

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4013671号  
(P4013671)

(45) 発行日 平成19年11月28日(2007.11.28)

(24) 登録日 平成19年9月21日(2007.9.21)

(51) Int. Cl.	F I				
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00		A	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00		A	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68		A	

請求項の数 24 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2002-197038 (P2002-197038)	(73) 特許権者	000005821
(22) 出願日	平成14年7月5日(2002.7.5)		松下電器産業株式会社
(65) 公開番号	特開2004-33141 (P2004-33141A)		大阪府門真市大字門真1006番地
(43) 公開日	平成16年2月5日(2004.2.5)	(74) 代理人	100097445
審査請求日	平成17年6月23日(2005.6.23)		弁理士 岩橋 文雄
		(74) 代理人	100109667
			弁理士 内藤 浩樹
		(74) 代理人	100109151
			弁理士 永野 大介
		(72) 発明者	中谷 将也
			大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
		(72) 発明者	行政 哲男
			大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリメラーゼ連鎖反応容器及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

基板と、この基板上に形成された一つ以上のキャビティと、このキャビティを封止するための蓋板とを有し、前記キャビティは少なくとも一つ以上の外部に開口したサンプル注入口と連結されているポリメラーゼ連鎖反応を実施するための容器であって、前記基板上の前記キャビティが形成された同一面内に少なくとも一つ以上の流路溝を有し、この流路溝は前記キャビティの少なくとも一部の側面に沿った隔壁によって隔てて設けられており、前記流路溝には外部に開口した熱媒体の流入口と排出口がそれぞれ少なくとも一つ以上連結されたポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項2】

基板と、この基板の一面側に形成された一つ以上のキャビティと、このキャビティを封止するための第一の蓋板と、前記基板の他面側に形成された少なくとも一つ以上の流路溝と、この流路溝を封止するための第二の蓋板を備えたポリメラーゼ連鎖反応を実施するための容器であって、前記流路溝は前記キャビティの少なくとも一部の側面に沿った隔壁によって隔てて設けられており、前記キャビティには少なくとも一つ以上の外部に開口されたサンプル注入口が設けられ、前記流路溝には熱媒体の流入口と排出口がそれぞれ少なくとも一つ以上連結されたポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項3】

基板と、この基板の一面側に形成された一つ以上のキャビティと、このキャビティを封止するための第一の蓋板と、前記基板の他面側に形成された少なくとも一つ以上の流路溝と

、この流路溝を封止するための第二の蓋板を備えたポリメラーゼ連鎖反応を実施するための容器であって、前記流路溝はキャビティの少なくとも一部の底面に沿った隔壁によって隔てて設けられており、前記キャビティには少なくとも一つ以上の外部に開口されたサンプル注入口が設けられ、前記流路溝には熱媒体の流入口と排出口がそれぞれ少なくとも一つ以上連結されたポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 4】

側面あるいは底面の隔壁が基板と同一材料からなる請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 5】

流路溝とキャビティは基板と異なる材料による隔壁によって隔てられており、前記基板の材料と前記隔壁の材料は同一の溶液またはガスに対して異なるエッチングレートを持つ請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

10

【請求項 6】

基板がシリコン基板である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 7】

蓋板が二酸化珪素またはこれを含むガラス基板である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 8】

基板がシリコン基板と、二酸化珪素またはこれを含むガラス基板からなる複合積層体である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

20

【請求項 9】

側面あるいは底面の隔壁が二酸化シリコン、窒化シリコン、金、白金、クロム、ニッケルのいずれかを含む材料である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 10】

キャビティに連結されたサンプル注入口と、流路溝に連結された熱媒体の流入口と排出口のいずれかまたはすべてが蓋板に形成されている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 11】

キャビティに連結されたサンプル注入口が第一の蓋板に形成されており、流路溝に連結された熱媒体の流入口と排出口は前記第二の蓋板に形成されている請求項 2 または 3 に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

30

【請求項 12】

サンプル注入口、熱媒体の流入口、排出口のいずれかまたはすべてにおいて、これらの形状が蓋板の基板と接合される側の方が小さいすり鉢形状となっている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 13】

キャビティに連結されたサンプル注入口と、流路溝に連結された熱媒体の流入口と排出口のいずれかまたはすべてが基板と蓋板を張り合わせた側面に形成されている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

40

【請求項 14】

基板と蓋板が接着剤を用いない直接接合法によって張り合わされている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 15】

キャビティと流路溝を隔てる隔壁の厚みが 100  $\mu\text{m}$  以下である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

【請求項 16】

キャビティの形状が楕円あるいは長方形である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

50

## 【請求項 17】

キャビティの形状が少なくとも2つ以上の複数の屈曲部を持つミアンダ形状もしくは渦巻形状である請求項1～3のいずれかに一つ記載のポリメラーゼ連鎖反応容器。

## 【請求項 18】

シリコンからなる基板に、少なくともエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスの2種類を用いたドライエッチングによって、前記基板の一面側にキャビティ及び流路溝を形成する工程と、ガラスからなる蓋板にサンプル注入口を形成する工程と、前記基板と前記蓋板を張り合わせる工程からなるポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法。

## 【請求項 19】

シリコンからなる基板の一面側から少なくともエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスの2種類を用いたドライエッチングによってキャビティを形成する工程と、前記基板の他面側から同様のエッチングによって流路溝を形成する工程と、ガラスからなる第一及び第二の蓋板にサンプル注入口と熱媒体の流入口及び排出口を形成する工程と、前記基板の一面側に第一の蓋板を張り合わせ、前記基板の他面側に第二の蓋板を張り合わせる工程からなるポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法。

10

## 【請求項 20】

シリコンからなる基板の一面側からエッチングによってキャビティを形成する工程と、キャビティの内壁に熱酸化法あるいはCVD法あるいはスパッタ法により二酸化シリコン層を形成する工程と、基板の他面側の面からエッチングによって流路溝を形成する工程を含む請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法。

20

## 【請求項 21】

シリコンからなる基板の一面側からエッチングによってキャビティを形成する工程と、キャビティの内壁にCVD法あるいはスパッタ法あるいは真空蒸着法あるいはメッキ法により金、白金、クロム、ニッケルのいずれかまたは複数の材料を形成する工程と、基板の一面側あるいは他面側の面からエッチングによって流路溝を形成する工程を含む請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法。

## 【請求項 22】

基板の他面側からエッチングによって流路溝を形成する工程において、レジストマスクの開口の大きさを基板の一面側に形成したキャビティの底面より大きくなるように設ける請求項20または21に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法。

30

## 【請求項 23】

基板とガラス基板の張り合わせを直接接合法あるいは陽極接合法にて行う請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法。

## 【請求項 24】

ガラス基板にサンプル注入口を形成する方法がサンドブラスト法である請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は核酸を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応を行うポリメラーゼ連鎖反応容器及びその製造方法に関する。

40

## 【0002】

## 【従来の技術】

近年、遺伝子情報に関する技術が盛んに開発されている。医療分野では、疾患関連遺伝子を解析することにより、疾患の分子レベルでの治療が可能となってきている。また、遺伝子診断により、患者個人ごとに対応したテーラーメイド医療も可能となってきた。製薬分野においては、遺伝子情報を使用して、抗体やホルモンなどのタンパク分子を特定し、薬品として利用している。農業や食品分野などにおいても、多くの遺伝子情報を利用した製品が作り出されている。

## 【0003】

50

このような遺伝子情報に関する技術において最も重要な手法の一つとしてポリメラーゼ連鎖反応法がある。ポリメラーゼ連鎖反応法は、遺伝子のある特定の部分のみを大量に増幅する技術であり、分子生物学等の研究用途の他、医療微生物学、遺伝疾患の臨床診断、法医学等、広範な分野において利用されている。特に臨床の場における遺伝子診断技術では、より多くの検体をより迅速に分析できる事が望まれており、ポリメラーゼ連鎖反応法においても微少化・高速化技術の開発が必要とされている。

【0004】

ポリメラーゼ連鎖反応法については特開昭62-281号公報に開示されている。このポリメラーゼ連鎖反応法によって遺伝子の増幅を行うためには、二本鎖のDNAを一本鎖へと解離させる工程(熱変性)、プライマーを結合させる工程(アニーリング)、ポリメラーゼによりDNAを伸長する工程(伸長反応)の三段階の工程を1サイクルとして、この工程を30から35サイクル繰り返すことにより行う。これらの工程は条件によっても異なり、特にアニーリングの温度は使用するプライマーのT<sub>m</sub>値に依存するが、通常それぞれ熱変性; 94 × 1分間、アニーリング; 50~60 × 1分間、伸長反応72 × 1~5分間の条件で行う。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

このように、ポリメラーゼ連鎖反応では40程度の温度変化を30回以上も繰り返す必要があり、従来のポリメラーゼ連鎖反応を行う装置ではポリプロピレン製のチューブ内にサンプルを供給した後アルミニウムブロックを用いて温度の上昇・下降を行うので、ポリメラーゼ連鎖反応を完了させるためには数時間以上を費やす必要があった。つまり、温度の上昇・下降を確実にサンプル溶液に伝える必要があるため、アルミニウムブロックが温度上昇・下降する時間、及びアルミニウムブロックからポリプロピレンチューブを伝わってサンプル溶液の温度上昇・下降に時間を要するからである。

