

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6525877号
(P6525877)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月17日(2019.5.17)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 M 1/00 (2006.01)
 G 01 N 35/08 (2006.01)
 C 12 Q 1/6844 (2018.01)

C 12 M 1/00 Z N A A
 G 01 N 35/08 A
 C 12 Q 1/6844 Z

請求項の数 29 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2015-534674 (P2015-534674)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月26日 (2013.9.26)
 (65) 公表番号 特表2015-532094 (P2015-532094A)
 (43) 公表日 平成27年11月9日 (2015.11.9)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/062042
 (87) 國際公開番号 WO2014/052671
 (87) 國際公開日 平成26年4月3日 (2014.4.3)
 審査請求日 平成28年9月26日 (2016.9.26)
 (31) 優先権主張番号 61/706,115
 (32) 優先日 平成24年9月26日 (2012.9.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 13/843,739
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 514273055
 セフェイド
 アメリカ合衆国 94089 カリフォルニア州 サニーベール カリビアン ドライブ 904
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳
 (72) 発明者 チャン、ユ-ミン
 アメリカ合衆国 94087 カリフォルニア州 サニーベール インバーナス ウェイ 1075

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】反応チューブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1の平面表面と第2の平面表面との間の流体経路を規定する平面フレームと、前記平面フレームの一方の端における流体インタフェースであって、各々前記平面フレームの同じ端に沿って異なる位置に提供された流体インレットと流体アウトレットとを備える、流体インタフェースとを備え、

前記流体経路は、複数のウェルで構成されたウェル基板を有するウェルチャンバを更に含み、前記ウェルチャンバは前記平面フレーム内で前記第1の平面表面又は前記第2の平面表面と前記ウェル基板との間に配置され、前記ウェルチャンバは前記流体インレット及び前記流体アウトレットの間で流体連通し、

前記流体インタフェースは、前記流体アウトレットが前記流体インレットの上に位置するように垂直に向けられた前記第1の平面表面と前記第2の平面表面とにより反応チューブが支持されるように、流体試料を含む試料容器に機械的及び流体的に接続されるように構成される、

反応チューブであって、

前記流体経路は、前記流体インタフェースを介して試料容器に流体接続され、前記平面フレームは、垂直に向けられ、流体試料が前記ウェルチャンバに充填及び排出されるように構成されている、

反応チューブ。

10

20

【請求項 2】

前記流体経路は、前記平面フレーム内で前記第1の平面表面と前記第2の平面表面との間に配置される前置増幅チャンバを含む、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 3】

前記前置増幅チャンバは、ウェルチャンバ入口と流体連通する前置増幅チャンバ出口を含む、請求項2に記載の反応チューブ。

【請求項 4】

前記前置増幅チャンバ出口は、前記ウェルチャンバ入口から通路によって分離される、請求項3に記載の反応チューブ。

【請求項 5】

前記流体アウトレットが前記流体インレットの上方にあるように前記第1の平面表面及び第2の平面表面が垂直に向かっている場合、前記前置増幅チャンバ出口は、前記前置増幅チャンバの最上部に位置付けられる、請求項4に記載の反応チューブ。

【請求項 6】

前記ウェルチャンバ入口は、前記ウェルチャンバの最下部に位置付けられる、請求項5に記載の反応チューブ。

【請求項 7】

前記ウェルチャンバ入口は、前記前置増幅チャンバの下方に位置付けられる、請求項6に記載の反応チューブ。

【請求項 8】

前記通路は、前記前置増幅チャンバ出口から前記ウェルチャンバ入口まで下向きに傾斜する、請求項7に記載の反応チューブ。

【請求項 9】

前記流体経路は蛇行チャネルを備える、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 10】

前記流体経路は無弁である、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 11】

前記ウェル基板は100～1000個のナノウェルを備える、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 12】

前記ウェル基板は、100～500μmの深さを有する複数のウェルを備える、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 13】

前記ウェル基板は、50～500μmの直径を有する複数のウェルを備える、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 14】

前記ウェル基板は、複数の0.8nLウェルを備える、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 15】

前記平面フレームの一部は、疎水性物質を保持するオイルチャンバを規定する、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 16】

前記オイルチャンバは前記ウェルチャンバと流体連通する、請求項15に記載の反応チューブ。

【請求項 17】

前記平面フレームは、基部から延在するスカフォードを備える、請求項1に記載の反応チューブ。

【請求項 18】

前記第1の平面表面及び第2の平面表面は、前記スカフォードを流体的に封止する第1の膜及び第2の膜を備える、請求項17に記載の反応チューブ。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

前記平面フレームは、前記流体インタフェースを介して試料容器に流体的に接続される、請求項 1 に記載の反応チューブ。

【請求項 20】

前記ウェル基板はニッケル材料を備える、請求項 1 に記載の反応チューブ。

【請求項 21】

反応チューブの流体インタフェースに試料流体を提供する方法であって、

前記反応チューブにおける前記流体インタフェースの流体インレットに試料流体を導入し、ここで、前記反応チューブは、第 1 の平面表面と第 2 の平面表面との間の流体経路を規定する平面フレームを備え、前記流体経路は、前記平面フレームの一方の端に位置し、各々前記平面フレームの同じ端に沿って異なる位置に提供された流体インレット及び流体アウトレットを備える流体インタフェースと、複数のウェルを有するウェルチャンバであって、前記流体経路に沿って前記流体インレット及び前記流体アウトレットの間に配置されるウェルチャンバとを含み、

前記流体アウトレットが前記流体インレットの上に位置するように垂直に向けられた前記平面フレームと前記流体インタフェースを介して試料容器に機械的及び流体的に接続された前記流体経路で、前記試料流体で前記ウェルチャンバを充填し、これにより前記ウェルチャンバの前記複数のウェルが前記試料流体で少なくとも部分的に充填され、

前記流体インタフェースを介して試料容器に機械的及び流体的に接続された前記流体経路と垂直に向けられた前記平面フレームとで、前記ウェルチャンバから余分な前記試料流体を排出し、これにより前記複数のウェルは、前記試料流体で少なくとも部分的に充填されたままとなること

を含む方法。

【請求項 22】

前記流体経路の前置増幅チャンバを前記試料流体で充填することと、前記ウェルチャンバを充填することに先立って前記前置増幅チャンバを前記試料流体で増幅することを更に含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記流体アウトレットが前記流体インレットの上方に位置するように前記反応チューブが垂直に向けられている場合に、前記前置増幅チャンバは、前記前置増幅チャンバの最上部に前置増幅チャンバ出口を含み、前記前置増幅チャンバは、前記前置増幅チャンバ出口より下のレベルにおいて充填される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 24】

前記前置増幅チャンバ出口は、前記前置増幅チャンバ出口からウェルチャンバ入口まで下向きに傾斜する通路によって前記ウェルチャンバ入口に流体接続される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 25】

前記流体経路は無弁である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ウェルチャンバから前記余分な試料流体が排出された後に、前記ウェルチャンバを疎水性物質で充填することを更に含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記疎水性物質は、前記ウェルチャンバと流体連通する前記平面フレームのオイルチャンバから供給される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 28】

前記試料流体は、蛇行する様態で前記流体経路に沿って送られる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1 の平面表面及び第 2 の平面表面に加熱及び冷却サイクルを加えることを更に含む、請求項 2 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、2012年9月26日出願の米国特許仮出願第61/706,115号の利益を主張する2013年3月15日出願の米国特許出願第13/843,739号の優先権を主張するものである。本出願はまた、2012年9月26日出願の米国特許仮出願61/706,115号の利益も主張するものである。前述の各出願の全体は参照によって本明細書中に援用される。

【背景技術】**【0002】**

10

複数のアッセイを同時に実行して多様かつ広範なデータセットを提供することが望ましい場合がある。そのようなプロセスはしばしば「多重化アッセイ」と呼ばれる。従って、多重化アッセイを実行できる装置が必要とされている。

【発明の概要】**【0003】**

本発明のいくつかの実施形態は、第1の平面表面と第2の平面表面との間の流体経路を規定する平面フレームを有してもよいハニカムチューブに関する。流体インタフェースが平面フレームの一方の端に位置してもよい。流体インタフェースは流体インレットと流体アウトレットとを有してもよい。流体経路は、複数のウェルで構成されたウェル基板を有するウェルチャンバを更に含んでもよく、ウェルチャンバは平面フレーム内で第1の表面又は第2の表面とウェル基板との間に配置され、ウェルチャンバは流体インレット及び流体アウトレットと流体連通する。

20

【0004】

いくつかの実施形態では、流体経路は、平面フレーム内で第1の平面表面と第2の平面表面との間に配置される前置増幅チャンバを含んでもよい。

【0005】

いくつかの実施形態では、ウェルチャンバは、前置増幅チャンバと流体アウトレットとの間にある。

【0006】

いくつかの実施形態では、前置増幅チャンバは含まれない。

30

【0007】

いくつかの実施形態では、前置増幅チャンバは、1つ以上の化学物質を含む狭い経路である。

【0008】

いくつかの実施形態では、前置増幅チャンバは、ウェルチャンバ入口と流体連通するチャンバ出口を含んでもよい。

【0009】

いくつかの実施形態では、前置増幅チャンバ出口は、ウェルチャンバ入口から通路によって分離される。

【0010】

40

いくつかの実施形態では、第1の平面表面及び第2の平面表面が垂直に向かっている場合、前置増幅チャンバ出口は、前置増幅チャンバの最上部に位置付けられてもよい。

【0011】

いくつかの実施形態では、ウェルチャンバ入口は、ウェルチャンバの最下部に位置付けられてもよい。

【0012】

いくつかの実施形態では、ウェルチャンバ入口は、前置増幅チャンバの下方に位置付けられてもよい。

【0013】

いくつかの実施形態では、通路は、前置増幅チャンバ出口からウェルチャンバ入口まで

50

下向きに傾斜してもよい。

【0014】

いくつかの実施形態では、流体経路は蛇行チャネルを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、流体経路は無弁であってもよい。

【0016】

いくつかの実施形態では、ウェル基板は、約100～約1500個の複数のナノウェルを有してもよい。

【0017】

いくつかの実施形態では、ウェル基板は、約50～約500μmの直径を有する複数のウェルを含む。 10

【0018】

いくつかの実施形態では、ウェル基板は、約100μmの深さをそれぞれが有する複数のナノウェルを有してもよい。

【0019】

いくつかの実施形態では、ウェル基板は複数のナノウェルを有してもよく、複数のナノウェルのうちの各ウェルは深さが25μm～1000μmの範囲であってもよい。

【0020】

いくつかの実施形態では、ウェル基板は複数のナノウェルを有してもよく、複数のナノウェルのうちの各ウェルは約25μm～約500μmの範囲内の幅を有する。 20

【0021】

いくつかの実施形態では、ウェル基板は複数のナノウェルを有してもよく、各ウェルは約8.5nLの容積を有する。

【0022】

いくつかの実施形態では、複数のウェルのうちの各ウェルは約0.1nL～500nLの範囲内の容積を有してもよい。

【0023】

いくつかの実施形態では、平面フレームの一部が、疎水性物質を保持するためのオイルチャンバを規定してもよい。

【0024】

いくつかの実施形態では、オイルチャンバはウェルチャンバと流体連通してもよい。 30

【0025】

いくつかの実施形態では、平面フレームは、基部から延在するスカフォード(scaffold)であってもよい。

【0026】

いくつかの実施形態では、第1の平面表面及び第2の平面表面は、スカフォードを流体的に封止する第1の膜及び第2の膜を有してもよい。

【0027】

いくつかの実施形態では、平面フレームは、流体インタフェースを介して試料容器に流体的に接続されてもよい。 40

【0028】

いくつかの実施形態では、ウェル基板はニッケル材料から構成されてもよい。

【0029】

いくつかの実施形態では、複数のウェルは、特異的な標的の増幅及び/又は検出のための、少なくとも1つの核酸プライマー及び/又はプローブを含んでもよい。

【0030】

いくつかの実施形態では、複数のウェルは、特異的な標的の検出のための分子、例えば抗体又は核酸を含んでもよい。

【0031】

本発明のいくつかの実施形態は、ハニカムチューブの流体インタフェースに試料流体を 50

提供する方法に関する。ハニカムチューブは、第1の平面表面と第2の平面表面との間の流体経路を規定する平面フレームを有してもよく、それらの表面のそれぞれは薄い可撓性膜を用いて封止されてもよい。流体経路のウェルチャンバは試料流体で充填されてもよく、試料流体は分析される試料材料を含み、アッセイを実施するための1つ以上の化学物質を更に含んでもよく、従ってウェルチャンバ内の複数のウェルは試料流体で充填される。試料流体は次に、ウェルチャンバから排出されてもよく、これにより複数のウェルは、試料流体で少なくとも部分的に充填されたままとなる。

【0032】

いくつかの実施形態では、前置増幅チャンバが流体経路内でウェルチャンバの前に存在し、反応流体は、前置増幅チャンバ内で増幅工程を受けてから、ウェルチャンバを充填する。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、前置増幅チャンバは、前置増幅チャンバの最上部出口を含んでもよく、前置増幅チャンバは、前置増幅チャンバの最上部出口より下のレベルにおいて充填され得る。

【0034】

いくつかの実施形態では、疎水性物質はウェルチャンバから排出される。いくつかの実施形態では、ウェルチャンバは、疎水性物質の排出の後、続いて水性流体で充填される。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、第1の平面表面及び第2の平面表面の両方に加熱及び／又は冷却サイクルが加えられる。

【0036】

いくつかの実施形態では、第1の平面表面又は第2の平面表面のいずれかに加熱及び／又は冷却サイクルが加えられる。

【0037】

本発明のいくつかの実施形態は、ハニカムチューブ内で多重増幅反応を実施することに関する。

【0038】

いくつかの実施形態では、試料流体は、蛇行する様態で流体経路に沿って送られる。

【0039】

30

いくつかの実施形態では、多重反応はネステッド P C R を含む。

【0040】

いくつかの実施形態では、多重反応は、アンプリコンの存在を示すための蛍光指示薬を使用して監視される。

【0041】

いくつかの実施形態では、アンプリコンの存在は融解曲線分析を使用して検出される。

【0042】

いくつかの実施形態では、多重反応は、少なくとも1つの一塩基多型（S N P ）の有無を検出する。

【0043】

40

いくつかの実施形態では、多重反応において使用される試料材料は、体液であるか又は体液に由来する。

【0044】

いくつかの実施形態では、試料材料は、組織試料であるか又は組織試料に由来する。

【0045】

いくつかの実施形態では、反応はタンパク質標的の有無を検出する。

【0046】

いくつかの実施形態では、反応は核酸の有無を検出する。

【0047】

いくつかの実施形態では、核酸はD N A である。

50

【0048】

いくつかの実施形態では、核酸はmRNAである。

【0049】

いくつかの実施形態では、核酸はマイクロRNAである。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1A】本発明のいくつかの実施形態によるハニカムチューブの斜視図を示す。

