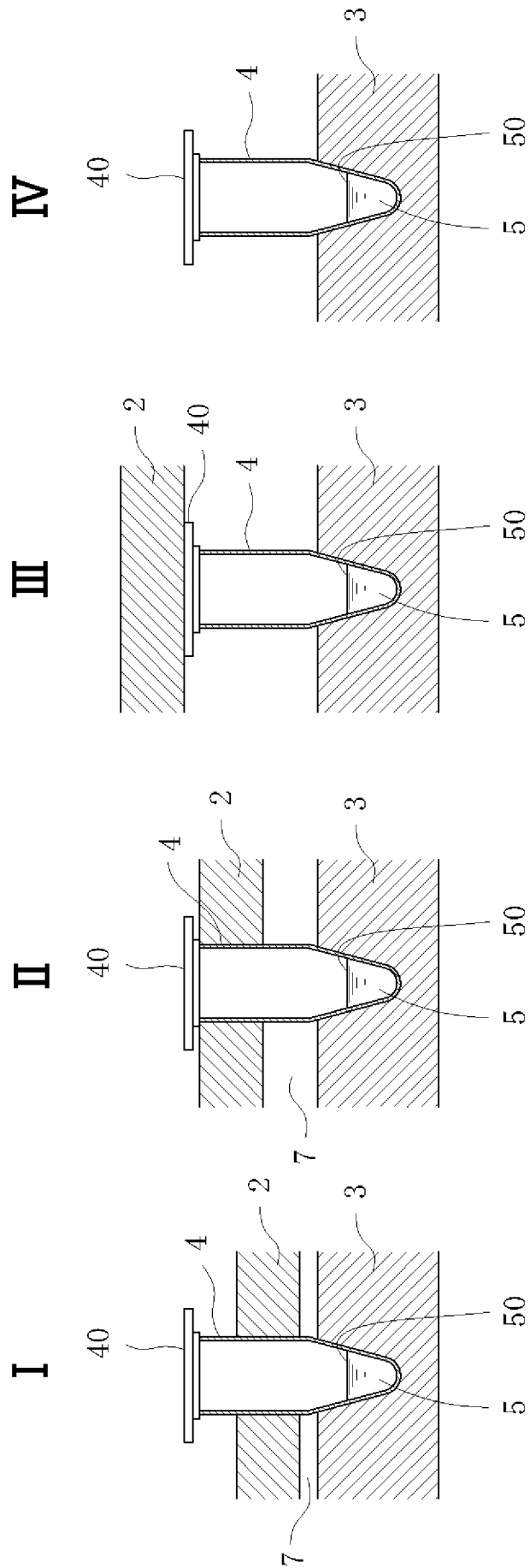
B



C

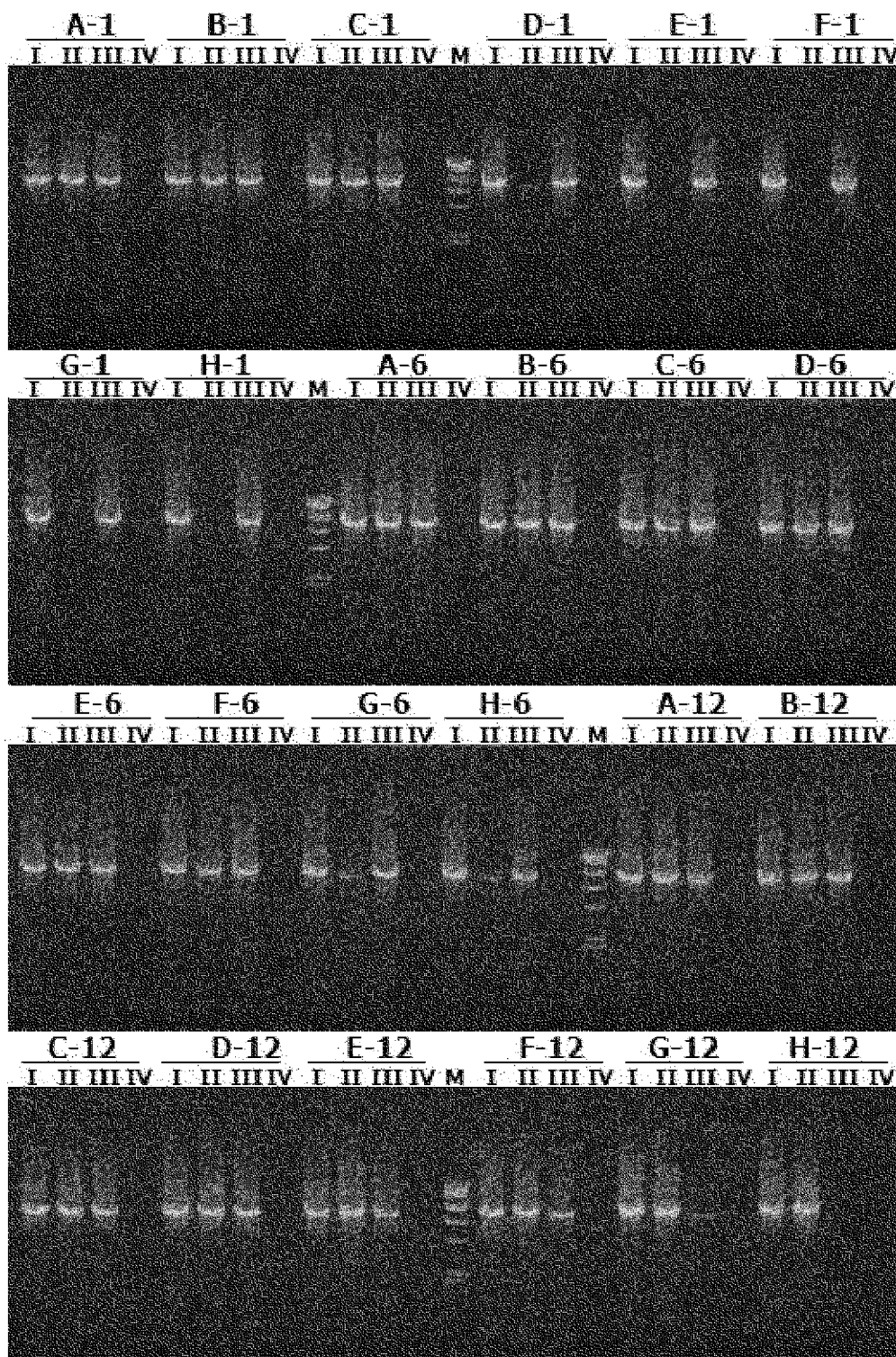


[図9]



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/063926

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/43740 A2 (APPLERA CORP.), 08 October 1998 (08.10.1998), claims; fig. 3, 5 & EP 0963250 A2 & EP 1127619 A2 & JP 2001-521379 A & EP 1127619 B1 & EP 1386666 A1 & US 2005/0145273 A1 & US 7133726 B1 & US 2007/0113880 A1 & US 2007/0117200 A1 & US 2007/0230535 A1 & JP 2008-278896 A & US 2008/0314431 A1 & US 7537377 B2 & EP 2090366 A2 & US 7645070 B2 & EP 2156892 A2	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 September, 2010 (02.09.10)

Date of mailing of the international search report
14 September, 2010 (14.09.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/063926

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/070198 A2 (CALIFORNIA INST TECHNOLOGY INC.), 12 June 2008 (12.06.2008), paragraphs [0005] to [0015], [0125] to [0129]; fig. 3 to 5 & US 2008/0003649 A1 & EP 2027251 A2 & JP 2009-537152 A	1-6
X	US 2004/0258568 A1 (EPPENDORF AG.), 23 December 2004 (23.12.2004), paragraphs [0025] to [0039]; fig. 1, 2 & WO 98/20975 A1 & EP 0881950 A1 & JP 2000-504231 A & EP 1426110 A2 & EP 0881950 B1 & US 6767512 B1 & EP 1955771 A2 & JP 4235848 B2 & US 7074367 B2	1-5
A	WO 2007/102400 A1 (Sanyo Electric Co., Ltd.), 13 September 2007 (13.09.2007), & JP 2007-236219 A & EP 1992682 A1 & US 2009/0155891 A1	1-6