【0006】

また、ポリプロピレンチューブの大きさを小さくすることが困難なため、ポリプロピレンチューブ内のサンプル量は10~100μlが必要であり、サンプル量を浪費している。今後、臨床の現場において遺伝子診断を行う必要があると考えられており、このような場合、より少量のサンプルでより高速にポリメラーゼ連鎖反応を行える装置の開発が必要とされていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明の請求項1に記載の発明は、基板と、この基板上に形成された一つ以上のキャビティと、このキャビティを封止するための蓋板とを有し、前記キャビティは少なくとも一つ以上の外部に開口したサンプル注入口と連結されているポリメラーゼ連鎖反応を実施するための容器であって、前記基板上のキャビティが形成された同一面内に少なくとも一つ以上の流路溝を有し、この流路溝は前記キャビティの少なくとも一部の側面に沿った隔壁によって隔てて設けられており、前記流路溝には外部に開口した熱媒体の流入口と排出口がそれぞれ少なくとも一つ以上連結されたポリメラーゼ連鎖反応容器であり、微量のサンプルでも容器内に満たすことができ、この状態で熱媒体がキャビティの側面を循環することにより、高速に温度の上昇・下降制御をサンプルに対して行うことができ、ポリメラーゼ連鎖反応を高速化することができる。

【0008】

本発明の請求項2に記載の発明は、基板と、この基板の一面側に形成された一つ以上のキャビティと、このキャビティを封止するための第一の蓋板と、前記基板の他面側に形成された少なくとも一つ以上の流路溝と、この流路溝を封止するための第二の蓋板を備えたポリメラーゼ連鎖反応を実施するための容器であって、前記流路溝は前記キャビティの少なくとも一部の側面に沿った隔壁によって隔てて設けられており、前記キャビティには少なくとも一つ以上の外部に開口されたサンプル注入口が設けられ、前記流路溝には熱媒体の流入口と排出口がそれぞれ少なくとも一つ以上連結されたポリメラーゼ連鎖反応容器であ

10

20

30

40

50

り、微量のサンプルでも容器内に満たすことができ、この状態で熱媒体がキャビティの側面を循環することにより、高速に温度の上昇・下降制御をサンプルに対して行うことができ、ポリメラーゼ連鎖反応を高速化できることに加えて、キャビティ側と熱媒体側が完全に分離されているので、熱媒体がガス状流体であってもキャビティ側に混入する心配が全くないという利点も有する。

**【0009】**

本発明の請求項3に記載の発明は、基板と、この基板の一面側に形成された一つ以上のキャビティと、このキャビティを封止するための第一の蓋板と、前記基板の他面側に形成された少なくとも一つ以上の流路溝と、この流路溝を封止するための第二の蓋板を備えたポリメラーゼ連鎖反応を実施するための容器であって、前記流路溝はキャビティの少なくとも一部

10

の底面に沿った隔壁によって隔てて設けられており、前記キャビティには少なくとも一つ以上の外部に開口されたサンプル注入口が設けられ、前記流路溝には熱媒体の流入口と排出口がそれぞれ少なくとも一つ以上連結されたポリメラーゼ連鎖反応容器であり、微量のサンプルでも容器内に満たすことができ、この状態で熱媒体がキャビティの底面を循環することにより、より大きな面積の隔壁によってキャビティに接するために、ポリメラーゼ連鎖反応を高速化することと、熱媒体がガス状流体の場合においてもキャビティ側に混入する心配が全くないという利点も有する。

**【0010】**

本発明の請求項4に記載の発明は、側面あるいは底面の隔壁が基板と同一材料からなる請求項1～3のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、同一の基板材料からキャビティ、流路溝を切り出すことが可能であり、これらの高密度化を促進することができる。

20

**【0011】**

本発明の請求項5に記載の発明は、流路溝とキャビティは基板と異なる材料による隔壁によって隔てられており、前記基板の材料と前記隔壁の材料は同一の溶液またはガスに対して異なるエッチングレートを持つ請求項1～3のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、キャビティと流路溝を隔てる隔壁が基板材料とエッチングレートの異なる材料で構成されていることにより、エッチングによってキャビティ及び流路溝を形成する際に、隔壁部を侵すことがないのでより高精度なキャビティ、流路溝、隔壁の構成を可能にすることができる。

30

**【0012】**

本発明の請求項6に記載の発明は、基板がシリコン基板である請求項1～3のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、基板材料がシリコン基板とすることにより、熱伝導率が優れていることとキャビティ及び流路溝を高密度に配置できるようになることにより、高速で温度の上昇・下降の制御が可能になるとともに、ポリメラーゼ連鎖反応容器の小型化が可能となる。

**【0013】**

本発明の請求項7に記載の発明は、蓋板が二酸化珪素またはこれを含むガラス基板である請求項1～3のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、シリコンとの直接接合・陽極接合が可能になるという製造上の利点を有し、接着剤が界面に存在しないのでサンプル溶液への影響を心配する必要がない。

40

**【0014】**

本発明の請求項8に記載の発明は、基板がシリコン基板と二酸化珪素またはこれを含むガラス基板からなる複合積層体である請求項1～3のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、二酸化珪素またはこれを含むガラス基板からなる積層体であることにより、シリコンと二酸化珪素のエッチングを制御できるので、より高精度にキャビティ、流路溝、隔壁を形成できるという請求項5の効果も補完する。

**【0015】**

本発明の請求項9に記載の発明は、側面あるいは底面の隔壁が二酸化シリコン、窒化シリコン、金、白金、クロム、ニッケルのいずれかを含む材料である請求項1～3のいずれか

50

一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、隔壁材料が基板材料と異なるこれらの材料を用いることによって、請求項 8 と同様の効果を持つとともに隔壁材料が金属の場合にはより高速な熱交換を行うことができる。

【 0 0 1 6 】

本発明の請求項 1 0 に記載の発明は、キャビティに連結されたサンプル注入口と、流路溝に連結された熱媒体の流入口と排出口のいずれかまたはすべてが蓋板に形成されている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、キャビティへのサンプル注入と熱媒体の流路溝への供給・回収を容易にすることができる。

【 0 0 1 7 】

本発明の請求項 1 1 に記載の発明は、キャビティに連結されたサンプル注入口が第一の蓋板に形成されており、流路溝に連結された熱媒体の流入口と排出口は前記第二の蓋板に形成されている請求項 2 または 3 に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、キャビティへのサンプル注入と熱媒体の流路溝への供給・回収を容易にすることができる。

10

【 0 0 1 8 】

本発明の請求項 1 2 に記載の発明は、サンプル注入口、熱媒体の流入口、排出口のいずれかまたはすべてにおいて、これらの形状が蓋板の基板と接合される側の方が小さいすり鉢形状となっている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、サンプル注入口へのサンプル溶液の注入・出し入れと、熱媒体の供給・回収のための作業を容易にすることができる。

【 0 0 1 9 】

本発明の請求項 1 3 に記載の発明は、キャビティに連結されたサンプル注入口と、流路溝に連結された熱媒体の流入口と排出口のいずれかまたはすべてが基板と蓋板を張り合わせた側面に形成されている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、側面にこれらが形成されることにより、蓋板には加工をしなくて済む上より高密度なキャビティ、流路溝の配置を可能にすることができる。

20

【 0 0 2 0 】

本発明の請求項 1 4 に記載の発明は、基板と蓋板が接着剤を用いない直接接合法によって張り合わされている請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、接着剤が用いられていないので、サンプル溶液に接着剤が溶け出すといった心配は全くなくなる。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の請求項 1 5 に記載の発明は、キャビティと流路溝を隔てる隔壁の厚みが 1 0 0  $\mu$  m 以下である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、隔壁の厚みをより薄くすることにより、極めて高速な熱交換を可能にすることができる。

【 0 0 2 2 】

本発明の請求項 1 6 に記載の発明は、キャビティの形状が楕円あるいは長方形である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、楕円もしくは長方形とすることにより、長辺側の側面に流路溝を配置すれば、より大きな面積でキャビティに接するので熱効率が良くなるとともに、たくさんのキャビティ、流路溝を並べて高密度に配置できるようになる。

40

【 0 0 2 3 】

本発明の請求項 1 7 に記載の発明は、キャビティの形状が少なくとも 2 つ以上の複数の屈曲部を持つミアンダ形状もしくは渦巻形状である請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のポリメラーゼ連鎖反応容器であり、キャビティの幅を細くできるので、流路溝がより大きな面積でキャビティに接することができより高い熱交換を可能にすることができる。

【 0 0 2 4 】

本発明の請求項 1 8 に記載の発明は、シリコンからなる基板に少なくともエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスの 2 種類を用いたドライエッチングによって前記基板の一面側にキャビティ及び流路溝を形成する工程と、ガラスからなる蓋板にサンプル注入口を形成する工程と、前記基板と前記蓋板を張り合わせる工程からなるポリメラーゼ

50

連鎖反応容器の製造方法であり、シリコン基板に垂直形状な溝を形成できるので高密度にキャビティや流路溝を形成できるので、ポリメラーゼ連鎖反応容器の小型化および高密度化に貢献できる。

【0025】

本発明の請求項19に記載の発明は、シリコンからなる基板の一面側から少なくともエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスの2種類を用いたドライエッチングによってキャビティを形成する工程と、前記基板の他面側から同様のエッチングによって流路溝を形成する工程と、ガラスからなる第一及び第二の蓋板にサンプル注入口と熱媒体の流入口及び排出口を形成する工程と、前記基板の一面側に第一の蓋板を張り合わせ、前記基板の他面側に第二の蓋板を張り合わせる工程とからなるポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法であり、シリコン基板に垂直形状な溝を形成できるので高密度にキャビティや流路溝を形成できるので、ポリメラーゼ連鎖反応容器の小型化および高密度化に貢献できる。さらに、基板の一面側と他面側からそれぞれキャビティと流路溝を形成しているので、より効率的な温度の上昇・下降を実現できるポリメラーゼ連鎖反応容器を製造できるのである。また、キャビティと流路溝が完全に分離されているので、互いに流体が漏れない容器の製造方法を実現することができる。