【図1B】本発明のいくつかの実施形態によるハニカムチューブの右側面図を示す。

【図1C】本発明のいくつかの実施形態によるハニカムチューブの左側面図を示す。

【図1D】

10

【図1E】図1D及び1Eはそれぞれ、本発明のいくつかの実施形態によるハニカムチューブの右側面図である。

【図2A】

【図2B】

【図2C】

【図2D】

【図2E】

【図2F】

【図2G】

【図2H】図2A～2Hは、本発明のいくつかの実施形態による、ウェル基板120の様々な実施形態を示すためのハニカムチューブの部分の断面を示す。

20

【図3A】本発明のいくつかの実施形態による、ウェル基板120にプライマー材料を提供する方法の斜視図を示す。

【図4A】

【図4B】

【図4B-2】

【図4C】

【図4D】

【図4D-2】

【図4D-3】

30

【図4E】図4A～4Eは、本発明のいくつかの実施形態による、ウェル基板を試料流体で充填する様々な方法を示す。

【図5A】

【図5B】

【図5C】

【図5D】

【図5E】

【図5F】図5A～5Fは、本発明のいくつかの実施形態による、ハニカムチューブに関する様々なセンサーセンブリの位置を示す。

【図6】本発明のいくつかの実施形態による、試料流体をハニカムチューブに提供するための流体制御及び処理システムを示す。

40

【図7】

【図8】

【図9A】

【図9B】

【図9C】

【図10A】

【図10B】

【図10C】

【図11】

50

【図12】

【図13】図7～13は、実施例1による多重PCR SNP分析を実行するための実施例の工程を示す。

【発明を実施するための形態】

【0051】

I. 例示的なハニカムチューブの構成

本明細書中で使用される場合、用語「ハニカム」は、予め設計された位置において固体基板の表面内に設けられる複数のウェルを表す。いくつかの実施形態では、本発明のハニカムチューブは少なくとも100～200個のウェルを含む。いくつかの実施形態では、ハニカムチューブは約100～300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500の任意の数のウェル又はより多くのウェルを含んでもよい。ウェルは任意の形状であってもよく、それらの位置は予め規定されるが、任意のフォーマット又はパターンで基板上に配置されてもよい。本明細書中で使用される場合、用語「ハニカムチューブ」は「ウェルチャンバ」、「マルチウェル反応チャンバ」、又は「マルチウェル反応チューブ」と交換可能に使用され得る。10

【0052】

図1A、図1B、及び図1Cはそれぞれ、ハニカムチューブ100の斜視図、右側面図、及び左側面図を示す。ハニカムチューブ100（マルチウェル反応チャンバと交換可能に使用される）は平面フレーム102を含み、平面フレーム102はいくつかの実施形態では、一般にPCR適合性であるポリマー（例えばポリプロピレン／アクリル基板）又は金属材料から形成されるトラス状構造である。平面フレーム102は、開いた側上で第1の平面基板104及び第2の平面基板106によって区切られるオープントラス又はスカフォードとして形成されてもよい。20

【0053】

第1の平面基板104及び第2の平面基板106は、平面フレーム102に接着される又はその他の手法で接合される比較的薄いポリマー膜から形成されてもよい。いくつかの実施形態では、第1の平面基板104及び第2の平面基板106のうちの一方の、全て又は部分は、平面フレーム102と一緒に形成されてもよい（例えば、基板のうちの一方を平面フレーム102と共に3Dプリンティング、成形、同時成形、又は機械加工することによって）。いくつかの実施形態では、第1の平面基板104及び第2の平面基板106は透明材料から構成され、これがここで示されている。第1の平面基板104及び第2の平面基板106のそれぞれは、内向き及び外向き表面を含む。これらの内向き表面は、平面フレーム102の内部キャビティを用いた流体通路を形成する。30

【0054】

平面フレーム102の一部は流体インタフェース108を形成する。流体インタフェース108は、平面フレーム102の大部分を片持ち梁式に支える構造部材である。流体インタフェース108は平面フレーム102と一緒に形成されてもよい。流体インタフェース108は、本明細書中の他の箇所で説明するカートリッジ装置への機械的継手としても働く。流体インタフェース108は、カートリッジ装置又は試料容器への流体インタフェースを提供する流体インレット110と流体アウトレット112とを含む。流体インレット110及び流体アウトレット112のそれぞれは、平面フレーム102内で第1の平面基板104と第2の平面基板106との間に形成される流体経路114に流体的に結合される。用語「インレット」及び「アウトレット」の使用は、流体インレット110及び流体アウトレット112の機能を限定するものではないということを理解されたい。従って流体は、両方又はいずれかから導入及び排出され得る。いくつかの実施形態では、流体経路114は無弁であり、従って流体インレット（110）から流体アウトレット（112）まで延在する流体経路114内の流体を移動させるために、外部システムによって、外部からの圧力の増加又は減少が、流体インレット110及び流体アウトレット112を介して加えられてもよい。流体経路114の断面は円形又は矩形であってもよく、約50μ4050

m～約2mmの範囲の径又は幅を有してもよい。一般に、径又は幅は約250μm～約1mmの範囲である。

【0055】

流体経路114は、ウェルチャンバ118に流体的に接続された前置増幅チャンバ116を含む。ウェルチャンバ118は、複数のウェル（本明細書中ではナノウェルとも呼ばれる）を有するウェル基板120（本明細書中ではハニカムとも呼ばれる）を保持する。ウェル基板120は、金属（例えば金、白金、又はニッケル合金）、セラミック、ガラス、又はその他のP C R適合性ポリマー材料、あるいは複合材料から構成されてもよい。ウェル基板120は複数のウェルを含む。いくつかの実施形態では、ウェル基板120は100～1000個の又はより多くのウェルを含んでもよい。ウェルは、ウェル基板120内に止まり穴又は貫通穴として形成されてもよい。ウェルは、例えばレーザ穿孔（例えばエキシマ又は固体レーザ）、超音波エンボス加工、熱エンボス加工リソグラフィ、ニッケル型の電鋳、射出成形、及び射出圧縮成形によってウェル基板120内に作成されてもよい。いくつかの実施形態では、ウェル基板120は平面フレーム102に接着されるか又は平面フレーム102と同時成形され、いくつかの実施形態では、ウェル基板120は平面フレーム102の成形された特徴である。いくつかの実施形態では、個々のウェルの容積は0.1～1500nL、一般には0.5～200nL、好ましくは0.5～50nLの範囲である。例えばいくつかの実施形態では、各ウェルは約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、15、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、又は500nLの容積を有してもよい。ウェルの寸法は任意の形状、例えば円形、橢円形、正方形、矩形、卵形、六角形、八角形、円錐形、及び当業者に周知のその他の形状などを有してもよい。更にウェル形状は、軸に沿って変化する断面積を有してもよい。例えば正方形の穴が第1のサイズから、第1のサイズの数分の1である第2のサイズまで先細りしてもよい。いくつかの実施形態では、ウェルの寸法は、径と深さとがほぼ等しい正方形であってもよい。いくつかの実施形態では、ウェルの径と深さとは等しくない。いくつかの実施形態では、ウェルを規定する壁は非平行である。いくつかの実施形態では、ウェルを規定する壁は一点に収束する。ウェルの寸法は、ウェル基板120の総容積容量から導き出されてもよい。いくつかの実施形態では、ウェルの深さは25μm～1000μmの範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、例えばウェルは25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、又は1000μmの深さを有してもよい。いくつかの実施形態では、ウェルの径は約25μm～約500μmの範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、例えばウェルは25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、又は500μmの幅を有してもよい。10
20
30
40

【表1】

チャートI-例示的なウェル基板の寸法(メートル)

径 (mm)	深さ (mm)	ウェル 容積 (nL)	ピッチ* (mm ²)	25μLチュープ	65μLチュープ	100μLチュープ
				長さ(mm)		
				4.6	7.1	9.0
0.1	0.1	0.8	0.23	20	400	31
0.15	0.15	2.7	0.3	15	225	24
0.2	0.2	6.3	0.35	13	169	20
0.25	0.25	12.3	0.4	11	121	18

【0056】

ウェル基板120の部分、及び/又は、第1の平面基板104及び/又は第2の平面基板106の内部は、流体の付着を助長又は抑止するために修正されてもよい。例えばウェルを規定する面は、親水性の材料でコーティングされ(又は親水性であるように修正され)てもよく、これにより流体の保持が助長される。更に、(ウェルを規定する内面を囲む)平面表面は、疎水性の材料でコーティングされ(又は疎水性であるように修正され)てもよく、これによりその上の流体の保持が抑止される。流体が好ましくはウェルの内部に保持され、しかし余分な流体の排出を助長するために上面上では保持されないように、その他の表面処理が行われてもよい。

【0057】

ウェル基板120のウェルは、整列された行及び列の単純な幾何学的パターンを、あるいは対角線状に又は六角形に配置されたパターンを有するようにパターン化されてもよい。いくつかの実施形態では、ウェル基板120のウェルは、無秩序なパターンや、シリガーナー(Schillinger)ら(Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering, 2012年1月22日)によって記載されたイソジオメトリック(isogeometric)設計パターンなどの複雑な幾何学的パターンを有するようにパターン化されてもよい。充填プロセス中の試薬の相互汚染の防止に役立つように、ウェルは互いに幾何学的に分離されてもよく、かつ/又は大きな深さ幅比を備えてもよい。いくつかの実施形態では、試薬の相互汚染を防止するために、本明細書中で開示される方法及び当業者に周知の方法が使用されてもよい。

【0058】

図1Aに示すように、ウェル基板120の前部と第1の平面基板104との間に(流体が通過することを可能にするための)ギャップが形成されるように、ウェル基板120の一部は第2の平面基板106に接続されてもよい。前置増幅チャンバ116は、存在する場合、(図示されている向きにおいて)前置増幅チャンバ116の最上部に位置する前置増幅チャンバ出口122を含む。ウェルチャンバ入口124がウェルチャンバ118の最下部に位置する。下向きに傾斜した中間通路126が、前置増幅チャンバ出口122とウェルチャンバ入口124とを分離する。最下インレット通路128及び最上アウトレット通路130が、流体経路114の残りの部分を構成する。

【0059】

いくつかの実施形態では、平面フレーム102は、オイル又はその他の化学溶液などのプロセス流体を前置増幅チャンバ116、ウェルチャンバ118、及び/又は流体経路114の任意のその他の部分に提供するために使用可能な1つ以上の(すなわち少なくとも1つの)補助チャンバ132を含む。そのような補助チャンバ132は、1つ以上の膜、弁、及び/又は、金属箔又は薄膜などの圧力切断可能基板(pressure severable substrates)(すなわち補助チャンバ内の又は流体経路114の隣接する部分内の流体から所定の量の圧力を受けると壊れる材料)を介して流体経路114の部分に流体的に接続されてもよい。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、流体経路 114 は、図 1 D に示すような曲がりくねった部分を含んでもよい。インレット通路 128 とウェルチャンバ 118 との間の曲がりくねった経路は、流体プロセスの制御及び処理に役立ち得る。曲がりくねった経路は、流体経路を通したオイルの流れを妨げる可能性がある気泡の形成を減らすのに役立ち得るということが見出された。図 1 D に示すハニカムチューブ 100' は、図 1 A ~ 図 1 C に示すハニカムチューブ 100' と大部分同じであるが、中間通路 126' は、蛇行する様態で接続された複数の細長いチャネル部分を含む。ここでは 3 つの細長いチャネル部分が示されているが、より多くの又はより少ない部分が使用されてもよい。一般には少なくとも 2 つのチャネル部分が使用され、いくつかの実施形態では、2 ~ 10 の細長いチャネル部分が使用される。10

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、流体経路 114 は、図 1 E に示すような広範囲にわたる曲がりくねった部分を含む。ここに示すハニカムチューブ 100" は、図 1 A ~ 図 1 C に示すハニカムチューブ 100" と大部分同じであるが、中間通路 126" は、ハニカムチューブ 100" の構造の大部分を通して延在する。この手法において、中間通路 126" の細長いチャネル部分は、内部で増幅が発生し得る細長いチャンバに類似するように比較的広くされてもよい。ここでは 4 つの細長いチャネル部分が示されているが、より多くの又はより少ない部分が使用されてもよい。一般には少なくとも 2 つのチャネル部分が使用され、いくつかの実施形態では、2 ~ 10 の細長いチャネル部分が使用される。細長いチャネルの間で中間通路 126" を規定する鋭角の内部曲線は、細長いチャネルの間の断面積を減らすために球状になっている。角のあたりの減らされた断面積は、曲線の内半径における流体と比較した曲線の外半径における流体の間の流量差を減らすために役立つ。そのような流量差が大きすぎる場合、泡形成を発生させる望ましくないキャビテーションがもたらされる可能性がある。ここでは、屈曲部の幅は、細長いチャネル部分の幅の約 50 % である。いくつかの実施形態では、屈曲部の幅は、細長いチャネル部分の幅の 10 ~ 90 % の範囲である。いくつかの実施形態では、屈曲部の幅は互いに異なる。20

【 0 0 6 2 】

上述のように、図 1 E に示すチャネル形状は、流体プロセスの制御及び処理のために有益であり得る。前置増幅チャンバは図示されていないが、ハニカムチューブ 100" の特定の用途によっては 1 つ以上が含まれてもよい。図示されている形状では、標的的極めて少数のコピー（すなわち 1 又は 2）しか試料に含まれない場合、蛇行チャネルの直線的性質により、増幅後に、増幅された標的の混合及び均一な分配がなされない可能性があるということを理解されたい。従って、流体をカートリッジ内（シリングチューブ又は別個のチャンバ内のいずれか）に戻してアンプリコンの混合及び均一な分配を行わせてから、ウェルチャンバのウェルを充填しなければならない可能性がある。30

【 0 0 6 3 】

図 2 A ~ 図 2 G は、ウェル基板 120 の様々な実施形態を示すための、ハニカムチューブの部分の断面を示す。

【 0 0 6 4 】

図 2 A は、ウェル基板 120 のウェルが、平面フレーム 102 内に作られた止まり穴によって構成される一実施形態を示す。この実施形態では、第 2 の平面基板 106 は平面フレーム 102 と一緒に、それらが本質的に 1 つの材料片であるように形成される。プライマー / プローブ材料 134 が、ウェル基板 120 の各ウェル内に配置されて示されている。

【 0 0 6 5 】

図 2 B は、ウェル基板 120 のウェルが、平面フレーム 102 上に接合されるポリマー膜などの基板内に作られた貫通穴によって構成される一実施形態を示す。例えば、別個の基板が穿孔されて貫通穴のウェル基板が形成され、続いて平面フレーム 102 上に接着又は溶接されてもよい。この実施形態では、第 2 の平面基板 106 は平面フレーム 102 と50

一体に、それらが本質的に1つの材料片であるように形成される。いくつかの実施形態では、第2の平面基板106内に止まり穴が形成されてもよく、第2の平面基板106は平面フレーム102上に接合されてもよい。

【0066】

図2Cは、ウェル基板120のウェルが、平面フレーム102の一部内に形成された貫通穴によって構成される一実施形態を示す。この実施形態では、第2の平面基板106は平面フレーム102と一体化され、ウェル基板120は平面フレーム102内のポケットに接着又は溶接される別個の構成要素である。

