



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410092584.6

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 1297651C

[22] 申请日 2004.11.16

[21] 申请号 200410092584.6

[30] 优先权

[32] 2003.11.17 [33] JP [31] 2003-386614

[73] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 中谷将也 行政哲男

[56] 参考文献

CN1368555A 2002.9.11 C12Q 1/68

JP2002207031A 2002.7.26 C12M 1/00

JP2003083965A 2003.3.19 C12M 1/00

CN1394963A 2003.2.5 C12Q 1/68

审查员 孔佳音

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司
代理人 汪惠民

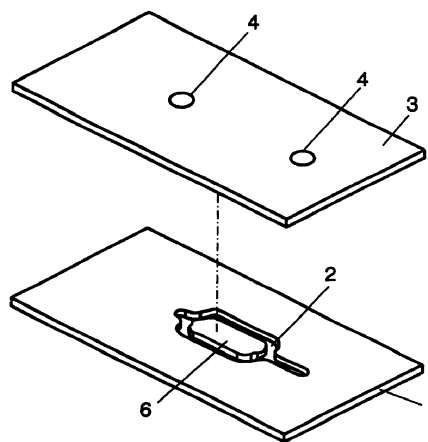
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 7 页

[54] 发明名称

核酸扩增反应器及其制造方法

[57] 摘要

本发明提供一种核酸扩增反应器，其特征在于，具备基板(1)、形成在基板(1)内的腔室(2)、用于密封腔室(2)的盖板(3)、形成在盖板(3)上的样品注入孔(4)，在腔室(2)内具有连接在盖板(3)或基板(1)上的柱状构造体(6)。使用本发明的核酸扩增反应器，可以高速进行样品液的温度上升、下降。



1、一种用于核酸扩增的反应器，其特征在于，具有形成了可收容样品的腔室的基板和形成有通向所述腔室的样品注入孔且覆盖所述腔室并与所述基板接合的盖板，

在所述腔室中具有仅露出侧表面、并且与所述盖板或者所述基板形成一体结构的柱状构造体。

2、根据权利要求1所述的反应器，其特征在于，所述柱状构造体的断面形状是圆形、椭圆形或弯曲形中的任意一种。

3、根据权利要求1所述的反应器，其特征在于，所述腔室内有多个所述柱状构造体。

4、根据权利要求1所述的反应器，其特征在于，所述柱状构造体是通过直接接合法与所述盖板或者所述基板相接合。

5、根据权利要求1所述的反应器，其特征在于，所述基板的材料是硅，所述盖板的材料是玻璃。

6、根据权利要求1所述的反应器，其特征在于，所述腔室是弯曲形或者漩涡形的沟槽。

7、一种制造权利要求1所述的用于核酸扩增的反应器的方法，其特征在于，具有：

在基板上形成腔室和柱状构造体的基板加工工序、

在盖板的规定位置上形成通孔的盖板形成工序、

以所述通孔和所述腔室互相重叠的方式使所述基板和所述盖板密接的工序、

采用阳极接合法或直接接合法中任何一种方法对密接后的所述盖板与所述基板进行接合的工序。

8、根据权利要求7所述的核酸扩增反应器的制造方法，其特征在于，是在所述盖板上具有所述柱状构造体的反应器的制造方法，

所述基板加工工序是在基板上形成腔室的工序，

所述盖板形成工序还包括所述柱状构造体的形成工序，

所述密接工序中包括使所述腔室的位置和所述柱状构造体的位置匹配的操作。

9、根据权利要求7所述的核酸扩增反应器的制造方法，其特征在于，所述基板加工工序是形成弯曲形或者漩涡形的腔室的工序。

核酸扩增反应器及其制造方法

技术领域

本发明涉及一种在利用聚合酶链反应的核酸扩增中所使用的核酸扩增反应器及其制造方法。

背景技术

近年来,有关基因信息的技术正在不断被开发出来。特别是通过对医疗领域中的有关疾病的基因进行分析,可以进行分子水平的疾病治疗。另外,可以通过基因诊断进行对患者个人的量体裁衣式治疗。而且,在制药领域中使用基因信息来特定抗体或激素等蛋白质分子而作为药品利用。

另外,在农业或食品等领域中制造出许多利用基因信息的产品。

在有关这种基因信息的技术中,作为最重要的方法之一有核酸的扩增反应。其中,聚合酶链反应是只在基因的某个特定部分进行大量扩增的技术,除了分子生物学等研究用途之外,还被广泛应用到医疗微生物学、遗传疾病的临床诊断、法医学等领域。特别是临床基因诊断技术,有望可以进行更快速的分析,即使在聚合酶链反应法中也要求研发高速化技术。

这种聚合酶链反应法包括下述的三道工序。

- (1) 热变性工序是把双链 DNA 解离成单链的工序。
- (2) 退火工序是接合引物的工序。
- (3) 延伸反应工序是通过聚合酶延长 DNA 的工序。

通常情况下,把上述 3 个阶段的工序作为 1 个循环,重复实施这些工序 30~35 个循环。特开昭 62-000281 号公报中公开这些工序的处理条件分别是(1)热变性工序:94℃×1 分钟,(2)退火工序:50~60℃×1 分钟,(3)延伸反应工序:72℃×1~5 分钟。