A	WO 00/61797 A1 (ANALYTIK JENA AG.), 19 October 2000 (19.10.2000), & EP 1045038 A1 & EP 1090141 A1 & JP 2002-542445 A & US 6556940 B1 & EP 1090141 B1 & JP 3867889 B2	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/00(2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 98/43740 A2 (APPLERA CORP) 1998.10.08, 請求項、図 3、図 5 & EP 0963250 A2 & EP 1127619 A2 & JP 2001-521379 A & EP 1127619 B1 & EP 1386666 A1 & US 2005/0145273 A1 & US 7133726 B1 & US 2007/0113880 A1 & US 2007/0117200 A1 & US 2007/0230535 A1 & JP 2008-278896 A & US 2008/0314431 A1 & US 7537377 B2 & EP 2090366 A2 & US 7645070 B2 & EP 2156892 A2	1 - 5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 9 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 4 . 0 9 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

伊達 利奈

4 B

3 9 6 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2008/070198 A2 (CALIFORNIA INST TECHNOLOGY INC) 2008.06.12, [0005] - [0015]、[0125] - [0129]、図3-5 & US 2008/0003649 A1 & EP 2027251 A2 & JP 2009-537152 A	1 - 6
X	US 2004/0258568 A1 (EPPENDORF AG) 2004.12.23, [0025] - [0039]、図1、図2 & WO 98/20975 A1 & EP 0881950 A1 & JP 2000-504231 A & EP 1426110 A2 & EP 0881950 B1 & US 6767512 B1 & EP 1955771 A2 & JP 4235848 B2 & US 7074367 B2	1 - 5
A	WO 2007/102400 A1 (三洋電機株式会社) 2007.09.13, & JP 2007-236219 A & EP 1992682 A1 & US 2009/0155891 A1	1 - 6
A	WO 00/61797 A1 (ANALYTIK JENA AG) 2000.10.19, & EP 1045038 A1 & EP 1090141 A1 & JP 2002-542445 A & US 6556940 B1 & EP 1090141 B1 & JP 3867889 B2	1 - 6