

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-500002
(P2016-500002A)

(43) 公表日 平成28年1月7日(2016.1.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q	1/68	Z N A A 2 G O 4 5
C 12 Q 1/04	(2006.01)	C 12 Q	1/04	4 B O 2 4
C 12 M 1/34	(2006.01)	C 12 M	1/34	B 4 B O 2 9
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 M	1/34	Z 4 B O 6 3
G 01 N 33/50	(2006.01)	C 12 N	15/00	F

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-535848 (P2015-535848)	(71) 出願人	305053547 カリフォルニア インスティテュート オ プ テクノロジー
(86) (22) 出願日	平成25年10月4日 (2013.10.4)		アメリカ合衆国 9 1 1 2 5 カリフォル ニア、パサデナ、イースト カリフォルニ ア ブールバード 1 2 0 0
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月28日 (2015.5.28)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/063594	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02014/055963	(72) 発明者	イズマジロフ, ラステム エフ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 0 0 1, アルタデナ, モルスレー ロー ド 2 3 9 7
(87) 國際公開日	平成26年4月10日 (2014.4.10)		
(31) 優先権主張番号	61/710,454		
(32) 優先日	平成24年10月5日 (2012.10.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マイクロ流体イメージングおよび分析のための方法およびシステム

(57) 【要約】

本明細書では、試料を、消費者のセルフォーンなどのデバイスからの画像を使用して、疾患または生物の存在について評価するための方法およびデバイスが開示される。試料データを作成するための方法であって、i) 一連の光子を、光源から、短いバーストで放出するステップであり、前記バーストが、約 1,000,000 分の 5 秒間～約 1 秒間にわたり持続し、前記光子のうちの少なくとも一部が、前記試料に接触するステップと、ii) 少なくとも 1 つの光子を画像センサーにより回収して、試料データを創出するステップであり、前記回収される光子が、前記試料に接触した光子であるステップと、iii) 前記試料データを処理して、前記試料中の核酸のバイナリー定量化をもたらすステップと、iv) 核酸の前記バイナリー定量化を解析して、前記試料に関連する結論記載を作成するステップとを含む方法。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料データを作成するための方法であって、

i) 一連の光子を、光源から、短いバーストで放出するステップであり、前記バーストが、約 1,000,000 分の 5 秒間～約 1 秒間にわたり持続し、前記光子のうちの少なくとも一部が、前記試料に接触するステップと、

i i) 少なくとも 1 つの光子を画像センサーにより回収して、試料データを創出するステップであり、前記回収される光子が、前記試料に接触した光子であるステップと、

i i i) 前記試料データを処理して、前記試料中の核酸のバイナリー定量化をもたらすステップと、

i v) 核酸の前記バイナリー定量化を解析して、前記試料に関連する結論記載を作成するステップと

を含む方法。

【請求項 2】

前記試料中の核酸の前記定量化を使用して、前記試料の非核酸成分を検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記非核酸成分が、細胞、タンパク質、およびウイルスを含む群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記回収される光子が、前記光源から、短いバーストで放出された前記光子のうちの 1 つである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記光子が、可視光スペクトル内の光子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記光子が、UVスペクトル内の光子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記光源が、カメラフラッシュまたはフラッシュバルブである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記光源が、キセノンフラッシュである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記光源が、発光ダイオード (LED) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記画像センサーが、CMOS である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記画像センサーが、CCD である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

放出される前記一連の光子の強度が、前記短いバーストの時間の長さの間で一定でない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記試料と関連する前記データが、過去の時点または基準試料に対する、前記試料の光学的特性の変化を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記試料と関連する前記データが、蛍光データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記蛍光データが、光子が蛍光色素から放出される結果である、請求項 14 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記蛍光色素が、SYTO 9 である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記蛍光色素が、カルセインである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記試料と関連する前記データが、比色データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記試料と関連する前記データが、半透明データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記試料と関連する前記データが、有色データと対比した半透明データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試料と関連する前記データが、不透明データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記試料と関連する前記データが、完全に同時に捕捉される单一の画像である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記試料と関連する前記データが、複数の空間的に隔離されたコンパートメントからの測定値を含み、前記コンパートメントの各々が、前記試料の一部を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記データを処理するステップが、サイズの弁別、形状の弁別、1 つの基準もしくは一連の基準との比較、または单一の画像内の色による比較を活用して、前記試料中の核酸のデジタル定量化をもたらすことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記データを処理するステップが、

i) 試料と関連する前記データを検討し、以下の特徴的な閾値 a ~ e :

a) 少なくとも 1 つのアライメント特徴が存在し、かつ / または正確な配向性にあること、

b) 前記試料と関連する前記データが、焦点の合った画像を含むこと、

c) 前記画像と関連する前記データにより、アッセイの適正な利用が確認されること、

d) 前記画像が、意図される試料のグラフィック表示を含むこと、

e) 前記試料の寸法が、意図される寸法と一致すること、

f) 前記試料が、意図される一連のコンテナーにわたり、单一のコンテナー内に分布すること

のうちの少なくとも 1 つずつについて測定すること、および

i i) 前記特徴的な閾値のうちの 1 または複数が満たされない場合は、全ての特徴的な閾値を超えるように要求されるパラメータを調整し、満たされなかった特徴的な閾値が満たされるまで、請求項 1 の全てのステップを繰り返すことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記データ処理ステップを、ローカルコンピュータにより行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記データ処理ステップを、前記データを異なるデバイスへと転送して、処理することにより行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

前記試料に接触した、前記放出された光子のうちの少なくとも1つの波長が、蛍光に起因してシフトしている、請求項1に記載の方法。

【請求項29】

結論記載が、疾患についての記載である、請求項1に記載の方法。

【請求項30】

前記結論記載により、遺伝子障害の存在または非存在が記載される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記結論記載が、ウイルス負荷の定量化である、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記結論記載が、ウイルス感染の存在または非存在についての診断である、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

前記結論記載が、少なくとも1つの細菌種の定量化である、請求項29に記載の方法。

【請求項34】

前記結論記載が、細菌感染の存在または非存在についての診断である、請求項29に記載の方法。

【請求項35】

結論記載が、前記試料中の遺伝子の前記定量化である、請求項1に記載の方法。

【請求項36】

結論記載が、前記試料中の遺伝子または核酸配列の存在または非存在を決定している、請求項1に記載の方法。

【請求項37】

結論記載が、前記試料中の遺伝子の存在または非存在を決定している、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

結論記載が、前記試料中のDNA配列またはRNA配列の存在または非存在を決定している、請求項39に記載の方法。

【請求項39】

結論記載が、前記試料中の遺伝子内の突然変異または核酸配列内の突然変異の存在または非存在を決定している、請求項1に記載の方法。

【請求項40】

結論記載が、前記試料中の遺伝子または核酸配列内の突然変異の前記定量化である、請求項1に記載の方法。

【請求項41】

前記遺伝子または核酸配列が、植物由来である、請求項37から40に記載の方法。

【請求項42】

前記遺伝子または核酸配列が、ヒト由来である、請求項37から40に記載の方法。

【請求項43】

前記遺伝子または核酸配列が、ウイルス由来である、請求項37から40に記載の方法。

【請求項44】

前記遺伝子または核酸配列が、細菌由来である、請求項37から40に記載の方法。

【請求項45】

非一過性のコンピュータで読み取り可能な媒体データベース内で、前記結論記載および他の情報を表示し、かつ/または関連付けるステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項46】

前記他の情報が、前記試料を回収した生物についての情報である、請求項45に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 7】

患者名、年齢、体重、身長、試料回収の時点、試料の種類、試料回収および／もしくはデータ収集に関する G P S 位置データ、または医療記録、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記結論記載を表示するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記結論記載を、前記使用者へと表示する、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記結論記載を、異なるデバイスへと送信する、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記試料が、少なくとも 1 つの核酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 5 2】

前記核酸が、ヒトから得られる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記核酸が、植物または植物種子から得られる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記核酸が、動物から得られる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記核酸が、細菌から得られる、請求項 5 1 に記載の方法。

20

【請求項 5 6】

前記核酸が、ウイルスから得られる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記核酸が、合成核酸である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記核酸が、未知の供給源に由来する、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記試料が、バーコードなど、マシンで読み取り可能な標識をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記標識が、前記試料の形状、試料サイズ、試料の種類、試料の配向性、前記試料を得た生物、前記標識に近接する試料の数、またはさらなるデータ解析のための命令に関連するコード化された情報を含む、請求項 5 9 に記載の方法。