另外,特开 2002-207031 号公报提出作为用于进行聚合酶链反应的容器或芯片使用下述的构件。例如,在上侧基材上形成用于配置毛细管的

沟槽，在该上侧基材和下侧基材之间重叠放置毛细管并进行接合，由此可以把已有想要扩增的核酸的样品放置到毛细管中，通过对该毛细管进行温度控制，可以使样品中的核酸扩增。

而且，对可以使上述聚合酶链反应高速化的装置的研发也在进行中。例如，罗士（Loche）公司制的轻循环控制装置（LightCycler）使用热风作为热源，通过向玻璃毛细管的容器中提供样品而尝试高速化。另外，Cepheid公司制的智能循环控制装置（SmartCycler）（R）使用管壁较薄的专用聚丙烯制试管，进行聚合酶链反应的高速化。

但是，在聚合酶链反应中，40℃左右的温度变化也需要重复30次以上。在以往的进行聚合酶链反应的装置中，在向聚丙烯制试管中提供样品的同时使用铝块使温度升高，为了完成聚合酶链反应需要数小时以上的处理时间。

另外，特开2002-207031号公报所公开的方法是通过把毛细管封闭在上下基材内而有望在某种程度上改善热传导性。但是，当单独构成毛细管、上侧基材、下侧基材之后，采用粘结技术以接合它们。此时，对于上下基材和毛细管之间的热传导性，形成粘结材料等构成热阻挡层，有可能妨碍迅速的温度上升、下降。

另外，可以通过使用把热风作为热源的装置而实现高速化，但即使这样仍需要数十分钟以上的处理时间。

而且，以前的技术都使用毛细管等专用容器来谋求高速化。因此，例如用于从血液中抽取DNA的聚合酶链反应的前处理必须成为分批处理，缺点是样品的处理非常繁琐。

发明内容

本发明的核酸扩增反应器是具备基板、形成在该基板内的腔室、用于密封该腔室的盖板、形成在该盖板上的样品注入孔的容器，其特征在于，在所述腔室中具有仅露出侧表面、并且与所述盖板或者所述基板形成一体结构的柱状构造体。当从构成核酸扩增反应器的盖板以及基板中任意一方或者它们两者进行加热、冷却时，因为具有柱状构造体而促进热传递，可以高速改变腔室内含有核酸的溶液的温度。其结果是能确实可靠地进行高

速聚合酶链反应的核酸扩增反应器可以得到实现。

本发明的核酸扩增反应器是腔室的形状为弯曲形或漩涡形的反应器。通过腔室的形状为这些形状之一，相对于腔室的体积，腔室的表面积增大，所以可以有效进行和基板的热交换。

本发明的上述核酸扩增反应器的制造方法是在腔室内设置与盖板或基板一体化的柱状构造体的反应容器的制造方法，是采用阳极接合法或直接接合法中的任意一种方法进行盖板和基板之间的接合的制造方法。该制造方法的特征在于，采用阳极接合法或直接接合法中的任意一种方法进行盖板和基板之间的接合，通过在盖板和基板之间的接合面上不存在这些材料之外的物质的接合方法而进行接合，可以实现热传导性良好、无需担心在核酸扩增反应器中使容器内剩余的成分会溶出的核酸扩增反应器。

本发明的核酸扩增反应容器的制造方法的特征在于，是腔室的形状为弯曲形或漩涡形的反应器的制造方法。通过采用阳极接合法或直接接合法中的任意一种方法进行盖板和基板之间的接合，通过在上述盖板和上述基板之间的接合面上不存在这些材料之外的物质的接合方法而进行接合。

本发明的核酸扩增反应器及其制造方法，通过实现可以高速加热、冷却的结构，可以高精度且高速地对样品中的 DNA 进行扩增。另外，可以提供样品处理容易且用于核酸扩增反应的芯片型核酸扩增反应容器及其制造方法。

附图说明：

图 1 是表示本发明的实施方式 1 中一例核酸扩增反应器的结构的立体图。

图 2 是表示实施方式 1 中核酸扩增反应器分解立体图。

图 3 是表示实施方式 1 中其它例核酸扩增反应器的结构的主要部分立体图。

图 4 是表示实施方式 1 中其它例核酸扩增反应器的结构的主要部分立体图。

图 5 是表示本发明的实施方式 2 中一例核酸扩增反应器的结构的主要部分立体图。

图 6 是表示实施方式 2 中其它例核酸扩增反应器的结构的主要部分立体图。

图 7~图 12 是对实施方式 2 中核酸扩增反应器的制造工序进行说明的剖面图。

图 13A、13B、13C、13D 是表示实施方式 2 的实验中试用的核酸扩增反应器的分解俯视图。

图 14 是表示使用实施方式 2 中的核酸扩增反应器的聚合酶链反应的特性比较图。

具体实施方式

本发明的核酸扩增反应器是用于核酸扩增的反应器，是具备基板、形成在该基板内的腔室、用于密封该腔室的盖板、形成在该盖板上的样品注入孔，且在腔室内设置连接在盖板或基板上的柱状结构体的反应器。关于用于利用聚合酶链反应的核酸扩增方法的核酸扩增反应容器，当从盖板、基板或者它们的两面进行加热、冷却时，热迅速传递至上述柱状构造体，所以可以高速改变腔室内含有核酸的溶液的温度，其结果是能够实现能确实可靠地进行高速聚合酶链反应的核酸扩增反应器。

