

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5795313号
(P5795313)

(45) 発行日 平成27年10月14日(2015.10.14)

(24) 登録日 平成27年8月21日(2015.8.21)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q	1/68	A
G 01 N 35/00	(2006.01)	G 01 N	35/00	D
G 01 N 35/02	(2006.01)	G 01 N	35/02	A
C 12 M 1/00	(2006.01)	C 12 M	1/00	A

請求項の数 20 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2012-521908 (P2012-521908)
 (86) (22) 出願日 平成22年7月29日 (2010.7.29)
 (65) 公表番号 特表2013-500021 (P2013-500021A)
 (43) 公表日 平成25年1月7日 (2013.1.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/AU2010/000953
 (87) 國際公開番号 WO2011/011823
 (87) 國際公開日 平成23年2月3日 (2011.2.3)
 審査請求日 平成25年7月16日 (2013.7.16)
 (31) 優先権主張番号 2009903546
 (32) 優先日 平成21年7月29日 (2009.7.29)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 512021483
 パイロベット ピーティーイー エルティ
 ーディー
 PYROBETT PTE LTD
 シンガポール国, 149555, シンガポ
 ール, #02-02, コモンウェルス レ
 ーン 8
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アッセイを行うための方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリヌクレオチド分子のバイロシークエンシングを行う方法であって、次の各工程：
 その上面の一以上の無蓋の個別領域にポリヌクレオチド分子を結合するようになってい
 る回転可能プラットフォームを用意する工程と、

該回転可能プラットフォームの該上面の該無蓋の個別領域の一以上に該ポリヌクレオチ
 ド分子を結合させる工程と、

該ポリヌクレオチド分子の一本鎖にオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせ
 る工程と、

該プラットフォームの外部の位置から該各無蓋の個別領域に一連のバイロシークエンシ
 ング試薬を分注する工程であって、該分注工程の一以上又は全ての後に、該試薬のいかなる
 残存分又は未反応分も該各個別領域から遠心力で除去されて該プラットフォームから除
 去されるように該プラットフォームを回転させる工程と、

ピロリン酸基の存在を調べる工程と

該分注工程及び該調べる工程を繰り返し、該ポリヌクレオチド分子を配列決定する工程
 と、

を含む方法。

【請求項 2】

前記回転可能プラットフォームが円形であり、2～500個の無蓋の個別領域が該円形
 プラットフォームの上面の外周囲に配置されている、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

前記回転可能プラットフォームの直径が 50 ~ 500 mm であり、該プラットフォームの厚さが 1 ~ 4 mm であり、前記無蓋の個別領域は平坦であるか、又は体積が 0.5 ~ 100 μ L であるか若しくは深さが 0.5 ~ 3 mm の浅いウェルである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記回転可能プラットフォームが、ポリカーボネート、ポリスチレン、高衝撃ポリスチレン、ポリエチレン及びポリプロピレンからなる群から選択されるプラスチック材料で形成されているか、又はガラス若しくは石英から形成されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記一以上の無蓋の個別領域は前記回転可能プラットフォーム上の被覆であり、該被覆は前記ポリヌクレオチド分子を結合するようになっている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記プラットフォームの前記各無蓋の個別領域に、前記ポリヌクレオチド分子が化学的に吸着されるか、又は共有結合、イオン結合若しくは水素結合されるか、あるいは、該プラットフォームの該各無蓋の個別領域に、該ポリヌクレオチド分子がファンデルワールス力によって結合される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記回転可能プラットフォームの回転時に該プラットフォームの上面から除去又は遠心分離される廃棄流体を受けるための、該プラットフォームの外周に配置されたトラフを更に有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記パイロシークエンシング試薬は、一種以上の酵素、基質、A、T、G 及び / 若しくは C ヌクレオチド、又は該ヌクレオチドそれぞれの適切なアナログ、洗浄試薬、ならびにリーン試薬からなる群から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記回転可能プラットフォームの回転が 400 ~ 1000 rpm の速度で行われて、前記試薬のいかなる残存分又は未反応分も該プラットフォームの上面から遠心力で除去され、かつ前記分注工程が該試薬を分注しながら該回転可能プラットフォームを 10 ~ 200 rpm の速度で回転させる工程を更に含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチド分子が DNA 若しくは RNA、又はそれらの改変体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記ポリヌクレオチド分子がビオチン化されており、前記個別領域が該ビオチン化ポリヌクレオチド分子を結合させるためのアビジン若しくはストレプトアビジン、又はそれらのアナログを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

40

前記一連のパイロシークエンシング試薬を分注する工程は、

a) 各ヌクレオチド又はそのアナログを所望又は所定の順序で別々にかつ逐次的に添加すること、又は

b) A + T + G + C ヌクレオチド又はこれらの所定又は所望のサブセットを混合物として添加し、かつ必要に応じて該添加を一回以上繰り返すこと、

を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ピロリン酸基の存在を調べる工程が、光シグナルを検出する工程を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記ポリヌクレオチド分子が二重鎖ポリヌクレオチド分子であり、かつ該二重鎖ポリヌクレオチド分子を前記アニーリング工程前に変性させる工程と、変性後に未結合の鎖を遠心力で除去する工程とを更に含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記変性工程が前記二重鎖ポリヌクレオチド分子を加熱して変性させること、又は該二重鎖ポリヌクレオチド分子を高 pH に曝露することを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記無蓋の個別領域を洗浄試薬、及び必要に応じて酵素処理により洗浄する工程を更に含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記洗浄工程が一以上の分注工程の後に行われる、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記酵素が DNA ポリメラーゼ、 ATP スルフリラーゼ、ルシフェラーゼ及びアピラーゼのうちの一以上を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 19】

前記基質がアデノシン 5' ホスホ硫酸 (APS) 及び / 又はルシフェリンを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法で使用される、ポリヌクレオチド分子のパイロシークエンシングを行うためのキットであって、その上面の一以上の無蓋の個別領域にポリヌクレオチド分子を結合するようになっている回転可能プラットフォームと、一以上のパイロシークエンシング試薬とを含む、キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はアッセイを行うための方法及び装置に関する。詳細には、本発明は、アッセイ (特に多工程アッセイ) を行うために用いることができる回転可能プラットフォームに関する。本発明は、主にパイロシークエンシングによる核酸の配列決定に用いるために開発されたものである。以下、この用途に関して説明するが、本発明はこの特定の使用分野に限定されるものではない。

30

【背景技術】

【0002】

以下、本発明の技術分野を適切に特定し、本発明の利点がより十分に理解できるようにするために先行技術の説明を行う。しかし、本明細書全体における如何なる先行技術の説明も、このような先行技術が広く知られている、又は当該分野における通常の一般知識の一部を構成するという明示又は暗黙の了解として理解されるべきではない。

【0003】

DNA のヌクレオチド配列を決定することは、最近ますます重要となっている。従来、DNA 配列決定には、酵素的連鎖停止方法及び化学的切断技法の二種が最も一般的に用いられており、いずれの方法も、大型の DNA セグメントから生じた DNA 断片をそのサイズに応じて分離するゲル電気泳動による手法である。電気泳動工程や分離 DNA 断片の検出は煩雑な処置である。しかし、自動電気泳動ユニットが市販されてはいるものの、電気泳動は、ハイスループットの比較的費用対効果が高いユニットを必要とする臨床的配列決定や大規模のゲノムプロジェクトには適していない。従って、配列決定における非電気泳動方法の必要性は大きい。

40

【0004】

単一の DNA 塩基変化の迅速な検出を可能にする技法も遺伝子解析においては重要なツールである。固相原理に基づくミニ配列決定プロトコールが既に開示されているが、そのプロトコールにおいては、放射標識ヌクレオチドの取り込みが測定され、ヒトアポリボタンパク質 E 遺伝子の 3 種の対立遺伝子多型の解析に用いられている。しかし、放射標識に

50

よる方法は通常の臨床用途には適していないため、迅速なDNA配列解析用の簡易な非放射性方法の開発も注目されている。

【0005】

ポリメラーゼ反応時に放出される無機ピロリン酸(PPi)を検出する概念に基づく配列決定方法が既に開示されており(特許文献1及び2参照)、通常、パイロシークエンシングと称される。ポリメラーゼ反応時に成長核酸鎖に各ヌクレオチドを添加すると、ピロリン酸分子が放出される。このような条件下で放出されたピロリン酸は酵素的に(例えばルシフェラーゼ-ルシフェリン反応における光の発生によって)検出できることが見出されている。このような方法によって標的位置で塩基を同定することができ、DNAの配列決定を容易且つ迅速に行うことができると共に、電気泳動及び有害な放射標識を使用する必要性を回避することができる。

10

【0006】

パイロシークエンシングを行うための初期の先行技術法では、0.2mLの微量遠心チューブ(又は類似物)を用い、チューブに試薬を逐次的に添加してチューブ内に存在するDNAの配列を決定している。この方法は比較的簡易ではあるが、ヌクレオチド試薬の各々の添加によって反応が弱まり、及び/又は反応副生物が蓄積し、反応がこれ以上進行しないポイントまで反応状態が到達するため、リード長が短いという問題を有する。例えば、この方法で確実に配列決定できるのは通常約80塩基でしかない。

20

【0007】

パイロシークエンシングを用いた市販装置も開発されている。このようなシステムではフローセルを用いて標的DNA/RNA分子のハイブリダイゼーションを行う。すなわち、フローセル内に配置された固定ビーズに一本鎖DNAを固定化するが、通常は、二本鎖DNAを固定化し、相補鎖を変性させることによって行う。ヌクレオチド(A、G、C又はT)を含む試薬をビーズに流し、ヌクレオチドが取り込まれた場合には光を検出する。光のシグナル強度は単一反応で取り込まれたヌクレオチドの数に比例する。ビーズを異なるヌクレオチドに曝露する間には洗浄工程も行い、このプロセスを繰り返して次のヌクレオチドの取り込みを検出する。

【0008】

合成による他の配列決定方法(例えば、蛍光標識ヌクレオチドを用いた方法)も知られている。このような方法においては、DNAサンプルを先ず断片化し、DNA二重らせんを融解して一本鎖にする。単一DNA分子は、フローセル内の表面に捕捉され、合成プロセスによる配列決定の鋳型として機能する。蛍光標識ヌクレオチドを一個ずつ添加し、DNAポリメラーゼ酵素によって成長相補鎖に取り込ませる。未使用のヌクレオチドは洗い流される。レーザー照射の際、取り込まれたヌクレオチドは、検出される光を発する。蛍光標識を除去した後、次のヌクレオチドを添加してサイクルを継続する。ヌクレオチドの取り込みを追跡することによって、個々のDNA分子の正確な配列が決定される。

30

【0009】

ライゲーションによる配列決定も知られている。このDNA配列決定方法では、DNAリガーゼ酵素を用いてDNA配列の所定位置に存在するヌクレオチドを同定する。DNAリガーゼ酵素のミスマッチ感受性を用いて標的DNA分子の基礎配列を決定する。例えば、特許文献3及び4を参照することができる。

40

【0010】

種々の化学及び検出方法で使用可能な、アッセイ及び解析を行うための装置が必要であり、特に、核酸の配列決定に用いるような複数の反応及び洗浄工程を伴うアッセイを行うための装置が必要である。また、フロースル-環境を必要とするアッセイに代わる、あるいは、核酸配列決定の際に希釈作用によって最大配列リード長が制限される固定反応容器アッセイに代わる簡便な手段として使用可能な装置が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

50

【特許文献 1】国際公開第 9 3 / 2 3 5 6 4 号
【特許文献 2】国際公開第 8 9 / 0 9 2 8 3 号
【特許文献 3】米国特許第 5 , 7 5 0 , 3 4 1 号
【特許文献 4】米国特許第 4 , 8 8 3 , 7 5 0 号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 2】

本発明の目的は、上述の先行技術の一以上の問題点を克服又は改善すること、又は有用な代替手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

10

【0 0 1 3】

本発明は、その第 1 の態様において、アッセイを行うための回転可能プラットフォームであって、その表面の一以上の個別領域 (discrete area) に第 1 の結合パートナーを固定化するようになっているプラットフォームを提供する。