【0067】

図2Dは、図2Cに示すのと同様に、ウェル基板120のウェルが、平面フレーム102の一部内に形成された貫通穴によって構成される一実施形態を示す。しかしこの実施形態では、平面フレーム102と第2の平面基板106との間に気体透過性膜136が位置する。膜136は、気体がウェルから膜を通して排出されることを可能にし、流体が通過することは許可しない。気体透過性膜は、気体透過性接着剤によってウェル基板に接着されてもよい。いくつかの実施形態では、膜136はポリジメチルシリコサン(PDMS)から構成され、20～1000μmの範囲の厚さを有し、いくつかの実施形態では100～200μmの範囲の厚さを有する。

【0068】

図2Eは、ウェル基板120のウェルが、平面フレーム102の一部内に形成された止まり穴によって構成される一実施形態を示す。この実施形態では、第2の平面基板106は平面フレーム102と一体化され、ウェル基板120は平面フレーム102内のポケットに接着又は溶接される別個の構成要素である。

【0069】

ウェル基板120の全て又は部分は、導電性金属部分(例えば金)を、金属からウェルへの熱伝達を可能にするために含んでもよい。例えば、第2の平面基板106に接触して配置されるウェル基板120の部分は、金属板又はコーティングであってもよい。いくつかの実施形態では、ウェルの内面は、熱伝達を可能にするために金属を用いてコーティングされてもよい。

【0070】

図2Fは、図2Dの実施形態と同様に構成される一実施形態を示す。しかしここではウェル基板は、第1の基板と第2の基板との間の中間点に位置付けられる。気体透過性膜136が、気体透過性接着剤によってウェル基板に接着されてもよい。図2Dに示す実施形態と同様に、液体の充填中に気体透過性膜を通じてウェルの裏側に空気が出ることが可能である。PCR緩衝液がウェルを充填しウェル内の乾燥したプライマーセットを再水和した後、クロストークを防止するために隔離オイル又は熱伝導性液体がウェル基板120の両方の側を充填してもよい。

【0071】

図2Hは、図2Fの実施形態と同様に構成される一実施形態を示す。しかしここでは膜は含まれない。従って処理流体は、ウェル基板120の両方の側にさらされ得る。PCR緩衝液がウェルを充填しウェル内の乾燥したプライマーセットを再水和した後、クロストークを防止するために隔離オイル又は熱伝導性液体がウェル基板120の両方の側を充填してもよい。

【0072】

図2Hは、例えば図2A～図2Fに示すような、本明細書中で開示され示される実施形態のうちの任意のものと共に使用可能なウェル基板120の一実施形態を示す。ここでウェル基板120のウェル121は、円錐と同様に、より大きな直径からより小さな直径まで先細りするように形成される。円錐形のウェルでは、プライマー材料を含む液体試薬を沈着させるために非接触沈着方法(例えばインクジェット)を使用することがウェルの傾斜した壁により可能となるため、プライマー適用の間の利点が提供されるということが見出された。更に円錐形のウェルでは、円錐形により乾燥が促進されるため、液体試薬適用

10

20

30

40

50

の接触及び非接触方法の両方について、液体試薬のより容易な適用が可能になる。円錐形のウェルは、気体透過性膜 136 が存在する場合の泡及び漏洩を防止するのにも役立つということが見出された。

【0073】

図 3 A は、ウェル基板 120 にプライマー材料を提供する方法を示す。図示されているように、液体プライマーでウェルを充填するために市販のプリンティングピンが使用されてもよく、液体プライマーはウェル内で乾燥されてもよく、又は液体が充填されたウェルが充填後に封止されてもよい。いくつかの実施形態では、ウェル基板 120 にプライマーが液体形態で提供された後、プライマー材料は乾燥されてもよく、これにより、プライマー残留物のみが後で液化するために各ウェルに付着して残されてもよい。そのようなピン（及び関連するシステム）の例としては、米国カリフォルニア州 94089、サニーベール、イースト・ウェデル・ドライブ 524 (524 East Weddell Drive, Sunnyvale, CA 94089, USA) に立地するアレイイト・コーポレーション (ArrayIt Corporation) による 946 MP (x) シリーズのピンが含まれる。ヘイサン (Hasan) らの米国特許出願公開第 2009/0054266 号明細書、及びヘス (Hess) らの米国特許第 6,716,629 号明細書によって開示された方法も、プライマー材料を提供するために使用されてもよい。適用プロセスの間、プリンティングピンはウェル基板 120 と接触するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、非接触プロセス、例えばインクジェットプリンティングなどの小滴ベースの方法又は当業者に知られているその他の好適な非接触プロセスが、液体試薬（例えばプライマー）をウェルに提供するために使用されて、ウェルを規定する 1 つ以上の壁上の乾燥した試薬がもたらされてもよい。1020

【0074】

I I . ハニカムチュープ内への試料の装填

図 4 A 及び図 4 B は、ウェル基板 120 を試料流体で充填する方法を示す。図 4 A では、試料流体は、ウェル基板 120 と第 1 の平面基板 104 との間を（例えば圧力によって）前進させられる。流体がウェル基板 120 を通過する際に各ウェルが流体で充填され、流体は表面張力によってウェル内に主として保持される。上述のように、ウェルを規定する壁などのウェル基板 120 の部分は、親水性の物質でコーティングされるか又は比較的より親水性になるように処理されてもよく、これにより、試料流体が通過する際の完全かつ均一なウェルの充填が助長される。加えて、ウェル表面を囲む上面などの、ウェル基板 120 のその他の表面が、疎水性の物質でコーティングされるか又は比較的より疎水性になるように処理されてもよく、これにより、流体試料がウェル内のみに保持され、隣接する表面上には保持されないようになり、一貫性のない検査結果が減少する。加えて、第 1 の平面表面 120 の内面が疎水性効果のためにコーティングされるか又は処理されてもよい。図 4 B では、試料流体が後退した後にウェルのみが充填されていることがわかる。いくつかの実施形態では、流体試料は図 4 B'（日本語による訳文では図 4 B - 2）に示すように前進させられて、空気のポケットがそれに続いてもよく、これにより、図 4 B の例示的実施形態に示すように試料を撤収する必要がなくなる。ジャックマン (Jackman) ら (Anal Chem., 1998 年、70, 2280 ~ 2287) によって、及びハッチ (Hatch) らの「デジタル生物学のためのマルチレイヤ高密度 3D ナノウェルアレイ (MULTILAYER HIGH-DENSITY 3D NANOWELL ARRAYS FOR DIGITAL BIOLOGY)」(15th Int'l Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2011 年 10 月 2 ~ 6 日、269 ~ 271) によって開示された「不連続ウェッティング (discontinuous wetting)」などの充填方法も使用されてもよい。一般に、ウェル内での異なるプライマーの相互汚染を避けるために、ウェル基板 120 はなるべく迅速にディウェッティングされるべきである。304050

【0075】

図4C及び図4Dは、ウェル基板120を試料流体で充填する別 の方法を示す。図4Cでは、ウェル基板120は、図4A及び図4Bに示す技法の組み合わせに従って充填される。しかし試料流体にはオイルのポケットが続く。図4Cにおけるオイルは試料流体に直接接触して示されているが、オイルキャップと試料流体との間に空気ギャップが設けられてもよい。

【0076】

図4Dに示すように、各ウェルが試料流体で充填された後は、オイルが各ウェルに完全に「蓋(キャップ)」をしてもよく、これはウェブ基板120が熱サイクルを受ける場合の蒸発の減少の一助となり得る。いくつかの実施形態では、ウェルが充填された後で、オイルがチャンバの最上部から導入され、図4D'（日本語訳文では図4D-2）に示すようにチャンバ入口124から撤収されてもよい。図4D及び図4D'の両方の実施形態において、ウェルがオイルで蓋をされた後、熱伝導性を向上させるためにチャンバ118を水溶液が充填してもよい。いくつかの実施形態では、流体及びいかなる泡の移動も停止させるために、静止した水溶液がチャンバ118内で加圧されてもよい。

10

【0077】

いくつかの実施形態では、図4D''（日本語訳文では図4D-3）に示すように、ウェルが充填された後は、熱サイクリングの間、オイルがチャンバ内に静止して保持されてもよい。いくつかの実施形態では、流体及びいかなる泡の移動も停止させるために、静止したオイルはチャンバ118内で加圧されてもよい。

20

【0078】

鉱油などのオイルが、各ウェルの隔離のために及び熱伝導性を提供するために使用されてもよい。但し本発明の実施形態は「オイル」に限定されない。フッ素化液体（例えば3M F C - 40）などの任意の熱伝導性液体が使用されてもよい。従って本開示中での「オイル」への言及は、そのような代替を含むものと理解されたい。

【0079】

いくつかの実施形態では、図4Cに示すようにウェルが試料流体で充填された後、オイルが試料流体の後に続いて、ウェルに蓋をし、ウェルチャンバ118内に維持されてもよい。この実施形態を明示する実験が、実施例3で説明するように、及び図4Eに示すように行われた。

【0080】

30

図5A及び図5Bは、ウェル基板120における反応を検出するための例示的なセンサアセンブリの位置付けを示す。いくつかの実施形態では、センサアセンブリAは第1の平面基板104に直接隣接して又は接触して位置付けられる。いくつかの実施形態では、第2のセンサアセンブリBは第2の平面基板106に直接隣接して又は接触して位置付けられる。各センサアセンブリは、PCR検査のための励起及び/又は検出デバイスを含んでもよい。いくつかの実施形態では、センサは、蛍光の励起及び検出のための光センサである。

【0081】

図5Cは、図5A及び図5Bの構成の代わりに又はそれと組み合わせて使用されてもよい例示的なセンサアセンブリの構成を示す。ここではセンサアセンブリAは、ハニカムチューブ100の前縁に沿って位置付けられる。いくつかの実施形態では、第2のセンサアセンブリBが含まれる。いくつかの実施形態では、図5A及び図5BのセンサアセンブリA及びBのうちの一方又は全てが、図5CのセンサアセンブリA及びBのうちの一方又は全てと組み合わせて使用される。

40

【0082】

図5Dは、例示的なセンサアセンブリの構成を示す。いくつかの実施形態では、このセンサアセンブリ構成は、図5A～図5Cに示す構成と共に使用されてもよい。センサアセンブリは、光ファイバフェースプレート（FOFP）に結合されたCCD/CMOS検出器を含む。フィルタがFOFPの上に階層化され、標的に接触して又は隣接して配置され、ここでは標的はウェル基板120である。いくつかの実施形態では、図5Eに示すよう

50

に、フィルタは C C D の上に直接階層化（接合）され、その上に F O F P が配置されてもよい。

【 0 0 8 3 】

図 5 F は、別の例示的なセンサアセンブリの構成を示す。いくつかの実施形態では、この構成は、図 5 A ~ 図 5 C に示す構成のうちの 1 つ以上と共に使用されてもよい。ここでは C C D / C M O S 検出器は、フィルタが間に配置された二重レンズ構成に結合される。いくつかの実施形態では、フィルタは C C D / C M O S 検出器に接合されてもよい。

【 0 0 8 4 】

I I I . 使用方法

いくつかの実施形態では、試料流体が流体インレット 1 1 0 内に、及びインレット通路 1 2 8 を通して導入される。次に前置増幅チャンバ 1 1 6 が試料流体で充填されてもよい。前置増幅チャンバ 1 1 6 は、所望の化学反応を引き起こしてそれによりその中の流体を増幅する 1 つ以上の化学物質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、流体は、所望の反応が発生するまで前置増幅チャンバ 1 1 6 内に、前置増幅チャンバ出口 1 2 2 に達するがそれを越えることのないように維持されてもよい。流体は次に前置増幅チャンバ出口 1 2 2 を通過して、下向きに傾斜した中間通路 1 2 6 内に入る。流体は次にウェルチャンバ入口 1 2 4 を通ってウェルチャンバ 1 1 8 を充填する。いくつかの実施形態では、前置増幅チャンバ内での流体の増幅の後、流体は前置増幅チャンバから流体インレットを通して流体処理カートリッジ内の別個のチャンバ内に混合のために撤収され、次に流体インレットを通して戻されて前置増幅チャンバを通過し、ウェルチャンバに入る。ウェル基板 1 2 0 のウェルが次に、例えば図 4 A ~ 図 4 D ” に示す方法に従って充填されてもよい。ウェル基板 1 2 0 のウェルが充填されたら、流体はウェルチャンバ 1 1 8 から、アウトレット通路 1 3 0 を通して又はインレット通路 1 2 8 を逆に通して排出されてもよい。いくつかの実施形態では、熱サイクリングの間の蒸発を防止するために、充填されたウェル上に鉛油などのオイルがコーティングされてもよい。いくつかの実施形態では、5 ~ 2 0 p s i (訳注：3 4 . 4 7 ~ 1 3 7 . 9 k P a) の範囲の圧力がウェルチャンバ 1 1 8 に加えられる。従って、P C R 緩衝液及び任意の熱伝導性液体（オイル）は、P C R 液及び任意の乾燥したプライマーの再水和の間に発生する可能性がある小泡を保持するために圧力下に置かれる。この圧力の印加は、任意の発生した泡の不動化を引き起こし得、従って、移動する泡及び液体による光学干渉が発生しなくなる。いくつかの実施形態では、ウェルチャンバ 1 1 8 が 1 0 0 % の湿度を、又は熱サイクリングの間の過蒸発を防止するのに十分な湿度を有するように、蒸留水などの水和流体が前置増幅チャンバ 1 1 6 内で、又は補助チャンバ 1 3 2 のうちの 1 つの中で加熱されてもよい。充填が完了した後、P C R のための熱サイクリングを実行するために、ウェル基板 1 2 0 は、ハニカムチューブ 1 0 0 と熱的に接触している外部装置によって加熱されてもよい。いくつかの実施形態では、R F I D 、キュリー点、誘導、又はマイクロ波加熱などの非接触加熱方法が使用されてもよい。これら及びその他の非接触加熱方法は当業者に周知であり、本明細書内で開示されるハニカムチューブに容易に適用され得る。熱サイクリングの間、ハニカムチューブは、図 5 A ~ 図 5 E で説明したセンサ配置によって化学反応について監視されてもよい。

【 0 0 8 5 】

様々な生物学的アッセイが、ハニカムチューブ 1 0 0 を使用して、一般にテスト試料内の少なくとも 1 つの対象分析物の存在を示すという目的のために行われ得る。これらのアッセイとしては、以下に限定されないが、（抗体 - 抗原結合対、又は十分な相補性を有する 2 つのポリヌクレオチド配列などの）予め選択された分子対の間の特異的結合親和性に基づく結合アッセイ、特定の所定のヌクレオチド配列に基づく基準に依拠する核酸増幅反応、及び予め規定された活動の分子（酵素など）の存在を示す化学反応が含まれる。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、所定の配置においてハニカムチューブ内に沈着される分析剤又はプローブ、例えば「ベイト」タンパク質又は核酸は、基板表面の最小の構造的変更又は修正で固体基板の表面上に直接不動化される。言い換えると、薬剤又はプローブは表面