本发明的核酸扩增反应器是柱状构造体的断面形状为圆形、椭圆形、弯曲形的核酸扩增反应器。可以通过选择这些形状进行有效的热交换，从而可以实现能进行高速聚合酶链反应的核酸扩增反应器。

本发明的核酸扩增反应器可以具有多个柱状构造体。通过具有多个柱状构造体，使能更有效地进行热交换的核酸扩增反应器得到实现。

本发明的核酸扩增反应器的柱状构造体与盖板或基板材料相同，是不存在其接合面的一体化构造体反应器。作为相同材料而不存在接合面，所以没有热交换的阻挡，所以能更高速地进行聚合酶链反应的核酸扩增反应器可以得到实现。

本发明的核酸扩增反应器是基板和柱状构造体直接接合的反应器。能进行生产率优良的高速聚合酶链反应的核酸扩增反应器可以得到实现。

本发明的核酸扩增反应器是盖和柱状构造体直接接合的反应器。能进行生产率优良的高速聚合酶链反应的核酸扩增反应器可以得到实现。

本发明的核酸扩增反应器是腔室形状为弯曲形或漩涡形的反应器。关于这些形状的腔室，可以说弯曲形或漩涡形的沟槽的壁自身是柱状构造体。通过使腔室形状为弯曲形或漩涡形，相对于腔室的体积，腔室的表面积增大，从而可以有效地进行和基板的热交换。

本发明的核酸扩增反应器是用玻璃制造盖板，基板为硅的反应容器。因基板为硅，可以成为具有较高热传递性的核酸扩增反应器。另外，通过用玻璃制造盖板，可以采用阳极接合、直接接合等接合方法与由硅构成的基板接合而制造。其结果使基板和盖板之间的热传递性变好，在聚合酶链反应过程中容器内没有多余的成分溶出的核酸扩增反应器可以较容易地得到实现。

本发明的核酸扩增反应器的制造方法是在把与盖板或基板一体化的柱状构造体设置于腔室内的反应器的制造中，采用阳极接合法或直接接合法中的任意一种方法进行盖板和基板之间的接合的制造方法。通过盖板和基板之间的接合面上不存在这些材料之外的物质的接合方法进行接合，可以实现热传递性良好并且不用担心在核酸扩增反应器中多余的成分在容器中溶出的核酸扩增反应器。

本发明的核酸扩增反应器的制造方法，是腔室的形状为弯曲形或涡旋形状的核酸扩增反应器的制造方法，其特征在于，采用阳极接合法或直接接合法中的一种方法进行盖板与基板之间的接合。从而可以通过在基板与盖板之间的接合面上不存在它们材料之外的材料的接合方法进行接合。

（实施方式1）

下面，使用实施方式1对本发明的核酸扩增反应器进行详细说明。

图1和图2是表示本发明的实施方式1中的一例核酸扩增反应器的构造的图。

本发明的实施方式1中的核酸扩增反应器具有用于在硅构成的基板1中存积样品液的腔室2，在该腔室2内设置有由硅构成的椭圆形柱状构造体6。

在该基板1以及柱状构造体6的上面接合由玻璃等构成的盖板3，从外部遮蔽腔室2。样品可以通过设置在盖板3上的样品注入孔4密封于腔室2内。这里，对于基板1和盖板3的接合不需使用粘合剂，由硅构成的

基板 1 和由玻璃构成的盖板 3 之间通过分子键进行接合。

这里，作为基板 1 和盖板 3 的材料，和样品液不发生反应的材料比较适合。例如，除了硅、玻璃之外，可以使用锗等半导体，石英，陶瓷，以及钛酸锂、铌酸锂等单晶体基板。当使用这些材料时，可以使用实施方式 2 中说明的接合技术。例如，可以使用作为分子键的直接接合或阳极接合的接合技术等。通过使用这些接合技术，可以对本发明的核酸扩增反应器进行有效加工。

在本发明的核酸扩增反应器中，柱状构造体 6 和基板 1 使用相同的材料，可以通过制成一个构造体而减少热传递的阻挡。

而且，盖板 3 和基板 1 通过分子键而直接接合，因不使用粘合剂等异种材料，所以在热传递中几乎不存在热阻挡，可以迅速进行热传递。

这里，作为柱状构造体 6 的形状，除了图 2 所示的椭圆形之外，还可以是圆形、弯曲形等形状。如果有多个柱状构造体 6，则进一步增大促进热传递的效果。例如，可以形成多个图 3 或图 4 所示的圆形柱状构造体 7 或弯曲形状的柱状构造体 8。通过形成这些柱状构造体 6、7、8，腔室 2 的容量体积以及壁的面积发生改变。特别是当这些因素对核酸的扩增反应产生影响时，除了温度的上升、特性下降之外，可以通过使容量体积、壁表面积、柱状构造体 6、7、8 的个数等最优化来控制规定的性能。