30

【請求項 6 1】

前記試料が、前記光子に接触する前に、核酸増幅反応を起こす、請求項 1 に記載の方法。

。

【請求項 6 2】

前記核酸増幅反応が、ループ媒介増幅 (L A M P) 反応である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記核酸増幅反応が、P C R 反応である、請求項 6 1 に記載の方法。

40

【請求項 6 4】

前記方法が、約 5 5 ~ 6 5 で、または 5 5 ~ 6 5 の温度範囲で実施される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記試料のうちの少なくとも一部が、少なくとも 2 つ以上のコンテナーを含むアレイへと分配され、前記画像が、各コンテナーの位置由来の光学データを含む、請求項 6 1 から 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記光学データが、蛍光シグナルまたは蛍光シグナルの欠如である、請求項 6 5 に記載の方法。

50

【請求項 6 7】

前記アレイが、 SlipChip である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

増幅される前記核酸が RNA である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 9】

試料内の核酸の前記ディジタル定量化についての前記解析が、

i) 反応が、 57 ~ 63 の間の温度範囲内で生じること、

ii) 15 分間 ~ 1.5 時間の間の反応時間、

iii) 湿度が、 0 % ~ 100 % の間であること、および

iv) バックグラウンド光が、 0 ~ 6 ルクスの間であること

10

からなる群から選択される反応パラメータのうちの少なくとも 1 つについて、前記試料についての一貫した結論記載をもたらす、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記試料についての前記一貫した結論記載が、前記反応パラメータのうちの少なくとも 2 つについての結論記載である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記試料についての前記一貫した結論記載が、前記反応パラメータのうちの少なくとも 3 つについての結論記載である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記試料についての前記一貫した結論記載が、前記反応パラメータのうちの 4 つについての結論記載である、請求項 6 9 に記載の方法。

20

【請求項 7 3】

前記画像センサーが、セルフォーンまたはタブレットコンピュータの一部である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

以下のステップ：

a) セルフォーンを使用する、蛍光領域の検出、

b) モバイルハンドヘルドデバイスを使用する、蛍光領域の検出、

c) 単一分子からの増幅産物に対応する蛍光領域の検出、

30

d) モバイル通信デバイスと統合されたコンパクトフラッシュ (登録商標) を使用して、蛍光を励起するステップ、

e) 画像および / または処理された画像および / または結果として得られるデータを、中央コンピュータへと伝送するステップ、

f) 色チャネルの組合せを使用する、画像のバックグラウンド補正、

g) 1 または複数のフィルタリングアルゴリズムを使用することによる蛍光領域の増強、

40

h) 1 または複数の形状を使用して、画像忠実度を決定する形状検出、

i) 1 または複数の形状を使用して、解析されるべき前記領域を決定する形状検出ステップ、

j) 1 または複数のアルゴリズムを使用して、陽性領域を決定する形状検出、

k) 前記中央コンピュータ上で、画像および / またはデータを処理および / または解析するステップ、

l) 前記画像および / またはデータを、任意選択でアーカイブ化するステップ、

m) 情報を前記モバイルデバイスへと返送するステップ、

n) 画像および / または処理された画像および / または結果として得られるデータを、前記使用者へと伝送するステップ、

o) 画像および / または処理された画像および / または結果として得られるデータを、第 3 者へと伝送するステップ、

p) ポアソン統計解析を適用して、蛍光領域および非蛍光領域の数を定量化するステップ、ならびに

50

q) ポアソン統計解析を適用して、蛍光領域および非蛍光領域の数に基づき、濃度を定量化するステップ

のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記光源が、少なくとも 100,000 ルクスまたはそれより強い光強度を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記光が、内蔵カメラを含有するモバイルフォーンまたは内蔵カメラを含有するタブレットから放出される、請求項 1 に記載のポータブルディジタルデバイス。

【請求項 7 7】

前記光が、フィルタリングされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

フィルターが、フィルターのセットを含む、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記フィルターのセットが、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つのフィルター、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

フィルターが、蛍光フィルターを含む、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記蛍光フィルターが、ダイクロイックフィルターおよび / またはロングパスフィルターを含む、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記ダイクロイックフィルターの透過率が、390 ~ 480 nm またはその近辺において、85 % を超え得、かつ、540 ~ 750 nm またはその近辺において、1 % 未満でありうる、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記ロングパスフィルターのブロッキングが 50 D を超え得、かつ、530 ~ 750 nm またはその近辺の波長における透過率が 90 % を超えうる、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記解析工程が、1 分間未満かかりうる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記解析工程が、第 2 の色チャネルから収集されたデータを使用して、画像のバックグラウンド補正を実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

ソフトウェアのアルゴリズムが、ポアソン統計解析を適用して、蛍光領域および非蛍光領域の数を定量化しうる、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記データ解析を、クラウドベースのサービスを介して、遠隔に位置する中央コンピュータを介して、またはこれらの任意の組合せを介してローカルで行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記方法が、核酸を検出するための用途をもたらす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8 9】

写真を撮影するときに、ポータブルディジタルデバイスを、角度を付けた位置に傾ける、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9 0】

試料データを作成するためのデバイスであって、

i) 一連の光子を、短いバーストで放出する光源であり、前記バーストが、約 1,000,000 分の 5 秒間 ~ 約 1 秒間にわたり持続し、前記光子のうちの少なくとも一部が前記試料に接触する光源と、

10

20

30

40

50

i i) 前記試料のうちの少なくとも一部に接触した前記光子を回収して、前記試料と関連するデータを創出する、前記光源と並んでいない画像センサーと、

i i i) 前記試料データを処理して、前記試料中の核酸のバイナリー定量化をもたらすように構成されたプロセッサー、または前記試料データを、前記試料中の核酸のバイナリー定量化をもたらすように構成された、異なるデバイスへと伝送するための無線接続と、

i v) 核酸の前記バイナリー定量化を解析して、前記試料に関連する結論記載を作成するように構成されたプロセッサーと
を含むデバイス。

【請求項 9 1】

フィルターをさらに含む、請求項 9 0 に記載のデバイス。 10

【請求項 9 2】

前記フィルターのセットが、少なくとも 1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つのフィルター、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項 9 1 に記載のデバイス。

【請求項 9 3】

前記フィルターが、蛍光フィルターを含む、請求項 9 2 に記載のデバイス。

【請求項 9 4】

前記蛍光フィルターが、ダイクロイックフィルターおよび / またはロングパスフィルターを含む、請求項 9 3 に記載のデバイス。

【請求項 9 5】

前記ダイクロイックフィルターの透過率が、約 3 9 0 ~ 4 8 0 nm または 3 9 0 ~ 4 8 0 nm において、 8 5 % を超え、かつ、約 5 4 0 ~ 7 5 0 nm または 5 4 0 ~ 7 5 0 nm において、 1 % 未満でありうる、請求項 9 4 に記載のデバイス。 20

【請求項 9 6】

前記ロングパスフィルターのプロッキングが 5 0 D を超え得、かつ、 5 3 0 ~ 7 5 0 nm またはその近辺の波長における透過率が 9 0 % を超えうる、請求項 9 5 に記載のデバイス。

【請求項 9 7】

前記結論記載を表示するスクリーンをさらに含む、請求項 9 0 に記載のデバイス。

【請求項 9 8】

前記光源が、カメラフラッシュである、請求項 9 0 に記載のデバイス。 30

【請求項 9 9】

前記画像センサーが、 C C D または C M O S である、請求項 9 0 に記載のデバイス。

【請求項 1 0 0】

i) 複数の小型コンテナーと、
i i) 核酸増幅反応成分と、
i i i) 使用のための指示書と
を含むコンテナーを含むキット。

【請求項 1 0 1】

前記複数の小型コンテナーが、 S l i p C h i p である、請求項 1 0 0 に記載のキット。 40

【請求項 1 0 2】

バーコードなど、マシンで読み取り可能な標識をさらに含む、請求項 1 0 0 に記載のキット。

【請求項 1 0 3】

前記標識が、前記試料の形状、試料サイズ、試料種類、試料の配向性、前記試料を得た生物、前記標識に近接する試料の数、またはさらなるデータ解析のための命令に関連するコード化された情報を含む、請求項 1 0 2 に記載のキット。