10

20

30

40

50

上に本質的に「スポットティング」され、2次元空間内に配置され閉じ込められる。いくつかの実施形態では、基板は、薬剤又はプローブを収容するための、所定の寸法の複数のウェル又はくぼみの配置を形成するように製造されてもよく、薬剤又はプローブはウェル又はくぼみ内に恒久的に不動化されるか、あるいはアッセイの持続時間にわたって一時的にウェル又はくぼみ内に閉じ込められてもよい。言い換えると、分析プローブは3次元空間内に閉じ込められる。

【0087】

ハニカムチューブの分析プローブとして働くのに好適な材料としては、タンパク質の選択肢（例えば抗体などの全長タンパク質、タンパク質フラグメント、又は短鎖ペプチド）、核酸（例えばDNA、RNA、マイクロRNA）、炭水化物、脂質、組織、細胞、又はほとんど全ての化学的性質の分子が含まれる。言い換えると、多重化アッセイのためのマイクロアレイを作るために使用されている任意の材料／分子は、本発明のハニカム検査チューブにおいて使用され得る。10

【0088】

I V . 対象分析物の検出

本発明の一態様は、少なくとも1つの対象分析物、例えば標的タンパク質（例えば特定の抗原性の抗体）、標的細胞、標的遺伝子、標的遺伝子配列、標的mRNA転写、又は標的核酸などが検査試料内に存在することを示す光信号の（図5A～図5Eのセンサ構成を使用した）監視に関する。そのような対象分析物（1つ又は複数）は、ウィルス性、細菌性、菌性、寄生性（例えば原生動物から）、動物、又はヒト由来など、任意の由来のものであってもよい。例えば、ウィルスタンパク質、ウィルス抗原に対する抗体、あるいは細菌又はウィルスゲノムに由来するDNA/RNA配列が、検査試料内で検出するための対象分析物であってもよい。例示的な非限定的な標的分析物としては、マイクロRNAなどの核酸配列、哺乳動物遺伝子、癌遺伝子内の（メチル化ステータスにおける様々なプロファイルを示す）様々な遺伝的突然変異体、対立遺伝子変異体、又は後成的変異などの、哺乳動物遺伝子の遺伝的変異体、癌抑制遺伝子、あるいは特定の病気又は症状と関連することが暗に示されてきた任意のその他の遺伝子が含まれ得、これらは本発明のハニカム検査チューブの適用における検出の焦点であり得る。例示的ウィルスであってその遺伝子及び／又はタンパク質が対象分析物であり得る例示的ウィルスとしては、以下に限定されないが、ヒト免疫不全ウィルス-1(HIV-1)、ヒトサイトメガロウィルス(CMV)、C型肝炎ウィルス(HCV)、B型肝炎ウィルス(HBV)、ヒト乳頭腫ウィルス(HPV)、エンテロウィルス、水痘-帯状疱疹ウィルス、ラビウイルス、ヘルペスウイルス、ノロウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、ペストウイルス、ピコルナウイルス、及びインフルエンザが含まれ得る。例示的細菌であってその遺伝子及び／又はタンパク質が対象分析物であり得る例示的細菌は、ヒト型結核菌(TB)、炭疽菌、レジュネラ・ニューモフィラ菌、リステリア菌、淋菌、トラコーマクラミジア、髄膜炎菌、黄色ブドウ球菌、ヘリコバクター・ピロリ、及び大便連鎖球菌である。対象となる可能性がある例示的ヒト遺伝子は、p53、BRCA1及びBRCA2、Her2/Neu及びその他のEGFRファミリーメンバー、BCR-ABL、PTEN、RAS、RAF、Src、RB、Myo、VEGF、トポイソメラーゼ、及びAPOE 4対立遺伝子である。203040

【0089】

様々な対象分析物を検出及び／又は定量化する基礎技術については、例えば、サムブルック(Sambrook)及びラッセル(Russell)の「分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」(第3版、2001年)、クリーグラー(Kriegler)の「遺伝子の導入と発現：実験室マニュアル(Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual)」(1990年)、オースベル(Ausubel)らの「分子生物学の現行プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」(1994年)、並びにハーロー(Harlow)の「分子生物学実験手帳(Handbook of Molecular Biology)」(1983年)等の書籍が公知されており、本発明の実施形態によれば、これらの技術を用いて対象分析物を検出する。50

arlow) 及びレーン (Lane) の「抗体、実験室マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)」(1988年)において見出すことができる。

【0090】

任意の特定の同一性のタンパク質の存在を検出する目的のために、免疫学的アッセイなどの、結合親和性に基づく様々なアッセイを使用することができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドに対する特異的結合親和性を有する(ハニカムフォーマットで所定のスポットに不動化された、又はハニカムの所定のウェル内に閉じ込められた)抗体を有する検査試料から標的タンパク質を捕捉することによって、サンドイッチアッセイフォーマットが実行されてもよい。タンパク質の存在は次に、蛍光発生分子などの、検出可能な標識にアタッチされる二次抗体を用いて示されてもよい。10

【0091】

対象核酸の存在を検出する目的のために、標的核酸配列に対して実質的に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む、かつワトソン - クリック型塩基対に基づいて標的配列にハイブリダイズすることが可能な、プローブ又は分子が一般に使用される。再び、プローブは固体基板の表面に所定の位置において不動化又はスポットティングされてもよく、又はいくつかの実施形態では、プローブは基板上の所定のパターン内の所定の位置におけるウェルに閉じ込められてもよい。例えば二本鎖であるか一本鎖であるかなどの、検出される標的ポリヌクレオチドの性質に応じて、検出プローブは、標的配列と実質的に配列が同一であるか、又は標的配列の相補的配列と実質的に配列が同一であってもよい。言い換えるとプローブは、標的ヌクレオチド配列に特異的に結合することが可能である。場合によっては、プローブは、標的ヌクレオチドに対する1つの結合セグメントと、非結合セグメントとを、非結合セグメントの存在が結合セグメントと標的核酸との間の特異的結合を妨げない限り含み得る。結合セグメントは一般に、標的配列の特異的認識を確実にするために、標的ポリヌクレオチド配列のいずれかの鎖に対して相補的である少なくとも8、多くの場合は少なくとも10、12、15、20、25、30、又はそれ以上の隣接ヌクレオチドを有する。プローブは、いくつかの実施形態では、例えば、フルオレセイン、ローダミン、テキサス赤、フィコエリトリン、ヒドロキシクマリン、アミノクマリン、カスケード青、パシフィックオレンジ、ルシファーイエロー、アロフィコシアニン、トゥルーレッド、フルオロX、又はランタニドのような蛍光又は発光分子などの、容易な検出のための発光部分を含む。20

【0092】

いくつかの実施形態では、特異的なポリヌクレオチド配列の存在を示すために様々な蛍光指示薬が使用される。いくつかの実施形態では、一般的な蛍光指示薬が使用される場合、融点に基づく検出方法が、特異的な標的ポリヌクレオチド配列の存在を検出するために有効であり得る。30

【0093】

ハニカムチューブ内に提供される分析剤への、分析物の結合親和性に直接に基づいて対象分析物の検出が行われる結合アッセイフォーマットに加えて、対象核酸の検出及び/又は定量化のための増幅に基づくアッセイシステムが、広範囲の用途を提供する。この増幅に基づくシステムでは、配列特異的な増幅反応が完了したら、1つ以上の対象核酸が検出及び/又は定量化される。更に、増幅に基づく方法によって対象核酸を検出する目的のために、複数セットのプライマーが各ウェル内に、ネステッドPCRフォーマットで実施される検出を可能にするために含まれてもよく、例えば、第1のセットのプライマーが標的配列の一部を規定し、1つ以上の後続のセットのプライマーによる更なるアンプリケーションを可能にするアンプリコンを生成してもよい。40

【0094】

いくつかの実施形態では、対象核酸はDNA分子である。ハニカムフォーマットの各ウェル内に少なくとも1セットのプライマー、遊離ヌクレオチド、及び適切なDNA又はRNAポリメラーゼを提供し、次にハニカムチューブを適切な温度に適切な持続時間だけさ50

らして任意の標的ポリヌクレオチド配列の合成及び増幅を達成することによって、配列特異的な増幅が実行される。

【0095】

各プライマーは一般に、塩基対によってポリヌクレオチド錆型と二重鎖を形成したら核酸合成の開始点として機能し得、伸長された二重鎖が形成されるようにその3'末端から錆型に沿って伸長され得る、オリゴヌクレオチド（天然又は合成のいずれであってもよい）である。プライマーの伸長は通常、DNA又はRNAポリメラーゼなどの核酸ポリメラーゼを用いて実施される。伸長プロセスにおいて追加されるヌクレオチドの配列は、錆型ポリヌクレオチドの配列によって決定される。ほとんどの実施形態において、プライマーはDNAポリメラーゼによって伸長される。多くの場合、プライマーは6～40ヌクレオチドの範囲の、一般には約12～約20ヌクレオチドの範囲の長さを有する。プライマーは、例えば単一のプライマーを用いる直鎖増幅反応、又は2つ以上のプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの、様々な核酸増幅反応において使用される。特定の用途のためのプライマーの長さ及び配列の選択の指針は当業者に周知であり、例えば、ディーフエンバッハ（Dieffenbach）編「PCRプライマー：実験室マニュアル（PCR Primer: A Laboratory Manual）」（第2版、Cold Spring Harbor Press、ニューヨーク、2003年）を参照されたい。10

【0096】

PCRなどの核酸増幅反応の文脈において、標的ポリヌクレオチド配列の増幅生成物は「アンプリコン」と呼ばれる。アンプリコンは、プライマー伸長によってたらされるポリヌクレオチドの集団であり、通常は二重鎖ポリヌクレオチドの形態である。アンプリコンは様々な増幅反応によって生成され得、増幅反応の生成物は、1つ以上の標的核酸の複数ラウンドの増幅後の複製物である。一般に、アンプリコンを生成する増幅反応は、反応物の塩基対形成における錆型駆動（template-driven）であり、ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドプライマーの両方が錆型ポリヌクレオチド又は標的ポリヌクレオチド配列内に相補体を有する。そのような相補性は、反応生成物又はアンプリコンの生成のために必要とされる。場合によっては、錆型駆動の反応は、核酸ポリメラーゼを用いたプライマー伸長、又は核酸リガーゼを用いたオリゴヌクレオチドライゲーションである。そのような反応としては、以下に限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、線状ポリメラーゼ反応、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換反応（SDA）、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、ローリングサークル増幅などが含まれ、例えば、マリス（Mullis）らの米国特許第4,683,195号明細書、米国特許第4,965,188号明細書、米国特許第4,683,202号明細書、及び米国特許第4,800,159号明細書（PCR）、ゲルファンド（Gelfand）らの米国特許第5,210,015号明細書（TaqManプローブを使用したリアルタイムPCR）、ウィットワー（Wittwer）らの米国特許第6,174,670号明細書、ランデグレン（Landegren）らの米国特許第4,988,617号明細書（LCR）、バーケンマイヤー（Birkenmeyer）らの米国特許第5,427,930号明細書（ギャップLCR）、カシイアン（Kaciain）らの米国特許第5,399,491号明細書（NASBA）、ウォーカー（Walker）の米国特許第5,648,211号明細書及び米国特許第5,712,124号明細書（SDA）、リザーディ（Lizardi）の米国特許第5,854,033号明細書、青野（Aono）らの特開平4-262799号公報（ローリングサークル増幅）などを参照されたい。いくつかの実施形態では、1つ以上の標的核酸のアンプリコンは、本発明のハニカムチューブ内で実行される1ラウンド以上のPCR、例えばネステッドPCRによって生成される。3040

【0097】

ポリメラーゼ連鎖反応すなわちPCRは、同時、複数ラウンドの、DNAの相補的鎖のプライマー伸長による、特異的なDNA配列のインピトロ増幅のための酵素媒介反応である。言い換えるとPCRは、プライマー結合部位によって隣接される標的核酸の複数のコ50

ピーや複製物を作るための反応であり、そのような反応は、(i) 標的核酸を変性させる工程と、(ii) プライマー結合部位にプライマーをアニーリングする工程と、(iii) ヌクレオシド三リン酸の存在下で核酸ポリメラーゼによってプライマーを伸長させる工程とを1回以上繰り返すことを含む。反応では一般に、変性、アニーリング、及び伸長の各工程のために最適化された異なる温度が繰り返される。各工程における特定の温度、持続時間、及び工程間の変化速度は、当業者に周知の多くの要因に依存し、例えば、マクファーソン (McPherson) ら編「PCR : A Practical Approach」及び「PCR2 : A Practical Approach」(IRL Press, Oxford、それぞれ1991年及び1995年) を参照されたい。
10 例えれば、Taq DNAポリメラーゼを使用する従来のPCRでは、二重鎖標的核酸が90を超える温度で変性され、プライマーが50～75 の範囲内の温度でアニーリングされ、プライマーが72～78 の範囲内の温度で伸長され得る。

【0098】

用語「PCR」は、以下に限定されないが、逆転写(RT)-PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、定量PCR、多重PCR、及びその他の同様の変種を含む派生形態の反応を包含する。これらの様々なPCRアッセイについて、一般的な反応容積は、ナノリットル、例えば約0.1～約500nLから、マイクロリットル、例えば約1～約5μLまでの範囲であってもよく、かつ本発明のハニカム検査チューブのウェル内に容易に含まれ得、従って迅速な多重化分析を可能にするものであってもよい。いくつかの非限定的な例示的実施形態では、ハニカムチューブの各ウェル内の反応容積は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、及び100nLである。
20

【0099】

逆転写PCRすなわちRT-PCRは、試料内のRNAの検出及び分析のため特に強力なツールである。RT-PCRは、先行する逆転移反応によって標的RNAが相補的一本鎖DNAに変換され、これが次に通常のPCRプロセスにおいて増幅されるPCRであり、例えば、テコット(Tecott)らの米国特許第5,168,038号明細書を参照されたい。
30

【0100】

リアルタイムPCRは、反応生成物すなわちアンプリコンの量が、反応が進行するのと同時に監視されるPCRプロセスである。反応生成物(1つ又は複数)の監視のために使用される検出手段が主として異なる多くの形態のリアルタイムPCRが存在し、例えば、ゲルファンド(Gel fand)らの米国特許第5,210,015号明細書(TaqManプローブ)、ウィットワー(Wittwer)らの米国特許第6,174,670号明細書及び米国特許第6,569,627号明細書(インターラーティング色素)、タイアギ(Tyagi)らの米国特許第5,925,517号明細書(分子ビーコン)を参照されたい。リアルタイムPCRのための検出用化学物質については、マッケイ(Mackay)ら(Nucleic Acids Research, 30:1292～1305、2002年)において概説されている。
40

【0101】

ネステッドPCRは、第1のセットのプライマーを使用する第1段階のPCRのアンプリコンが、第2のセットのプライマーを使用する第2段階のPCRのための鑄型となる、少なくとも2段階の増幅を含むPCRプロセスである。第2のセットのプライマーのうちの少なくとも1つのプライマーは、第1のセットの2つのプライマーのハイブリダイゼーション部位の間の位置において、すなわち第1段階のPCRのアンプリコンの配列内の位置において、標的ポリヌクレオチド配列に対する配列相補性を有し、これにハイブリダイズすることが可能である。
50