10

【0026】

本発明の請求項20に記載の発明は、シリコンからなる基板の一面側からエッチングによってキャビティを形成する工程と、キャビティの内壁に熱酸化法あるいはCVD法あるいはスパッタ法により二酸化シリコン層を形成する工程と、基板の他面側の面からエッチングによって流路溝を形成する工程を含む請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法であり、キャビティの内壁を基板と異なる材料にすることにより、流路溝の形成を容易にするとともに、より効率的な熱交換を可能にする流路溝を配置することができる製造方法を実現できる。

20

【0027】

本発明の請求項21に記載の発明は、シリコンからなる基板の一面側からエッチングによってキャビティを形成する工程と、キャビティの内壁にCVD法あるいはスパッタ法あるいは真空蒸着法あるいはメッキ法により金、白金、クロム、ニッケルのいずれかまたは複数の材料を形成する工程と、基板の一面側あるいは他面側の面からエッチングによって流路溝を形成する工程を含む請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法であり、請求項20の効果に加えて、隔壁の材料をより熱伝導率の高い金属にすることによって効率の良い熱交換を可能にするポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法を提供することができる。

30

【0028】

本発明の請求項22に記載の発明は、基板の他面側からエッチングによって流路溝を形成する工程において、レジストマスクの開口の大きさを基板の一面側に形成したキャビティの底面より大きくするように設ける請求項20または21に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法であり、流路溝の形成を容易にする製造方法を提供することができる。

【0029】

本発明の請求項23に記載の発明は、基板とガラス基板の張り合わせを直接接合法あるいは陽極接合法にて行う請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法であり、接着剤を用いないでシリコン基板とガラス基板の張り合わせをすることができるので、キャビティのサンプル溶液に接着剤の成分が溶出することのない製造方法を提供することができる。

40

【0030】

本発明の請求項24に記載の発明は、ガラス基板にサンプル注入口を形成する方法がサンドブラスト法である請求項18または19に記載のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法であり、サンプル注入口の形状をすり鉢状にすることが容易にできるようになり、よりサンプルを注入しやすいポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法を提供することができる。

【0031】

50

**【発明の実施の形態】**

以下、本発明のポリメラーゼ連鎖反応容器およびその製造方法について実施の形態および図面を用いて説明する。

**【0032】**

(実施の形態1)

以下、本発明の実施の形態1および図1～図9により請求項1、4、6、7、10、12、14～18、23、24に記載の発明を説明する。

**【0033】**

図1～図3は本発明の実施の形態1におけるポリメラーゼ連鎖反応容器の分解斜視図を示す。図4はポリメラーゼ連鎖反応容器の一部の斜視図を示す。図5～図9は同容器の製造工程を示す断面図を示す。

10

**【0034】**

図1～図3において、1はシリコンよりなる基板であり、この基板1の一面側にはキャビティ2が形成されており、キャビティ2の側面側には流路溝3が両側に形成されている。なお、このキャビティ2と流路溝3はシリコンよりなる隔壁4によって分断されている。

**【0035】**

また、キャビティ2の形状は長方形であり、流路溝3はキャビティ2の長方形の辺の長い側面に隣接されているとともに辺の短い側面を取り囲むようにして、一方は流入溝5、他方は排出溝6へ合流している。

**【0036】**

さらに、基板1の一面側にはキャビティ2に連結されるサンプル注入口7と、流入溝5及び排出溝6にそれぞれ連結される熱媒体の流入口8と排出口9を備えたガラスからなる蓋板12が張り合わされている。これにより、キャビティ2、流路溝3は外部より封止され、サンプル注入口7と熱媒体の流入口8、排出口9のみが外部へ開口した状態となる。

20

**【0037】**

本実施の形態1ではシリコンからなる基板1とガラスからなる蓋板12は後に述べるように直接接合法によって接合されているので、接着剤などは基板1と蓋板12の界面には存在していない。

**【0038】**

このように接着剤を介していないことにより、サンプル溶液のポリメラーゼ連鎖反応をキャビティ2内で起こさせる場合、接着剤がサンプル溶液内に溶け出す心配は全くないが、基板1と蓋板12の材料によっては直接接合法が使えないなど、どうしても接着材を使う必要がある場合には接着剤がサンプル溶液内に溶け出すことのないような注意が必要である。

30

**【0039】**

上記のような構造とすることにより、流路溝3とキャビティ2を隔てる隔壁4は基板1の材料のシリコンのみで構成することができる。さらにシリコンは後に述べる製造方法によれば極めて微細な加工が可能であり、たとえば隔壁4の厚みを100 $\mu\text{m}$ 以下にすることが可能である。このように熱伝導率がガラスや樹脂など従来のポリメラーゼ連鎖反応容器で用いられていた材料より高い上隔壁4の厚みも従来より薄くすることができるので、流路溝3に熱媒体を循環させたとき、隔壁4がシリコンで構成していることから極めて高速に熱媒体からの熱をキャビティ2側に伝えるあるいはキャビティ2側の熱を取り除くことができる。

40

**【0040】**

さらに、この構成ではキャビティ2は長方形をしているので、図2に示すように複数のキャビティ2がそれぞれ流路溝3と隣接した状態で高密度に配置することができるため、一度に多数のサンプル溶液のポリメラーゼ連鎖反応を可能とすることができる。

**【0041】**

ここで、本発明のポリメラーゼ連鎖反応容器を用いたポリメラーゼ連鎖反応の手順について述べる。まず、キャビティ2に入れるサンプル溶液を作成する。たとえば、サンプル溶

50

液は以下の材料を混ぜ合わせる。

【0042】

増幅させるターゲットDNAのテンプレートとして DNA (寶酒造製)、プライマーとして TaKaRa ポリメラーゼ連鎖反応 Amplification Kit (寶酒造製) の Control Primer 1 (5' - GATGAGTTCGTGTCCGTACAAC T - 3') および Primer 3 (5' - GGT TATCGAAATCAGCCACAGCGCC - 3') を用い、それぞれ、適度な濃度に調整する。

【0043】

さらに、ポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド三リン酸ミックス、MgCl<sub>2</sub>などの必要な成分を適切な量を加えて混合し、サンプル溶液を調整する。

10

【0044】

次に図1に示すようなポリメラーゼ連鎖反応容器のサンプル注入口7よりキャビティ2内にサンプル溶液を注入し、サンプル注入口7に蓋をする。このときの蓋をする方法としてはシリコンゴムなどを押さえつけることで、サンプル溶液は外部に漏れ出さなくなる。同時に、熱媒体の流入口8、排出口9には外部の熱循環器などに接続を行い、94、55、72 付近の3種類の温度の熱媒体をそれぞれ所定時間、循環させるようにしておく。これによりサンプル溶液の温度が上昇・下降を繰り返し、すなわち、94 の熱媒体を循環させる熱変性、55 の熱媒体循環によりアニーリング、72 の熱媒体循環により伸長反応を起こさせることができる。このときの温度制御サイクル数はたとえば30~50 サイクル行う。これにより、ターゲットDNAはポリメラーゼ連鎖反応により増幅する。

20

【0045】

このように、本発明のポリメラーゼ連鎖反応容器を用いると3種類の温度制御を熱媒体を流すことによって行い、しかも熱媒体の流路溝3とキャビティ2を隔てるのはシリコンからなる100 μm以下の厚みの隔壁4のみなので、熱交換が極めて効率よく行われることとなり、ヒートブロックなどを用いた場合にはサンプル溶液の温度の上げ下げに十分な時間を必要とするが極めて短時間で反応を終了させることができる。

【0046】

また、本発明によるポリメラーゼ連鎖反応容器ではシリコンからなる基板1の一面に微細なキャビティ2を形成しているため、少ないサンプル量でも確実なポリメラーゼ連鎖反応が期待できる。

30

【0047】

さらに、図2のポリメラーゼ連鎖反応容器のように複数のキャビティ2を高密度に配置できるので、たとえば異なる複数のターゲットDNAを増幅する場合においても各キャビティ2にそれぞれ異なるターゲットDNAを含むサンプル溶液を注入して、熱媒体によって温度の上昇・下降を行えば、一つのチップ上で同時に複数のサンプル溶液に対してポリメラーゼ連鎖反応を実現することができる。

【0048】

また、サンプル注入口7、熱媒体流入口8及び排出口9の形状はガラスからなる蓋板12の上面側の方が大きく、基板1と接着される側の方が小さい、いわゆるすり鉢形状となっている。これにより、マイクロピペットなどを用いてサンプル溶液の注入を行う際に効率よく注入を行うことができる。

40

【0049】

また、熱媒体の循環のためのチューブなどを熱媒体の流入口8及び排出口9に挿入しやすくなっている。なお、サンプル注入口7は一つでもサンプル溶液の出し入れは可能であるが、2つ以上あった方がサンプルの注入時に逆側の注入口が空気の逃げ道となるので、注入がさらに容易になる。

【0050】

また、サンプル注入口7、熱媒体流入口8及び排出口9はすべて蓋板12の上面に形成されているために熱媒体の循環のための工程がより簡便になる。このことを少し詳しく説明

50

すると、たとえば図3のようなアタッチメントプレート31を用意する。このアタッチメントプレート31には本実施の形態1のポリメラーゼ連鎖反応容器10を窪みにセットできるようになっており、ポリメラーゼ連鎖反応容器10のサンプル注入口7に対応する位置にシリコンゴムよりなる蓋シート32が設けられ、熱媒体流入口8及び排出口9に対応する位置にそれぞれ供給口33および排出口34が設けられている。また、アタッチメントプレート31の外部流入口37は供給口33と、外部排出口38は排出口34とそれぞれつながっている。