【請求項 1 0 4】

前記核酸増幅反応成分が、前記小型コンテナーのうちの少なくとも 1 つの中に配置される、請求項 1 0 0 に記載のキット。 50

【請求項 105】

請求項 90 に記載のデバイスをさらに含む、請求項 100 から 104 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

相互参照

本願は、2012年10月5日に出願した米国仮出願第 61/710,454 号の利益を主張する。米国仮出願第 61/710,454 号は、その全体が参考により本明細書に援用される。

【0002】

10

連邦政府による助成研究についての言明

本発明は、DARPA Cooperative Agreement HR0011-11-2-0006、National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineeringにより供与されるNIH補助金R01EB012946の下での、およびNIH Roadmap for Medical Researchの一部であるNIH Director's Pioneer Award プログラム (5DP1OD003584) による、政府援助によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】**【0003】**

20

現在のところ、多くの重要な定量的診断 / 検出ツールが利用可能なのは、複合的な検査室設定に限られている。検査室では、分子を定量化するのに 2 つの方法：反応速度解析および単一分子カウンティングが一般に使用されている。反応速度解析は、最も一般的な方法であり、PCR 反応の蛍光リードアウトを、サイクル数の関数として測定し、得られる曲線を、既知の濃度と比較して、具体的な試料濃度を決定する、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (rt-PCR) などの検査を含む。この種の解析により良好な結果を得うるが、高度に制御された環境において、複雑で高価な検査室装置を使用しなければならない。

【0004】

30

セルフォーンなどの消費者用電子機器の発達により、このようなデバイスを診断 / 検出プラットフォームとして使用することが可能となっている。これらのデバイスは、訓練された職員、インフラストラクチャー、医療計器、および電気および冷却などのリソースへのアクセスに対して制限がある、限られた資源の設定においてとりわけ魅力的である。無線遠隔通信のインフラストラクチャーおよびクラウドベースの技術の発達により、モバイル通信デバイスを、遠隔環境において、診断 / 検出データを、イメージング、処理、および通信するのに使用しうるであろう。

【0005】

40

消費者用電子機器の、診断法または検出のための使用については、いくつかの難題が存在する。現在、多くのセルフォーンアッセイは、側方流免疫クロマトグラフィーデータの解析に基づく。これらの検査は、結果のアナログでレシオメトリックな性格に起因して、確度および信頼性の欠如を被る可能性がある。デバイス間のばらつきはまた、消費者用電子機器を、診断または検出の目的で使用することについての難題ももたらす。各使用者の電話機は、異なるハードウェアおよび / またはソフトウェアを有する可能性があり、これにより、信頼性および再現性についての難題がもたらされる。加えて、デバイスは、制御された環境の外で使用されるので、湿度または温度の変化など、検査室環境の差異により、確度および精度を伴って消費者用電子機器を使用する能力が変化する可能性もある。

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0006】**

一つの態様では、本発明は、試料データを作成するための方法であって、

50

i) 一連の光子を、光源から、短いバーストで放出するステップであり、前記バーストが、約 1,000,000 分の 5 秒間～約 1 秒間にわたり持続し、前記光子のうちの少なくとも一部が、前記試料に接触するステップと、

ii) 少なくとも 1 つの光子を画像センサーにより回収して、試料データを創出するステップであり、前記回収される光子が、前記試料に接触した光子であるステップと、

iii) 前記試料データを処理して、前記試料中の核酸のバイナリー定量化をもたらすステップと、

iv) 核酸の前記バイナリー定量化を解析して、前記試料に関連する結論記載を作成するステップと

を含む方法を提供する。

10

【0007】

一部の実施形態では、前記試料中の核酸の前記定量化を使用して、前記試料の非核酸成分を検出する。一部の実施形態では、前記非核酸成分が、細胞、タンパク質、およびウイルスを含む群から選択される。

【0008】

一部の実施形態では、前記回収される光子が、前記光源から、短いバーストで放出された前記光子のうちの 1 つである。

【0009】

一部の実施形態では、前記光子が、可視光スペクトル内の光子を含む。

【0010】

一部の実施形態では、前記光子が、UV スペクトル内の光子を含む。

20

【0011】

一部の実施形態では、前記光源が、カメラフラッシュまたはフラッシュバルブである。

【0012】

一部の実施形態では、前記光源が、キセノンフラッシュである。

【0013】

一部の実施形態では、前記光源が、発光ダイオード (LED) である。

【0014】

一部の実施形態では、前記画像センサーが、CMOS である。

【0015】

一部の実施形態では、前記画像センサーが、CCD である。

30

【0016】

一部の実施形態では、放出される前記一連の光子の強度が、前記短いバーストの時間の長さの間で一定でない。

【0017】

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、過去の時点または基準試料に対する、前記試料の光学的特性の変化を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである。

【0018】

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、蛍光データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである。一部の実施形態では、前記蛍光データが、光子が蛍光色素から放出される結果である。一部の実施形態では、前記蛍光色素が、SYTO 9 である。一部の実施形態では、前記蛍光色素が、カルセインである。

40

【0019】

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、比色データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである。

【0020】

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、半透明データの存在または非存在を捕捉する 1 つの画像または複数の画像のセットである。

【0021】

50

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、有色データと対比した半透明データの存在または非存在を捕捉する1つの画像または複数の画像のセットである。

【0022】

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、不透明データの存在または非存在を捕捉する1つの画像または複数の画像のセットである。

【0023】

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、完全に同時に捕捉される単一の画像である。

【0024】

一部の実施形態では、前記試料と関連する前記データが、複数の空間的に隔離されたコンパートメントからの測定値を含み、前記コンパートメントの各々が、前記試料の一部を含む。

【0025】

一部の実施形態では、前記データを処理するステップが、サイズの弁別、形状の弁別、1つの基準もしくは一連の基準との比較、または単一の画像内の色による比較を活用して、前記試料中の核酸のデジタル定量化をもたらすことをさらに含む。

【0026】

一部の実施形態では、前記データを処理するステップが、

i) 試料と関連する前記データを検討し、以下の特徴的な閾値a～e：

a) 少なくとも1つのアライメント特徴が存在し、かつ／または正確な配向性にあること、

b) 前記試料と関連する前記データが、焦点の合った画像を含むこと、

c) 前記画像と関連する前記データにより、アッセイの適正な利用が確認されること、

d) 前記画像が、意図される試料のグラフィック表示を含むこと、

e) 前記試料の寸法が、意図される寸法と一致すること、

f) 前記試料が、意図される一連のコンテナーにわたり、単一のコンテナー内に分布すること

のうちの少なくとも1つずつについて測定すること、および

i i) 前記特徴的な閾値のうちの1または複数が満たされない場合は、全ての特徴的な閾値を超えるように要求されるパラメータを調整し、満たされなかった特徴的な閾値が満たされるまで、本明細書に記載の方法の全てのステップを繰り返すことをさらに含む。

【0027】

一部の実施形態では、前記データ処理ステップを、ローカルコンピュータにより行う。

【0028】

一部の実施形態では、前記データ処理ステップを、前記データを異なるデバイスへと転送して、処理することにより行う。

【0029】

一部の実施形態では、前記試料に接触した、前記放出された光子のうちの少なくとも1つの波長が、蛍光に起因してシフトしている。

【0030】

一部の実施形態では、結論記載が、疾患についての記載である。一部の実施形態では、前記結論記載により、遺伝子障害の存在または非存在が記載される。一部の実施形態では、前記結論記載が、ウイルス負荷の定量化である。一部の実施形態では、前記結論記載が、ウイルス感染の存在または非存在についての診断である。一部の実施形態では、前記結論記載が、少なくとも1つの細菌種の定量化である。一部の実施形態では、前記結論記載が、細菌感染の存在または非存在についての診断である。一部の実施形態では、結論記載が、前記試料中の遺伝子の前記定量化である。

【0031】

本発明の一部の実施形態では、結論記載が、前記試料中の遺伝子または核酸配列の存在

10

20

30

40

50

または非存在を決定している。一部の実施形態では、結論記載が、前記試料中の遺伝子の存在または非存在を決定している。

【0032】

一部の実施形態では、結論記載が、前記試料中のDNA配列またはRNA配列の存在または非存在を決定している。一部の実施形態では、結論記載が、前記試料中の遺伝子内の突然変異または核酸配列内の突然変異の存在または非存在を決定している。