在实施方式 1 中，是把这些柱状构造体 6、7、8 和基板 1 或盖板 3 作为一个构造体进行说明的。针对此，可以分开制作这些柱状构造体 6、7、8 和基板 1 或盖板 3，然后使用直接接合技术且使用一体化的方法。通过这种制造方法，具有与实施方式 1 的反应器大致相同的热传递性的核酸扩增反应器可以得到实现。

（实施方式 2）

使用实施方式 2 对本发明的其它核酸扩增反应器进行说明。

图 5 是表示实施方式 2 中核酸扩增反应器的基板 9 的立体图。在由硅构成的基板 9 上形成漩涡形状的腔室 10，由此腔室 10 的隔壁与硅基板 9 一体化。即，腔室 10 是基板 9 或柱状构造体 91 围绕而成的形状。另外，通过使腔室 10 形成漩涡形，可以使腔室 10 集中在基板 9 内狭小的区域内而形成。因此，优点是可以在样品溶液和基板 9 之间迅速地进行热交换，

并设计成可具有高均热性。

图6是表示在由硅构成的基板11上形成弯曲形状的腔室12的其它例子。即，腔室12的形状是由基板11或者柱状构造体111围绕而形成。腔室12为弯曲形状的优点相同于刚才所述的漩涡形状时的优点。当进一步附加而作为弯曲形时，样品溶液流向基板11上的一个方向，所以可以在基板11的端部设置样品注入孔（未图示）。

对此，当为漩涡形状时，样品注入孔位于一端为涡形的中心。关于腔室形成漩涡形还形成弯曲形，可以根据样品或处理方案来确定。

接着，根据图7~图12对用于获得本发明的核酸扩增反应器的制造方法进行说明。

这里，把厚度为500 μm 的硅单晶板用作基板13，使用制作用于聚合酶链反应的核酸扩增反应器的例子进行说明。

首先，准备表面进行了镜面处理的厚度为500 μm 的硅构成的基板13和厚度为400 μm 的玻璃构成的盖板16。如图7所示，在由硅构成的基板13上按规定的图形形成抗蚀剂掩模14，然后如图8所示，采用使用了 SF_6 的干式蚀刻法以形成腔室15。作为该蚀刻的深度，根据需要的样品容量而发生变化，但优选150~400 μm 左右。然后，可以通过形成该腔室15而设置柱状构造体20。

这里，作为在由硅构成的基板13内形成腔室15的形成方法，如果基板13是硅等半导体，可以使用RIE等干式蚀刻法或使用了强碱性蚀刻液等的湿式蚀刻法。另一方面，如果基板13是玻璃，也可以使用利用氟酸的湿式蚀刻法。

特别是，如果把硅等半导体用于基板13，可以利用半导体领域中公知的微细加工技术，以良好的精度对微小腔室15以及高密度配置的柱状构造体20进行加工，所以优选。

接着，如图9所示，在成为盖板16的玻璃基板上形成抗蚀剂掩模17之后，如图10所示，采用喷砂法形成样品注入孔18而成为盖板16。此时，作为形成样品注入孔18的方法，除了喷砂法之外，也可以使用利用氟酸等的湿式蚀刻法，也可以使用利用 SF_6 气体、 CF_4 气体、 C_3F_8 气体、 C_4F_8 气体等的干式蚀刻法。

当选择样品注入孔 18 的形成方法时,可以根据样品注入孔 18 所要求的加工精度选择最佳方法。

接着,如图 11 所示,使用酸性洗涤剂清洗由硅构成的基板 13 和由玻璃构成的盖板 16 的表面,然后以相互之间不进入空气的方式进行密接。在密接状态下,300℃加热 3 小时,由此无需使用粘合剂而通过直接接合以接合基板 13 和盖板 16,得到如图所示的核酸扩增反应器 19。然后,必要时切成芯片状而得到小型核酸扩增反应器。

由此,通过使用直接接合技术,由硅构成的基板 13 和由玻璃构成的盖板 16 的接合面是分子间成键的牢固接合,由此在溶液能接触的位置不存在粘合剂等多余的成分,所以在聚合酶链反应过程中不必担心容器内有这些成分溶出。

其中,采用本实施方式 2 中说明的直接接合法,使密接时的加热温度为 300℃而加热 3 小时,但可以根据玻璃的材质改变加热时的温度。如果是含有钠、钾等的玻璃材料,则 250℃左右已经足够,如果是不含钠、钾等的玻璃材料,则温度需要升高至 400℃左右才能进行直接接合。另外,玻璃材质也可以是类似石英玻璃而不含杂质的材质,此时需要进一步使接合温度上升至 500℃以上。而且,也可以把硅用于盖板 16 的材料。此时,形成了腔室 15 的由硅构成的基板 13 和形成样品注入孔 18 且由硅构成的盖板 16 通过直接接合而进行贴合,由此而可以形成。此时的直接接合温度有必要为 500℃以上。