【0102】

多重PCRは、複数の潜在的標的ポリヌクレオチド配列の増幅が、同じ反応混合物中で同時に実施されるPCRプロセスであり、例えば、バーナード(Bernard)ら(Anal. Biochem., 273: 221~228, 1999年)(2色リアルタイムPCR)を参照されたい。本発明のハニカムアッセイフォーマットは多重PCRを実施するのに好適である。特異的なセットのプライマーが、特異的な標的ポリヌクレオチド配列の増幅及び検出を目的とするウェル内に含まれる。一般に、同じプライマーを含む多数の反復ウェルが重複ウェルとしてハニカムウェル配置内に存在する。例えば、非限定的な例示的実施形態において、1つの全体的なハニカムウェル配置は、様々な予め作られた反応混合物であってそれぞれが合計で最大8、16、25、50、又は更には100の異なるセットのプライマーから選択される特異的なプライマーセットを含む反応混合物を、特異的なセットのプライマーを含む各反応混合物のために設けられる8レプリケートウェルのクラスタを用いて含み得る。

【0103】

定量PCRは、試料内の1つ以上の特異的な標的配列の存在量を測定することを可能にするPCRプロセスである。定量PCRは、標的配列の絶対的定量化及び相対的定量化の両方の測定を含み得る。定量測定は、標的配列と別個に又は一緒にアッセイされてもよい1つ以上の基準配列を使用して行われる。基準配列は試料に対して内在性(天然に存在する)又は外来性(人工的に追加される)であってもよく、後者の場合は1つ以上の競合錆型を含み得る。一般的な内在性基準配列としては、¹-アクチン、GAPDH、²ミクログロブリン、リボソマルRNAなどの遺伝子の転写物のセグメントが含まれる。定量PCRのための技法は当業者に周知であり、例えば、フリーマン(Freeman)ら(Bio techniques, 26: 112~126, 1999年)、ベッカー・アンドレ(Becker-Andre)ら(Nucleic Acids Research, 17: 9437~9447, 1989年)、ツインマーマン(Zimmerman)ら(Bio techniques, 21: 268~279, 1996年)、ディヴィアッコ(Diviacco)ら(Gene, 122: 3013~3020, 1992年)、ベッカ--アンドレ(Becker-Andre)ら(Nucleic Acids Research, 17: 9437~9446, 1989年)を参照されたい。

【0104】

増幅反応の進行と同時に反応生成物が測定されることを可能にする検出機構、例えば、上述のリアルタイムPCR、又は例えばレオーネ(Leone)ら(Nucleic Acids Research, 26: 2150~2155, 1998年)に記載のリアルタイムNASBAが存在する場合、増幅反応は「リアルタイム」増幅であり得る。本明細書中で使用される場合、用語「増幅する」は、増幅反応を実行することを意味する。「反応混合物」は、反応を行うために必要な全ての反応物を含む溶液(又はそのような溶液の凍結乾燥されたバージョン)であり、そのような反応物としては、以下に限定されないが、緩衝剤、塩、補因子、スカベンジャーなどが含まれ得る。いくつかの実施形態では、乾燥された試薬がハニカムチュープのウェル内に、製造プロセス中に沈着される。いくつかの実施形態では、乾燥された試薬は、1つ以上の標的ポリヌクレオチド配列、ヌクレオシド三リン酸、酵素(1つ又は複数)、及び/又は1つ以上のアンプリコンの存在及び/又は量を示す検出部分を増幅するための、少なくとも1セットのプライマーを含む。いくつかの実施形態では、検出部分は蛍光指示薬である。リアルタイムPCRにおけるアンプリコンの検出又は定量化は多くの場合、TaqMan(登録商標)プローブ、分子ビーコンプローブ、又はスコーピオンプローブなどの、蛍光共鳴エネルギー移動プローブすなわちFRETプローブの使用を含む。

【0105】

本明細書中で使用される場合、蛍光指示薬は、増幅反応の生成物(1つ又は複数)(すなわちアンプリコン)の存在下で蛍光シグナルを生成することが可能な分子(例えば色素又はプローブ)であり、これにより、少なくとも所定の範囲のアンプリコン濃度にわたつ

10

20

30

40

50

て、反応混合物中にアンブリコンが蓄積するにつれて蛍光指示薬のシグナルが増加する。

【0106】

いくつかのタイプの蛍光指示薬が、本発明のハニカムチューブ内で行われる增幅反応において使用されてもよく、第1に、蛍光色素が使用されてもよい。このクラスの好適な色素は、例えばエチジウムプロマイド、SYBRグリーンI及びII、SYBRゴールド、YO(オキサゾールイエロー)、TO(チアゾールオレンジ)、及びPG(ピコグリーン)などの、二本鎖DNA生成物に結合するインターハーティング色素のような、アンブリコンのポリヌクレオチド配列に関して非特異的なものであり、例えば、イシグロ(ISHIGURO)ら(Anal. Biochem.、229:207~213、1995年)、ツェン(TEENG)ら(Anal. Biochem.、245:207~212、1997年)、モリソン(Morrison)ら(Biotechniques、24:954~962、1998年)を参照されたい。本発明と共に使用するのに好適な追加の蛍光指示薬は当業者に周知である。10

【0107】

第2に、場合によっては、1つ以上のプライマーは、蛍光分子が蛍光クエンチャーに近接して保持され、これにより、プライマー伸長によってヘアピン構造が強制的に離されるまでクエンチャーによって蛍光が消光される、ヘアピン構造を有するように設計されてもよく、例えば、ウィットコーム(Whitecombe)ら(Nature Biotechnology、17:804~807、1999年)(Amplifluor(商標)プライマー)を参照されたい。好適な蛍光分子としては、前述のものが含まれる。20

【0108】

第3に、蛍光指示薬はまた、標的核酸のポリヌクレオチド配列に特異的であってもよい。このタイプの指示薬はしばしば蛍光プローブと呼ばれ、通常、蛍光部分と蛍光クエンチャーとを、それらがアタッチされるオリゴヌクレオチド部分が増幅生成物に特異的に結合するまでは近接して含み、例えば、ゲルファンド(Gel f and)らの米国特許第5,210,015号明細書(TaqManプローブ)、ナザレンコ(Nazarenko)ら(Nucleic Acids Research、25:2516~2521、1997年)スコーピオンプローブ)、タイアギ(Tyagi)ら(Nature Biotechnology、16:49~53、1998年)(分子ビーコン)を参照されたい。蛍光指示薬は、リアルタイムPCRに関連して使用されてもよく、又はそれらは反応の完了時に反応生成物の総量を測定するために使用されてもよい。様々な分子ビーコン及びその他のヘアピンプローブの概説については、ブルード(Broude)の「Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics」(2005年、846~851ページ)を参照されたい。30

【0109】

一般に、本発明のハニカムチューブ内で行われる各反応について、その性質が結合親和性に基づくものであるか又は増幅に基づくものであるかに関係なく、少なくとも1つのポジティブコントロール及び少なくとも1つのネガティブコントロールが存在し、従ってこれらのコントロールによって正常な反応の確立がもたらされ、すなわち、ポジティブシグナルが検出されてもシステム全体の汚染によるものではなく、ネガティブシグナルが検出されてもアッセイシステムの障害によるものではない。いくつかの実施形態では、内部標準が含まれ得る。内部標準は、同じ反応に関与する既知の分子であり、例えば、試料内の標的分析物の定量化(相対的定量化又は絶対的定量化のいずれか)を可能にするために、標的ポリヌクレオチドと同じ増幅反応において増幅される核酸配列である。内部標準は、内在性、すなわち試料内に予め存在することが知られているものであってもよく、又は外来性、すなわち検査に先立って追加されるものであってもよい。40

【0110】

V. 反応条件に対応するための分析剤の設計

本発明のハニカムチューブ内で実行される多重化アッセイは一般に、ほぼ同じ条件でほぼ同時に実施されるため、ハニカムチューブの各スポット上又は各ウェル内に置かれる分50

析剤は、所定の反応パラメータのセットの下で最適又は概最適な反応結果を達成するためには慎重に設計されなければならない。一例では、配列相補性に基づくハイブリダイゼーションによって試料内の8つの特異的な標的核酸を検出するために、8つの異なるポリヌクレオチドプローブが基板表面上にスポットティング又は不動化される。特定のアッセイのための所定の反応パラメータの範囲内に入るように各標的プローブ配列を設計及び最適化することは、十分に当業者の技能の範囲内である。プローブの設計及び最適化における非限定的なパラメータとしては、特定のアッセイのための所与の反応条件下でプローブとその標的との間の特異的なハイブリダイゼーションをもたらすプローブの長さ、標的配列内の相対位置、及びG C含量が含まれる。

【0111】

10

別の例では、8つの異なる標的ポリヌクレオチド配列の増幅を目的とする8セットの異なる反応混合物が、4パッチフォーマットで配置され、各パッチは各反応混合物の8つのレプリケートスポットを含む。これらの8セットの異なる反応混合物のそれぞれは、特異的な標的配列の増幅のための少なくとも1セットのオリゴヌクレオチドプライマーを含む。これらの8つのセットのプライマーは、変性、アニーリング、及び伸長の工程が、8つの異なる標的配列について同じ温度下でかつ同じ時間フレーム内で全て適切に完了し得るように設計されてもよい。

【0112】

当業者は、プローブ又はプライマーの長さ、G C含量を調節することによって、必要な設計を達成することができる。場合によっては、天然に存在するヌクレオチドを、修正された又は人口のヌクレオチドで置換することが、プローブ及びプライマーのアニーリング/変性挙動を更に微調整するのに効果的である。例えば、ルコント(Leconte)ら(J. Am. Chem. Soc. 2008年; 130(7): 2336~2343)、米国特許第8,268,978号明細書を参照されたい。いくつかの既知の類似体としては、1-メチルアデニン、1-メチルイノシン、1-メチルブソイドウラシル、1-メチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、2-チオシトシン、2-チオシトシン、2-チオウラシル、2,2-ジメチルグアニン、2,6-ジアミノプリン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、3-メチルシトシン、4-アセチルシトシン、4-チオウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、5-フルオロウラシル、5-メチルシトシン、5-メトキシウラシル、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メチルウラシル、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、7-メチルグアニン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、-D-マンノシルケオシン、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、N6-メチルアデニン、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、オキシブトキソシン、ブソイドイシトシン、ブソイドウラシル、ブソイドウラシル、ケオシン、ウラシル-5-オキシ酢酸、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、及びウラシル-5-オキシ酢酸などが含まれる。多くのヌクレオチド類似体が、シグマ(SIGMA)及びアプライドバイオシステムズ(APPLIED BIOSYSTEMS)などの供給業者を通して市販されている。

【0113】

20

図6は、複数のチャンバ13を有するハウジング12を含む流体制御及び処理カートリッジ10を示す。内部に位置する流体制御装置(図示せず)、及びハニカムチューブ100は、ハウジング12の異なる部分に接続される。カートリッジ10は、流体インタフェース108と流体的に結合することによって、試料流体及びその他の流体を必要に応じてハニカムチューブに提供する。一般に、ハニカムチューブを含むカートリッジは、米国カリフォルニア州サンニーベール(Sunnyvale, California, U.S.A.)のセフィエド(Ceph�d)(登録商標)によるジーンエキスパート(Gene Expert)(登録商標)システム内で使用される。いくつかの実施形態では、ハニカム

30

40

50

チューブを含むカートリッジは、参照によって援用され付録Aの一部として本明細書に添付される米国特許出願第61/639820号明細書において開示されたヘテロジナスシステム(heterogenous system)の1つ以上のモジュール内で使用される。システム10及び使用法の追加の詳細は、米国特許第8,048,386号明細書、米国特許第8,187,557号明細書、米国特許第8,119,352号明細書、及び米国特許出願公開第2008-0038737号明細書に記載されており、当該特許及び特許出願公開のそれぞれは参照によって本明細書中に援用され付録Aとして本明細書に添付される。

【0114】

V I . 実施例

10

実施例は、限定のためではなく、例示のみのために提供される。当業者は、本質的に同じ又は類似した結果をもたらすために変更又は修正され得る様々な非重要なパラメータを容易に認識するであろう。

【0115】

実施例1：コドン12及び13におけるK-Ras SNPの分析

ジーンエキスパート(GeneExpert)カートリッジ反応チューブを使用して、この一塩基多型分析において、8プローブ、8レプリケート、4パッチフォーマットがセットアップされた。具体的には、全体のプローブ配置は、反応チューブのフレームの一方の側を囲む薄膜である固体基板の表面上の8×8の所定のスポットの4パッチからなった。各パッチ内に、特異的なヌクレオチド配列の8つのヌクレオチドプローブのそれぞれが沈着され(チューブ内に合計256スポット、スポット当たりの直径100μm、スポット密度は50μM(50μmol/L)、及びスポット容量は0.5nL)、8つの予め選択されたスポットのクラスタに不動化され、結果として各特異的なプローブについて8つのレプリケートスポットがもたらされた。

20

【0116】

8つのオリゴヌクレオチドプローブのそれぞれはそのヌクレオチド配列において、1つのバージョンのK-Ras配列のみとハイブリダイズするように設計された。この特定の研究において、1つのプローブは、コドン12及び13を囲む野生型(WT)K-Ras配列とハイブリダイズするように設計され、1つのプローブは12Val突然変異体とハイブリダイズするように、1つのプローブは12Asp突然変異体とハイブリダイズするように、1つのプローブは12Arg突然変異体とハイブリダイズするように、1つのプローブは12Cys突然変異体とハイブリダイズするように、1つのプローブは12Ser突然変異体とハイブリダイズするように、1つのプローブは13Asp突然変異体とハイブリダイズするように設計された。固体基板上の8プローブ配置を図7に示し、プローブ配列を表1に示す。表2はプローブの融解温度を示す。

30

【表2】

表1：KRASプローブ配列

オリゴ名	オリゴ配列*(5'→3')	3'-Mod
KRAS WT ArryPrb1	CGCCACCAGCTCCAAC(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino
KRAS 12ARG ArryPrb1	CGCCACGAGCTCCAAC(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino
KRAS 12ASP ArryPrb1	CGCCATCAGCTCCAACT(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino
KRAS 12VAL ArryPrb1	CGCCAACAGCTCCAACT(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino
KRAS 12CYS ArryPrb1	CGCCACAAGCTCCAACT(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino
KRAS 12SER ArryPrb1	CGCCACTAGCTCCAACT(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino
KRAS 12ALA ArryPrb1	CGCCAGCAGCTCCAAC(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino
KRAS 13ASP ArryPrb1	CGTCACCAGCTCCAACT(S18)(S18)(S18)(S18)	Amino

40

【表3】

表2 : KRASプローブTm (VissualOmp)

	プローブ配列							
	WT	12ASP	12VAL	12CYS	12SER	12ALA	12ARG	13ASP
WT	62.2	57.9	58.9	55.8	57.0	58.1	54.3	57.2
12ASP	52.9	61.3	55.4	48.1	49.0	56.5	44.9	46.0
12VAL	52.1	54.0	61.5	47.5	48.9	55.2	44.2	45.5
12CYS	51.8	49.0	47.5	61.5	55.3	44.6	55.3	45.7
12SER	51.3	48.4	47.6	55.0	60.4	44.8	53.7	45.0
12ALA	50.3	54.3	54.3	47.3	47.2	62.8	43.9	42.2
12ARG	51.3	49.0	47.3	53.2	53.8	44.5	62.4	44.9
13ASP	50.8	44.6	46.2	42.6	44.3	45.1	40.3	60.4