【0 0 1 4】

本発明は、その第 2 の態様において、アッセイを行うための回転可能プラットフォームであって、その表面の一以上の個別領域に第 2 の結合パートナーを選択的に固定化するようになっているプラットフォームを提供する。

【0 0 1 5】

20

一実施形態においては、プラットフォームの上面全体は、第 1 の結合パートナーを固定化するか、又は第 2 の結合パートナーを選択的に固定化するようになっている。しかし、他の実施形態においては、複数の個別領域、所定部位又は標的部位をプラットフォームの表面、あるいは、プラットフォームの表面に比較的容易に結合する二次的表面（例えば、ビーズ）に設けて、第 1 の結合パートナーを固定化するか、又は第 2 の結合パートナーを選択的に固定化する。他の例においては、個別領域は回転可能プラットフォーム上の被覆であって、当該被覆は第 1 の結合パートナーを固定化するようになっている。

【0 0 1 6】

幾つかの実施形態においては、第 1 の結合パートナーはプラットフォームの表面に化学的に吸着される。他の実施形態においては、第 1 の結合パートナーはプラットフォームの表面に共有結合、イオン結合又は水素結合され、更に他の実施形態においては、ファンデルワールス力によって第 1 の結合パートナーがプラットフォームの表面に保持される。プラットフォームの表面に既に結合している第 1 の結合パートナーに対し、第 2 の結合パートナーが結合可能又は反応可能であることは理解されるであろう。

30

【0 0 1 7】

本発明は、特に核酸配列決定法（例えば、パイロシークエンシング）等の方法やアッセイに関する。例えば、第 1 及び第 2 の結合パートナーは結合パートナー対（必要に応じて、その内的一方を検出可能に標識することができる）であり、アビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアクチン又はそのアナログ、及びビオチン又はそのアナログから選択することが好ましい。

【0 0 1 8】

40

しかし、更に後述するように、本発明の利点は、洗浄工程を比較的迅速且つ比較的簡易にして、付随する洗浄溶液や試薬の廃棄量を削減することにある。

【0 0 1 9】

本発明をパイロシークエンシングの場合について説明するが、本発明はこのアッセイに限定されるものではない。

【0 0 2 0】

第 1 の態様においては、プラットフォームは、第 1 の結合パートナー（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアクチン又はそのアナログとすることができる）を固定化するようになっており、次のプロセシング工程でアビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアクチン又はそのアナログを例えば、ビオチン化 DNA と反応させることができ

50

きる。また、第2の態様においては、プラットフォームは既に第1の結合パートナーを有しており、プラットフォームは第2の結合パートナーを選択的に固定化するようになっている。従って、第1の態様に記載のプラットフォームは「機能化されていない」と見なすことができ、第2の態様に記載のプラットフォームは「機能化されている」又は「予備機能化されている」と見なすことができる。

【0021】

本発明は、その第3の態様において、アッセイを行うための方法であって、次の各工程：

第1の態様に記載のプラットフォームを用意する工程と、
前記プラットフォームの前記表面又は前記プラットフォームの表面に埋め込まれた表面
(例えば、ビーズ)の一以上の個別領域に第1の結合パートナーを結合又は固定化させる
工程と、
10

前記各個別領域に一連の試薬を逐次的に接触させる工程とを含む方法であって、前記接
触工程の一以上又は全ての間に、前記試薬のいかなる残存分又は未反応分も前記各個別領
域から実質的に遠心力で除去されるように前記プラットフォームを回転させる方法を提供
する。

【0022】

最初の一連の試薬は第1の結合パートナーに対する第2の又は相補的結合パートナーを
含み、次の試薬は、更に後述するように、例えば、洗浄試薬やリンス試薬から選択するこ
とが好ましい。
20

【0023】

本発明は、その第4の態様において、アッセイを行うための方法であって、次の各工程
：

第2の態様に記載のプラットフォームを用意する工程と、
前記プラットフォームの前記表面又は該プラットフォームに埋め込まれた表面の一以上の
個別領域に第2の結合パートナーを選択的に結合又は固定化させる工程と、

前記各標的部位に一連の試薬を逐次的に接触させる工程とを含む方法であって、前記接
触工程の一以上又は全ての間に、前記試薬のいかなる残存分又は未反応分も前記標的部位
から実質的に遠心力で除去されるように前記プラットフォームを回転させる方法を提供す
る。
30

【0024】

本発明の方法は、前記各接触工程時及び/又はその後にアッセイを解析する工程を更に
含むことが好ましい。好ましい実施形態においては、個別領域に次の試薬を接触させる前
に、前記各個別領域を洗浄試薬を用いた洗浄工程又はリンス工程に付す。洗浄試薬は、先
の接触工程からの残存溶液を実質的に洗い流すことができるか、又は残存溶液の量及び前
記溶液に存在する成分の量を削減することができるかなる試薬(例えば、副生物を分解
するか、又は副生物の濃度を低下させるアピラーゼや他の適切な酵素等の活性剤)であつ
てもよい。

【0025】

洗浄試薬は、先の接触工程からの残存溶液を実質的に洗い流すことができるか、又は残
存溶液の量及び前記溶液に存在する成分の量を削減することができるかなる試薬であつ
てもよく、アピラーゼ等の活性剤もよく、他の実施形態においては、マシャエキ(Mashay
ekhi) F. 及びロナギ(Ronaghi) M.、バイロシークエンシング化学におけるリード長
制限因子の解析、Anal. Biochem. (2007)、363(2): 275~287に詳述のように、余分な核酸を除去するための洗浄工程ではアピラーゼを用いないこ
とが好ましい(該文献の全内容を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する)
。マシャエキ(Mashayekhi)らによって詳述されているように、前記洗浄工程をアピラ
ーゼを用いない洗浄工程に置き換えることによって、バイロシークエンシングのリード長が
改善されることが示されている。

【0026】

10

20

30

40

50

試薬を分注しながら回転可能プラットフォームを低速度（例えば、約10～200 rpm）で回転させて標的部位に添加した試薬が除去されないようにし、また、試薬を分注しながら回転可能プラットフォームを高速度（例えば、約400～1000 rpm）で回転させることが好ましい。しかし、他の回転速度も可能である。

【0027】

好ましい実施形態においては、前記プラットフォームを回転させていかなる残存試薬も遠心力で除去することにより、前記個別領域を実質的に「乾燥する」ことによって、前記各個別領域を次の前記各試薬に向けて準備する。こうすることによって、前工程からの試薬で前記個別領域が汚染されることを実質的に抑制する（好ましくは実質的になくす）。

【0028】

本発明は、その第5の態様において、アッセイを行うための第1又は第2の態様に記載のプラットフォームの使用を提供する。

【0029】

本発明は、その第6の態様において、第1又は第2の態様に記載のプラットフォームと、前記アッセイのための一以上の試薬とを含むキットを提供する。

【0030】

本発明は、その第7の態様において、アッセイを行うための装置であって、前記第1又は第2の態様に記載の前記プラットフォームを所定の制御可能でユーザが選択可能な回転速度で回転させる装置と、

必要に応じて、前記プラットフォームの前記表面の前記一以上の個別領域に前記第1の結合パートナーを分注して、前記第1の結合パートナーを前記個別領域に固定化する装置、又は前記プラットフォームの前記表面の前記一以上の個別領域に前記第2の結合パートナーを分注して、前記第2の結合パートナーを前記個別領域に選択的に固定化する装置と、

試薬を分注して前記個別領域に接触させる装置と、

必要に応じて、洗浄試薬を分注する装置とを含む装置を提供する。

【0031】

プラットフォームを回転させる装置はモータであり、所定の回転速度はユーザが選択可能であり、約10～1000 rpmであることが好ましい。また、その装置には、回転可能なプラットフォームから除去される廃棄試薬を抜き出す真空抽出システムを設けることも好ましい。

【0032】

別の設計においては、回転可能プラットフォームは、必ずしもディスク自体である必要はなく、回転フォーマットに各個別反応ウェルを保持するクレードル内にロードされた複数の個別反応ウェルから構成されることも可能である。例えば、改造された0.2 mLの微量遠心チューブを回転可能クレードル状のプラットフォームに45度で取り付けることができる。この構成においては、微量遠心チューブのキャップは開いており、水平面に置かれている（キャップの内部表面は上方を向いている）。キャップは、低 rpmでキャップ内／上に分注された試薬が高 rpmでそのチューブ内に注入されるように改造されている。また、微量遠心チューブのプラスチックヒンジがチャネルとして作用し、廃棄試薬がキャップからチューブに向かうように改造されていることも好ましい。キャップは、第1の結合パートナーを受けて固定化する個別領域、又は第2の結合パートナーを受けて選択的に固定化させた後、次の試薬を受ける個別領域として機能し、チューブ自身は廃棄槽（トラフ）／容器として機能する。この利点は、オペレータが所望の数のチューブをクレードル内に挿入して一個のサンプル又は多数のサンプルをロードできることにある。

【0033】

本発明は、その第8の態様において、アッセイを行うための装置であって、

第1の結合パートナーを固定化するようになっているか、又は第2の結合パートナーを選択的に固定化するようになっている個別領域を有するプレートと、

フランジによって前記プレートに接続された容器とを含む装置であって、前記フランジ

10

20

30

40

50

は、前記プレートから前記容器へ流体を通過させるチャネルを有する装置を提供する。

【0034】

該容器は開口上部を有し、該プレートは、容器の開口上部と選択的に係合して流体を密封するようになっているフランジを有するのが好ましい。プレートは容器用のキャップであることが好ましい。

【0035】

該容器は、ホルダ（例えば、カルーセル）内に容器を支持するための径方向外側に向かって放射状に延在する環状フランジを有することが好ましい。該容器は実質的に円筒状であることが好ましい。前記容器は使い捨てで、プラスチック材料からなることが好ましい。

10

【0036】

第7の態様に記載のアッセイを行うための装置は、改造された微量遠心チューブ（例えば、改造されたエッペンドルフ（Eppendorf（登録商標）））であることが好ましい。

【0037】

本発明は、その第9の態様において、二以上のプレートを受けるようになっている回転可能クレードルであって、各プレートは、第1の結合パートナーを固定化するようになっているか、又は第2の結合パートナーを選択的に固定化するようになっている個別領域を有するクレードルを提供する。また、回転可能クレードルは二以上の容器を受けるようにもなっており、各容器はフランジによって各プレートに接続されており、前記フランジは、前記プレートから前記容器へ流体を通過させるためのチャネルを有することが好ましい。前記プレートは改造された微量遠心チューブのキャップであり、前記容器は該微量遠心チューブ自体であることが好ましい。第9の態様は、第8の態様に記載の装置を用いることが好ましい。

20

【0038】

本発明は、その第10の態様において、アッセイを行うための方法であって、次の各工程：

第9の態様に記載の回転可能クレードルと第8の態様に記載の装置を用意する工程と、少なくとも1個のプレートを前記プラットフォームに係合させる工程と、

前記個別領域に第1の結合パートナーを結合又は固定化するか、又は前記個別領域に第2の結合パートナーを選択的に結合又は固定化する工程と、

30

前記各個別領域に一連の試薬を逐次的に接触させる工程とを含む方法であって、前記接触工程の各々又はいずれかの間に、前記試薬の如何なる残存分又は未反応分も前記個別領域から実質的に遠心力で除去されるように前記回転可能クレードルを回転させる方法を提供する。

【0039】

本発明は、その第11の態様において、アッセイを行うための第9の態様に記載の回転可能クレードルの使用、又は、アッセイを行うための第8の態様に記載の装置の使用を提供する。

【0040】

本発明は、その第12の態様において、第8の態様に記載の装置と、前記アッセイのための一以上の試薬とを含むキットを提供する。

40

【0041】

本発明は、その第13の態様において、第9の態様に記載の回転可能クレードルと、前記アッセイのための一以上の試薬とを含むキットを提供する。

【0042】

本発明は、その第14の態様において、アッセイを行うための装置であって、第9の態様に記載の前記回転可能クレードルを所定の制御可能でユーザが選択可能な回転速度で回転させる装置と、