另外,作为除此之外可以形成分子键的接合方法,也可以使用在基板 13 和盖板 16 之间边施加电压边进行加热的阳极接合法、在真空中对基板 13 和盖板 16 进行等离子照射之后而接合的常温直接接合法等方法。

接着,使用实施方式 1 和实施方式 2 中说明的核酸扩增反应器对核酸扩增的步骤进行说明。

其中,这里对用于本发明的核酸扩增反应器的温度上升、下降的机构没有特别限制。可以使用利用铝块的以往的方式。或者,如同在以往技术一栏中所说明的,可以使用作为类似轻循环控制装置的热源而利用热风的方式、作为红外线放射源而利用钨丝灯的方式 (R. P. Oda et al., Infrared - Mediated Thermocycling for Ultrafast Polymerase Chain Reaction

Amplification of DNA、Analytical Chemistry、1998、70、4361—4368)、利用电磁感应加热的方式等。

试用于核酸扩增反应的容器的腔室形状如图 13A~13D 所示。

(比较例)腔室 201 为圆形且没有柱状构造体的以往的容器 13a 如图 13A 所示。

(实施例 1)腔室 202 内有椭圆形的柱状构造体 602 的反应器 13b 如图 13B 所示。

(实施例 2)腔室 203 内有多个弯曲形的柱状构造体 603 的反应器 13c 如图 13C 所示。

(实施例 3)腔室 204 内有多个圆形的柱状构造体 604 的反应器 13d 如图 13D 所示。

其中,在该比较实验中,作为用于聚合酶链反应的热循环控制装置使用 Roche 公司的轻循环控制装置。

作为使用本发明的核酸扩增反应器而扩增核酸的反应,使用聚合酶链反应。实施该聚合酶链反应的方案都是一般的方案,所以省略对其的详细说明。这里,对用于实施该聚合酶链反应的材料进行说明。

首先,作为使用的模板,使用 λ DNA (宾酒造制)(关于 λ DNA 的碱基序列,参照 Genbank 数据库的 Accession No. V00636, J02459, M17233, X00906)。另外,作为引物,使用 TaKaRa 聚合酶链反应扩增试剂盒(宾酒造制)的控制引物 1 (5' -GATGAGTTCGTGTCCGTACA ACTGG-3') 以及引物 3 (5' -GAATCACGGTATCCGGCTGCGCTGA-3') (扩增 300bp 用)。

另外,关于含有想要扩增的核酸的聚合酶链反应应用样品,在聚丙烯制试管中对 2.5U/ μ l 的 TaKaRa Z-Taq 0.5 μ l、10 \times Z-Taq 缓冲液 5 μ l、2.5mM 的各 dNTP 混合物 4 μ l、20pmol/ μ l 的引物 1 以及引物 3 各 2.25 μ l、0.25 μ g/ μ l 的牛血清白蛋白 2 μ l 进行混合之后,加入 10ng/ μ l 的 λ DNA 5 μ l,最后加入蒸馏水 29 μ l,采用吸移法缓慢混合而进行调制(总量 50 μ l)。

接着,将如上所述调制的聚合酶链反应应用样品分别注入比较例、实施例 1、2、3 的核酸扩增反应器 13a、13b、13c、13d 中。每个核酸扩增反应器都通过使用耐热带密封注入孔 4 而密封样品。由此,把密封了样品的

核酸扩增反应器设置在 Roche 公司制的轻循环控制装置，在初期变性反应为 98°C/1 秒、变性反应 98°C/1 秒、退火和延伸反应 66°C/4 秒的各反应条件下重复进行 30 个循环。总反应时间为 522 秒。

在实施该温度上升、下降循环之后，把核酸扩增反应器插入离心试管内，以 10krpm 的旋转数对各反应器进行离心分离处理 1 分钟，由此从核酸扩增反应器对用于聚合酶链反应的样品进行回收。

接着，使用 Agilent 技术公司制的 Agilent 2100 生物分析仪对回收的样品进行分析，对作为扩增目标的 300bp 的核酸进行定量。

核酸扩增反应的评价结果如图 14 所示。

由图 14 的结果可知，和比较例相比，实施例 1、2 和 3 中目标核酸的扩增产物都比较多。即，和使用没有柱状构造体的比较例的核酸扩增反应器 13a 的情况相比，通过使用腔室内由柱状构造体的本实施方式 2 的核酸扩增反应器 13b、13c、13d，发现可以进行有效且良好的核酸扩增反应。