#### 【0051】

これにより本実施の形態1のポリメラーゼ連鎖反応容器10のように、蓋板12の一面のみにサンプル注入口7、熱媒体流入口8、排出口9が設けられている場合、サンプル溶液をキャビティに注入した後、このアタッチメントプレート31に蓋板12側を向けてセットすればサンプル注入口7の封止と熱媒体流入口8、排出口9への接続が同時にできるようになり、よりポリメラーゼ連鎖反応の作業がより簡便なものとする事ができる。

10

#### 【0052】

また、キャビティ2の形状はサンプル溶液が効率よく注入でき、流路溝3との熱伝導が良い状態に保たれるのであれば良く、たとえば図4に示すように、基板44に形成するキャビティ45の幅を細くして、2つ以上の複数の屈曲部を持つようにミアンダ形状にし、流路溝46を両側面に沿うようにすれば、キャビティ45の体積に対して大きな面積の流路溝46が沿うことになるので、極めて効率的に熱媒体によってサンプルの温度上昇・下降を効率的にできる。

20

#### 【0053】

また、熱効率を上げるためのキャビティ2の形状としてはキャビティ2の幅を細くすれば良く、基板1の中に効率的に配置するためには複数の屈曲部を持っていけばよいので渦巻状としても同様の効果が得られる。

#### 【0054】

次に、本発明の実施の形態1によるポリメラーゼ連鎖反応容器を製造するための手順について図面を用いて説明する。図5～図9は本実施の形態1のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法を示すための断面図である。

#### 【0055】

図5に示すように、シリコンからなる基板1にレジストマスク21をフォトリソグラフィによって形成する。なお、基板1の少なくとも上面は鏡面に研磨されたものを用いる。これは後の工程で、上面をガラス基板と直接接合させるためである。直接接合により接合しないのであれば必要ない。

30

#### 【0056】

次に図6に示すようにエッチングによってキャビティ2、流路溝3を形成する。この時、エッチングする方法としては、エッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスの2種類を少なくとも用いたドライエッチングによって行う。通常、エッチングを促進するガス、たとえば $SF_6$ 、 $CF_4$ などのガスのみを用いてエッチングすると、エッチングはレジストマスク21の下方にも広がるサイドエッチ現象が発生するので、あまり高密度にエッチング溝を配置できない。しかし、 $C_4F_8$ や $CHF_3$ などのエッチングを抑制するガスを混合させることで、エッチング側壁にエッチングを抑制する保護膜を形成するのでエッチングは垂直方向のみに進むのである。

40

#### 【0057】

なお、前記2種類のガスは同時に混合するよりも、エッチングを促進するガスによって少しだけのエッチングと、エッチングを抑制するガスによって少しだけ保護膜を形成することを数秒間の周期で繰り返して行う方が側壁4の垂直性にはより効果がある。これにより、キャビティ2及び流路溝3は最大限高密度に配置できるようになる。

#### 【0058】

次に、図7に示すようにガラスからなる蓋板12に、レジストマスク22を形成する。なお、蓋板12の少なくとも下面は鏡面状態のものを用いる。これは後の工程で下面を基板

50

1と直接接合させるためである。直接接合により接合しないのであれば必要ない。

【0059】

次に図8に示すようにサンドブラストによって、サンプル注入口7と、熱媒体の流入口8（図示せず）および排出口9（図示せず）を形成する。サンドブラストによるサンプル注入口7、熱媒体の流入口8、排出口9の形成により、穴の形状は図8のようにすり鉢形状となり、サンプル溶液をピペットなどを用いて注入する場合あるいは熱媒体を注入させることがより容易になる。

【0060】

次に、図9に示すように基板1と蓋板12の張り合わせる面をゴミ・キズのないように注意深く洗浄した後、張り合わせて両者の界面の空気を除去すると、基板1と蓋板12間はファンデルワールス力により吸着する。この状態で温度を250～500程度にすると基板1と蓋板12は強固に接合される。これにより、本実施の形態1のポリメラーゼ連鎖反応容器が完成する。

【0061】

なお、複数のポリメラーゼ連鎖反応容器を大きな基板上に複数同時に作ることもでき、この場合は直接接合により基板1と蓋板12を張り合わせた後、ダイシングによって個別の容器ごとに切り離す。また、基板1と蓋板12を接着させる方法としては、他に陽極接合法がある。これは基板1と蓋板12を張り合わせた後、両者に高電圧を掛けると静電気により吸着が行われ、この状態で約250～500以上の温度を掛けると強固に接合される。また、他の接着方法として接着剤を使うこともできるが、この場合は接着剤の材料がサンプル溶液に影響を与えないか注意が必要である。

【0062】

なお、ポリメラーゼ連鎖反応容器に用いられる基板1はサンプル液と反応しなければどのような材料でもよく、シリコン以外には、ガリウムヒ素等の半導体、石英ガラス、鉛ガラス、ホウ珪酸ガラス、ソーダガラスなどのガラス基板、ポリメタクリル酸メチルまたはその共重合体、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレートなどのプラスチック基板、セラミック基板、金属基板等を使用することができる。たとえば、基板1をガリウムヒ素とした場合にはRIE等のドライエッチング、ガラスであればドライエッチングに加えてフッ酸等を用いたウェットエッチング、プラスチックであればナノプリンティング等を用いることができる。しかしながら、基板としてシリコンを用いれば、既に説明したようなエッチング方法により、微小なキャビティをもっとも精度良く加工することができる。

【0063】

また、キャビティ2からサンプルが流出しないよう封止する蓋板12の材質は基板1の材質と同様のものを用いることができるが、基板1と完全に接着もしくは密着し、キャビティ2内部のサンプルを封止する必要があるので基板1と蓋板12を接着する方法によって最適な組み合わせを選ぶべきである。例えば、陽極接合、直接接合等の接着剤を用いない方法を用いるのであれば基板1がシリコン、蓋板12がガラスの組み合わせ、もしくは両方ともガラス、あるいはシリコンにすることができる。その他にも直接接合できる組み合わせは多くあり、水晶基板どうし、タンタル酸リチウム基板どうしなどがある。

【0064】

また、基板1と蓋板12を張り合わせた後、界面にフッ酸を浸透させて界面を溶解させて接合させるフッ酸接合法を用いる場合には、基板1および蓋板12が双方ともガラス、石英ガラスなどにすることができる。また、接着剤を用いる場合には、プラスチックなどでも可能である。つまり、基板1と蓋板12の組み合わせはいろいろ考えられるので、接着方法、キャビティ2及び流路溝3の加工方法、必要とするキャビティ密度、材料の熱伝導性、コスト等を鑑みて最適な組み合わせを選ぶべきである。

【0065】

しかしながら、本発明の実施の形態1にあげたシリコンからなる基板1、ガラスからなる蓋板12の組み合わせはキャビティ2の高密度配置、シリコンの熱伝導性、接合の高信頼性の点から最も優れている組み合わせの一つである。

## 【0066】

(実施の形態2)

以下、本発明の実施の形態2および図10～図13により請求項8に記載の発明を説明する。図10は本発明の実施の形態2によるポリメラーゼ連鎖反応容器の基板の部分の斜視図で示したものであり、図11はこれを側面から見た図である。図12～図13は同容器の製造工程を示す断面図である。

## 【0067】

実施の形態1と違う点は基板51が図10、図11のようにシリコン層52、54と二酸化シリコン層またはこれを含むガラス基板53との複合多層基板となっている点である。基板材料としてこの複合多層基板51を用いると、サンプル容量の精度の高いポリメラーゼ連鎖反応容器を得ることができる。

10

## 【0068】

実施の形態1で示したように基板材料をシリコン材料のみから構成されている場合、キャビティ55の深さを正確に均一性よく製造しようとする、シリコンをエッチングする際に所定の深さまでエッチングしたときにこれを止める必要があるが、エッチングレートはエッチング装置の状態によってばらつきを持っており、正確にエッチングを止める判断が難しくなることがある。

## 【0069】

特に本発明のポリメラーゼ連鎖反応容器の大きさは5×10mm程度と小さいため、一度に多数のポリメラーゼ連鎖反応容器56を製造するために、通常は直径が100mm以上のシリコン基板をエッチングすることによって多数のキャビティ55の作成を一括して行う。

20

## 【0070】

この場合、エッチング装置、エッチング条件などによってシリコン基板の場所によって容器のキャビティ深さが違ってしまうことになる。

## 【0071】

しかしながら、図10に示すようにシリコン層52、54と二酸化珪素またはこれを含むガラス基板53との複合多層からなる基板51を用いた場合には上部のシリコン層52をエッチングすればよいので、図11に示すようにキャビティ55の深さは上部のシリコン層52の厚みとなり、正確なエッチング深さが実現できる。

30

## 【0072】

このことをさらに詳しく説明するために図面を用いて同容器の製造方法を説明する。図12のようにシリコン層52、54と二酸化珪素またはこれを含むガラス基板53との複合多層基板51の上部シリコン層52側にレジストマスク60をフォトリソグラフィによりパターンニングした後、キャビティ55および流路溝57をドライエッチングする。

## 【0073】

このときのドライエッチングの方法は実施の形態1と同様である。このドライエッチングはガラス基板53まで達したときにエッチングの進みが急に遅くなる。これによって、キャビティ深さは最初の基板51の上部シリコン層52の厚みによって決まるので、極めて正確なキャビティ深さとすることができるのである。

40

## 【0074】

次に図13に示すように、複合多層基板51の一面側に、サンプル注入口59、熱媒体流入口(図示せず)、排出口(図示せず)を形成したガラスよりなる蓋板58を接合することで本実施の形態2のポリメラーゼ連鎖反応容器56を得る。