必要に応じて、前記個別領域上に第1の結合パートナー又は第2の結合パートナーを分注する装置と、

50

一以上の試薬を分注して前記個別領域に接触させる装置とを含む装置を提供する。

【0043】

本発明の他の態様は、アッセイを並行して行うことに関する。例えば、本発明は、その第15の態様において、少なくとも1個の円周方向に延在するレーンを有する、アッセイを行うための回転可能シリンダであって、前記各レーンは、第1の結合パートナーを固定化するようになっているか、又は第2の結合パートナーを選択的に固定化するようになっている一以上の個別領域を有するシリンダを提供する。本発明は、この態様において、回転可能になっている（又は構成されている）、アッセイを行うためのシリンダを提供する。当業者であれば、この実施形態によって多数のサンプルを同時に又は並行して実行することができるることは理解されよう。

10

【0044】

結合パートナーや試薬等の個別領域上への分注を可能とする長手方向に延在する開口部を有する容器内に回転可能シリンダを収容できることは理解されよう。当然のことながら、該シリンダを高速度で回転させる場合には、検出要素が廃棄流体の接線経路内にある。従って、遠心分離時に長手方向に延在する開口部を閉じるためのシャッタを用いることによってこのような問題を回避できる。

【0045】

本発明は、その第16の態様において、アッセイを行うための方法であって、次の各工程：

第15の態様に記載の回転可能シリンダを用意する工程と、

20

一以上の個別領域に前記第1の結合パートナーを結合又は固定化するか、又は一以上の個別領域に第2の結合パートナーを選択的に結合又は固定化する工程と、

前記各個別領域に一連の試薬を逐次的に接触させる工程とを含む方法であって、前記接触工程の各々又はいずれかの間に、前記試薬のいかなる残存分又は未反応分も前記個別領域から実質的に遠心力で除去されるように前記回転可能シリンダを回転させる方法を提供する。

【0046】

本発明は、その第17の態様において、前記アッセイの第15の態様に記載の回転可能シリンダの使用を提供する。

【0047】

30

本発明は、その第18の態様において、第15の態様に記載の回転可能シリンダと、前記アッセイのための一以上の試薬とを含むキットを提供する。

【0048】

本発明は、その第19の態様において、アッセイを行うための装置であって、

前記第15の態様に記載の前記回転可能シリンダを所定の制御可能でユーザが選択可能な回転速度で回転させるための装置と、

必要に応じて、一以上の個別領域上に前記第1又は第2の結合パートナーを分注し、前記結合パートナーをそれぞれ前記個別領域に固定化又は選択的に固定化するための装置と、

試薬を分注して前記個別領域に接触させるための装置とを含む装置を提供する。

40

【0049】

本発明をパイロシークエンシングの場合について説明するが、本発明はこのアッセイに限定されるものではない。

【0050】

[パイロシークエンシング]

第20の態様においては、アッセイはパイロシークエンシングであり、本発明は、核酸鎖の配列決定を行うための回転可能プラットフォームであって、その表面又は前記表面に埋め込まれたビーズ上のー以上の個別領域に核酸鎖結合パートナーを固定化するようになっているプラットフォームを提供する。

【0051】

50

第21の態様においては、アッセイはパイロシークエンシングであり、本発明は、核酸鎖の配列決定を行うための回転可能プラットフォームであって、その表面又は前記表面に埋め込まれたビーズ上のー以上の個別領域に核酸鎖を選択的に固定化するようになっているプラットフォームを提供する。

【0052】

用いる配列決定方法はパイロシークエンシングであることが好ましい。しかし、更に後述するように、他の核酸鎖配列決定方法を用いることもできる。

【0053】

前記核酸鎖はDNA、RNA又はその改変体（例えば、亜硫酸水素塩処理や天然の核酸に存在しない更なる塩基の被覆による）であることが好ましい。核酸鎖のコピーはー以上の個別領域の各々に保持される。

10

【0054】

回転可能プラットフォームは実質的に円形で、直径が約50～500mmであることが好ましい。回転可能プラットフォームは、その中心から等距離で配置された約2～500個の個別領域を有することが好ましい。直径は、いかなる値とすることもでき、直径は所定数の個別領域（2個以上とすることができる）を収容するように選択できる。好ましい実施形態においては、回転可能プラットフォームの外周囲に個別領域を実質的に均等に配置（分布）させて実質的に円形の配列を形成する。

【0055】

個別領域は、核酸鎖（例えば、配列決定用鋳型や配列決定用プライマー）を選択的に結合、捕捉又は固定化するようになっていることが好ましい。例えば、いくつかの好ましい実施形態においては、核酸鎖はビオチン化されており、個別領域はビオチン化核酸鎖を結合させるためのアビジン（好ましくはストレプトアビジン又はそのアナログ）を含む。あるいは、個別領域又はビーズは、アビジン（好ましくはストレプトアビジン）を結合、捕捉又は固定化するようになっており、次の工程において、ビオチン化核酸鎖は個別領域に結合したアビジン／ストレプトアビジンに選択的に固定化される。しかし、核酸鎖を個別領域に固定化するための他の化学も利用可能である。本発明は、核酸鎖を個別領域に固定化するために用いることができる化学に限定されない。

20

【0056】

回転可能プラットフォームの個別領域は、ストレプトアビジンをそこへ選択的に結合又は付着させる処理（又は上述のような同等の化学）を必要とし得ることも当業者には理解されよう。例えば、回転可能プラットフォームを形成する材料がポリカーボネートの場合、ストレプトアビジンはこのポリマーに結合しにくいか又は全く結合しない。従って、個別領域にはストレプトアビジンが結合する材料（例えば、ポリスチレン）のコーティングが必要となる場合がある。当然のことながら、ポリスチレン以外の材料を用いてストレプトアビジンが結合する個別領域を形成し、最終的にはビオチン化核酸鎖を個別領域に固定化することができることは当業者には理解されよう。個別領域には核酸を選択的に固定化することができるような処理を施すことが好ましい。

30

【0057】

一実施形態においては、本発明のプラットフォームは使い捨て品であるが、別の実施形態においては、該プラットフォームは、例えば核酸を「除去」し、更なるアッセイで再利用するのに適している。例えば、該プラットフォームはセラミック又はガラスで形成することができる。

40

【0058】

一実施形態においては、個別領域は、核酸鎖又はアビジン／ストレプトアビジンを受け、選択的に保持するようになっている回転可能プラットフォームの表面のゾーン（領域）に過ぎない。個別領域を実質的に平坦とするか、又は回転可能プラットフォームと同じ表面形状とすることができます。しかし、他の好ましい実施形態においては、個別領域は浅いウェルとすることができる、体積を約0.5～100μLとすることができます。浅いウェルは、いかなる形状とすることもでき、該ウェルは、いかなる体積とすることもできる。し

50

かし、通常のパイロシークエンシング解析／アッセイで用いる試薬の量を比較的少なくするという観点から、ウェルの体積をごく小さくする（例えば、約0.5～10μL）。他の実施形態においては、個別領域を回転可能プラットフォームの表面に対して相対的に隆起した部分とすることも可能であることが意図されている。

【0059】

好みの実施形態においては、個別領域は直径が約1～5mmである。しかし、個別領域は平面視で、いかなる直径や形状とすることもできる。

【0060】

回転可能プラットフォームは簡便にプラスチック材料で形成されることが好みの10が、他の材料（例えば、ガラスや石英）も可能であることは当業者には理解されよう。プラスチック材料は、ポリカーボネート、ポリスチレン及びポリプロピレンからなる群から選択されることが好みの。また、回転可能プラットフォームをラミネート構造とすることができることも意図されている。回転可能プラットフォームを形成する材料が何であろうと、該プラットフォームは、変形せずに回転に耐え得ることが必要であり、また、更に後述するように、核酸を変性させるための熱的作用に耐え得ることが必要である。

【0061】

いくつかの好みの実施形態においては、回転可能プラットフォーム（実質的に円形ディスクとができる）は、更に、回転可能プラットフォームの回転時にその表面から除去又は遠心分離される廃棄流体を受けるためのトラフを該プラットフォームの外周に有する。パイロシークエンシング反応の各工程又は複数の工程が一旦終了すれば、長いリード長を得るには個別領域に接触している未使用試薬又は廃棄試薬を除去する必要がある。回転可能プラットフォームの回転による遠心力によって廃棄流体がプラットフォームから除去されるが、廃棄流体の処理を改善するためにトラフを設ける。

【0062】

あるいは、該プラットフォームからの廃棄試薬の除去は、スクレオチド添加を50サイクル実施する毎に行ってもよく、試薬が十分に希釈されて反応を阻害する直前に行ってよい。

【0063】

この実施形態においては、個別領域に更なるパイロシークエンシング試薬を添加し、各パイロシークエンシング反応の終了後に回転可能プラットフォームから該試薬を除去すると、該プラットフォームの総質量が増加する。従って、別の一実施形態においては、回転可能プラットフォームにはトラフを設けず、回転可能プラットフォームが内部に配置された筐体を、トラフが該プラットフォームの外周に隣接する位置に設けられるように構成し、回転可能プラットフォームの回転時にその表面から除去される廃棄流体がこの「固定」トラフに捕捉されるようにすることが望ましい。

【0064】

パイロシークエンシングの背景にある技法や化学に精通している当業者であれば、個別領域に固定化された核酸鎖を変性して相補核酸鎖を除去する必要があり得ることは理解されよう。変性は、いかなる方法でも行うことができるが、好みの例としては、個別領域又は回転可能プラットフォーム全体を変性に十分な温度（例えば、94～99）まで加熱することや、個別領域を94超まで加熱した溶媒（例えば、バッファー）に曝露することが挙げられる。あるいは、個別領域を変性用組成物（例えば、NaOHを含む組成物）に曝露することもできる。他の方法としては、赤外線や同等の放射線による加熱が挙げられる。回転可能プラットフォームは、このような変性条件に耐え得る材料で形成される必要がある。

【0065】

また、回転可能プラットフォームは、捕捉した核酸標的又は捕捉した配列決定用プライマーに対してDNAをハイブリダイズ又は融解するように加熱及び冷却が行われることもできる。パイロシークエンシングの場合、一旦、dsDNA標的を捕捉し、変性すれば、配列決定用プライマーを添加してssDNAにハイブリダイズさせるか、あるいは、ss

10

20

30

40

50

D N A を捕捉した配列決定用プライマーにハイブリダイズさせる。この場合、回転可能プラットフォームを加熱して s s D N A 中の任意の三次構造を除去した後、冷却して配列決定用プライマーを固定化標的にハイブリダイズすることができる。

【 0 0 6 6 】

比較的少量の試薬を用いた場合、チャンバを適切な手段で封止するため、チャンバを加熱することによってデバイスは多少複雑になり得る。あるいは、オイルオーバーレイを用いて加熱段階時の蒸発を抑制することができる。他の適切な手段は当業者にはよく知られている。あるいは、捕捉した s s D N A 及び配列決定用プライマーに変性試薬を添加した後、低 pH のバッファーを添加して標的部位の pH を低下させ、配列決定用プライマーを D N A 標的にアニーリングさせることができる。一旦アニーリングさせれば、p H バッファーを除去して廃棄することができる。 10

【 0 0 6 7 】

当業者であれば、本発明が種々の実施形態において提供することができる多くの利点を理解するであろう。例えば、本発明では、先行技術のデバイスや方法と比べて塩基リード長を向上することができる。すなわち、先行技術の方法では 0.2 mL の微量遠心チューブ（又は類似物）にてパイロシークエンシングを行い、試薬をチューブに逐次的に添加してチューブ内に存在する D N A の配列を検出する。反応バッファー中の D N A 、全ての酵素及び基質を含む反応にヌクレオチドを逐次的に添加する。反応は 96 又は 24 ウェルプレートにて行う。反応時にプレートを加熱（28）し、振盪する。従って、添加するヌクレオチドの量は蒸発する量とほぼ等しくなり、その結果、反応混合物は希釈されず、副生物が蓄積する。先行技術の方法はリード長が比較的短いという問題を有するが、これは、分解生成物（例えば、アピラーゼの活性によって生成する）の蓄積による可能性が最も高い。本発明の場合、固定化した核酸鎖をヌクレオチドに接触させ、次いで残ったヌクレオチドと共に全ての反応生成物及び副生物を上述のように実質的に個別領域から除去し、また、必要に応じて、個別領域を次のヌクレオチド試薬と接触させる前に洗浄するため、従来技術における問題を有さない。300 又は 400 塩基を超える塩基リード長が可能であり、化学的改善によっては、1000 塩基を超える塩基リード長の可能性もあることが意図されている。 20