【0033】

一部の実施形態では、結論記載が、前記試料中の遺伝子または核酸配列内の突然変異の前記定量化である。本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、前記遺伝子または核酸配列が、植物由来である。一部の実施形態では、前記遺伝子または核酸配列が、ヒト由来である。一部の実施形態では、前記遺伝子または核酸配列が、ウイルス由来である。一部の実施形態では、前記遺伝子または核酸配列が、細菌由来である。

10

【0034】

一部の実施形態では、本発明の方法は、非一過性のコンピュータで読み取り可能な媒体データベース内で、前記結論記載および他の情報を表示し、かつ／または関連付けるステップをさらに含む。

【0035】

一部の実施形態では、前記他の情報が、前記試料を回収した生物についての情報である。一部の実施形態では、前記他の情報が、患者名、年齢、体重、身長、試料回収の時点、試料の種類、試料回収および／もしくはデータ収集に関するGPS位置データ、または医療記録を含む。

20

【0036】

一部の実施形態では、本発明の方法は、前記結論記載を表示するステップをさらに含む。一部の実施形態では、前記結論記載を、前記使用者へと表示する。一部の実施形態では、前記結論記載を、異なるデバイスへと送信する。

【0037】

一部の実施形態では、前記試料が、少なくとも1つの核酸を含む。一部の実施形態では、前記核酸が、ヒトから得られる。

【0038】

一部の実施形態では、前記核酸が、植物または植物種子から得られる。一部の実施形態では、前記核酸が、動物から得られる。一部の実施形態では、前記核酸が、細菌から得られる。一部の実施形態では、前記核酸が、ウイルスから得られる。一部の実施形態では、前記核酸が、合成核酸である。一部の実施形態では、前記核酸が、未知の供給源に由来する。

30

【0039】

一部の実施形態では、前記試料が、バーコードなど、マシンで読み取り可能な標識をさらに含む。一部の実施形態では、前記標識が、前記試料の形状、試料サイズ、試料の種類、試料の配向性、前記試料を得た生物、前記標識に近接する試料の数、またはさらなるデータ解析のための命令に関連するコード化された情報を含む。

40

【0040】

一部の実施形態では、前記試料が、前記光子に接触する前に、核酸增幅反応を起こす。一部の実施形態では、前記核酸增幅反応が、ループ媒介增幅（LAMP）反応である。一部の実施形態では、前記核酸增幅反応が、PCR反応である。一部の実施形態では、前記方法が、約55～65で、または55～65の温度範囲で実施される。一部の実施形態では、前記試料のうちの少なくとも一部が、少なくとも2つ以上のコンテナーを含むアレイへと分配され、前記画像が、各コンテナーの位置由来の光学データを含む。一部の実施形態では、前記光学データが、蛍光シグナルまたは蛍光シグナルの欠如である。一部の実施形態では、前記アレイが、Slipchipである。一部の実施形態では、増幅される前記核酸がRNAである。

【0041】

50

一部の実施形態では、試料内の核酸の前記ディジタル定量化についての前記解析が、
 i) 反応が、57 ~ 63 の間の温度範囲内で生じること、
 ii) 15分間 ~ 1.5時間の間の反応時間、
 iii) 湿度が、0 % ~ 100 %の間であること、および
 iv) バックグラウンド光が、0 ~ 6ルクスの間であること

からなる群から選択される反応パラメータのうちの少なくとも1つについて、前記試料についての一貫した結論記載をもたらす。一部の実施形態では、前記試料についての前記一貫した結論記載が、前記反応パラメータのうちの少なくとも2つについての結論記載である。一部の実施形態では、前記試料についての前記一貫した結論記載が、前記反応パラメータのうちの少なくとも3つについての結論記載である。一部の実施形態では、前記試料についての前記一貫した結論記載が、前記反応パラメータのうちの4つについての結論記載である。一部の実施形態では、前記画像センサーが、セルフォーンまたはタブレットコンピュータの一部である。

【0042】

一部の実施形態では、本発明の方法は、以下のステップ：
 セルフォーンを使用する、蛍光領域の検出、
 モバイルハンドヘルドデバイスを使用する、蛍光領域の検出、
 単一分子からの増幅産物に対応する蛍光領域の検出、
 モバイル通信デバイスと統合されたコンパクトフラッシュ（登録商標）を使用して、蛍光を励起するステップ、
 画像および/または処理された画像および/または結果として得られるデータを、中央コンピュータへと伝送するステップ、
 色チャネルの組合せを使用する、画像のバックグラウンド補正、
 1または複数のフィルタリングアルゴリズムを使用することによる蛍光領域の増強、
 1または複数の形状を使用して、画像忠実度を決定する形状検出、
 1または複数の形状を使用して、解析されるべき前記領域を決定する形状検出ステップ

、
 1または複数のアルゴリズムを使用して、陽性領域を決定する形状検出、
 前記中央コンピュータ上で、画像および/またはデータを処理および/または解析するステップ、

前記画像および/またはデータを、任意選択でアーカイブ化するステップ、
 情報を前記モバイルデバイスへと返送するステップ、
 画像および/または処理された画像および/または結果として得られるデータを、前記使用者へと伝送するステップ、

画像および/または処理された画像および/または結果として得られるデータを、第3者へと伝送するステップ、

ポアソン統計解析を適用して、蛍光領域および非蛍光領域の数を定量化するステップ、
 ポアソン統計解析を適用して、蛍光領域および非蛍光領域の数に基づき、濃度を定量化するステップ

のうちの少なくとも1つをさらに含む。

【0043】

一部の実施形態では、前記光源が、少なくとも100,000ルクスまたはそれより強い光強度を有する。

【0044】

一部の実施形態では、前記光が、内蔵カメラを含有するモバイルフォーンまたは内蔵カメラを含有するタブレットから放出される。

【0045】

一部の実施形態では、前記光が、フィルタリングされる。

【0046】

一部の実施形態では、フィルターが、フィルターのセットを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

一部の実施形態では、前記フィルターのセットが、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つのフィルター、またはこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、フィルターが、蛍光フィルターを含む。一部の実施形態では、前記蛍光フィルターが、ダイクロイックフィルターおよび/またはロングパスフィルターを含む。一部の実施形態では、前記ダイクロイックフィルターの透過率が、390～480nmまたはその近辺において、85%を超える、かつ、540～750nmまたはその近辺において、1%未満でありうる。一部の実施形態では、前記ロングパスフィルターのブロッキングが50Dを超える、かつ、530～750nmまたはその近辺の波長における透過率が90%を超える。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、前記解析工程が、1分間未満かかりうる。

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、前記解析工程が、第2の色チャネルから収集されたデータを使用して、画像のバックグラウンド補正を実施する。一部の実施形態では、ソフトウェアのアルゴリズムが、ポアソン統計解析を適用して、蛍光領域および非蛍光領域の数を定量化しうる。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態では、前記データ解析を、クラウドベースのサービスを介して、遠隔に位置する中央コンピュータを介して、またはこれらの任意の組合せを介してローカルで行う。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、前記方法が、核酸を検出するための用途をもたらす。

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態では、写真を撮影するときに、ポータブルデジタルデバイスを、角度を付けた位置に傾ける。

【 0 0 5 3 】

別の態様では、本発明は、試料データを作成するためのデバイスであって、

i) 一連の光子を、短いバーストで放送出する光源であり、前記バーストが、約1,000,000分の5秒間に約1秒間にわたり持続し、前記光子のうちの少なくとも一部が前記試料に接触する光源と、

i i) 前記試料のうちの少なくとも一部に接触した前記光子を回収して、前記試料と関連するデータを創出する、前記光源と並んでいない画像センサーと、

i i i) 前記試料データを処理して、前記試料中の核酸のバイナリー定量化をもたらすように構成されたプロセッサー、または前記試料データを、前記試料中の核酸のバイナリ-定量化をもたらすように構成された、異なるデバイスへと伝送するための無線接続と、

i v) 核酸の前記バイナリー定量化を解析して、前記試料に関連する結論記載を作成するように構成されたプロセッサーと
を含むデバイスを提供する。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態では、前記デバイスが、フィルターをさらに含む。一部の実施形態では、前記フィルターのセットが、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つのフィルター、またはこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、前記フィルターが、蛍光フィルターを含む。一部の実施形態では、前記蛍光フィルターが、ダイクロイックフィルターおよび/またはロングパスフィルターを含む。一部の実施形態では、前記ダイクロイックフィルターの透過率が、約390～480nmまたは390～480nmにおいて、85%を超える、かつ、約540～750nmまたは540～750nmにおいて、1%未満でありうる。一部の実施形態では、前記ロングパスフィルターのブロッキングが50Dを超える、かつ、530～750nmまたはその近辺の波長における透過率が90%を超える。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、前記デバイスが、前記結論記載を表示するスクリーンをさらに含