## 【0075】

なお、サンプル注入口59、熱媒体の流入口、排出口の作成方法は実施の形態1と同じサンドブラスト法であり、これによりこれらの形状はすり鉢状となることで溶液、熱媒体の注入が行いやすくなる点は同じである。

## 【0076】

(実施の形態3)

50

以下、本発明の実施の形態3および図14～図30により請求項2、3、5、11、19に記載の発明を説明する。図14は本発明のポリメラーゼ連鎖反応容器68の分解切断斜視図であり、図15は同容器の断面図であるが分かりやすいようにサンプル注入口66の部分で切断した様子を示している。

【0077】

図14に示すように基板61の一面にキャビティ62が形成されており、流路溝63は基板61の他面側にキャビティ62の側面に沿うように設けられている。さらに、サンプル注入口66の形成された第一の蓋板64と、熱媒体の流入口（図示せず）および排出口67が形成された第二の蓋板65が基板61の両面に接合されている。これによって、本実施の形態3のように基板61の一面側と他面側にサンプル溶液の入るキャビティ62と熱媒体の流れる流路溝63を分離していることで、これらサンプル溶液・熱媒体が混ざることが全くなくなる。

10

【0078】

これはたとえば実施の形態1のようにキャビティ2と流路溝3を隔てる材料として蓋板12を接合・接着して用いるとともに熱媒体をHe、N<sub>2</sub>などのガス状流体にした場合において、わずかな穴が存在しただけでもキャビティ2側に漏れることが心配されるが、本実施の形態3では完全に分離されているのでそのようなことが起こらない。

【0079】

さらに、本実施の形態3の別の構成について述べる。図16は本発明のポリメラーゼ連鎖反応容器78の分解切断斜視図であり、図17は同容器の断面図であるが、わかりやすいようにサンプル注入口76の部分で切断した様子を示している。図16に示すように基板71の一面にキャビティ72が形成されており、流路溝73は基板71の他面側に形成されており、キャビティ72の底面に沿うように設けられている。

20

【0080】

さらに上記と同様にサンプル注入口76の形成された第一の蓋板74と、熱媒体の流入口（図示せず）および排出口77が形成された第二の蓋板75が基板71の両面に接合されている。

【0081】

これによって、キャビティ72側のサンプル溶液と流路溝73が完全に分離されている前述の効果に加えて、キャビティ72の面積が大きい場合でも、キャビティ72の底面側に流路溝73を設けることにより大きな面積の流路溝73とすることができ、流路溝73の熱媒体からキャビティ72のサンプル溶液へ温度の上昇・下降がより確実に行えるようになる。

30

【0082】

さらに本実施の形態3の別の構成について述べる。図18は本発明のポリメラーゼ連鎖反応容器88の分解切断斜視図であり、図19は断面図であるが、わかりやすいようにサンプル注入口86の部分で切断した様子を示している。図18のように基板81の一面にキャビティ82が形成されており、流路溝83は基板81の他面側に形成されており、キャビティ82の底面と側面に沿うように設けられている。

【0083】

さらに、上記と同様にサンプル注入口86の形成された第一の蓋板84と熱媒体の流入口（図示せず）および排出口87が形成された第二の蓋板85が基板81の両面に接合されている。この例では、キャビティ82側のサンプル溶液と流路溝83が完全に分離されている前述の効果に加えて、キャビティ82の面積が大きい場合でも、キャビティ82の側面と底面側に流路溝83を設けるので、より大きな面積でキャビティ82を取り囲む流路溝83とすることができるので、熱媒体との熱伝導をさらに効率よく行える。

40

【0084】

次に本実施の形態3のポリメラーゼ連鎖反応容器68、78、88を製造するための手順を図面を用いて説明する。図20～図22はポリメラーゼ連鎖反応容器68の製造工程を説明する断面図であり、図23～図24はポリメラーゼ連鎖反応容器78の製造工程を説

50

明する断面図であり、図 2 5 ~ 図 2 6 はポリメラーゼ連鎖反応容器 8 8 の製造工程を説明する断面図である。

【 0 0 8 5 】

まず図 2 0 に示すように、シリコンからなる基板 6 1 の一面側にキャビティ 6 2 を形成する。これを形成する手段は実施の形態 1 と同様、レジストマスク 6 9 をフォトリソグラフィにより形成後、エッチングを促進するガスと抑制するガスの 2 種類を用いるドライエッチングによって行うのが適当である。

【 0 0 8 6 】

次に図 2 1 に示すように、基板 6 1 の他面側から流路溝 6 3 をキャビティ 6 2 の側面に沿うようにレジストマスク 7 0 をフォトリソグラフィによって形成後、ドライエッチングによって形成する。このとき、基板 6 1 を貫通してしまわないよう適当な深さでエッチングを止めることが必要である。

【 0 0 8 7 】

次に図 2 2 に示すように、実施の形態 1 と同様、ガラスよりなる第一の蓋板 6 4、第二の蓋板 6 5 にサンプル注入口 6 6、熱媒体の流入口、排出口 6 7 をサンドブラストにより形成した後、シリコン基板 6 1 と接合してポリメラーゼ連鎖反応容器 6 8 を得る。ここでサンプル注入口 6 6、熱媒体の流入口、排出口 6 7 をサンドブラストによって形成することにより、実施の形態 1 と同様、これらの形状はすり鉢状となることで溶液、熱媒体の注入が行いやすくなる。

【 0 0 8 8 】

また、図 2 3 に示すように、キャビティ 7 2 が形成された基板 7 1 に、キャビティ 7 2 の底面に沿うように流路溝 7 3 をエッチングする場合にはレジストマスク 8 0 をフォトリソグラフィによって形成後、ドライエッチングによって形成する。このときキャビティ 7 2 側に貫通しないように十分注意が必要である。

【 0 0 8 9 】

次に図 2 4 に示すように、図 2 2 と同様にガラスよりなる第一の蓋板 7 4 にサンプル注入口 7 6、第二の蓋板 7 5 に熱媒体の流入口、排出口 7 7 をサンドブラストにより形成した後、基板 7 1 と接合してポリメラーゼ連鎖反応容器 7 8 を得る。ここでサンプル注入口 7 6、熱媒体の流入口、排出口 7 7 をサンドブラストによって形成することにより、実施の形態 1 と同様、これらの形状はすり鉢状となることで、溶液、熱媒体の注入が行いやすくなる。

【 0 0 9 0 】

さらに、図 2 5 に示すように、キャビティ 8 2 の側面と底面に沿うように流路溝 8 3 を設ける場合には、図 2 3 のように底面に沿うように流路溝 7 3 を設けた後、図 2 5 のようにキャビティ 8 2 の底面にレジストマスク 9 0 をフォトリソグラフィにより形成後、キャビティ 8 2 の側面に沿うようにエッチングを行うことにより、目的の流路溝 8 3 を形成することができる。

【 0 0 9 1 】

次に、図 2 6 に示すように、実施の形態 1 と同様、ガラスよりなる第一の蓋板 8 4 にサンプル注入口 8 6、第二の蓋板 8 5 に熱媒体の流入口、排出口 8 7 をサンドブラストにより形成した後、シリコン基板 8 1 と接合してポリメラーゼ連鎖反応容器 8 8 を得る。ここでサンドブラストによる形成により、実施の形態 1 と同様、これらの形状はすり鉢状となることで、溶液、熱媒体の注入が行いやすくなる。

【 0 0 9 2 】

また、実施の形態 2 でも説明したように、本実施の形態 3 において、基板 6 1、7 1、8 1 にシリコンと二酸化シリコンまたはこれを含むガラス基板からなる複合多層基板とした場合には、特にキャビティの底面に流路溝 6 3、7 3、8 3 を設ける場合に有効である。図 2 7 および図 2 8 はこの場合の複合多層基板 9 1 の斜視図であり、図 2 7 はキャビティ 9 5 側を上にした場合の斜視図、図 2 8 は流路溝 9 7 を上にした場合の斜視図である。

【 0 0 9 3 】

つまり、図 27 および図 28 に示すように、流路溝 97 はキャビティ 95 の底面に二酸化シリコンよりなる隔壁 96 のみによって隔てられている。このことにより、キャビティ 95、流路溝 97 の深さを正確にエッチングできるようになることに加えて、あらかじめ埋め込まれた二酸化シリコン層 93 によってキャビティ 95 と流路溝 97 が隔てられるので、より正確な隔壁 96 の厚さとすることができる。

【0094】

また、この二酸化シリコン層 93 の厚みは 1  $\mu\text{m}$  程度と極めて薄いものから 100  $\mu\text{m}$  以上のものまで幅広く決めることができるので、特に、二酸化シリコンはシリコンに比べて熱伝導度が悪いがシリコンで隔壁を形成するよりも 10  $\mu\text{m}$  以下とより薄い隔壁 96 にすることができるので、熱効率は良くなるという利点を有する。

10

【0095】

図 29、図 30 はこのポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法を示す断面図を示している。まず、図 29 に示すように基板 91 はシリコン層 92、94 と二酸化シリコン層 93 からなる複合多層基板であり、この基板 91 の一面、他面側にそれぞれレジストマスク 98、99 をフォトリソグラフィにより形成後、実施の形態 1 と同様のエッチングを行うと、エッチングは二酸化シリコン層 93 で急に遅くなるので、正確にキャビティ 95、流路溝 97 を形成することができる。

【0096】

また、キャビティ 95 と流路溝 97 を隔てる隔壁 96 は 10  $\mu\text{m}$  以下と極めて薄い二酸化シリコン層 93 のみとすることができる。