10

【0117】

基板表面上にプローブを不動化するために、表面は最初に水酸化プロセスによって浄化され、これにより、約60°の接触角において表面エネルギーが38dyn/cm（訳注： 38×10^{-3} N/m）以上となり、表面反応性及び湿潤性が後続の機能化のために向上された。

【0118】

機能化プロセスには、グリシドキシプロピルトリメトキシランを前駆体として使用してグリシジル（glycidal）（エポキシ）基を基板表面に導入することが含まれた。スポットティングプロセスの間に、官能基とオリゴヌクレオチドプローブとの間に、その3'末端において共有結合が確立された。

20

【0119】

薄膜基板の機能化及びプローブのスポットティングの後、スポットティングされたプローブアレイを含む反応チューブは、フレームの、機能化された固体基板の側とは反対側上に第2の薄膜を配置することによって封止された。図7に示すような8プローブフォーマットを含む封止された反応チューブは次に、流体試料で充填され、基板表面上の全てのスポットが完全に浸漬された。試料内に存在するKRAS配列のコドン12/13 SNP分析は、非対称TaqMan増幅反応から開始され、これは、SNP領域にまたがるKRAS配列とハイブリダイズする、CF4標識の正行プライマーと非標識の逆行プライマーとを含むものであった。反応混合物にはまた、(1)CF5で標識された、かつPCRの進行を示す目的のために正行及び逆行プライマーの間にKRAS配列のセグメントに対応する配列を含む、TaqManプローブ、及び(2)WTアンプリコンを抑止する目的のための非標識のブロックメルト(BlockMelt)プローブも含まれていた。

30

【0120】

この特定の研究において、PCRプロセス及び後続のハイブリダイゼーションプロセスのために、反応チャンバの一方の側上で加熱/冷却が提供された。正行プライマー(5' CF4)は1000nM（訳注：1000nmol/L）の濃度において使用された。逆行プライマーは100nM（訳注：100nmol/L）の濃度において使用された。TaqManプローブ(5' CF5)は50nM（訳注：50nmol/L）の濃度において使用された。 \pm K-Ras WTブロックカープローブ、非標識、は100nM（訳注：100nmol/L）の濃度において使用された。60サイクルのPCRの後、反応チャンバの温度は、プローブ-アンプリコンハイブリダイゼーションのために、PCR溶出緩衝液(トリス緩衝液pH8)内で1~2時間にわたって約54℃に設定された。反応チャンバは次に、非特異的な残留CF4信号を除去するために、洗浄緩衝液(チューブウォッシュアレイイット(Tube Wash Array It)の「ウォッシュバッファ2(Wash Buffer 2)」)を用いて少なくとも1回、最大5回洗浄された。

40

【0121】

K-Ras WT細胞系(ホモ接合性正常)、K-Ras CCL細胞(ヘテロ接合性)、及びブロックされたK-Ras CCL細胞(ホモ接合性突然変異体)という3つの異なる試料が分析された。図8は、60サイクルのPCRの間の蛍光シグナル曲線を示す

50

。図9A～図9Cは、WT、ヘテロ接合性13Asp突然変異体、及びホモ接合性13Asp突然変異体細胞試料からの予想結果を示す。図10A～図10Cは、試料からの実際の結果を示す。全体のプローブスポットティングパターンの包括的な図を図11に示す。図12は、励起に続いて内蔵顕微鏡下で見た全体のプローブスポットティングパターンの包括的な図を示す。

【0122】

実施例2：乾燥したウェル内への試薬の装填

この研究において使用されたハニカムチューブ100は射出成形によって作成された。部品は、PCR領域内の1つの支持するウェル基板120と共に成形される。ナノウェルが、193nmにおけるエキシマレーザ穿孔によって作成された。この研究で使用されたナノウェルの寸法は、直径150μm、深さ約150μm、ピッチ間隔250μmである。これらのウェルは止まり穴であり、最大2.6nLを保持可能である。

【0123】

図3Aに示すように、次に、アレイイット(Array It)（登録商標）によるナノプリント(Nano Print)（登録商標）をマイクロスポットティングピン（ピンの先端における直径が100μmのモデル番号#946MP3）と共に使用することによって、緑色の食用色素がプリントされた。ピンからの各滴下は0.7nLの容積を有する。ナノプリント(Nano Print)（登録商標）はアレイイット(Array It)（登録商標）による商用化されたマイクロアレイプリンタであり、様々なピッチ間隔のためにプログラム可能であり、946MP3を使用する場合は0.7nLの倍数の液体量を供給することが可能である。選択するためのピンの品揃えが存在する。最も小さいマイクロスポットティングピンは、滴下当たりわずか0.35nLを供給することが可能である。実際の場合、緑色の食用色素はPCRプロセスのための、プライマーセットとなるか又は酵素を有するプライマーセットとなる。各個々のナノウェルは、PCRプロセスの間に増幅されるべき特定の核酸標的のための異なるプライマーセットを有し得る。スポットティングの後、保存の目的のためにフリーズドライ又は凍結乾燥プロセスが行われ得た。

【0124】

実施例3：試料の充填及び封止のための不連続ディウェッティング

この実施例（及び実施例4）において使用されるハニカムチューブ100はポリプロピレンから構成された。ハニカムチューブ100は、PCR領域内の1つの支持するウェル基板120と共に成形される。複数のナノウェルが、193nmの波長におけるエキシマレーザを使用して作成された。この実施例において使用されたナノウェルの寸法は、直径150μm、深さ約250μm、ピッチ間隔250μmである。これらのウェルは貫通穴であり、最大4.4ナノリットルを保持可能である。ハニカムチューブ100は次に、チューブの両側においてポリプロピレン膜によって封止された。各個々のウェルは封止されず、PCRのためのダイヤモンド領域全体（25μLの領域）が封止された。ハニカムチューブ100は、図6に示すカートリッジ10に結合された。

【0125】

ポリプロピレンの疎水性のため、ポリプロピレン表面上のウェッティングを向上させるためにPCR緩衝液（50mM（訳注：50mmol/L）トリス、pH8.6）が最初に界面活性剤（0.1%ツイーン）と混合された。少量の黄色の食用色素が、視覚化を向上させるためにPCR緩衝液内に滴下された。このPCR緩衝液は次に、図6に示すカートリッジ10内のチャンバ13のうちの1つの中に追加された。鉱油（CAS#8042-47-5）が別のチャンバ内に追加された。カートリッジ10を制御してハニカムチューブ100の液体充填を駆動するために、セフィエド(Cephaid)（登録商標）による市販のジーンエキスパート(GeneXpert)（登録商標）システムが使用された。

【0126】

ジーンエキスパート(GeneXpert)（登録商標）システムは、流体チャネルを通してウェルチャンバ118内に、1μL/秒の割合でPCR緩衝液を供給するようにブ

10

20

30

40

50

ログラムされた。PCR緩衝液はウェルチャンバ118内の各ナノウェルを充填し、いくらかの過剰なPCR緩衝液は上部流体チャネルを介して出た。ハニカムチューブ100のPCRチャンバが充填された後、チューブ100内のPCR緩衝液は次に、ウェルチャンバの底部から流体チャネル内に5μL/秒の割合で排出された。緩衝液は、上部流体チャネルからインレット通路128（最低部の流体チャネル）内に引き戻された。排出の後、毛管力によって各個々のナノウェル内にPCR緩衝液が残った。排出手順にもかかわらず、各ナノウェル内のPCR緩衝液は流出しなかった。PCR緩衝液がインレット通路128を介して完全に排出された後、鉛油がウェルチャンバ118内に1μL/秒で導入された。図4Eに示すように、封止膜とナノウェルを有するポリプロピレン基板との間のギャップは鉛油によって充填された。

10

【0127】

実施例4：試料の充填及び封止のための連続ウェッティング

実施例3におけるのと同じハニカムチューブ100を使用し、実施例3において説明した不連続ディウェッティング方法を使用して、ナノウェルはPCR緩衝液で充填された。しかし個々のナノウェルがPCR緩衝液によって充填された後、（実施例3におけるようにPCR緩衝液を排出する代わりに）PCRチャンバの充填を継続するために鉛油がインレット通路128からハニカムチューブのウェルチャンバ118内に5μL/秒で導入された。ナノウェルの上で、鉛油が、ウェルチャンバ118内の（すなわちポリプロピレン基板と上部封止膜との間の）PCR緩衝液に取って代わった。この方法は、2つの液体が連続的に表面を湿潤させるため、「連続ウェッティング」と呼ばれる。第1の液体（PCR緩衝液）は表面を湿潤させ、ナノウェルを充填する。第2の液体（鉛油）は表面を連続的に湿潤させるが、各ナノウェル「内」は充填せず、なぜなら表面張力と毛管力とが第1の水性液体をナノウェル内に保持するからである。

20

【0128】

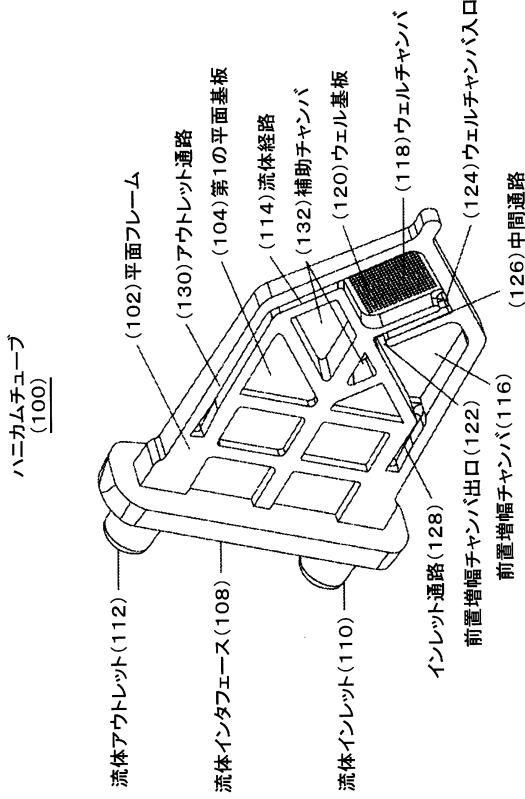
実施例3及び実施例4において使用される両方の方法で、所望のPCR緩衝液がナノウェル内に正常に導入され、鉛油を使用して各個々のナノウェル内のPCR緩衝液が隔離された。鉛油キャップは、ナノウェル内の水性液体が熱サイクリングプロセスの間に蒸発するのを防止できるという更なる利点を有する。

【0129】

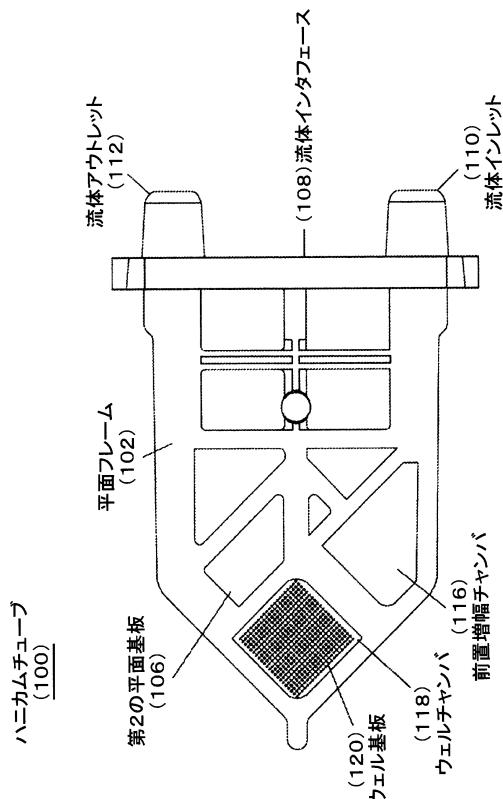
GenBankアクセション番号を含む、本出願において引用された全ての特許、特許出願、及びその他の出版物は、参照によってその全体が全ての目的のために援用される。