10

20

30

40

50

む。

【0056】

本発明のデバイスの一部の実施形態では、前記光源が、カメラフラッシュである。

【0057】

本発明のデバイスの一部の実施形態では、前記画像センサーが、CCDまたはCMOSである。

【0058】

さらに別の態様では、本発明は、

i) 複数の小型コンテナーと、

ii) 核酸增幅反応成分と、

iii) 使用のための指示書と

を含むコンテナーを含むキットを提供する。一部の実施形態では、前記複数の小型コンテナーが、Slip Chipである。

【0059】

一部の実施形態では、前記キットが、バーコードなど、マシンで読み取り可能な標識をさらに含む。一部の実施形態では、前記標識が、前記試料の形状、試料サイズ、試料種類、試料の配向性、前記試料を得た生物、前記標識に近接する試料の数、またはさらなるデータ解析のための命令に関連するコード化された情報を含む。本発明のキットの一部の実施形態では、前記核酸增幅反応成分が、前記小型コンテナーのうちの少なくとも1つの中に配置される。一部の実施形態では、本明細書に記載のキットは、本明細書に記載のデバイスをさらに含む。

【0060】

参照による組込み

本明細書で言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、参照により組み込まれるように具体的かつ個別に指示された場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0061】

本出願は、参照により、それらの全体において、任意で全ての目的について、以下の出願：2011年4月5日に出願された米国出願第61/516,628号、「Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids Via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Reactions on Slip Chip」；2011年5月9日に出願された米国出願第61/518,601号、「Quantification of Nucleic Acids With Large Dynamic Range Using Multivolume Digital Reverse Transcription PCR (RT-PCR) On A Rotational Slip Chip Tested With Viral Load」；2011年9月20日に出願された米国出願第13/257,811号、「Slip Chip Device and Methods」；2010年3月23日に出願された国際出願第PCT/US2010/028361号、「Slip Chip Device and Methods」；2009年11月18日に出願された米国出願第61/262,375号、「Slip Chip Device and Methods」；2009年3月24日に出願された米国出願第61/162,922号、「Sip Chip Device and Methods」；2010年3月22日に出願された米国出願第61/340,872号、「Slip Chip Device and Methods」；2012年4月5日に出願された米国出願第13/440,371号、「Analysis Devices, Kits, And Related Methods For Digital Quantification Of Nucleic Acids And Other Analytes」；および2012年5月9日に出願された米国出願第13/467,482号、「Multivolume Devices, Kits, and Related Methods for Quantification and Detection of Nucleic Acids and Other Analytes」を組み込む。

【0062】

本発明の新規の特色は、添付の特許請求の範囲において詳細に示す。本発明の原理が活用される例示的な実施形態を示す以下の詳細な記載および付属の図面を参照することによ

り、本発明の特色および利点についてのより良い理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1-1】図1は、デジタル対反応速度フォーマットにおける定量化の頑健性を例示する。反応速度フォーマットにおける曲線のための模式図は、リアルタイム核酸増幅の具体的な場合を模するように描かれている。図1aは、デジタルフォーマットと反応速度フォーマットとを、理想的条件下で比較する。デジタルフォーマットでは、個々の分子をコンパートメントへと分け、増幅することから、要求されるのは、終点のリードアウトだけである。解析物の元の濃度(C)は、左方の式(式中、 w_p = 陽性ウェルの数、 w_t = ウェルの総数、および w_v = 各ウェルの容量)により計算することができる。反応速度フォーマットでは、解析物をバルク培養物中で増幅し、強度として測定される増幅の進行を、時間の関数としてモニタリングする。元の濃度は、反応出力波形を、濃度が既知の溶液による基準曲線と比較することにより決定する。図1bは、デジタルフォーマットおよびリアルタイムフォーマットにおける反応速度変化の影響(増幅温度の差異として示される)を例示する。デジタルフォーマットでは、増幅反応速度の変動が終点のリードアウトに潜在的に影響を及ぼすことはなかろう。リアルタイムフォーマットでは、反応速度により、反応曲線が決定され、これにより、相対濃度も決定され、したがって、頑健ではないことが公知である。図1cは、デジタルフォーマットおよびリアルタイムフォーマットにおける、時間の変動効果(リードアウト時間として示される)を例示する。デジタルフォーマットが要求するのは、終点のリードアウトだけであるので、時間についての正確な知識は必ずしも要求されず、出力は、最適な反応時間を超える反応時間の変化に対しても頑健なはずである。リアルタイムフォーマットでは、濃度を正確に定量化するために、時間についての精密な知識および十分な時点が要求され、したがって、反応時間の変化に対して頑健ではないことが公知である。図1dは、デジタルフォーマットおよびリアルタイムフォーマットにおけるイメージングの効果を例示する。リアルタイムフォーマットでは、ノイズを増大させるか、または感度を低下させるイメージング条件は、基準と比較することができない反応出力波形をもたらすことにより、定量的能力に影響を及ぼす可能性があり、したがって、イメージング条件の変化に対して頑健ではないことが公知である。

【図1-2】図1は、デジタル対反応速度フォーマットにおける定量化の頑健性を例示する。反応速度フォーマットにおける曲線のための模式図は、リアルタイム核酸増幅の具体的な場合を模するように描かれている。図1aは、デジタルフォーマットと反応速度フォーマットとを、理想的条件下で比較する。デジタルフォーマットでは、個々の分子をコンパートメントへと分け、増幅することから、要求されるのは、終点のリードアウトだけである。解析物の元の濃度(C)は、左方の式(式中、 w_p = 陽性ウェルの数、 w_t = ウェルの総数、および w_v = 各ウェルの容量)により計算することができる。反応速度フォーマットでは、解析物をバルク培養物中で増幅し、強度として測定される増幅の進行を、時間の関数としてモニタリングする。元の濃度は、反応出力波形を、濃度が既知の溶液による基準曲線と比較することにより決定する。図1bは、デジタルフォーマットおよびリアルタイムフォーマットにおける反応速度変化の影響(増幅温度の差異として示される)を例示する。デジタルフォーマットでは、増幅反応速度の変動が終点のリードアウトに潜在的に影響を及ぼすことはなかろう。リアルタイムフォーマットでは、反応速度により、反応曲線が決定され、これにより、相対濃度も決定され、したがって、頑健ではないことが公知である。図1cは、デジタルフォーマットおよびリアルタイムフォーマットにおける、時間の変動効果(リードアウト時間として示される)を例示する。デジタルフォーマットが要求するのは、終点のリードアウトだけであるので、時間についての正確な知識は必ずしも要求されず、出力は、最適な反応時間を超える反応時間の変化に対しても頑健なはずである。リアルタイムフォーマットでは、濃度を正確に定量化するために、時間についての精密な知識および十分な時点が要求され、したがって、反応時間の変化に対して頑健ではないことが公知である。図1dは、デジタルフォーマットおよびリ

10

20

30

40

50

アルタイムフォーマットにおけるイメージングの効果を例示する。リアルタイムフォーマットでは、ノイズを増大させるか、または感度を低下させるイメージング条件は、基準と比較することができない反応出力波形をもたらすことにより、定量的能力に影響を及ぼす可能性があり、したがって、イメージング条件の変化に対して頑健ではないことが公知である。