20

【0097】

次に、図 30 に示すように、第一の蓋板 100、第二の蓋板 101 を接合してポリメラーゼ連鎖反応容器を得る。

【0098】

(実施の形態 4)

以下、本発明の実施の形態 4 および図 31 ~ 図 35 により請求項 9、20、21、22 に記載の発明を説明する。図 31 は本実施の形態 4 におけるポリメラーゼ連鎖反応容器の断面図である。図 31 に示すように、キャビティ 108 の内壁は二酸化シリコン 109 のみで構成されており、キャビティ 108 内部と流路溝 110 を隔てる隔壁 102 の材料は二酸化シリコンのみである。このように隔壁 102 を薄くすることにより、キャビティ 108 の内部のサンプル温度の上昇・下降を流路溝 110 に循環させる熱媒体によって高速・均一に制御できる。

30

【0099】

次に本実施の形態 4 のポリメラーゼ連鎖反応容器の製造方法について図面を用いて説明する。

【0100】

図 32 ~ 図 35 は本実施の形態 4 の同容器の製造方法を示す断面図である。まず図 32 に示すように、シリコンよりなる基板 105 にドライエッチングによりキャビティ 108 を形成する。このときのドライエッチングの方法はこれまでの方法と同じである。

【0101】

次に図 33 に示すように熱酸化法によって基板 105 の表面に二酸化シリコン層 109 を全面に形成する。このときの二酸化シリコン層 109 の厚みは最終的に隔壁 102 の厚みとなるので、必要とする隔壁 102 の厚みになるまで熱酸化処理を行う。また隔壁 102 として機能するためには穴（ピンホール）がないようにする必要があり、例えば、2  $\mu\text{m}$  以上の厚みにすれば穴（ピンホール）はほとんどなくすることができる。

40

【0102】

次に図 34 に示すように、基板 105 の他面側からレジストマスク 111 を形成した後、基板 105 の表面に形成された二酸化シリコン層 109 をエッチングする。ここで、レジストマスク 111 はキャビティ 108 の底面より大きな開口を持つようにパターンニングした方が望ましい。この理由はあとにも述べるが、キャビティ 108 の側面にも流路溝 11

50

0を効率よく形成するためである。

【0103】

次に図35に示すように基板105を他面側からエッチングする。基板105のエッチングが進むと、先にキャビティ108の底面に到達するが、底面つまり隔壁102は二酸化シリコンで構成されているのでエッチングされない。また先のレジストマスク111をキャビティ108の底面より大きな開口を持つようにパターニングしていることによりキャビティ108の側面の基板105もエッチングされ、結果として二酸化シリコンの隔壁102で構成されたキャビティ108が残る。

【0104】

なお、図35のようにキャビティ108の上部において、補強のために若干のシリコン109を残しておいても本発明の効果にはさほど影響しない。 10

【0105】

このように、キャビティ108が二酸化シリコンのみでできており、さらにこの二酸化シリコンは熱酸化法によって形成したため均一な厚みを持っており、極めて薄い厚みにすることもできるので流路溝110を循環する熱媒体によってキャビティ108内のサンプル溶液の温度上昇・下降が極めて効率よく行えるようになる。

【0106】

また、キャビティ108の内壁つまり隔壁102の材料としては二酸化シリコンの他に窒化シリコン、ニッケル、クロム、金、白金などを用いることができる。これらの材料の場合には熱酸化法で二酸化シリコンを形成する代わりにキャビティ108を形成後、キャビティ108の内壁にスパッタ、真空蒸着、CVD、メッキなど通常の薄膜形成方法によって、これらの材料を形成することができる。 20

【0107】

特に金、白金などの金属の場合はシリコン、二酸化シリコンより熱伝導率が高いので、より高速の温度上昇・下降が実現できるポリメラーゼ連鎖反応容器を得ることができる。

【0108】

(実施の形態5)

以下、本発明の実施の形態5および図36～図39により請求項13に記載の発明を説明する。図36は本実施の形態5におけるポリメラーゼ連鎖反応容器の分解斜視図である。この構成においても実施の形態1と同様、基板115の一面にはキャビティ116及び流路溝117が設けられている。 30

【0109】

そして、実施の形態1と違う点はサンプル注入口121と熱媒体の流入口120、排出口119が側面に設けられている点である。すなわち、基板115に形成されたキャビティ116は側面側にまでつながっており、側面でサンプル注入口121となる。また流路溝117は側面側につながることで、側面で熱媒体流入口120および排出口119となる。そして、この基板115の一面側には蓋板122が接合されることによりキャビティ116、流路溝117は外部より封止され、外部との導通はサンプル注入口121と熱媒体の流入口120および排出口119のみを通して行われる。なお、サンプル注入口121の数は両側面に2個ある方がサンプル注入の際に空気の逃げができるので、よりサンプル溶液を注入しやすい。またサンプル注入口を1個にする場合には遠心分離器などを使うことにより、サンプル溶液の注入は行うことができる。 40

【0110】

このポリメラーゼ連鎖反応容器を用いる場合に側面よりサンプル溶液の注入、熱媒体の流入・排出を行う必要があるが、蓋板122にサンプル注入口121、熱媒体の流入口120、排出口119を設けなくて良いので、キャビティ116、流路溝117をより高密度に配置できる上、蓋板122に加工を施さなくても良いという製造上の利点も有する。

【0111】

また、基板115、蓋板122の材料は実施の形態1と同様の材料で構成することができるが、基板115をシリコン、蓋板122をガラスとする組み合わせは最も優れている組み合 50

わせの一つである。

【0112】

次に、本発明の実施の形態5によるポリメラーゼ連鎖反応容器を製造するための手順を説明する。図37と図39は横の側面から見た断面図の様子であり、図38はこれとは垂直な側面からみた様子である。実施の形態1と製造上で違う点は蓋板122に穴をあけるなどの加工を施さずに基板115に接合する点であり、図37のようにレジストマスク123を形成してシリコン基板115にキャビティ116、流路溝117を設け、次に図38のように基板115の端にサンプル注入口121、流入口120、排出口119が位置するように設けておく。サンプル注入口121、キャビティ116、流路溝117を設けた後は図39のように蓋板122を接合する。

10

【0113】

このようにして、側面にサンプル注入口121、流入口120、排出口119が設けられる。このとき、シリコンよりなる基板115とガラスよりなる蓋板122を接合する方法は実施の形態1と同様に直接接合、陽極接合、接着剤などを用いることができる。

【0114】

さらに、複数のポリメラーゼ連鎖反応容器を作成する場合にはウエハー状態で基板115と蓋板122を接合した後、所定の位置をダイシングによって切り出して別個のポリメラーゼ連鎖反応容器とすることで、側面に熱媒体の流入口120、排出口119が設けられる。

【0115】

なお、この実施の形態5で述べた方法は実施の形態2、3、4においても同様の構成とすることができるのは明らかである。

20

【0116】

【発明の効果】

以上説明したように本発明はポリメラーゼ連鎖反応を実施するための容器であって、基板上にキャビティが形成された同一面内に一つ以上の流路溝を有し、この流路溝は前記キャビティの一部の側面に沿った隔壁によって隔てて設けられており、前記流路溝には外部に開口した熱媒体の流入口と排出口がそれぞれ一つ以上連結されたポリメラーゼ連鎖反応容器とその製造方法を提供することができる。

【0117】

これにより、微量のサンプルでも容器内に満たすことができるとともに、サンプルに対して温度の上昇・下降制御を高速に行うことができるためにポリメラーゼ連鎖反応を高速化することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施の形態1におけるポリメラーゼ連鎖反応容器の分解斜視図

【図2】同分解斜視図

【図3】同ポリメラーゼ連鎖反応容器の一部の斜視図

【図4】同ポリメラーゼ連鎖反応容器の一部の斜視図

【図5】同製造工程を示す断面図

【図6】同製造工程を示す断面図

40

【図7】同製造工程を示す断面図

【図8】同製造工程を示す断面図

【図9】同製造工程を示す断面図

【図10】本発明の実施の形態2における同容器の一部の分解斜視図

【図11】同容器の一部の断面図

【図12】同製造工程を示す断面図

【図13】同製造工程を示す断面図

【図14】本発明の実施の形態3における同容器の分解斜視図

【図15】同容器の断面図

【図16】同容器の切断分解斜視図

50

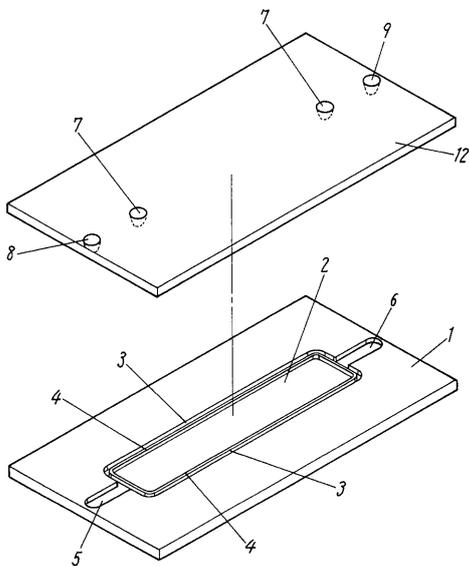
【図 1 7】同容器の断面図	
【図 1 8】同容器の切断分解斜視図	
【図 1 9】同容器の断面図	
【図 2 0】同容器の製造工程を示す断面図	
【図 2 1】同製造工程を示す断面図	
【図 2 2】同製造工程を示す断面図	
【図 2 3】同製造工程を示す断面図	
【図 2 4】同製造工程を示す断面図	
【図 2 5】同製造工程を示す断面図	
【図 2 6】同製造工程を示す断面図	10
【図 2 7】同容器の一部の斜視図	
【図 2 8】同容器の一部の斜視図	
【図 2 9】同容器の製造工程を示す断面図	
【図 3 0】同製造工程を示す断面図	
【図 3 1】本発明の実施の形態 4 における同容器の製造工程を示す断面図	
【図 3 2】同製造工程を示す断面図	
【図 3 3】同製造工程を示す断面図	
【図 3 4】同製造工程を示す断面図	
【図 3 5】同製造工程を示す断面図	
【図 3 6】本発明の実施の形態 5 における同容器の分解斜視図	20
【図 3 7】同容器の製造工程を示す断面図	
【図 3 8】同製造工程を示す側面図	
【図 3 9】同製造工程を示す断面図	
【符号の説明】	
1 基板	
2 キャビティ	
3 流路溝	
4 隔壁	
5 流入溝	
6 排出溝	30
7 サンプル注入口	
8 流入口	
9 排出口	
10 ポリメラーゼ連鎖反応容器	
12 蓋板	
21 レジストマスク	
22 レジストマスク	
31 アタッチメントプレート	
32 蓋シート	
33 供給口	40
34 排出口	
37 外部流入口	
38 外部排出口	
44 基板	
45 キャビティ	
46 流路溝	
51 基板	
52 シリコン	
53 二酸化シリコン	
54 シリコン	50