如上所述，本发明的核酸扩增反应器可以高速进行样品液的温度上升、下降，作为使核酸发生扩增反应的容器，例如聚合酶链反应容器是有用的。

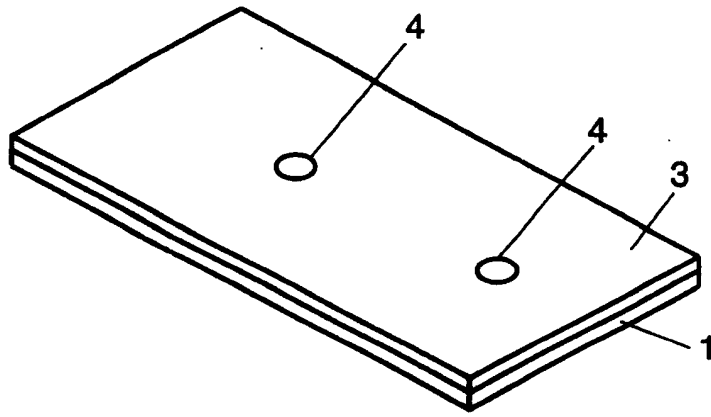


图 1

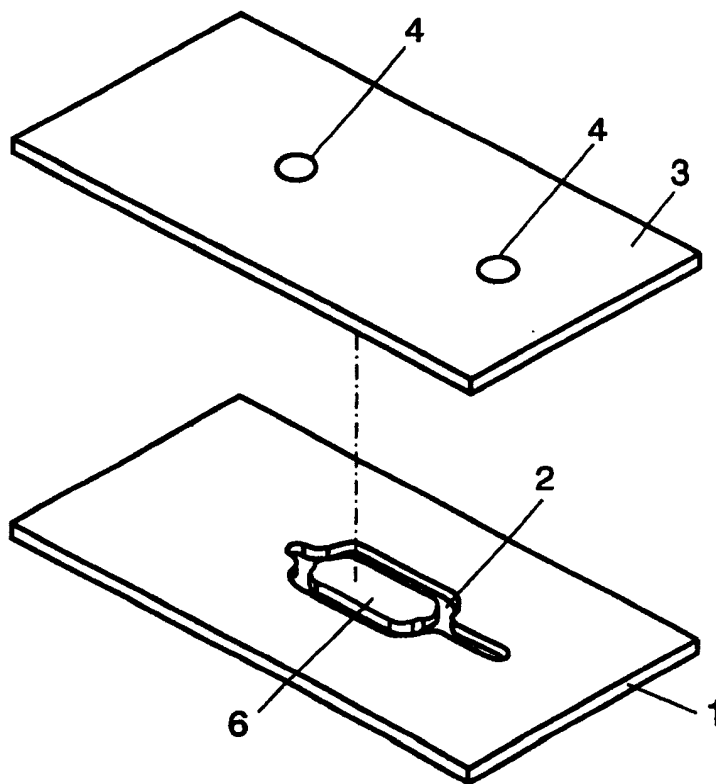


图 2

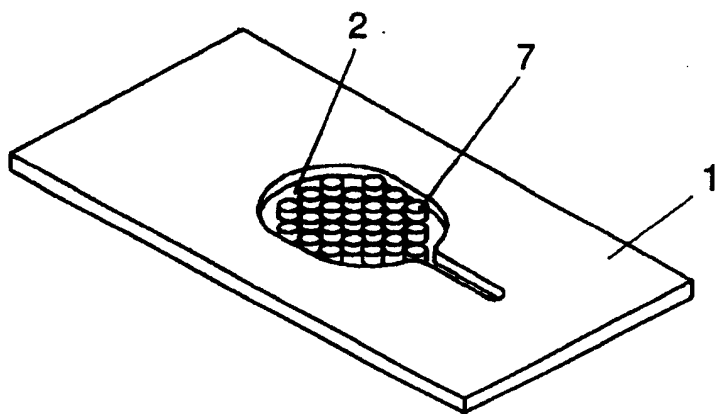


图 3

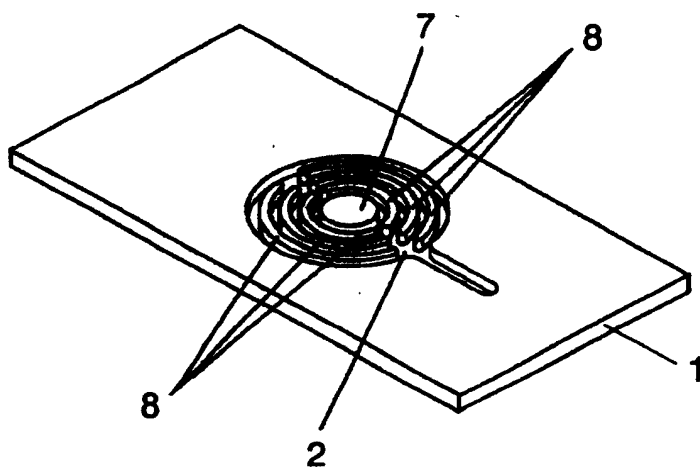


图 4