【図2-1】図2は、温度条件、時間条件、およびイメージング条件の変化に関する、リアルタイムRT-LAMPの頑健性の、デジタルRT-LAMPの頑健性と対比した検定を例示する。図2a～bは、リアルタイムRT-LAMP実験(2a)およびデジタルRT-LAMP実験(2b)の結果を、2つの濃度について、6度の温度範囲にわたり例示する。イメージングは、顕微鏡により実施した。図2cは、dRT-LAMP実験による陽性カウントの数を、2つの濃度について、多様な反応時間において例示する。図2dは、部分的な顕微鏡によるイメージングから得られるデータ(2b)、靴箱内のセルフオーンを伴うdRT-LAMPによるイメージングから得られるデータ、および薄暗がり(約3ルクス)の中のdRT-LAMPによるイメージングから得られるデータを、6度の温度範囲にわたり比較するプロットを例示する。P値は、所与のイメージング条件における、全てのデータの統計学的有意性(帰無仮説は、2つの濃度が同等であることである)を、各濃度について、温度に関わりなく表示する。図2eは、顕微鏡によりイメージングされたdRT-LAMP反応(上)および白色でマークされた領域からの蛍光出力を指示示す、その対応する直線走査(下)についての、トリミングされ、拡大された画像を例示する。図2fは、セルフオーンおよび靴箱(上)、ならびに白色でマークされた領域からの蛍光出力を指示示す、その対応する直線走査(下)を例示する。図2gは、薄暗がりの中のセルフオーン(上)および白色でマークされた領域からの蛍光出力を指示示す、その対応する直線走査(下)を例示する。セルフオーンによりイメージングされた各dRT-LAMP実験における陽性の数は、手作業でカウントした。誤差バーは、標準偏差を表す。

【図2-2】図2は、温度条件、時間条件、およびイメージング条件の変化に関する、リアルタイムRT-LAMPの頑健性の、デジタルRT-LAMPの頑健性と対比した検定を例示する。図2a～bは、リアルタイムRT-LAMP実験(2a)およびデジタルRT-LAMP実験(2b)の結果を、2つの濃度について、6度の温度範囲にわたり例示する。イメージングは、顕微鏡により実施した。図2cは、dRT-LAMP実験による陽性カウントの数を、2つの濃度について、多様な反応時間において例示する。図2dは、部分的な顕微鏡によるイメージングから得られるデータ(2b)、靴箱内のセルフオーンを伴うdRT-LAMPによるイメージングから得られるデータ、および薄暗がり(約3ルクス)の中のdRT-LAMPによるイメージングから得られるデータを、6度の温度範囲にわたり比較するプロットを例示する。P値は、所与のイメージング条件における、全てのデータの統計学的有意性(帰無仮説は、2つの濃度が同等であることである)を、各濃度について、温度に関わりなく表示する。図2eは、顕微鏡によりイメージングされたdRT-LAMP反応(上)および白色でマークされた領域からの蛍光出力を指示示す、その対応する直線走査(下)についての、トリミングされ、拡大された画像を例示する。図2fは、セルフオーンおよび靴箱(上)、ならびに白色でマークされた領域からの蛍光出力を指示示す、その対応する直線走査(下)を例示する。図2gは、薄暗がりの中のセルフオーン(上)および白色でマークされた領域からの蛍光出力を指示示す、その対応する直線走査(下)を例示する。セルフオーンによりイメージングされた各dRT-LAMP実験における陽性の数は、手作業でカウントした。誤差バーは、標準偏差を表す。

【図2-3】図2は、温度条件、時間条件、およびイメージング条件の変化に関する、リアルタイムRT-LAMPの頑健性の、デジタルRT-LAMPの頑健性と対比した検定を例示する。図2a～bは、リアルタイムRT-LAMP実験(2a)およびデジタルRT-LAMP実験(2b)の結果を、2つの濃度について、6度の温度範囲にわたり例示する。イメージングは、顕微鏡により実施した。図2cは、dRT-LAMP実験に

10

20

30

40

50

10 よる陽性カウントの数を、2つの濃度について、多様な反応時間において例示する。図2 dは、部分的な顕微鏡によるイメージングから得られるデータ(2b)、靴箱内のセルフオーンを伴うdRT-LAMPによるイメージングから得られるデータ、および薄暗がり(約3ルクス)の中のdRT-LAMPによるイメージングから得られるデータを、6度の温度範囲にわたり比較するプロットを例示する。P値は、所与のイメージング条件における、全てのデータの統計学的有意性(帰無仮説は、2つの濃度が同等であることである)を、各濃度について、温度に関わりなく描示する。図2eは、顕微鏡によりイメージングされたdRT-LAMP反応(上)および白色でマークされた領域からの蛍光出力を指し示す、その対応する直線走査(下)についての、トリミングされ、拡大された画像を例示する。図2fは、セルフオーンおよび靴箱(上)、ならびに白色でマークされた領域からの蛍光出力を指し示す、その対応する直線走査(下)を例示する。図2gは、薄暗がりの中のセルフオーン(上)および白色でマークされた領域からの蛍光出力を指し示す、その対応する直線走査(下)を例示する。セルフオーンによりイメージングされた各dRT-LAMP実験における陽性の数は、手作業でカウントした。誤差バーは、標準偏差を表す。

【0064】

20 【図3】図3は、5つの異なるプライマーセットおよび単一の鋳型を使用する、S1ipChipデバイス上のマルチプレックスPCRについてのセルフオーンイメージングを例示する。図3aは、プライマーをあらかじめロードされたS1ipChipデバイスについての概略図を例示する。図3bは、デバイス上の5つのプライマーセット:1=E.coliのnlp遺伝子、2=P.aeruginosaのvic遺伝子、3=C.albicansのcalb遺伝子、4=Pseudomonas属の16S、5=S.aureusのnuc遺伝子の配置を示す概略図を例示する。図3cは、S1ipChipに、S.aureusゲノムDNAをロードし、PCR増幅を実施した後における、S1ipChipのセルフオーン画像を例示する。S.aureusのプライマーを含有するウェルは、蛍光を増大させて、デザインされたパターンを形成した。印刷したときの可視性を増強するように、画像の強度レベルを調整し、画像を平滑化した。

【0065】

30 【図4】図4は、画像処理および直線走査の前(左上)および後(右上)においてセルフオーンにより撮影された、PCR反応の帰結を伴うデバイスの画像を例示し、グレーの値を、画像処理前(左下)および画像処理後(右下)のピクセルの距離の関数として示す。

【0066】

【図5】図5は、閾値化に対する、顕微鏡によりイメージングされたディジタルdRT-LAMP増幅の頑健性を例示する。図5aは、dRT-LAMP反応を顕微鏡によりイメージングする場合に観察される陽性反応の数を、陽性の数を計算するのに使用される閾値と比較して示すグラフを例示する。図5bは、2つの濃度を、90~240の間の閾値で比較することにより求めたp値についてのプロットを例示する。最小のp値は、190の閾値で観察される。

【0067】

40 【図6】図6は、S1ipChipおよびセルフオーンによるディジタル増幅を介して分子をカウントするのに使用される、画像解析ワークフローを例示する。図6aは、セルフオーンおよびイメージング処理アルゴリズムが、デバイス全体がイメージングされていることを確認するのに使用する、4つの黒色の丸印で標識したデバイスを例示する。図6bは、使用者により撮影された写真を解析し、生データをアーカイブ化し、結果を適切な関係者へと送信する、クラウドベースのサーバーについての模式図表示を例示する。図6cは、イメージングの成功(左上)およびイメージングの不成功(左下)、ならびに画像の解析の成功(右上)および画像の解析の不成功(右下)についての解析の後で、あらかじめ指定されたレシピエントにより受信された電子メールメッセージを示す、セルフオーンスクリーンのスクリーンショットを例示する。図6dは、セルフオーンから処理された生の陽性カウント(y軸)と、落射蛍光顕微鏡により実施した閾値化(x軸)とを比較する

グラフを例示する。

【0068】

【図7】図7は、2ステップdRT-LAMPのための、SlipChipの操作を示す概略図および画像を例示する。図7aは、アセンブリーの前にSlipChipの上側プレートおよび下側プレートを例示する。図7bは、RT溶液をロードした後における、アセンブルされたSlipChipを例示する。図7cは、スリッピングの後で、個々のウェルへと閉じ込められた、RNA分子を含有するRT溶液を例示する。図7dは、RT反応が完了した後における、LAMP試薬混合物のローディングを例示する。図7eは、再度のスリッピングの後で個々のウェルへと閉じ込められたLAMP試薬混合物を例示する。図7fは、スリッピングの後で、RTウェルとLAMPウェルとをミックスするために開始された反応を例示する。