【 0 0 6 8 】

更なる利点も当業者には明らかであろうが、明確には、本発明は、先行技術のフロースルーセルよりも比較的簡易な装置を提供する。更なる利点は、先行技術の方法やデバイスよりも比較的迅速に行える可能性のある配列決定に関すると共に、先行技術に比べて必要とする試薬の量が少なくなる可能性に関する。先行技術の方法（特にパイロシークエンシングを行う方法）の更なる限界は、1 反応サイクル（すなわち、1 ヌクレオチドの添加）に必要な時間が非常に長いことである。1 反応サイクルに必要な時間は通常、約 60 秒又はそれ以上であるが、これは先の反応サイクルで残ったヌクレオチド全てが分解するために必要な時間に基づく。先の反応サイクルで残ったヌクレオチドの実質的に全てが完全に分解して初めて、次のヌクレオチドを添加する。本明細書に記載の装置によって、残ったヌクレオチドを遙かに高速で（すなわち、遠心分離工程、洗浄工程によって）除去することができる。この結果、1 塩基を取り込むためのサイクル時間が遙かに短くなり（大概、約 15 秒）、これによって実行時間を少なくとも約 1/4 に低減する。 40

【 0 0 6 9 】

また、本発明によって、いくつかの先行技術のデバイスと比べて流体の処理を改善することもできる。C C D アレイの代わりに高速光電子増倍管を用いることができれば、本発明によって、先行技術のデバイスと比べて感度を向上させることも可能である。

【 0 0 7 0 】

パイロシークエンシングは「合成による配列決定」の原理に基づく D N A 配列決定方法であり、これは、ジデオキシヌクレオチドによる連鎖停止ではなく、ヌクレオチド取り込みによるピロリン酸放出の検出に依存する。「合成による配列決定」は、配列決定対象の D N A 一本鎖を得た後、その相補鎖を酵素的に合成することを伴う。「合成による配列決 50

定」方法は、DNAポリメラーゼのヌクレオチド付加反応の反応副生物を検出してDNAポリメラーゼ(DNA合成酵素)の活性を検出することに基づく(DNA + x dNTP DNA₊ + PP_i又はxに応じた異なる副生物。xはATPでもあり得る)。パイロシークエンシング反応においては、PP_iは、光を発生させる酵素カスケードを用いて定量する。

1. スルフリラーゼ: APS + PP_i ATP + SO₄
2. ルシフェラーゼ: ルシフェリン + ATP オキソルシフェリン + PP_i + 光
3. アピラーゼ: 残ったdNTP及びATPの分解

【0071】

また、副生物を定量するために用いることができる当該技術分野で公知の反応が数種類ある(例えば、PPDK(ホスホエノールピルビン酸ジキナーゼ)を用いたPP_i + PE P + AMPからピルビン酸 + ATP + Piへの転換)。また、例えば、pHの変化又は他の検出可能パラメータの変化によって副生物を検出することができる。あるいは、「合成による配列決定」方法は、DNAリガーゼのプライマー付加反応の反応副生物を検出するDNAリガーゼの活性の検出に基づくことができる。適切な方法は当業者にはよく知られている。

10

【0072】

本質的には、上述の方法におけるDNAの一本鎖の配列決定は、それに沿った相補鎖を合成し(一度に1塩基対)、各工程で実際に添加した塩基を検出することによって行う。鋳型DNA又は配列決定用プライマーを固定化し、A、C、G及び/又はTヌクレオチドの溶液を順次添加し、反応後に除去する。添加したヌクレオチドが鋳型の最初の不対塩基を補完した場合にのみ光が発生する。検出可能シグナル(例えば、化学発光シグナル)を発生させる添加ヌクレオチドの配列によって鋳型の配列が決定する。ssDNA鋳型を配列決定用プライマーにハイブリダイズするか又はその逆を行い、DNAポリメラーゼ(更に必要に応じてATPスルフリラーゼ、ルシフェラーゼ及び/又はアピラーゼ)と共にインキュベートし、更に、例えば、基質であるアデノシン5'ホスホ硫酸(APS)及びルシフェリンと共にインキュベートする。検出可能シグナルをもたらす他のカスケード反応は当業者にはよく知られている。

20

【0073】

概して、パイロシークエンシングは以下の通常の各工程に従う。

30

1. 4種のデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)の内の1種又はその適切な誘導体を核酸鎖鋳型に添加する。DNAポリメラーゼによって正しい相補dNTP又はその誘導体が鋳型に取り込まれると、ピロリン酸(PP_i)が化学量論的に放出される。

2. ATPスルフリラーゼによってPP_iがATPに定量的に転化する。このATPによって、ルシフェラーゼ介在によるルシフェリンからオキシルシフェリンへの転化が引き起こされ、ATPの量に比例する量の可視光が発生する。ルシフェラーゼ触媒反応で生じた光を検出し、解析する。

3. 次に、取り込まれなかったヌクレオチド及びATPをアピラーゼ又は他の適切な酵素で分解する。

【0074】

40

古典的なパイロシークエンシングプロトコールに対する、いくつかの変形例が当該技術分野ではよく知られており、本発明に係る装置上で行うのに適している。ヌクレオチド取り込みの各工程で発生する光は、取り込まれたヌクレオチドの量に比例するため、適切なソフトウェアを用いて、発生した光の情報を特定のヌクレオチド配列パターンに変換することができる。古典的なパイロシークエンシングにおいては、この光パターンを「パイログラム」と称する。また、前記ソフトウェアによって、特定位置における混合集団の取り込み比率を定量できることが好ましい。

【0075】

本発明は、配列決定対象の核酸鋳型又は配列決定用プライマーを固定化する工程と、段階的なヌクレオチド添加サイクルとを含む配列決定方法を意図している。本発明をパイロ

50

シークエンシングに関して説明してきたが、本発明は他の核酸配列決定化学（特に、フロースルー環境や固相から利益を得るような化学）にも有用である。また、本発明は、上述の工程のいくつかを回避する、又は該工程を少なくともより簡便にすることもできる。パイロシークエンシングには ssDNA 鑄型が存在することが必要である。必要に応じて、回転可能プラットフォームは、dsDNA を捕捉し、例えば、パイロシークエンシングに備えてアニーリングされた配列決定用プライマーを用いて前記 dsDNA を変性して ssDNA を残すようにも機能して、別の単離工程の必要性を排除する。本発明の一実施形態においては、回転可能プラットフォームを用い、例えば、dsDNA 鎖の 1 種を優先的に分解する酵素又は酵素混合物を添加して ssDNA を発生させることができる。

【0076】

10

具体的には、当業者であれば、「フロースルー DNA 配列決定」には、例えば、核酸鑄型又は配列決定用プライマーを固定化し、該プライマーを該鑄型にハイブリダイズするか又はその逆を行い、ヌクレオチド（この場合、ヌクレオチドには、例えば、必要に応じてジデオキシ部分等の鎖伸長停止部分が含まれ、また、必要に応じて検出可能標識が含まれる）の存在下で段階的にプライマー介在合成を行う方法（例えば、サンガー配列決定）が含まれることは理解されよう。更なる核酸配列決定方法の実施形態は、次の各工程、すなわち、標識ヌクレオチドを伸長プライマー鎖に取り込む工程と、取り込まれたヌクレオチドを同定する工程と、該伸長鎖を次のヌクレオチドの取り込みに備えるように鎖伸長停止部分及び標識を除去する工程とを含む。

【0077】

20

また、当業者であれば、「フロースルー DNA 配列決定」には、例えば、ライゲーションによる核酸配列決定が含まれることも理解されよう。「ライゲーションによる核酸配列決定」には、核酸鑄型又は配列決定用プライマーを固定化することと、該プライマーを該鑄型にハイブリダイズするか又はその逆を行うことと、それに続く、例えば、標識ヌクレオチドや短い標識プローブの DNA ライゲーションラウンドとが含まれることは明らかであろう。

【0078】

また、本発明が核酸固定化工程と段階的なヌクレオチド添加及び検出とを含む、いかなる DNA 配列決定方法をも意図していることは当業者には明らかであろう。

【0079】

30

当業者であれば、「フロースルー DNA 配列決定」には上述の技法の全てが含まれることも理解されよう。更なる一実施形態においては、本明細書に記載の「フロースルー DNA 配列決定」方法は、プラットフォームの表面に固定化された酵素の使用、及び / 又はプラットフォームの表面に結合又は固定化された更なる表面（例えば、前記酵素を結合することができるよう改変されたビーズ）に固定化された酵素の使用を含むことができる。

【0080】

本発明は、その第 22 の態様において、核酸鎖の配列決定方法であって、次の各工程：第 20 の態様に記載のプラットフォームを用意する工程と、

前記個別領域に核酸鎖結合パートナーを結合又は固定化した後、前記個別領域に核酸鎖を選択的に結合又は固定化する工程と、

40

必要に応じて、任意の相補核酸鎖をも変性及び除去し、配列決定用プライマーを個別領域にアニーリングさせる工程と、

A、T、G 及び / 又は C ヌクレオチド又はそれぞれの適切なヌクレオチドアナログを含む一連の試薬を前記各個別領域に逐次的に接触させる工程とを含む方法において、前記接触工程の各々又はいずれかの間に、実質的にいかなる残存試薬又は未反応試薬も前記個別領域から実質的に遠心力で除去されるように、前記プラットフォームを回転させる方法を提供する。

【0081】

必要に応じて行う洗浄工程又は酵素処理によって、残存試薬又は未反応試薬の除去を改善することができる。

50

【0082】

本発明は、その第23の態様において、核酸鎖の配列決定方法であって、次の各工程：第21の態様に記載のプラットフォームを用意する工程と、前記個別領域に核酸鎖を選択的に結合又は固定化する工程と、必要に応じて、任意の相補核酸鎖を変性及び除去し、配列決定用プライマーを個別領域にアニーリングさせる工程と、

A、T、G及び／又はCヌクレオチド又はそれぞれの適切なヌクレオチドアナログを含む一連の試薬を前記各個別領域に逐次的に接触させる工程とを含む方法であつて、前記接触工程の各々又はいずれかの間に、前記試薬の、いかなる残存分又は未反応分も前記個別領域から実質的に遠心力で除去されるように前記プラットフォームを回転させる方法を提供する。 10

【0083】

この態様においては、個別領域には核酸鎖結合パートナーが既に固定化されており、核酸鎖は、この核酸鎖結合パートナーに対して選択的に結合される。

【0084】

必要に応じて行う洗浄工程又は酵素処理によって、残存試薬又は未反応試薬の除去を改善することができる。

【0085】

一実施形態においては、逐次的な接触工程は、

a) Aの後にT、Tの後にG、Gの後にCヌクレオチドを添加し、それに続いてAを再度添加する等、又は 20

b) A + T + G + Cヌクレオチドを混合物として添加し、該混合物を再度添加する等の一方を含む。

【0086】

他の実施形態においては、前記各個別領域にA、T、G及び／又はCヌクレオチドを含む一連の試薬を逐次的に接触させる。逐次的な接触工程は、

a) 各ヌクレオチド又はそのアナログを所望又は所定の順序で別々に逐次的に添加すること、及び

b) A + T + G + Cヌクレオチド又はこれらの所定又は所望のサブセットを混合物として添加し、該混合物を再度添加する等の内の一方を含むことができる。 30

【0087】

逐次的接触工程a)はパイロシークエンシング方法には特に有用であり、逐次的接触工程b)は、標識ヌクレオチド(例えば、各々が異なる色素で標識された蛍光標識ヌクレオチド)を用いる場合に特に有用である。