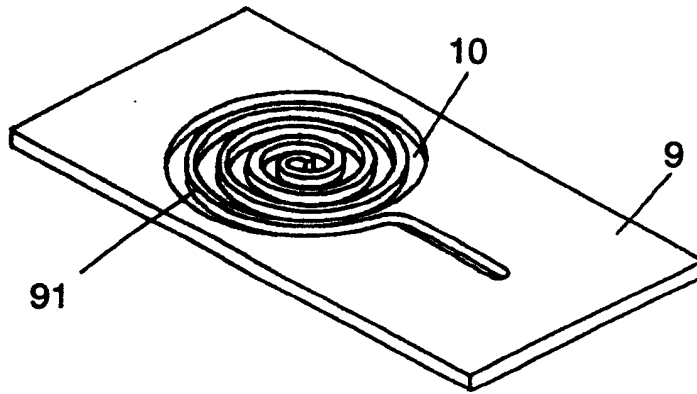


图 5

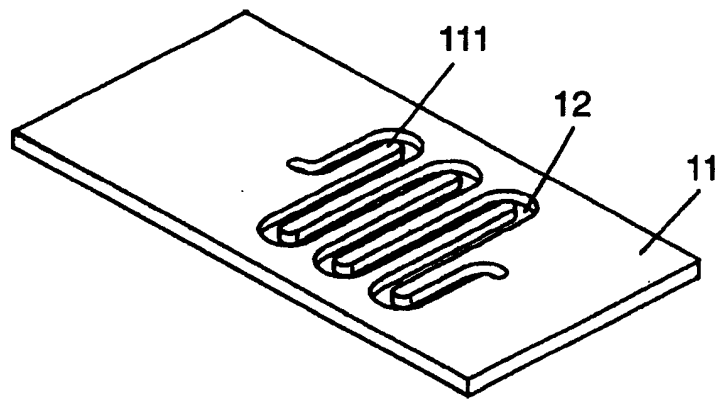


图 6



图 7

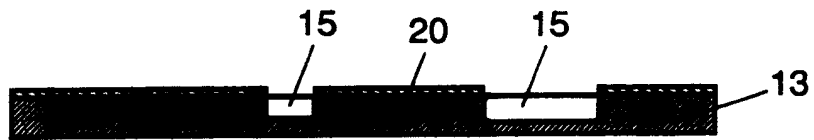


图 8

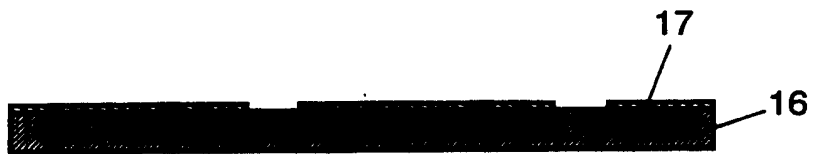


图 9



图 10

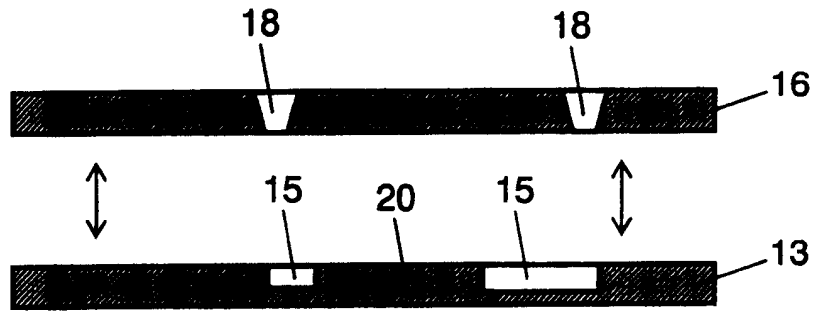


图 11

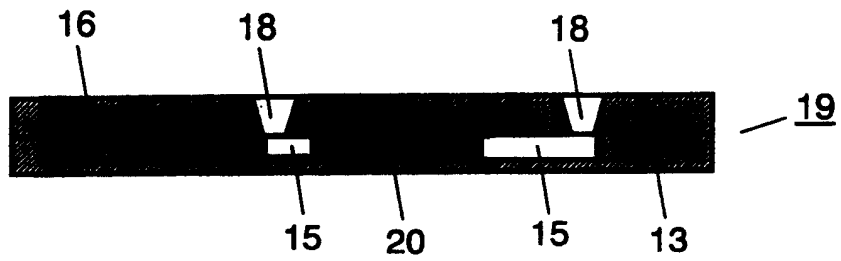