10

【0069】

【図8】図8aは、異なるプロトコールおよび同じ錆型濃度を使用するdRT-LAMPにより測定されるHIVウイルスRNAの濃度(1mL当たりのコピー数)を例示する。i) 1ステップdRT-LAMP; ii) 2ステップdRT-LAMP: RTステップ内の全てのプライマー、AMV RT; iii) 2ステップ法: RTステップにおけるBIP、AMV RT; iv) 2ステップ法: RTステップにおけるBIP、Superscrip t III; v) 2ステップ法: RTステップにおけるBIP、AMV RT、RNアーゼHを伴う; vi) 2ステップ法: RTステップにおけるBIP、Superscrip t III、RNアーゼHを伴う; vii) 2ステップ法: RTステップにおけるBIP、Superscrip t III、RNアーゼHを伴う、0.5倍濃度のカルセインである。図8bは、第2のステップを異なる温度で実施した場合の、HIVウイルスRNAの定量化結果(1mL当たりのコピー数)を例示する。図8cは、プラスチック製のSlipChip上における、2つの濃度の、HIVウイルスRNAの定量化結果(1mL当たりのコピー数)を、ガラス製のデバイス上で得られた結果に対する比較と共に例示する(全ての実験において、n=2であり、誤差バーは、標準偏差を表す)。

20

【0070】

【図9】図9は、dRT-LAMPおよびdRT-PCRを使用して、患者試料から精製されたHIVウイルスRNAの定量化を例示する。試料番号4については、プライマーを補正したdRT-LAMPを使用する定量化結果を、図の右端欄に示す(全ての実験において、n=2であり、誤差バーは、標準偏差を表す)。

30

【発明を実施するための形態】

【0071】

別段に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、特許請求される対象物が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書における開示の全体を通して言及される、全ての特許、特許出願、出願公開、および刊行物、GENBANK配列、ウェブサイトおよび他の公開資材は、別段に言及されない限り、参照により、それらの全体において組み込まれる。万一、本明細書における用語に複数の定義が見られる場合、本節における定義が優先される。URLまたは他のこののような識別子もしくはアドレスに言及する場合は、このような識別子は変化する可能性があり、インターネット上の特定の情報は現れては消えてゆくが、同等な情報が公知であり、インターネットおよび/または適切なデータベースを検索することなどにより、たやすくアクセスしうることが理解される。これらを参照することにより、このような情報の入手可能性および広範な流布が証拠立てられる。

40

【0072】

文脈により別段に指し示されることが明確でない限り、本明細書で使用される、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その」は、複数形の指示対象を含む。別段に具体的に言明されない限り、本出願では、単数形の使用は、複数形を含む。別段に言明されない限り、本明細書で使用される、「または」の使用は、「および/または」を意味する。さらに、「～を含む(including)」という用語のほか、他の形態

50

(例えば、「～を含む (include)」、「～を含む (includes)」、および「～を含めた (included)」)の使用は、限定的ではない。

【0073】

本明細書で使用される、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表すことができる。約はまた、正確な量も含む。よって、「約10度」は、「約10度」を意味するが、また、「10度」も意味する。一般に、「約」という用語は、実験誤差内にあることが予測される量を含みうる。

【0074】

本明細書では、疾患または生物の検出に関する方法、デバイス、およびシステムが開示される。検出は、アッセイ、例えば、疾患または生物と関連する核酸を検出するアッセイにより発生させるシグナルの検出でありうる。一部の実施形態では、消費者グレードのカメラ、例えば、セルフォーン上のカメラによりシグナルを検出する。

10

【0075】

「生物」という用語は、細菌、酵母、真菌、ウイルス、原生生物（原虫、微小藻類）、古細菌、植物、および真核生物を含む、任意の生物または微生物を指す。「生物」という用語は、本発明の方法により検出および同定されうる核酸を含む生命体およびウイルスを指す。生物は、細菌、古細菌、原核生物、真核生物、ウイルス、原虫、マイコプラズマ、真菌、植物、および線虫を含むがこれらに限定されない。異なる生物は、異なる株、異なる亜種、異なる種、異なる属、異なる科、異なる目、異なる綱、異なる門、および／または異なる界でありうる。生物は、土壤抽出物、海底堆積物、淡水堆積物、温泉、氷棚、地球外試料、岩の割れ目、雲を含む環境供給源から単離される場合もあり、水性環境に由来する粒子状物質に付着し、多細胞生物との共生関係に関与している場合もある。このような生物の例は、*Streptomyces*属種および天然供給源に由来する特徴付けられていらない種／未知の種を含むがこれらに限定されない。

20

【0076】

生物は、遺伝子操作された生物または遺伝子改変された生物を含みうる。

【0077】

生物は、トランスジェニック植物を含みうる。生物は、遺伝子改変された穀物を含みうる。任意の生物を、遺伝子改変することができる。遺伝子改変しうる生物の例は、オオバコ、ヤムイモ、ソルガム、サツマイモ、ダイズ、キャッサバ、ジャガイモ、コメ、コムギ、またはトウモロコシを含む。

30

【0078】

生物は、*Aeromonas hydrophila*および他の種；*Bacillus anthracis*；*Bacillus cereus*；ボツリヌス神経毒素を產生する*Clostridium*属種；*Brucella abortus*；*Brucella melitensis*；*Brucella suis*；*Burkholderia mallei*（旧称：*Pseudomonas mallei*）；*Burkholderia pseudomallei*（旧称：*Pseudomonas pseudomallei*）；*Campylobacter jejuni*；*Chlamydia psittaci*；*Clostridium botulinum*；*Clostridium perfringens*；*Coccidioides immitis*；*Coccidioides posadasii*；*Cowdria ruminantium*（心水病）；*Coxiella burnetii*；腸管毒素原性大腸菌（*Escherichia coli*）（ETEC）、腸管病原性大腸菌（*Escherichia coli*）（EPEC）、O157：H7腸管出血性大腸菌（*Escherichia coli*）（EHEC）、および腸管侵襲性大腸菌（*Escherichia coli*）（EIEC）などの腸管毒性大腸菌（*Escherichia coli*）群（EEC群）；*Escherichia chaffeensis*などの*Escherichia coli*属種；*Francisella tularensis*；*Legionella pneumophila*；*Liberobacter africanus*；*Liberobacter asiaticus*

40

50

cus ; *Listeria monocytogenes* ; *Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Proteus* 属、*Citrobacter* 属、*Aerobacter* 属、*Providencia* 属、および *Serratia* 属など、その他の腸内生物 ; *Mycobacterium bovis* ; *Mycobacterium tuberculosis* ; *Mycoplasma capricolum* ; *Mycoplasma mycooides mycooides* 亜種 ; *Peronosclerospora philippinensis* ; *Phakopsora pachyrhizi* ; *Plesiomonas shigelloides* ; *Ralstonia solanacearum* 系統 3、生物型 2 ; *Rickettsia prowazekii* ; *Rickettsia rickettsii* ; *Salmonella* 属種 ; *Schleropeltis rayssiae varzeae* ; *Shigella* 属種 ; *Staphylococcus aureus* ; *Streptococcus* 属 ; *Synchytium endobioticum* ; *Vibrio cholerae* 非 O1 型 ; *Vibrio cholerae* O1 型 ; *Vibrio parahaemolyticus* および他の *Vibrio* 属 ; *Vibrio vulnificus* ; *Xanthomonas oryzae* ; *Xylella fastidiosa* (柑橘類斑入り萎黄病株) ; *Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis* ; ならびに *Yersinia pestis* などの細菌病原体を含みうる。