5 5	キャビティ	
5 6	ポリメラーゼ連鎖反応容器	
5 7	流路溝	
5 8	蓋板	
5 9	サンプル注入口	
6 0	レジストマスク	
6 1	基板	
6 2	キャビティ	
6 3	流路溝	
6 4	第一の蓋板	10
6 5	第二の蓋板	
6 6	サンプル注入口	
6 7	排出口	
6 8	ポリメラーゼ連鎖反応容器	
6 9	レジストマスク	
7 0	レジストマスク	
7 1	基板	
7 2	キャビティ	
7 3	流路溝	
7 4	第一の蓋板	20
7 5	第二の蓋板	
7 6	サンプル注入口	
7 7	排出口	
7 8	ポリメラーゼ連鎖反応容器	
7 9	レジストマスク	
8 0	レジストマスク	
8 1	基板	
8 2	キャビティ	
8 3	流路溝	
8 4	第一の蓋板	30
8 5	第二の蓋板	
8 6	サンプル注入口	
8 7	排出口	
8 8	ポリメラーゼ連鎖反応容器	
8 9	レジストマスク	
9 0	レジストマスク	
9 1	基板	
9 2	シリコン	
9 3	二酸化シリコン	
9 4	シリコン	40
9 5	キャビティ	
9 6	隔壁	
9 7	流路溝	
9 8	レジストマスク	
9 9	レジストマスク	
1 0 0	第一の蓋板	
1 0 1	第二の蓋板	
1 0 2	隔壁	
1 0 3	サンプル注入口	
1 0 4	流入口	50

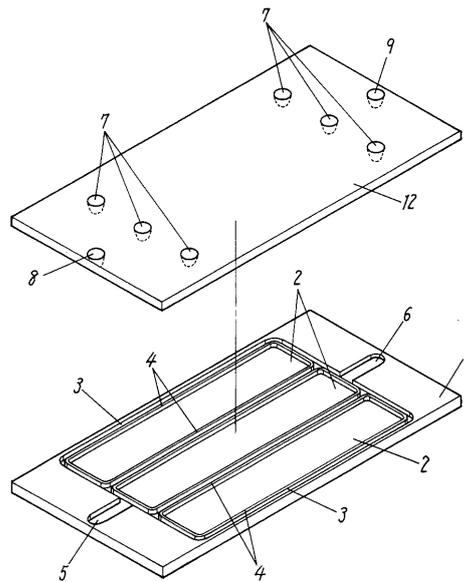
- 105 基板
- 106 第一の蓋板
- 107 第二の蓋板
- 108 キャビティ
- 109 二酸化シリコン
- 110 流路溝
- 111 レジストマスク
- 115 基板
- 116 キャビティ
- 117 流路溝
- 119 排出口
- 120 流入口
- 121 サンプル注入口
- 122 蓋板
- 123 レジストマスク

【図1】

- |         |           |
|---------|-----------|
| 1 基板    | 6 排出溝     |
| 2 キャビティ | 7 サンプル注入口 |
| 3 流路溝   | 8 流入口     |
| 4 隔壁    | 9 排出口     |
| 5 流入溝   | 12 蓋板     |

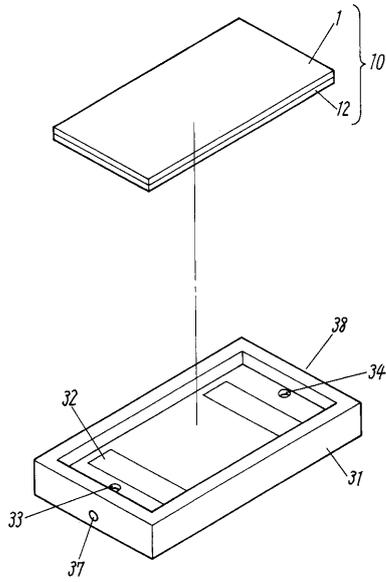


【図2】

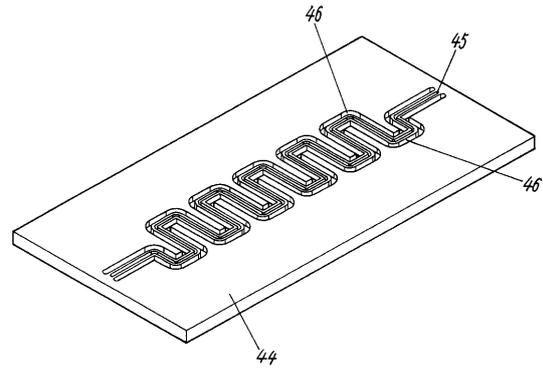


【 図 3 】

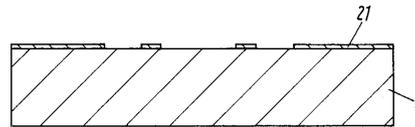
- 31 アタッチメントプレート    34 排出口
- 32 蓋シート                    37 外部流入口
- 33 供給口                        38 外部排出口