【0088】

一連のヌクレオチドを所定の順序及び／又は所定の組合せで添加することができ、核酸鑄型の配列決定に必要な十分の回数だけ配列決定が反復されるという点で、該方法全体が反復を有する。例えば、A、T、G及びCを公知の変異部位にのみ添加することができる。この実施形態の利点は、この手続きによって、必要な塩基添加を少なくしつつ公知の変異検出の速度を向上させることにある。 40

【0089】

本発明の方法は、前記各接触工程時及び／又はその後に核酸鎖を解析する工程を更に含むことが好ましい。解析は、いかなる解析とすることもできるが、パイロシークエンシングの場合においては、解析工程は、前記解析の各工程において、光の出力を核酸鎖に取り込まれたヌクレオチドの数と関連付けることによって核酸鎖内の次の塩基対を同定することを含む。ヌクレオチドの取り込みを検出する全ての適切な技術的手段を当業者は採用できる。例えば、反応によって生じた光を検出するための適切な検出器は光電子増倍管である。回転可能プラットフォームが回転する際に、サンプルが検出器を通過する(好ましくは、全てのサンプルが検出器を通過する)。

【0090】

好ましい実施形態においては、個別領域に次の試薬を接触させる前に、前記各個別領域を洗浄試薬を用いた洗浄工程又はリンス工程に付す。洗浄試薬は、先の接触工程からの残存溶液を洗い流す（好ましくは、先の接触工程からの実質的に全ての残存溶液を洗い流す）のに適した、いかなる試薬とすることもできる。しかし、好ましい一実施形態においては、洗浄試薬は、次の反応工程を行うバッファーである。また、洗浄試薬は洗浄促進剤（例えば、アピラーゼやホスファターゼ等）を含むこともできる。適切な洗浄試薬は当業者にはよく知られている。

【0091】

試薬及び前記酵素を分注しながら回転可能プラットフォームを低速度（例えば、約10～200 rpm）で回転させて個別領域に添加した試薬が除去されないようにし、また、洗浄試薬を分注しながら該プラットフォームを高速度（例えば、約400～1000 rpm）で回転させることができ。しかし、他の回転速度も可能である。

10

【0092】

上述のように、変性工程は、核酸鎖を加熱して変性させること、又は核酸鎖を高pHに曝露すること、又は核酸鎖を適切な酵素又は酵素混合物に曝露することを含むことができる。

【0093】

本発明の方法に係る好ましい実施形態においては、核酸鎖を変性した後にリンス試薬を用いたリンス工程で該相補鎖を除去する工程を含む。

20

【0094】

好ましくは、前記プラットフォームを回転させていかなる残存試薬も遠心力で除去することにより、前記個別領域を実質的に乾燥させることによって、前記各個別領域を前記次の試薬の各々に対して準備する。こうすることによって、試薬による前記個別領域の汚染を実質的に低減する、好ましくは、試薬による前記個別領域の汚染を実質的になくす。

【0095】

本発明は、その第24の態様において、核酸鎖の配列決定のための第20又は第21の態様に記載のプラットフォームの使用を提供する。

【0096】

本発明は、その第25の態様において、第20又は第21の態様に記載のプラットフォームと、核酸鎖の配列決定のための一以上の試薬とを含むキットを提供する。

30

【0097】

本発明は、その第26の態様において、核酸鎖の配列決定装置であって、

第20の態様に記載の前記プラットフォームを所定の制御可能でユーザが選択可能な回転速度で回転させる装置と、

必要に応じて、前記個別領域に核酸鎖結合パートナーを分注して、前記核酸鎖結合パートナーを前記個別領域に固定化する装置と、

必要に応じて、前記個別領域に核酸鎖を分注して、前記核酸鎖を前記個別領域に選択的に固定化する装置と、

必要に応じて、任意の相補核酸鎖を変性し、必要に応じて除去する装置と、

A、T、G及び／又はCヌクレオチド、該ヌクレオチドのそれぞれのアナログ、又はその組合せを分注して前記個別領域に接触させる装置と、

40

洗浄試薬を分注する装置と、

必要に応じて、一以上の酵素溶液を分注する装置とを含む装置を提供する。

【0098】

本発明は、その第27の態様において、核酸鎖の配列決定装置であって、

第21の態様に記載の前記プラットフォームを所定の制御可能でユーザが選択可能な回転速度で回転させる装置と、

必要に応じて、前記個別領域に核酸鎖を分注して、前記核酸鎖を前記個別領域に選択的に固定化する装置と、

必要に応じて、任意の相補核酸鎖を変性し、必要に応じて除去する装置と、

50

A、T、G及び／又はCヌクレオチド、該ヌクレオチドのそれぞれのアナログ、又はその組合せを分注して前記個別領域に接触させる装置と、

洗浄試薬を分注するための装置と、

必要に応じて、一以上の酵素溶液を分注する装置とを含む装置を提供する。

【0099】

プラットフォームを回転させる装置はモータであり、所定の回転速度はユーザが選択可能であり、約10～1000 rpmであることが好ましい。前記核酸鎖を分注し、A、T、G及び／又はCヌクレオチドを分注し、洗浄試薬を分注する装置は、いかなる装置とすることもできるが、インクジェット式技術、圧電作動型又は空気パルス駆動型に類似した装置であることが好ましい。また、該装置には、回転可能プラットフォームから除去される廃棄試薬を抜き出すための真空抽出システムを設けることも好ましい。また、該装置には、パイロシークエンシング反応によって生じた光を検出する適切な検出手段／装置も設けられる。適切な検出器は当業者には知られていようが、例えば、光電子増倍管を回転可能プラットフォームの下方又は上方に取り付けることができる。

10

【0100】

任意の相補核酸鎖を変性し、必要に応じて除去する装置は、プラットフォームを94まで加熱する装置を含むことができ、あるいは、加熱された試薬や他の変性用化学品を分注する更なるシリジン又は蠕動ディスペンサを含むことができる。

【0101】

別の設計においては、回転可能プラットフォームは必ずしもディスク自体である必要はなく、回転フォーマットに各個別反応ウェルを保持するためのクレードル内にロードされた複数の個別反応ウェルから構成することができる。例えば、改造された0.2 mLの微量遠心チューブを回転可能クレードル状のプラットフォームに45度で取り付けることができる。この構成においては、キャップは開いており、水平面上にある（キャップの内部表面は上方を向いている）。キャップは、低 rpmでキャップ内に分注された試薬が高 rpmで該チューブ内に注入されるように改変されている。また、微量遠心チューブのプラスチックヒンジがチャネルとして作用し、廃棄試薬がキャップからチューブに向かうように改変されている。キャップは、配列決定反応を行う個別領域として機能し、チューブ自身は廃棄トラフとして機能する。この利点は、オペレータが所望の数のチューブをクレードル内に挿入して一個のサンプル又は多数のサンプルをロードできることである。

20

【0102】

本発明の他の態様は、核酸鎖の配列決定を並行して行うこと（すなわち、多重配列決定）に関する。例えば、本発明は、少なくとも1個の円周方向に延在するレーンを有する、核酸鎖の配列決定を行うための回転可能シリンドラであって、前記各レーンは、第1の結合パートナーを固定化するようになっているか、又は第2の結合パートナーを選択的に固定化するようになっている一以上の個別領域を有するシリンドラを提供する。当業者であれば、この実施形態によって多数のサンプルを同時に又は並行して処理できることを理解できるであろう。

30

【0103】

当業者であれば、本発明には本明細書で開示された実施形態及び特徴が含まれると共に、開示された実施形態及び特徴のあらゆる組合せも含まれることを理解できるであろう。

40

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1A】本発明の回転可能プラットフォームの平面図である。

【図1B】図1Aに示す回転可能プラットフォームの側面図である。

【図1C】図1Bの線1C-1Cにおける断面図である。

【図2A】図1に示す回転可能プラットフォームの一実施形態の斜視図である。

【図2B】図1に示す回転可能プラットフォームの一実施形態の断面斜視図である。

【図3A】図1に示す回転可能プラットフォームの一実施形態の斜視図である。

【図3B】図1に示す回転可能プラットフォームの一実施形態の断面斜視図である。

50

【図4A】外周トラフを有する図1に示す回転可能プラットフォームの別の実施形態の平面図である。

【図4B】外周トラフを有する図1に示す回転可能プラットフォームの別の実施形態の側面図である。

【図5】図1Aに示す回転可能プラットフォームが内部に設置された装置の断面図である。

【図6】反応をモニターするための焦点レンズを用いた光学検出装置を示す。

【図7】反応をモニターするための直接画像化を用いた光学検出装置を示す。

【図8】プラットフォーム上の個別領域を加熱するためのヒータリングを示す。

【図9】図8に示すヒータリングを組み込んだ装置を示す。

【図10A】図10Aは、核酸の配列決定を行うための少なくとも1個の微量遠心チューブを受けるようになっているクレードル状の回転可能プラットフォームの平面図である。

【図10B】図4Aに示す回転可能クレードルの側面図である。

【図10C】図10Bの線10C-10Cにおける断面図である。

【図10D】回転可能クレードル状の本発明の回転可能プラットフォームと共に用いる改変微量遠心チューブの斜視図である。

【図11】EDCの存在下でストレプトアビジンをコートしたポリスチレンウェルに関するパイログラムの結果である。

【図12】ストレプトアビジンに結合した錫型のみがシグナルを発生し得ることを示すストレプトアビジン陰性対照ウェルに関するパイログラムである。

【図13】配列決定時にシグナルを示さないEDC陰性対照ウェルに関するパイログラムである。

【図14】配列決定-洗浄-配列決定戦略を用いたSEQ-OLIGO-30BP合成オリゴヌクレオチド配列のパイログラムである。

【発明を実施するための形態】

【0105】

以下、本発明の好ましい実施形態を添付図面を参照しつつ、あくまでも一例として説明する。

【0106】

【定義】

本発明の説明及び特許請求の範囲において、以下の専門用語は後述の定義に従って用いられる。また、本明細書における専門用語は、本発明の特定の実施形態を説明する目的にのみ用いており、限定を意図しないことも理解されたい。特に明記しない限り、本明細書で用いられる全ての技術的及び科学的な用語は、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。

【0107】

特に文脈にて明確に定められない限り、本明細書及び特許請求の範囲全体において、「～を含む（comprise）」や「～を含んでいる（comprising）」等の単語は排他的又は網羅的ではなく包含的な意味、すなわち、「～を含んでいるが、それに限定されない」という意味に解釈されるものとする。

【0108】

以下、特に明記しない限り、「%」は「重量%」を意味し、「比」は「重量比」を意味し、「部」は「重量部」を意味する。

【0109】

本発明の広い範囲を説明する数値範囲やパラメータは近似値であるものの、具体例に記載の数値はできる限り正確に報告する。しかし、いかなる数値も、各試験測定値に存在する標準偏差に必然的に起因するある種の誤差を本質的に含む。

【0110】

説明をより簡潔にするため、本明細書に記載の量的表現の幾つかには「約」という語を付していない。「約」を明確に用いようが用いまいが、本明細書に記載のあらゆる量は実

10

20

30

40

50

際の所定値を指すことを意味し、更には、当該技術分野における通常の技術に基づいて合理的に推測される該所定値に対する近似値（例えば、該所定値に関する実験条件及び／又は測定条件に起因する近似値）を指すことも意味する。

【0111】

特に明記しない限り、本明細書に記載の「主に」及び「実質的に」は50重量%以上多く含むことを意味する。

【0112】

終点を用いた数値範囲の列挙には、その範囲内に含まれる全ての数が含まれる（例えば、「1～5」の場合には1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等が含まれる）。

10

【0113】

「好ましい」及び「好ましくは」は、ある状況下で一定の有益性をもたらし得る本発明の実施形態を意味する。しかし、同一の状況下又は他の状況下で他の実施形態が好ましい場合もある。また、一以上の好ましい実施形態を列挙した場合、他の実施形態が有用でないことを意味するのではなく、また、本発明の範囲から他の実施形態を排除することを意図するものでもない。