图 12

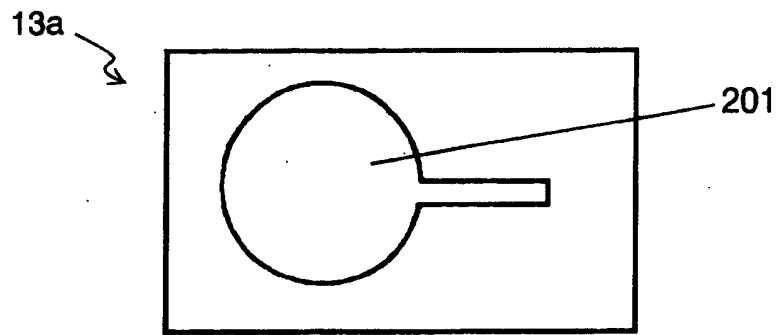


图 13A

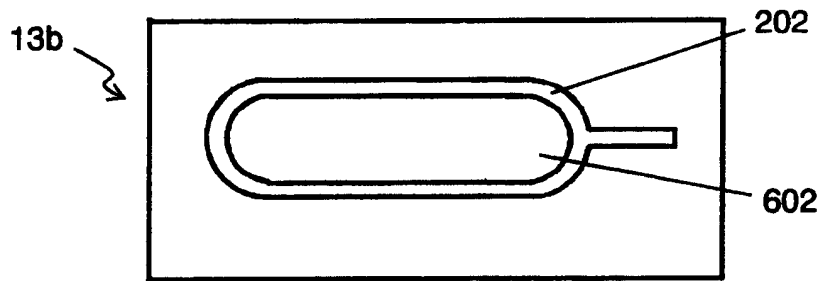


图 13B

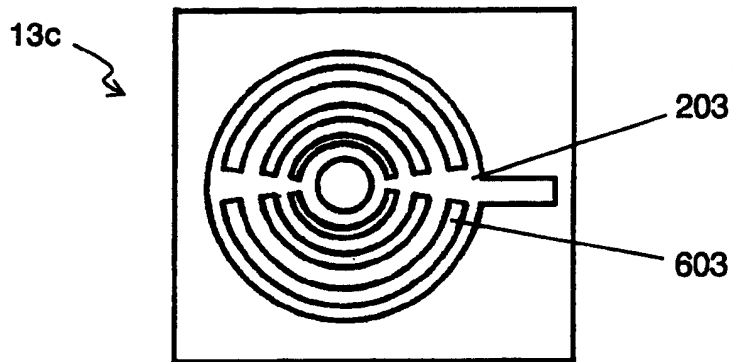


图 13C

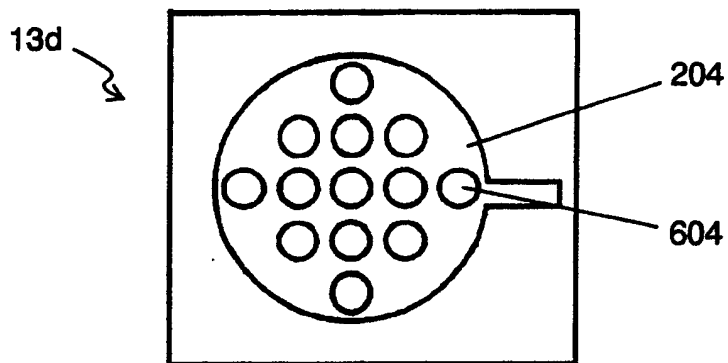


图 13D

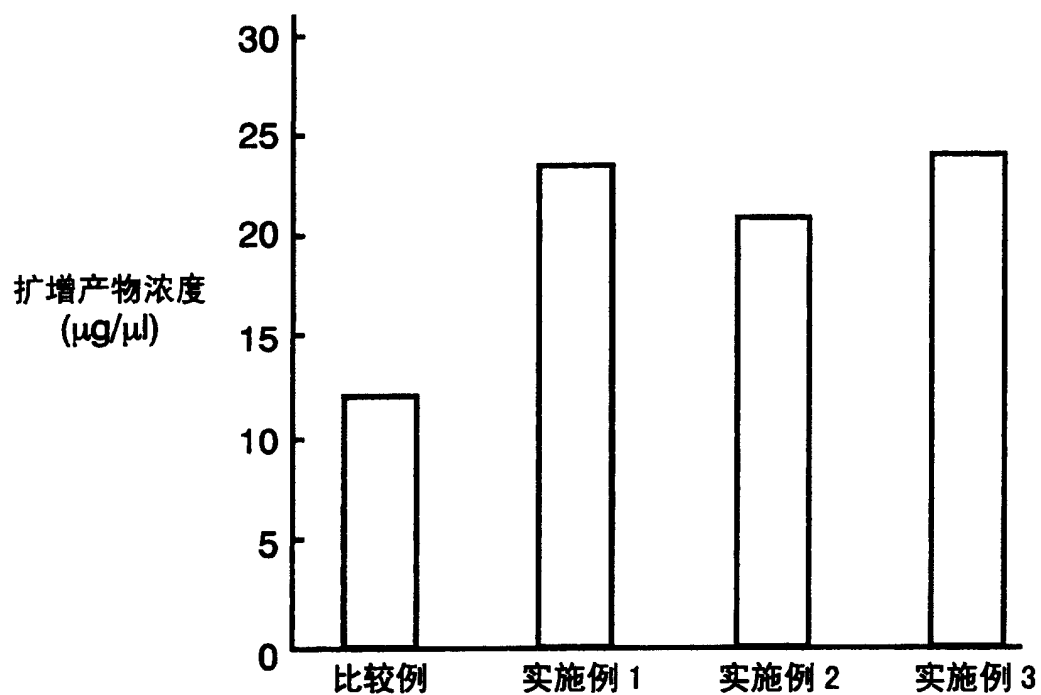


图 14