30

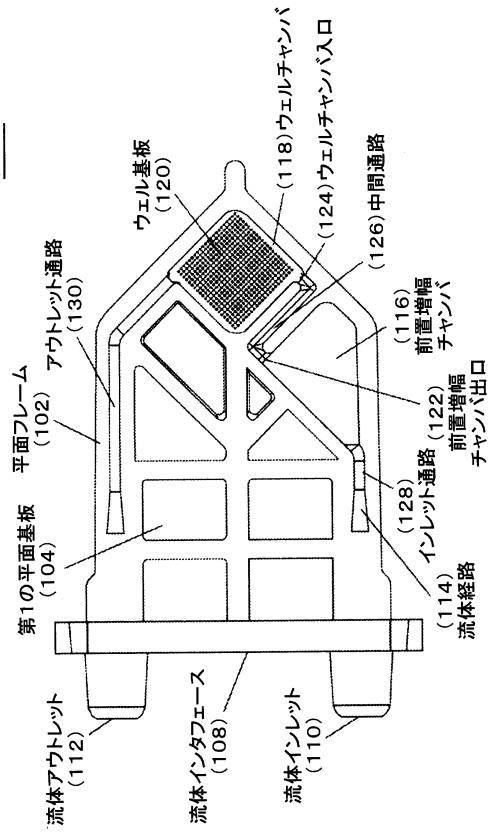
【図 1 A】



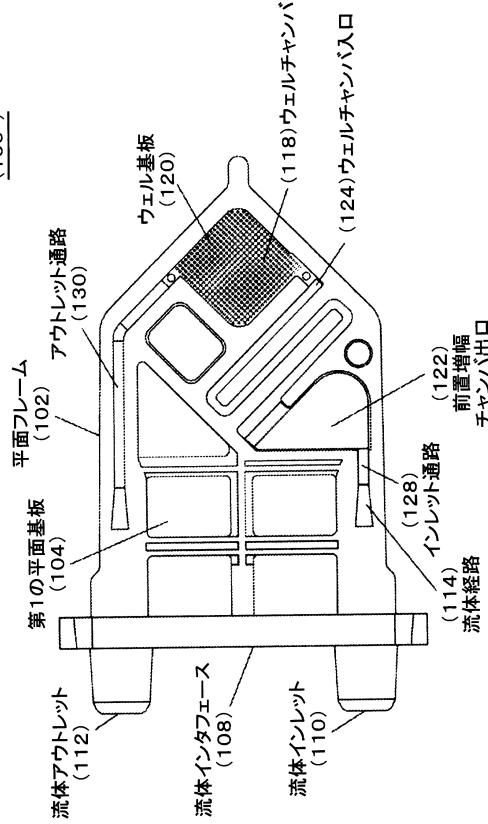
【図1C】



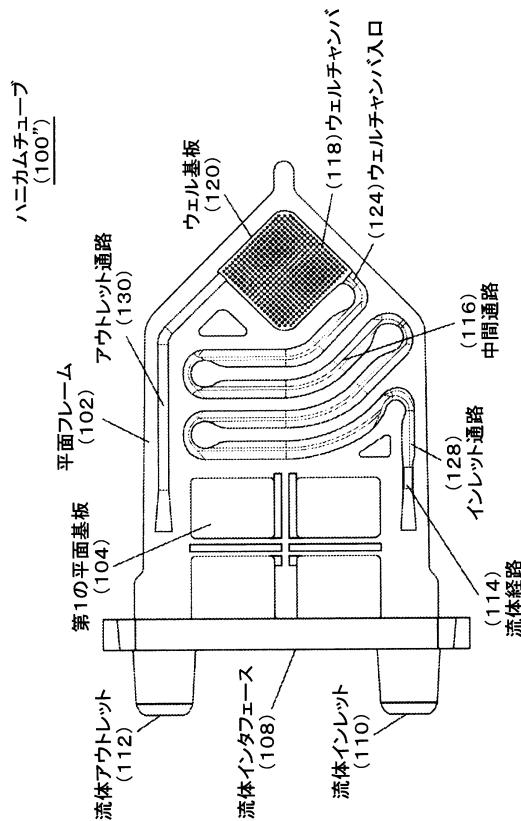
【 図 1 B 】



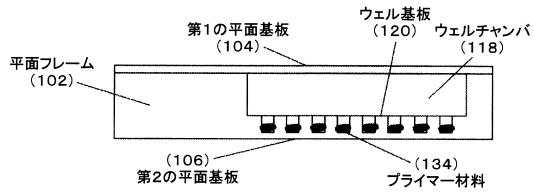
【図1D】



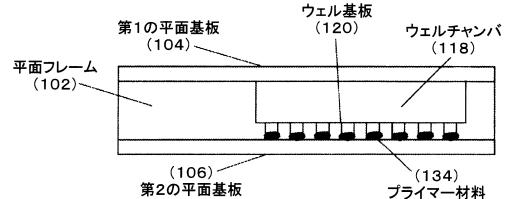
【図1E】



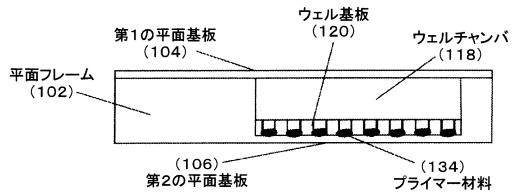
【図2A】



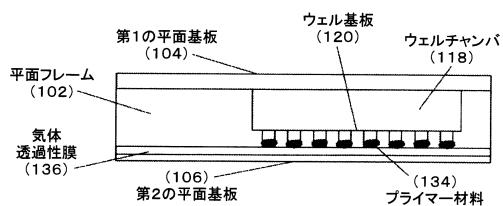
【図2B】



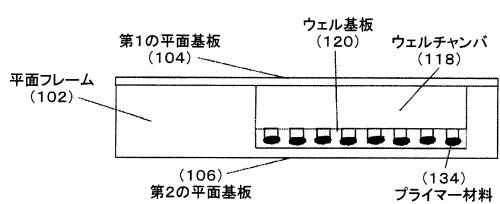
【図2C】



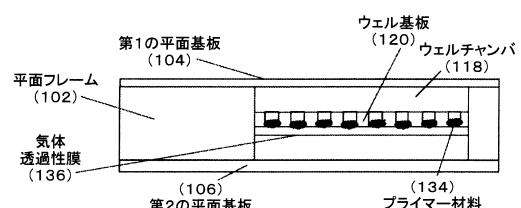
【図2D】



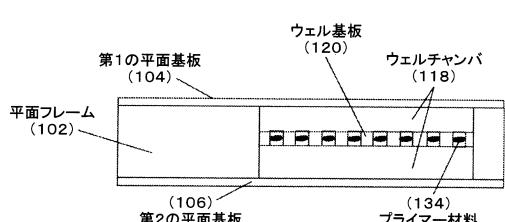
【図2E】



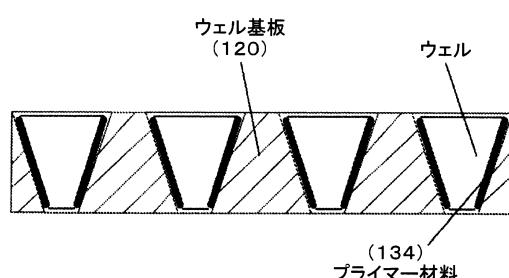
【図2F】



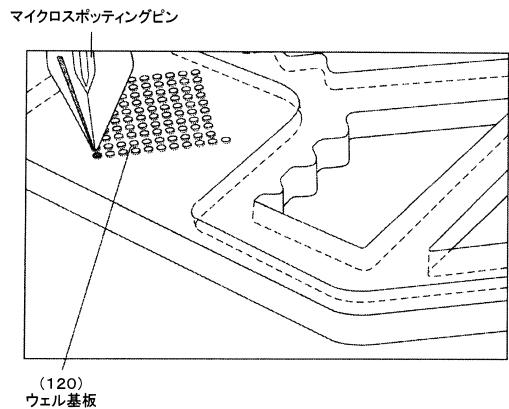
【図2G】



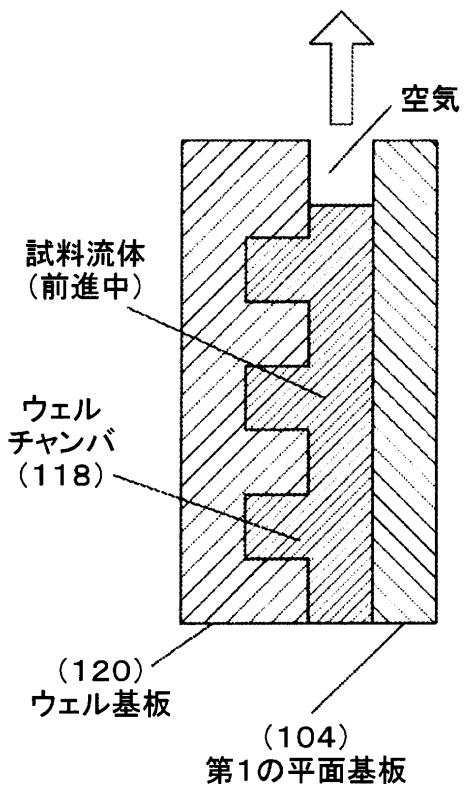
【図2H】



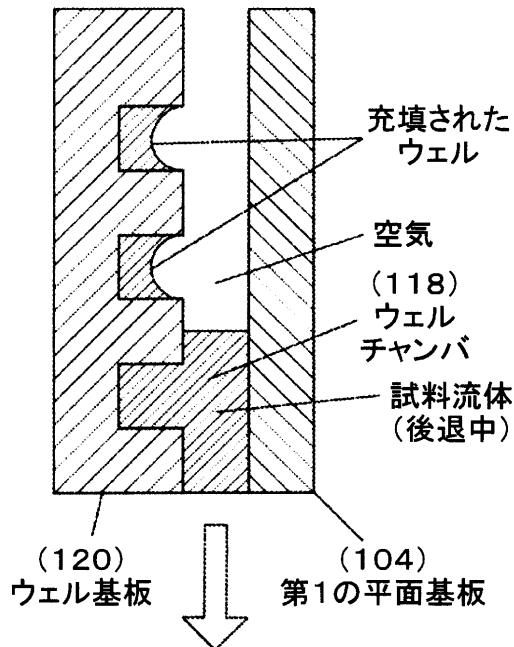
【図3A】



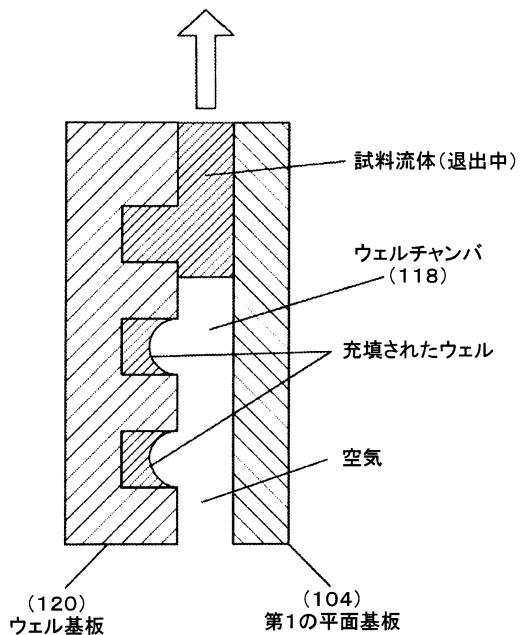
【図4A】



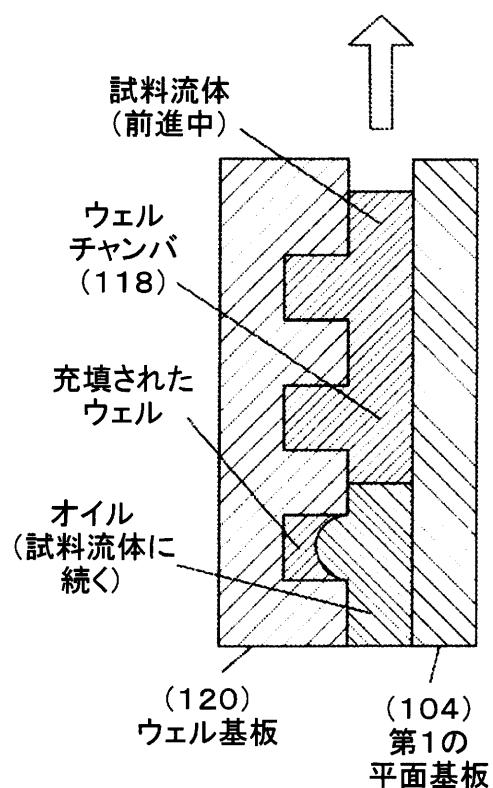
【図4B】



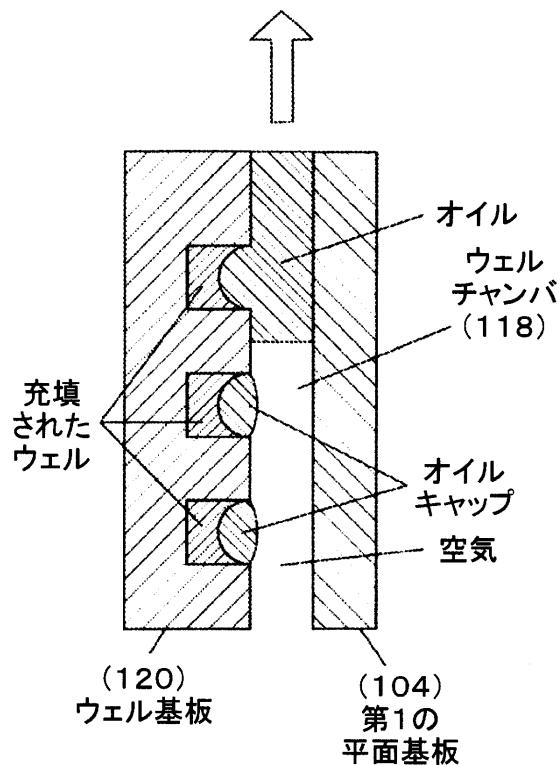
【図4B-2】



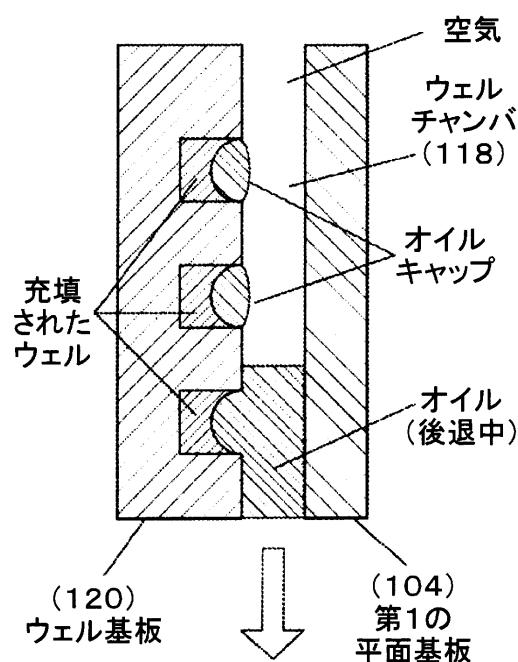
【図4C】



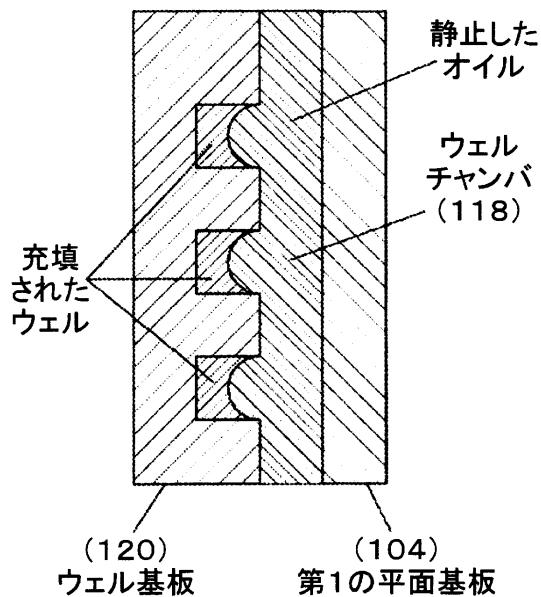
【図4D】



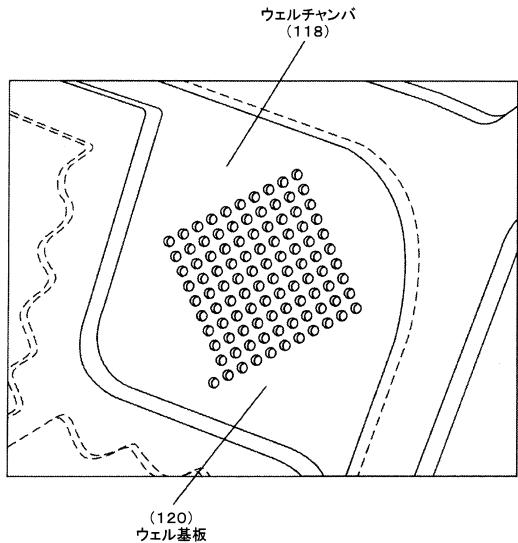
【図4D-2】



【図4D-3】

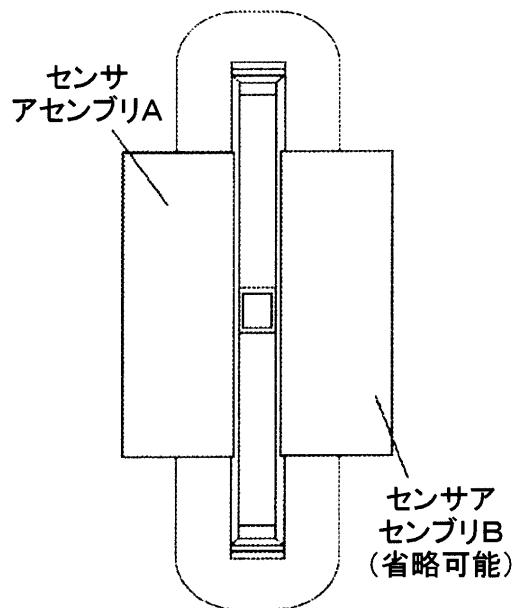


【図 4 E】



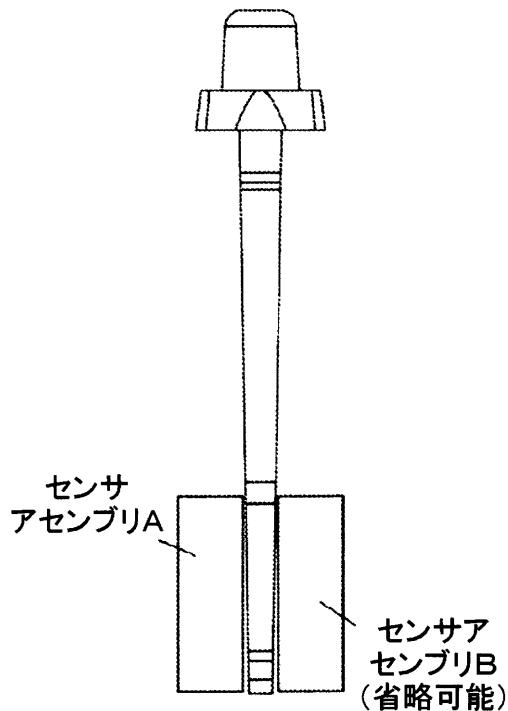
【図 5 A】

ハニカムチューブ
(100)