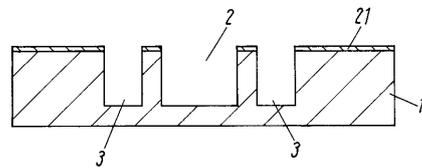
【 図 4 】



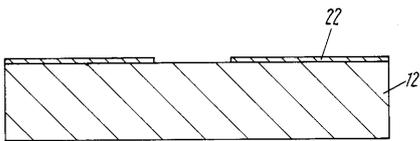
【 図 5 】



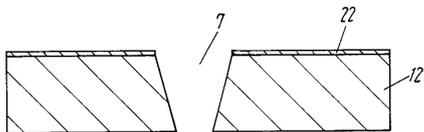
【 図 6 】



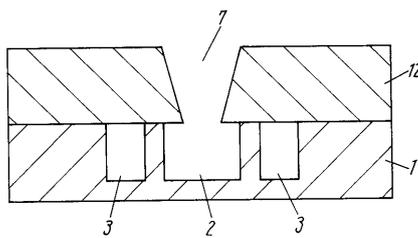
【 図 7 】



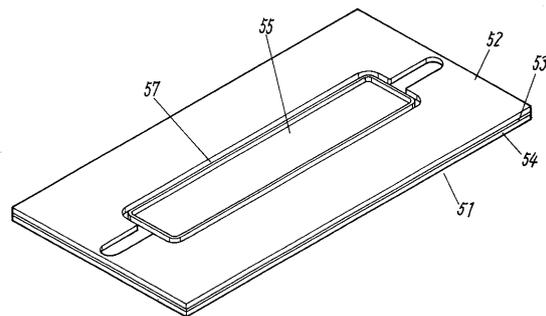
【 図 8 】



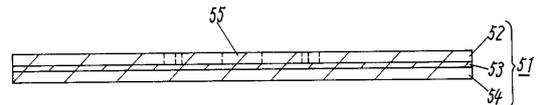
【 図 9 】



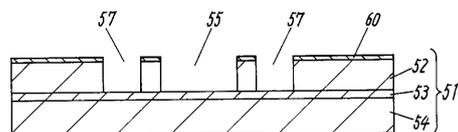
【 図 10 】



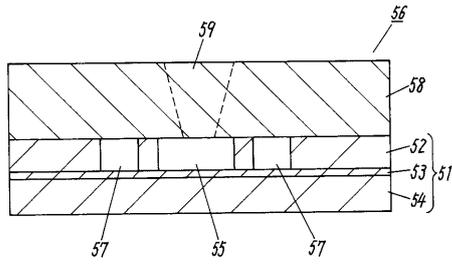
【 図 11 】



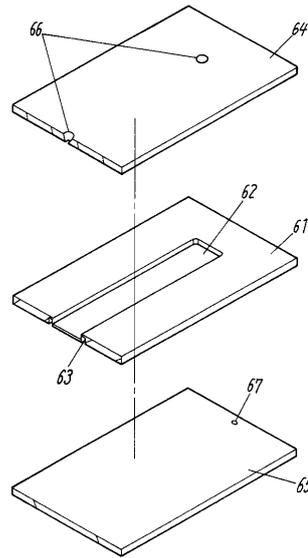
【 図 12 】



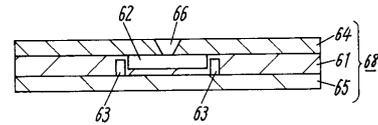
【 図 1 3 】



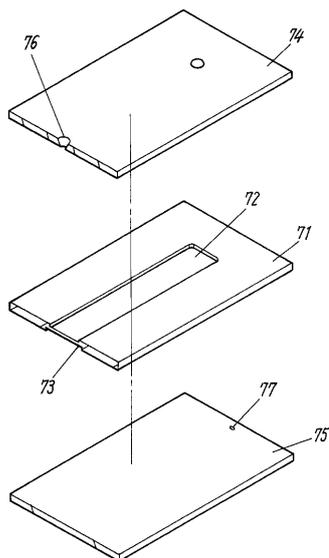
【 図 1 4 】



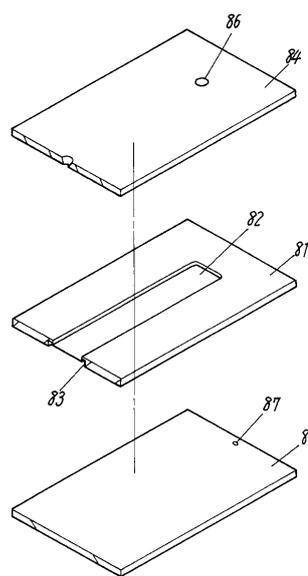
【 図 1 5 】



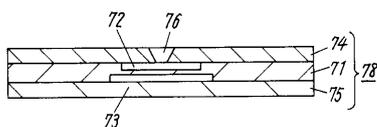
【 図 1 6 】



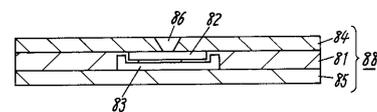
【 図 1 8 】



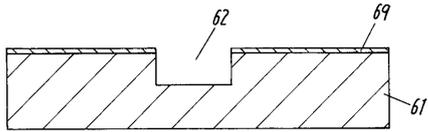
【 図 1 7 】



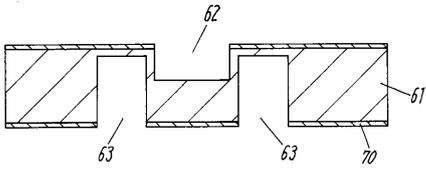
【 図 1 9 】



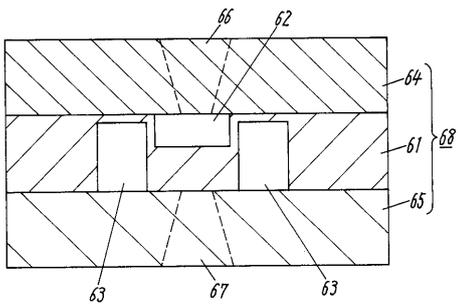
【 図 2 0 】



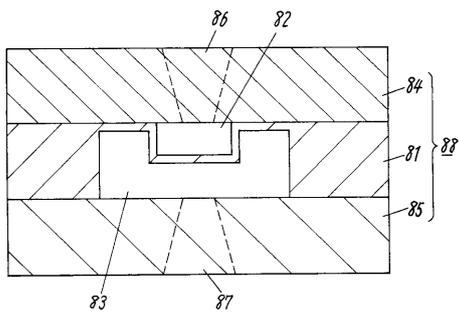
【 図 2 1 】



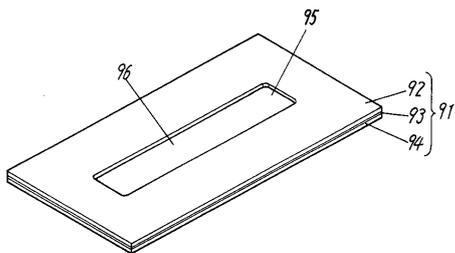
【 図 2 2 】



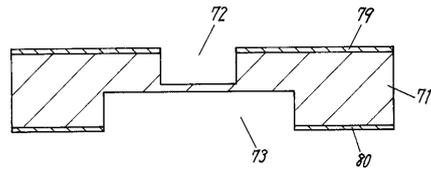
【 図 2 6 】



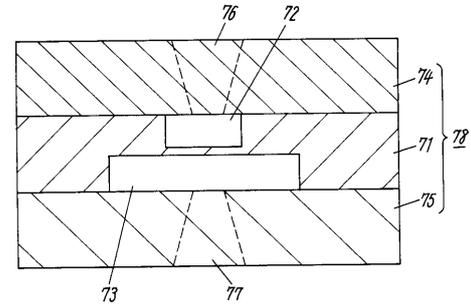
【 図 2 7 】



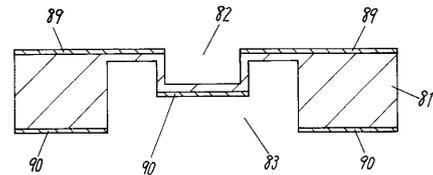
【 図 2 3 】



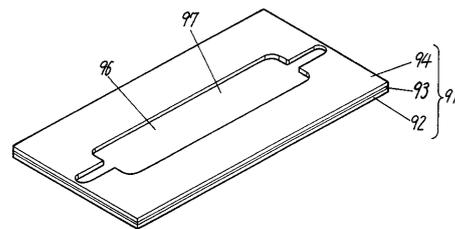
【 図 2 4 】



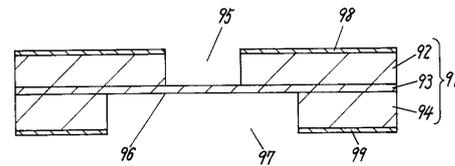
【 図 2 5 】



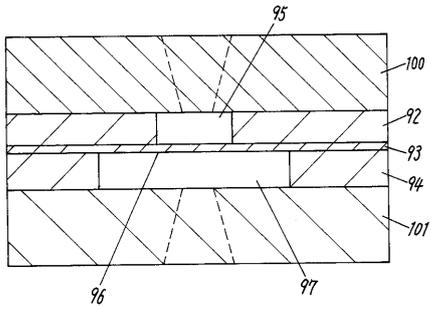
【 図 2 8 】



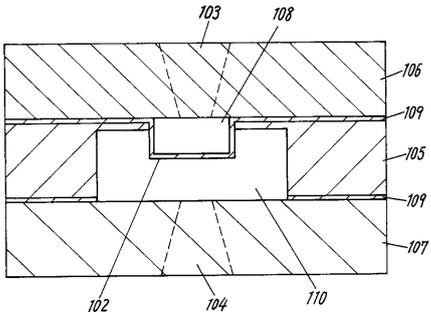
【 図 2 9 】



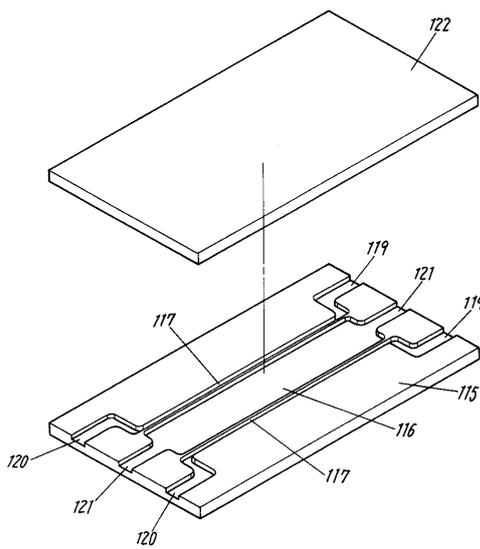
【 図 3 0 】



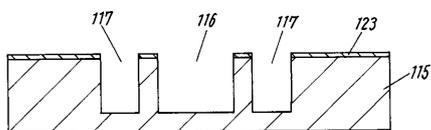
【 図 3 1 】



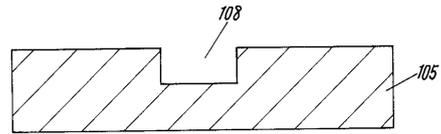
【 図 3 6 】



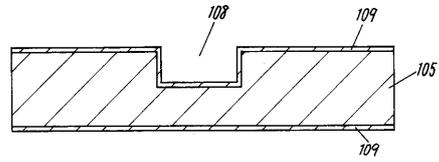
【 図 3 7 】



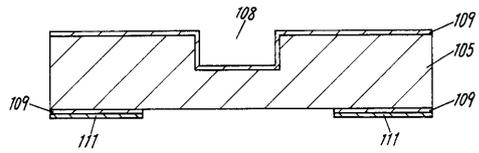
【 図 3 2 】



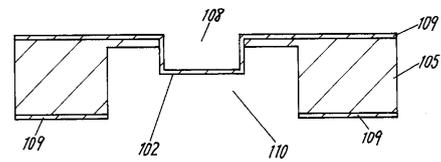
【 図 3 3 】



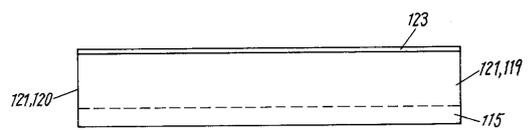
【 図 3 4 】



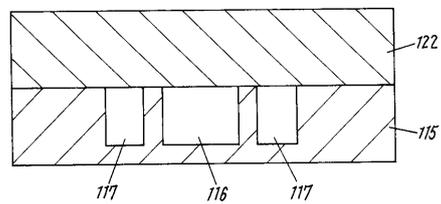
【 図 3 5 】



【 図 3 8 】



【 図 3 9 】



---

フロントページの続き

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特開2001-149059(JP,A)  
米国特許第5455175(US,A)  
米国特許第5939312(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-3/10

C12N 15/00-90

C12N 1/00-9/99

C12Q 1/00-70

G01N 33/00-98

PubMed、MEDLINE(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)