【0114】

特に明記しない限り、「a」、「an」及び「the」は「一又はそれ以上」を意味する。特に明記しない限り、「実施形態」に関して用いられる次の各表現「an embodiment」、「embodiment」、「embodiments」、「the embodiment」、「the embodiments」、「an embodiment」、「some embodiments」、「an example embodiment」、「at least one embodiment」、「one or more embodiments」及び「one embodiment」は「本発明の一以上の実施形態（必ずしも全ての実施形態ではない）」を意味する。

20

【0115】

列挙された項目のリストは、該項目のいずれか又はその全てが互いに排他的であることを意味するのではない。特に明記しない限り、列挙された項目のリストは、該項目のいずれか又はその全てが全体として網羅的であることを意味するのではない。また、列挙された項目のリストは、該項目がその列挙された順番に従って順序付けられることを意味するのではない。

【0116】

30

本特許出願に記載の各セクションの見出し及び本特許出願の名称は便宜上用いられているに過ぎず、決して開示内容を限定するものとして解釈すべきではない。

【0117】

本明細書において、「結合パートナー」は、結合パートナー対（いかなるリガンド／受容体対であってもよい）の一方を意味するものと理解されたい。結合パートナー対の一方を「第1の結合パートナー」と称し、結合パートナー対の他方を「第2の結合パートナー」と称する。例えば、結合パートナー対をストレプトアビシン／アビシン及びビオチンとすることができる。結合パートナー対は、例えば、ストレプトアビシンとビオチン化核酸を含むことができる。

【0118】

40

本明細書において、「回転可能」は回転されるようになっていることを意味する。

【0119】

本願明細書には多くの実施形態が記載されているが、これらは説明の目的で提示されているに過ぎない。記載された実施形態は、いかなる意味においても限定することを意図していない。本明細書における開示から容易に明らかのように、本発明は多くの実施形態に広く適用可能である。これらの実施形態は当業者が本発明を実施できるように十分に詳細に記載されているが、他の実施形態を用いることができると共に、本発明の範囲を逸脱せずに他の変更をなし得ることは理解されたい。従って、当業者であれば、種々の改変や変更を伴って本発明を実施できることは理解されよう。以下、図面を参照するが、全体として同様の参照番号は同様の部分を指す。

50

【0120】

バイロシークエンシングに関連して本発明の好ましい一実施形態について説明する。バイロシークエンシングに関連して行う好ましい一実施形態の説明は、本発明がバイロシークエンシングアッセイに限定されるものとして解釈すべきではない。

【0121】

図1を参照すると、ポリカーボネートディスク1の形をとる回転可能プラットフォームは、核酸の配列決定を行うための核酸鎖を選択的に保持するようになっている2個以上の個別領域2を有する。個別領域2は直径が約2～3mmで、ストレプトアビシンで被覆されており、ディスク1の外周囲に等間隔で配置されていることが好ましい。例えば、ディスク1の直径が120mmで円周が377mmとすると、直径が3mmの個別領域2をディスク1の中心から半径55mmの位置に6mm(個別領域/標的部位2の中心間の距離)ずつ離して配置した場合、約57個の個別領域がディスク1の外周囲に設けられる。しかし、個別領域の数を少なくしてもよく、あるいは、より大きなディスク1を用いるか、より小さな個別領域(例えば、直径が0.5mmで間隔を例えば1mmとする)を用いるか、又はそのいかなる組合せを用いて個別領域の数を多くしてもよい。個別領域2は浅いウェルで、体積が約0.5～100μLであることが好ましい。

10

【0122】

他の実施形態を図2及び3に示すが、ここでは同様の機構には同様の参照番号を付している。これらの例においては、回転可能プラットフォームは直径が120mmであり、50個のウェルが外周囲に等間隔で配置されている。ウェルは直径が約3mmであり、ポリカーボネートや透明ポリスチレン、白色高衝撃ポリスチレン(HIPS)等の材料から形成することができる。プラットフォームの厚さは通常1mm～3mmであり、ウェルの深さは0.8mm～2.8mmである。

20

【0123】

いくつかの実施形態においては、図4に最もよく示されるように、回転可能プラットフォーム1は、更に、回転可能プラットフォーム1の回転時にその表面から除去又は遠心分離される廃棄流体を受けるためのトラフ3を該プラットフォームの外周に有する。トラフ3はプラットフォーム1の成形要素であることが好ましい。配列決定反応の各工程において廃棄試薬はプラットフォームから遠心分離され、廃棄流体の処理を改善するためにトラフ3が設けられる。しかし、別の実施形態においては、回転可能プラットフォーム1が内部に配置される筐体4をトラフ5が該プラットフォーム1の外周に隣接する位置に設けられるように構成し、回転可能プラットフォーム1の回転時にその表面から除去される廃棄流体を受けるようにすることができる。トラフ5内の流体は、汚染を最小限に抑えるため、プラットフォーム1から導管6を経由させて抜き出すことができる。真空システム(図示せず)を用いることが好ましい。

30

【0124】

用いる配列決定方法はバイロシークエンシングであることが好ましい。しかし、上述したように、核酸鎖の配列決定の他の方法も用いることができる。

【0125】

個別領域2は核酸鎖を選択的に固定化するようになっていることが好ましい。例えば、核酸鎖をビオチン化することができ、個別領域2はビオチン化核酸鎖を結合させるためのストレプトアビシンを含む。しかし、核酸鎖を個別領域2に固定化するために他の化学作用も利用可能である。

40

【0126】

核酸鎖の配列決定を行うための本発明の方法においては、回転可能プラットフォーム1を用意し、核酸鎖を個別領域2に固定化する。次に、例えば、プラットフォーム1を約94まで加熱して、任意の相補核酸鎖を変性し、除去する。次に、個別領域2にA、T、G及びCヌクレオチドを逐次的に接触させ、各接触工程の間に、いかなる残存ヌクレオチド又は未反応ヌクレオチドも個別領域2から実質的に遠心力で除去されるようにプラットフォーム1を回転させる。

50

【0127】

本発明の方法は、前記各接触工程時及び／又はその後に核酸鎖を解析する工程を更に含む。解析工程は、ヌクレオチドの取り込みによって生じた光の出力を核酸鎖に結合したヌクレオチドの数と関連付けることによって核酸鎖内の次の塩基対を検出することを含む。反応によって生じた光を検出するための適切な検出器は光電子増倍管である。回転可能プラットフォーム1が回転するにつれ、全てのサンプルが検出器を通過する。ヌクレオチドが取り込まれなかった場合には、光シグナルは発生しないため、遠心力によって反応混合物を除去（各サイクル毎、又は（例えば）10～50サイクル毎（但し、80サイクル未満）に行う）し、次のヌクレオチドを用いて他のラウンドを開始する。

【0128】

10

好ましい実施形態においては、個別領域2に次のヌクレオチドを接触させる前に、各標的部位2を洗浄試薬を用いた洗浄工程又はリーンス工程に付す。洗浄試薬は、先の接触工程からの残存溶液を実質的に洗い流すことが可能な、いかなる試薬とすることもできるが、PCRバッファーであることが好ましい。

【0129】

ヌクレオチド試薬及び酵素を分注しながら回転可能プラットフォーム1を低速度（例えば、約10～200rpm）で回転させ、次いで洗浄試薬を分注しながらプラットフォーム1を高速度（例えば、約400～1000rpm）で回転させることが好ましい。

【0130】

20

本発明は、核酸鎖の配列決定のための回転可能プラットフォーム1の使用を提供すると共に、核酸鎖の配列決定のための回転可能プラットフォーム1と、一以上の試薬とを含むキットを提供する。

【0131】

図5を参照すると、本発明は更に、核酸鎖の配列決定のための回転可能プラットフォーム1を用いる装置を提供する。該装置は、所定の制御可能でユーザが選択可能な回転速度でプラットフォーム1を回転させるモータ（例えば、約10～1000rpmの回転速度を伝えることが可能なモータ）を有する。また、核酸鎖を個別領域2上に分注し、個別領域2に核酸鎖を固定化する装置も設けられる。このような装置は、インクジェット式技術の形態をとってもよく、適切なディスペンサー（例えば、シリニジポンプ）の形態をとってもよい。また、A、T、G及びCヌクレオチドを分注して個別領域2に接触させ、洗浄試薬を分注するための装置も設けられる。この場合も、このような装置はインクジェット式技術の形態をとることができる。また、任意の相補核酸鎖を変性し、除去するための装置も設けられるが、このような装置は、筐体4内に配置された加熱コイル（この図面には示さず）の形態をとることができる。

30

【0132】

40

また、パイロシークエンシング反応によって生じた光を検出するための適切な検出器8も設けられる。適切な検出器は当業者には知られていようが、例えば、光電子増倍管を回転可能プラットフォーム1の下方又は上方に取り付けることができる。特に図6及び7を参照すると、本発明に用いられる光電子増倍管検出器の種々の実施形態が示されている。一方の光学的構成では焦点レンズを用い（図6）、もう一方では直接画像化を用いている（図7）。図6は、焦点レンズ10、開口部11、感光表面12、光電子増倍管13及び検出電子機器14を示す。図7は、開口部15、感光表面16、光電子増倍管検出器17及び検出電子機器18を示す。

【0133】

50

図8を参照すると、加熱コイル又はリング20が示されている。ヒータリング20は、ヒータPCB（プリント回路基板）に結合したアルミニウムリングからなる。ヒータPCBには温度検知要素（図示せず）が組み込まれており、ヒータ温度の閉ループ制御を行うことができる。ヒータリング20は、回転可能プラットフォーム1のウェル／個別領域の設計に応じて突起部21を表面に有しても有さなくてもよい。突起部21は、回転可能プラットフォームのウェルの底部のみがヒータリング20に確実に接触するように設計され

ている。ヒータリング 20 は、上方に移動して回転可能プラットフォーム 1 に接触し、下方に移動して回転可能プラットフォーム 1 を自由に回転させ、反応ウェルから熱を迅速に除去するように設計されることが好ましい。これは、ヒータリング 20 をガイドポスト 23 の上下に摺動させるソレノイド 22 を用いて行うことができる。

【0134】

酵素及びヌクレオチド混合物を分注するために回転可能プラットフォーム 1 を低速度（すなわち、200 rpm 以下）で回転させることができると、この場合、遠心力は、該混合物が個別領域 2 から移動せず、反応が進行し、光学検出が行える程度に低い。洗浄試薬は高いロータ速度（すなわち、400 rpm）で添加することができるが、洗浄によって標的部位 2 から全ての試薬が除去され、個別領域 2 間の汚染は実質的になくなる。

10

【0135】

図 10 A ~ 10 C を参照すると、別の設計においては、回転可能プラットフォーム 1 は、必ずしもディスク自体である必要はなく、回転フォーマットに各個別反応ウェル 30 を保持するためのクレードル 31 内にロードされた複数の個別反応ウェル 30 から構成することができる。例えば、個別反応ウェル 30 は、回転可能クレードル 31 としてのプラットフォーム 1 に 45 度で取り付けることができる、改造された 0.2 mL の微量遠心チューブの形態とすることができます。この構成においては、キャップ 32 は開いており、水平面上に存在する（キャップの内部表面は上方を向いている）。キャップ 32 は、低 rpm でキャップ内に分注された試薬が高 rpm でチューブ 33 内に注入されるように改造されている（点線矢印参照）。キャップ 32 は、配列決定反応を行う標的部位 2 として機能し、チューブ 33 自身は廃棄トラフ 3 として機能する。ヒンジ 34 は、遠心分離された廃棄試薬をチューブ 33 に運ぶチャネルとして作用するように改造され得る。

20

【実施例】

【0136】

上述のように、DNA 配列決定は、パイロシークエンシングを利用することによって行うことができる（アガー（Agah）A.、アガジャン（Aghajan）M.、マシャエキ（Mashayekhi）F.、アミニ（Amini）S.、デイヴィス（Davis）R.、プランマー（Plummer）J. D.、ロナギ（Ronaghi）M.、グリフィン（Griffin）P. B.、パイロシークエンシングのための多酵素モデル、Nucleic Acids Res. 2004; 32: e166 参照）。配列決定は、DNA ポリメラーゼ酵素によって相補的な 3' - デオキシリボヌクレオシド - 5' - 三リン酸（dNTP）が一本鎖錠型に取り込まれた後のピロリン酸の放出を検出することによって行う。最初に、スルフリラーゼ酵素によってピロリン酸をアデノシン三リン酸（ATP）に転化する必要がある。ルシフェラーゼ酵素による ATP とルシフェリンとの反応によって光シグナルが発生し、これによってヌクレオチドの取り込みが示され、錠型錠の配列が示される。先に添加したヌクレオチドからの干渉をなくして次のヌクレオチドの取り込みと検出を行うためにアピラーゼ酵素を用いる。アピラーゼによって、次のヌクレオチドを添加する前に余分なヌクレオチドが分解する。