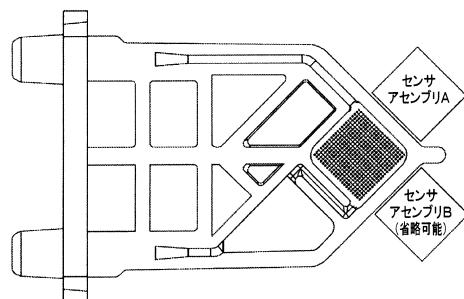
【図 5 B】

ハニカムチューブ
(100)

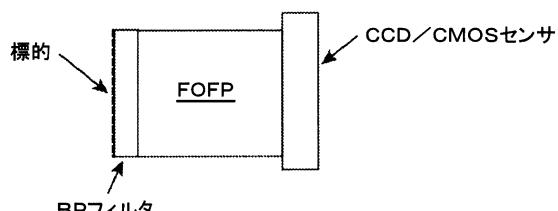


【図 5 C】

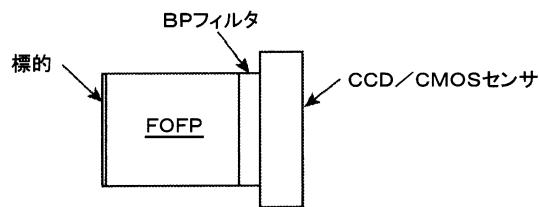
ハニカムチューブ
(100)



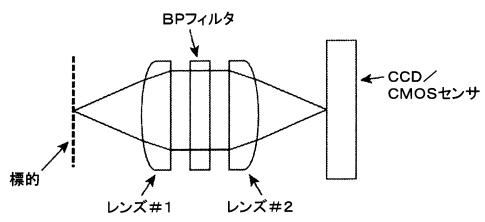
【図 5 D】



【図 5 E】



【図 5 F】



【図 6】

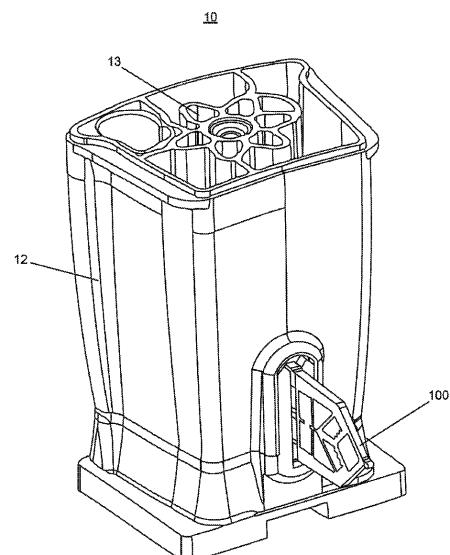
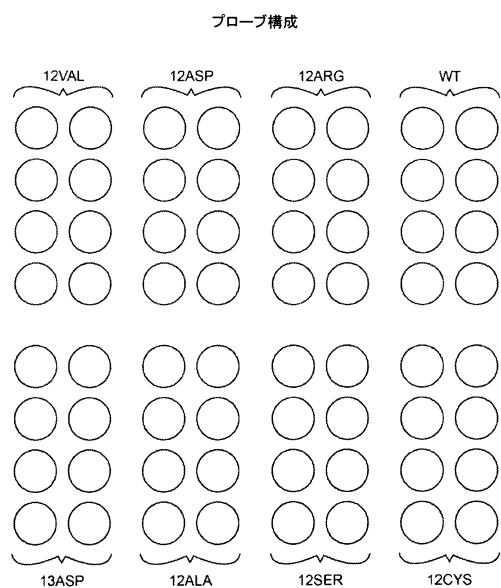


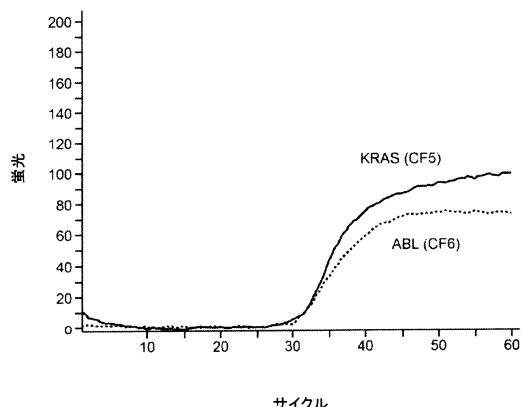
FIG. 6

【図 7】



【図 8】

KRAS PCR条件
・片側ヒーターを有する修正されたGXモジュール
・変性時間を5秒から15秒に延長



【図 9 A】

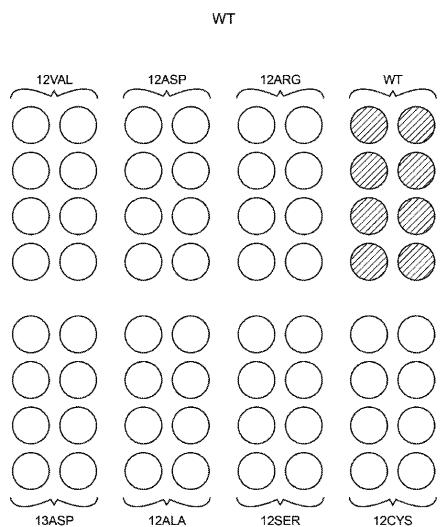
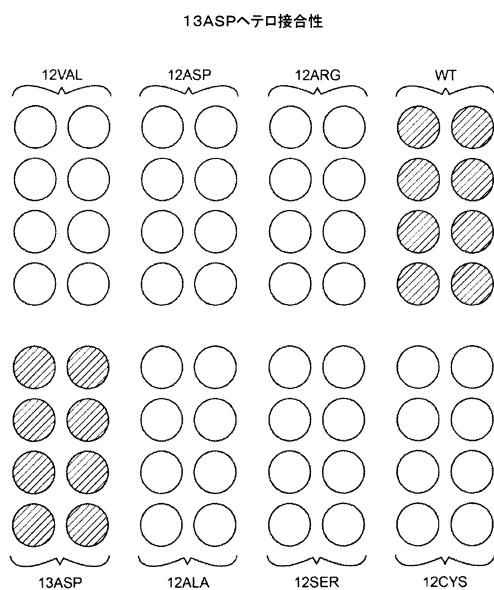
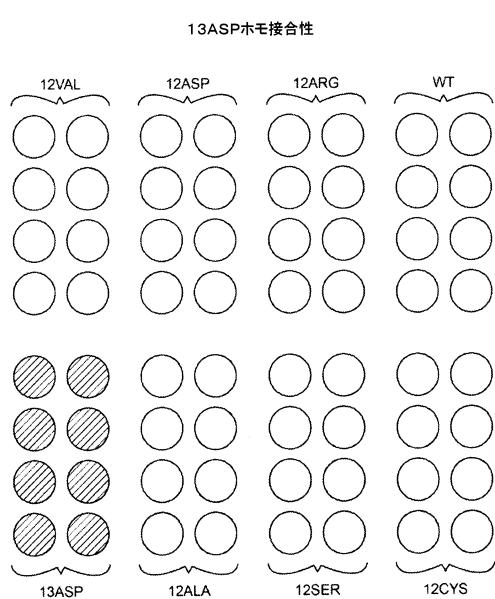


FIG. 9A

【図 9 B】



【図 9 C】



【図 10 A】

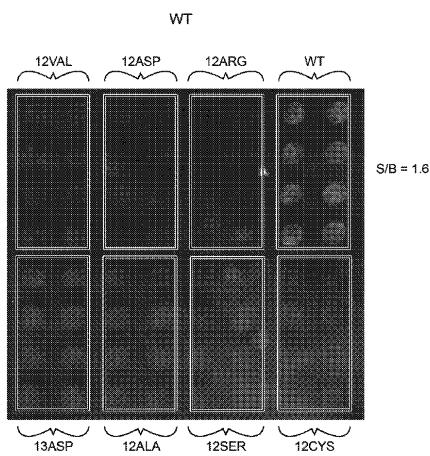
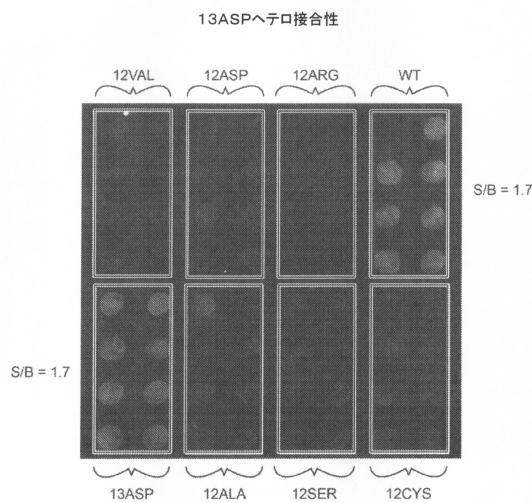
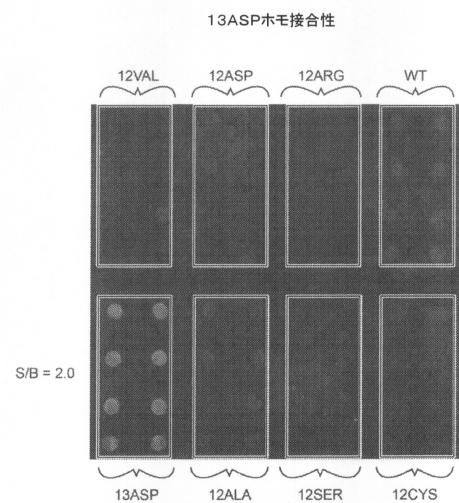


FIG. 10A

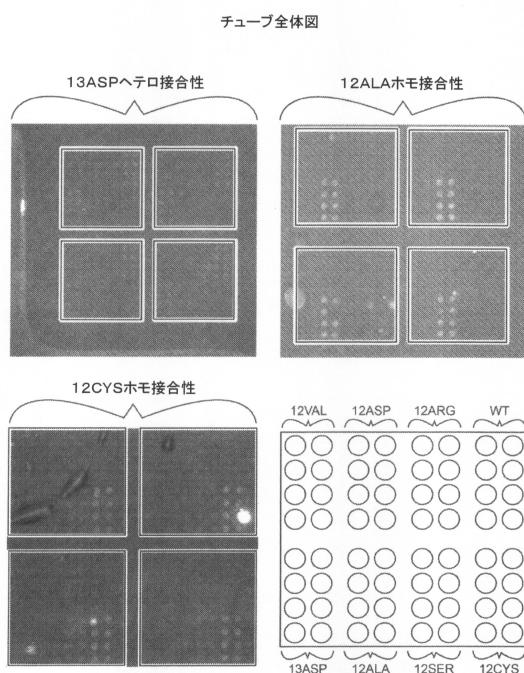
【図 10B】



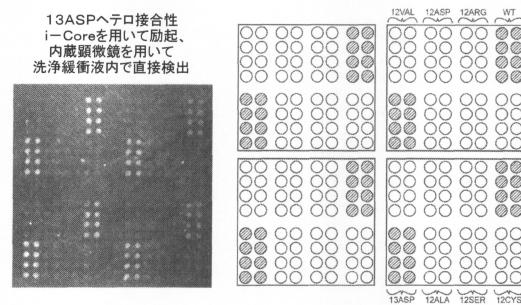
【図 10C】



【図 11】

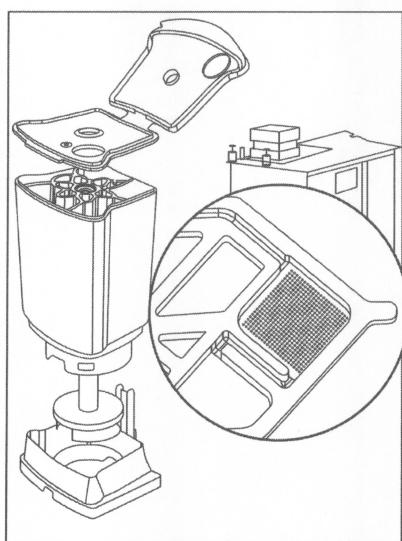


【図 12】



【図13】

高レベル多重化:ハニカムチューブ



機能

- ・最大1,000標的
- ・定性及び多重定量の両方のmRNA表現
- ・多重ネスティッドPCR

方法

- ・GXチューブ内にマイクロセルを製造
- ・前置増幅チャンバーを含む
- ・PCR試薬をセル内に配置
- ・各セルが個別のPCR反応を含む

フロントページの続き

(72)発明者 ドリティ、 ドグ

アメリカ合衆国 94941 カリフォルニア州 ミル バレー キャッスル ロック ドライブ
25

(72)発明者 ディケンス、 ダスティン

アメリカ合衆国 95054 カリフォルニア州 サンタ クララ アパート 1021 カーラ
イル コート 4505

(72)発明者 グラス、 ジェニファー

アメリカ合衆国 95110 カリフォルニア州 サン ノゼ サン ペドロ サークル 163

(72)発明者 ヴァン アタ、 ロウエル

アメリカ合衆国 94303 カリフォルニア州 パロ アルト ナンバー 229 ホーソーン
アベニュー 275

審査官 布川 莉奈

(56)参考文献 特表2011-506998 (JP, A)

特開2010-271304 (JP, A)

登録実用新案第3126208 (JP, U)

国際公開第2007/043619 (WO, A1)

Lab Chip, 2010年, Vol. 10, pp. 3210-3212

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10

G01N 35/00 - 37/00

CAPLUS / MEDLINE / WPI/IDS / BIOSIS (STN)