30

【0137】

パイロシークエンシングプロセス時には、ヌクレオチド硫酸やヌクレオチドニリン酸等の副生物が蓄積する。このような副生物は酵素を阻害し、配列決定の長さが長い場合にシグナル品質が低下する。例えば、アピラーゼの阻害によって、取り込まれていないヌクレオチドの除去が抑制され、これが塩基の非同期取り込みをもたらし、シグナル検出が弱くなる。その結果、パイロシークエンシングを利用した配列決定の長さが現在は 60 ヌクレオチド以下に制限されている（マシャエキ（Mashayekhi）F.、ロナギ（Ronaghi）M.、パイロシークエンシング化学におけるリード長制限因子の解析、Anal. Biochem. 2007; 363: 275 ~ 287 参照）。

40

【0138】

従って、副生物阻害の影響を抑制し、リード長を長くするため、本発明では、多くのヌクレオチド曝露を行った後に反応成分を洗い流すことができ、これによって、錠型を支持体に確実に結合させたまま、新しい試薬を添加して配列決定の次のセクションを続けるこ

50

とができる。

【0139】

[配列決定標的]

自己刺激ループ配列（下線で強調）を有する 5' - ビオチン標識合成オリゴヌクレオチドを用い、本発明に係るプラットフォームで最大 30 塩基対の配列決定を行った。合成オリゴヌクレオチド（SEQ - O L I G O - 30 B P）の完全塩基対配列は次の通りであった。

5' - ビオチン - A G T G T G C A G G A C G A G T C C C C A C C A C A C C C A G
G A A A C A G C T A T G A C C A T G C T T G C A T G G T C A T A G C T G T T T C
C - 3' (配列番号 1)

10

【0140】

自己刺激ループ配列はその相補配列に折り重なるため、これによって、パイロシークエンシング反応を合成オリゴヌクレオチドの 3' 末端から開始することができた。従って、該反応によって認識された最初のヌクレオチドはアデノシン（A）塩基（ボールド体で強調）であった。その結果、反応配列で用いた最初のヌクレオチドはその相補ヌクレオチドのチミジン（d T T P）であった。従って、SEQ - O L I G O - 30 B P 反応のための完全配列は、T G G G T G T G G T G G G G A C T C G T C C T G C A C A C T (配列番号 2) であった。パイロシークエンシング反応ではヘテロポリマーヌクレオチド（同一ヌクレオチドの多重伸長）を認識することができるため、配列決定のためのヌクレオチドの実際の分注順序は、T G T G T G A C T C G T C T G C A C A C T

20

G C A C A C T に短縮された。SEQ - O L I G O - 30 B P オリゴヌクレオチドは 0.2 μmol の濃度まで希釈した。

【0141】

[ストレプトアビジン被覆ディスク]

高衝撃ポリスチレンディスクのストレプトアビジンによる被覆を、次の化学品 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸（EDC）を用いた該タンパク質とポリマーとの共有結合によって行った。ウェルの準備は、2.5 μL の EDC (濃度: 10 mg / mL) と 2.5 μL のストレプトアビジン (濃度: 5 mg / mL) を添加した後、反応物の蒸発を抑制するよう加湿ボックス中、室温で 4 時間インキュベートして行った。インキュベーション後、ウェルをリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、更に水で洗浄した。ウェルを 1 時間空気乾燥させた後、乾燥剤を含む密封バッグ内に 4° で保存した。

30

【0142】

ストレプトアビジンをポリスチレンプラットフォームに共有結合できることは、キアゲン GmbH によって提供される対照オリゴヌクレオチドを用いた対照実験を数多く行うことによって示された。対照オリゴヌクレオチドの配列決定は、後述のように洗浄工程なしで行った。対照オリゴヌクレオチドの配列は、T A (C 又は T) G G T T T G C (配列番号 3) であり、ヌクレオチド分注の順序は、T A C T G T G C であった。対照ウェルには EDC 又はストレプトアビジンのいずれか一方が存在しない。陽性ディスクのパイロシークエンシングによって良好な強いシグナルが示された（図 11）。ストレプトアビジン陰性対照又は EDC 陰性対照のいずれにおいても真のシグナルは認められなかった（図 12 及び 13）。

40

【0143】

EDC の存在下でポリスチレンウェルをストレプトアビジンで被覆した場合のパイログラム結果を図 11 に示す。この結果から、ビオチン - ストレプトアビジン結合によって鑄型を容器に結合させた場合には配列の同定が可能であることが見出される。

【0144】

図 12 に示すストレプトアビジン陰性対照に関するパイログラム結果から、ストレプトアビジンに結合した鑄型のみがシグナルを発生させ得ることが見出される。従って、図 11 の結果において、洗浄後の残存鑄型はシグナルの発生に寄与しなかった。

50

【0145】

EDC陰性対照のパイログラム結果を図13に示すが、配列決定時にはシグナルが現れない。この結果から、ストレプトアビジンはEDCの存在下でのみポリスチレンウェルに結合したことが見出される。従って、プラットフォームへの結合は共有結合によってなされた。

【0146】

[アッセイセットアップ]

共有結合ストレプトアビジンで被覆したポリスチレンディスク／プラットフォームのウェル内に5μLのオリゴヌクレオチドを分注し、1pmolの配列決定用標的を用意した。鑄型を室温で10分間インキュベートしてビオチン-ストレプトアビジン結合を生じさせた。インキュベーション後、未結合の鑄型をピペットで除去し、ウェルを5μLの脱イオン水で2回洗浄して残存する未結合の鑄型を確実に除去した。

10

【0147】

[配列決定 - 洗浄 - 配列決定]

ディスク1を装置内に配置した。手動でセットアップを行い、2μLの水、1μLの酵素混合物(DNAポリメラーゼ、スルフリラーゼ、ルシフェラーゼ及びアピラーゼを含む)、及び1μLの基質(ルシフェリンとバッファーからなる)を微量注入できるようにした。10秒間ベースラインを安定化させた後、酵素と基質を添加し、その後、陰性対照ヌクレオチドであるdGTP(100nL)を微量注入し、実行時にランダムなシグナルが確実に発生しないようにした。グアノシンヌクレオチドは配列の最初の塩基ではないため、添加時にシグナルピークは生じない。次のヌクレオチドのセット(100nL)を30秒間隔でロードした(分注順序:T G T G T G T)。各ヌクレオチドを正確に添加した結果、光シグナルピークが生じた。ピーク値は連続する同一ヌクレオチドの数に応じて変化した。得られた該ピークのグラフをパイログラムと称する。

20

【0148】

これらの8個のヌクレオチドを添加した後、ディスクを1000回転／分で5秒間回転させて反応内容物を除去した。高速度回転の終了時に、ロータ速度を60回転／分まで戻し、同体積の水、酵素及び基質を添加して配列決定サイクルを再開した。次いで、次のヌクレオチドのセットをロードし、シグナルピークを測定した。2番目と3番目のヌクレオチドのセットにはG A C T C G T CとT G T C A C A Tを用いた(下線を付したヌクレオチドは反応非特異性をモニターするための更なる陰性対照として用いた)。これらの2個の配列セットの間に洗浄工程を行った。全配列データを図14に示す。

30

【0149】

図14は、配列決定 - 洗浄 - 配列決定戦略を用いたSEQ-OLIGO-30BP合成オリゴヌクレオチド配列のパイログラムを示す。セルフプライミンググループ配列を有する5'-ビオチン標識SEQ-OLIGO-30BP鑄型をストレプトアビジン被覆高衝撃ポリスチレンディスクのウェル内にロードし、ビオチン-ストレプトアビジン結合によって標的をウェルに捕捉させた。未結合の鑄型を洗浄し、酵素と基質を添加して配列決定反応を開始した。最初に陰性対照ヌクレオチド(dGTP)をロードし、反応における非特異性をモニターした。公知配列の最初のヌクレオチドの内の7個を30秒間隔で微量注入した(100nL)。配列内の対応する塩基の各々に対してピークが発生した。ピーク値は配列内の同一ヌクレオチドの数に応じて変化した。最初のセットの全てのヌクレオチドを添加した際に、ロータ速度を1000回転／分まで上昇させてウェルの液状内容物を除去し、鑄型をストレプトアビジン被覆ディスクの所定位置に結合させた。5秒後、速度を60回転／分まで戻し、新しい酵素及び基質と次のヌクレオチドのセットを添加して配列決定プロセスを再開した。この結果から、本発明のストレプトアビジン被覆ディスクに対して配列決定 - 洗浄 - 配列決定が可能であることが見出される。

40

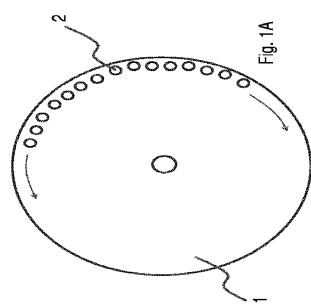
【0150】

現時点で本発明を実施するための最良の態様と考えられる実施形態を参照しつつ本発明について説明したが、本明細書に開示され、以下に続く特許請求の範囲によって把握され

50

るより広い発明概念を逸脱することなく、本発明を様々な実施形態に適応させる上で種々の変更をなし得ることは理解されたい。

【図 1 A】



【図 1 B】

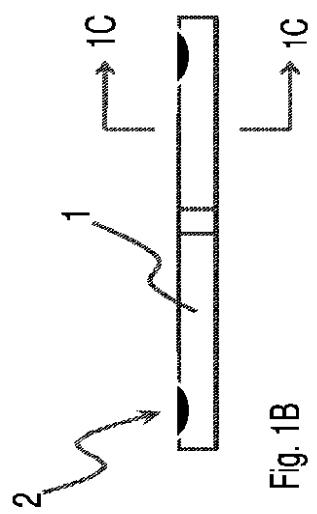


Fig. 1B

【図1C】

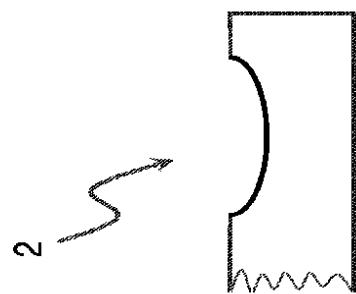


Fig. 1C

【図2A】

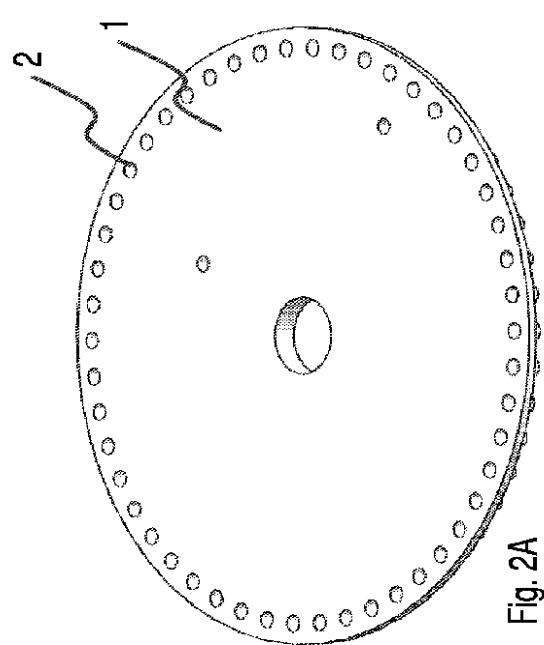


Fig. 2A

【図2B】

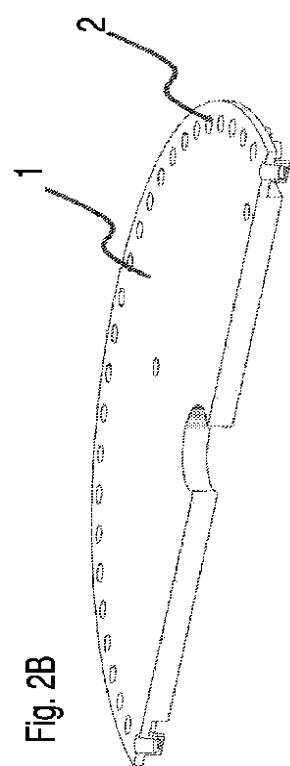


Fig. 2B

【図3A】

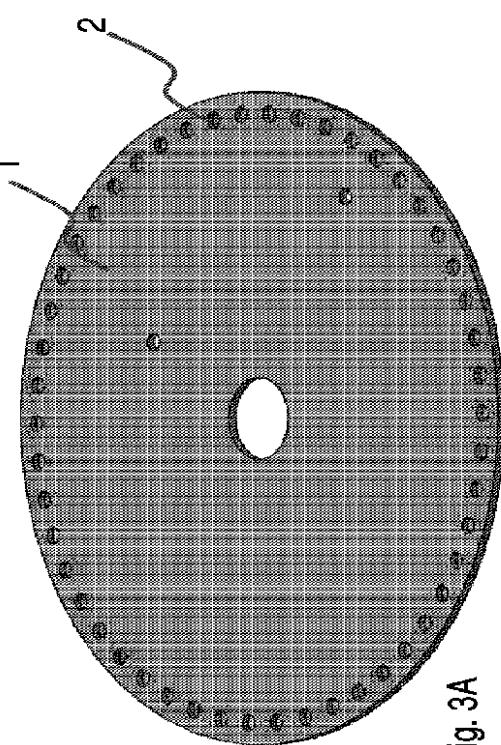


Fig. 3A

【図3B】

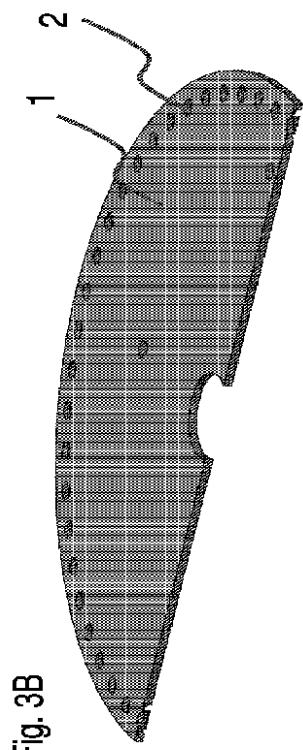


Fig. 3B

【図4A】

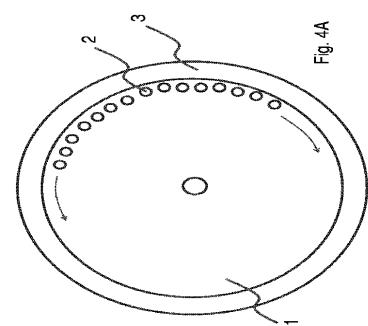


Fig. 4A

【図4B】

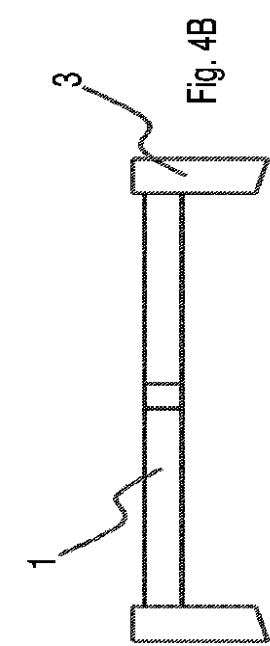


Fig. 4B

【図5】

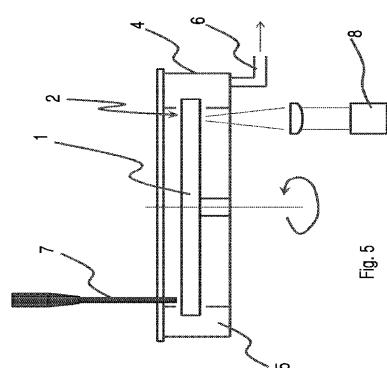


Fig. 5

【図6】

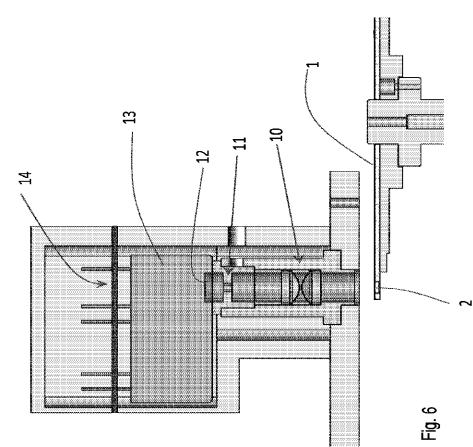


Fig. 6

【図7】

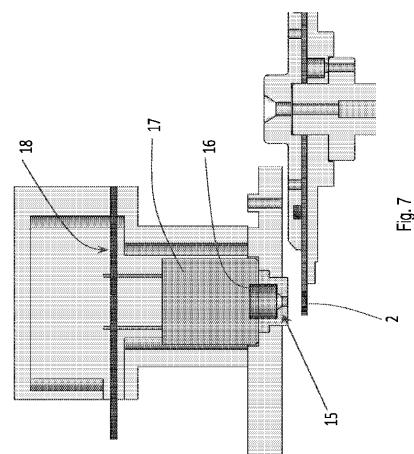


Fig. 7

【図9】

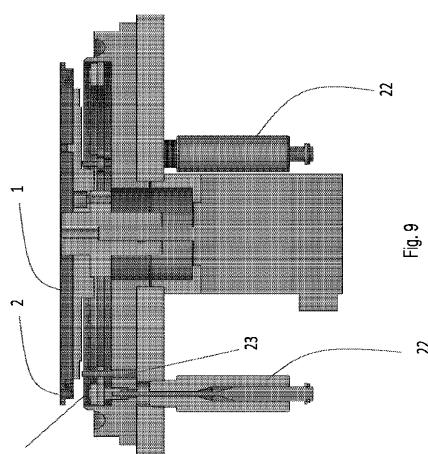


Fig. 9

【図8】

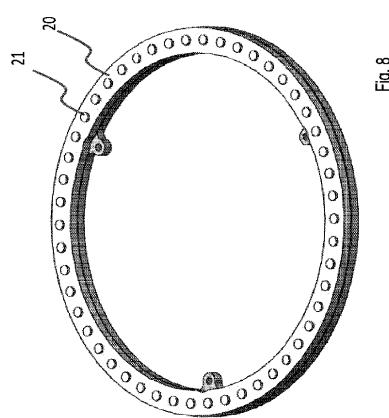
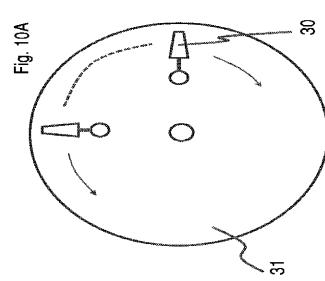


Fig. 8

【図10A】



31

【図10B】

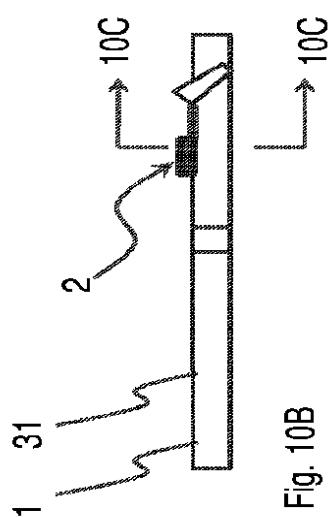


Fig. 10B

【図10C】

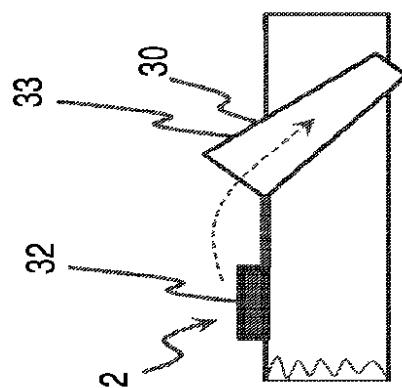


Fig. 10C

【図10D】

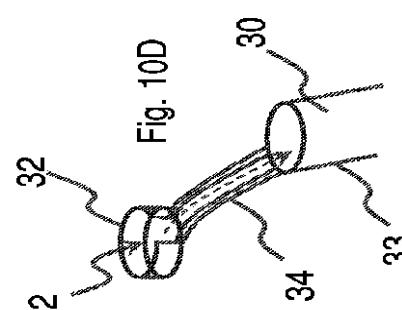


Fig. 10D

【図11】

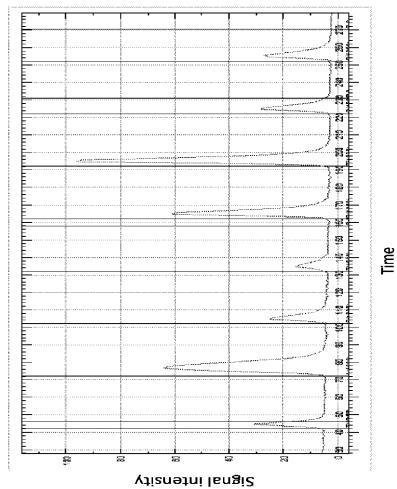


Fig.11

【図12】

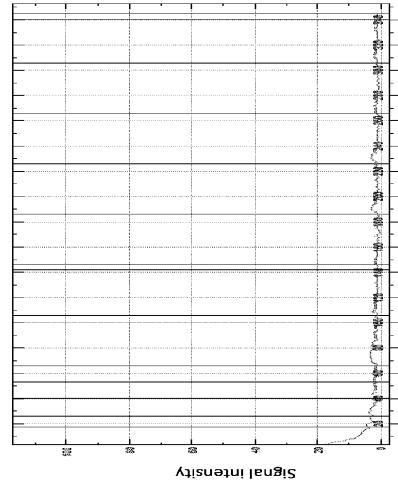


Fig.12

【図13】

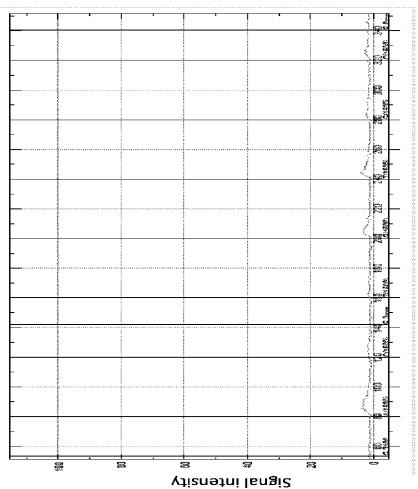


Fig.13

【図14】

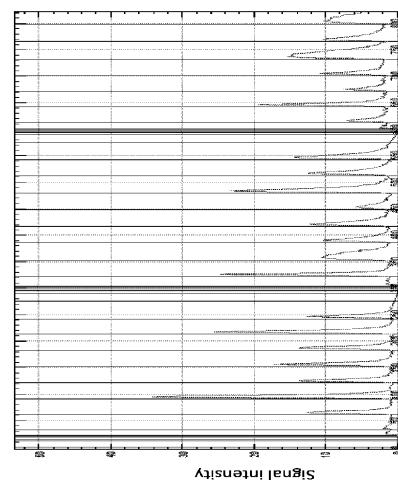


Fig.14

【配列表】

0005795313000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 コルベット, ジョン

オーストラリア国 2030 ニュー サウス ウエールズ, ポークリューズ, ザ クレセント
37

(72)発明者 コルベット, ジョン, エスエヌアール

オーストラリア国 4216 クイーンズランド, パラダイス ポイント, ナイツブリッジ パレ
ード ウエスト 48

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2002-534096 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
WPIIDS(STN)

JSTPLus/JMEDPLus/JST7580 (JDreamIII)

PubMed