【0079】

生物は、アフリカウマ病ウイルス ; アフリカブタ熱ウイルス ; アカバネウイルス ; トリインフルエンザウイルス (高病原性) ; バーンヤウイルス ; ブルータングウイルス (外来性) ; ラクダ痘ウイルス ; オナガザルヘルペスウイルス 1 ; チクングニアウイルス ; 古典的ブタ熱ウイルス ; コロナウイルス (SARS) ; クリミア - コンゴ出血熱ウイルス ; デングウイルス ; ジュグベウイルス ; エボラウイルス ; 東部ウマ脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、マレー渓谷脳炎、およびベネズエラウマ脳炎ウイルスなどの脳炎ウイルス ; ウマモルビリウイルス ; フレクサルウイルス ; 口蹄疫ウイルス ; ジャーミストンウイルス ; ヤギ痘ウイルス ; ハンタンウイルスまたは他のハンタウイルス ; ヘンドラウイルス ; イシク - クルウイルス ; クタンゴウイルス ; ラッサ熱ウイルス ; 跳躍病ウイルス ; ランピースキン病ウイルス ; リンパ球性脈絡膜炎ウイルス ; 悪性カタル熱ウイルス (外来性) ; マールブルクウイルス ; マヤロウイルス ; メナングルウイルス ; サル痘ウイルス ; ムカンボウイルス ; ニューカッスル病ウイルス (WND) ; ニパーウイルス ; ノーウォークウイルス群 ; 口囊ウイルス ; オルンゴウイルス ; 小反芻獣疫ウイルス ; ピリウイルス ; プラムポックスクボチウイルス ; ポリオウイルス ; ジャガイモウイルス ; ポワサンウイルス ; リフトバレー熱ウイルス ; 牛痘ウイルス ; ロタウイルス ; セムリキ森林ウイルス ; 羊痘ウイルス ; フレクサルウイルス、グアナリトウイルス、フニンウイルス、マチュポウイルス、およびサビアウイルスなどの南米出血熱ウイルス ; スポンドウェニウイルス ; ブタ水疱症ウイルス ; 中央ヨーロッパダニ媒介脳炎ウイルス、極東ダニ媒介脳炎ウイルス、ロシア春夏脳炎ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、およびオムスク出血熱ウイルスなどのダニ媒介脳炎複合 (フラビ) ウイルス ; 大痘瘡ウイルス (天然痘ウイルス) ; 小痘瘡ウイルス (アラストリムウイルス) ; 水疱性口炎ウイルス (外来性) ; ヴェセルスブロンウイルス ; 西ナイルウイルス ; 黄熱病ウイルス ; ならびにフニンウイルス、マチュポウイルス、サビアウイルス、フレクサルウイルス、およびグアナリトウイルスなどの南米出血熱ウイルスなどのウイルスを含みうる。

【0080】

生物のさらなる例は、*Acanthamoeba* 属および他の自由棲息アーバ ; *Anisakis* 属種ならびに他の類縁の蠕虫である *Ascaris lumbricoides* および *Trichuris trichiura* ; *Cryptosporidium parvum* ; *Cyclospora cayetanensis* ; *Diphyllobothrium* 属種 ; *Entamoeba histolytica* ; *Eustron*

10

20

30

40

50

gylides 属種 ; Giardia lamblia ; Nanophyetus 属種 ; S histosoma 属種 ; Toxoplasma gondii ; フィラリア性線虫および *Trichinella* 属などの寄生性原虫および寄生性蠕虫を含む。解析物のさらなる例は、植物花粉およびコムギグルテンなどのアレルゲンを含む。

【0081】

生物のさらなる例は、Aspergillus 属種 ; Blastomyces dermatitidis ; Candida 属 ; Coccidioides immitis ; Coccidioides posadasii ; Cryptococcus neoformans ; Histoplasma capsulatum ; トウモロコシサビ菌 ; イネイモチ病菌 ; イネ褐点病菌 ; ライムギかさ枯病菌 ; Sporothrix schenckii ; およびコムギ真菌などの真菌を含む。生物のさらなる例は、C. Elegans および病原性蠕虫または病原性線虫などの蠕虫を含む。

【0082】

「疾患」という用語は、生物にとって異常であると考えることのできる、任意の状態 (state) 、状態 (condition) 、または特徴を指す。疾患は、医学的状態であります。疾患は、障害であります。疾患は、一連の症状と関連しうる。疾患は、伝染性であります。疾患は、非伝染性であります。一部の実施形態では、疾患という用語はまた、疾患または前疾患の危険性因子も含む。

【0083】

疾患は、慢性であります。疾患は、急性であります。疾患は、再燃する場合もあり、再発する場合もある。一部の実施形態では、本明細書で提示される方法、デバイス、およびシステムにより、疾患状態、例えば、疾患の活性相または疾患と関連するウイルス負荷の量を検出することができる。一部の実施形態では、ウイルスにより引き起こされる疾患は、HIV / AIDS 、マラリア、麻疹、下痢性疾患、および呼吸器感染を含む。

【0084】

疾患は、遺伝子疾患であります。遺伝子疾患は、単一の遺伝子と関連しうる。遺伝子疾患は、複数の遺伝子と関連しうる。遺伝子障害は、一塩基多型と関連しうる。遺伝子障害のいくつかの非限定的な例は、以下を含む。

【0085】

本発明に従い検査されうる遺伝子疾患は、21-ヒドロキシラーゼ欠損症、ABC/C8 関連高インスリン症、ARSA/C/S 、軟骨無形成症、色盲、アデノシン-リノ酸デアミナーゼ 1 、神経障害を伴う脳梁無発生、アルカプトン尿症、アルファ -1- アンチトリプシン欠損症、アルファ - マンノシドーシス、アルファ - サルコグリカン異常症、アルファ - サラセミア、アルツハイマー病、1型アンジオテンシン I I 受容体、アポリポタンパク質 E 遺伝子型判定、アルギニノコハク酸尿症、アスパルチルグルコサミン尿症 (Aspartylglucosaminuria) 、ビタミン E 欠損症を伴う運動失調症、毛細血管拡張性運動失調症、1型自己免疫性多腺性内分泌障害症候群、B R C A 1 遺伝性乳がん / 卵巣がん、B R C A 2 遺伝性乳がん / 卵巣がん、バルデー - ビードル症候群、ベスト病 (卵黄様黄斑変性症) 、ベータ - サルコグリカン異常症、ベータ - サラセミア、ビオチニダーゼ欠損症、ブラウ症候群、ブルーム症候群、C F T R 関連障害、C L N 3 関連ニューロンセロイド脂褐素症、C L N 5 関連ニューロンセロイド脂褐素症、C L N 8 関連ニューロンセロイド脂褐素症、力ナバン病、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I A 欠損症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I I 欠損症、軟骨毛髪形成不全症、脳海綿状血管腫、先天性脈絡膜欠如、コーエン症候群、先天性白内障、顔面異形症および神経障害、I a 型先天性グリコシル化異常症、I b 型先天性グリコシル化異常症、フィンランド型先天性ネフローゼ、クローン病、シスチン蓄積症、D F N A 9 (COCH) 、糖尿病および聴力低下、早期発症原発性ジストニア (D Y T 1) 、ヘルリッツ - ピアソン型接合部型表皮水疱症、F A N C C 関連ファンコーニ貧血症、F G F R 1 関連頭蓋骨癒合症、F G F R 2 関連頭蓋骨癒合症、F G F R 3 関連頭蓋骨癒合症、因子 V ライデン型血栓性素因、因子 V R 2 突然変異血栓性素因、因子 X I 欠損症、因子 X I I I 欠損症、家族性腺腫様ポリープ、家族性自律

10

20

30

40

50

神経失調症、B型家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、遊離シアル酸蓄積障害、パーキンソン病を伴う前頭側頭型認知症17、フマラーゼ欠損症、GJB2関連DFNA3による非症候群性聴力低下および難聴、GJB2関連DFNB1による非症候群性聴力低下および難聴、GNE関連ミオパチー、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症、1型グルタル酸血症、Ia型糖原病、Ib型糖原病、I型糖原病、H1型糖原病、V型糖原病、グラシル症候群、HFE関連遺伝性ヘモクロマトーシス、ハイダー-AIM、ヘモグロビンSベータ-サラセミア、遺伝性フルクトース不耐症、遺伝性膵炎、遺伝性チミン-ウラシル尿症、ヘキソサミニダーゼA欠損症、2型発汗性外胚葉異形成、シスタチオニンベータシンターゼ欠損症により引き起こされるホモシスチン尿症、1型高カリウム血性周期性四肢麻痺、高オルニチン血症-高アンモニア血症-ホモシトルリン尿症症候群、高シュウ酸尿症、原発性1型高シュウ酸尿症、原発性2型低軟骨形成症、1型低カリウム血性周期性四肢麻痺、2型低カリウム血性周期性四肢麻痺、低ホスファターゼ症、乳児ミオパチーおよび乳酸性アシドーシス（致死性形態および非致死性形態）、イソ吉草酸血症、クラッペ病、LGMID2I、レーバー遺伝性視神經委縮症、フランス-カナダ型リー症候群、長鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、MELAS、MERRF、MTHFR欠損症、MTHFR熱不安定性変異体、MTRNR1関連聴力低下および難聴、MTTS1関連聴力低下および難聴、MYH関連ポリープ症、IA型メープルシロップ尿症、IB型メープルシロップ尿症、マキューン-オルブライト症候群、中鎖アシル-コエンザイムAデヒドロゲナーゼ欠損症、皮質下囊胞を伴う巨脳性白質脳症、異染性白質ジストロフィー、ミトコンドリア性心筋症、ミトコンドリア性DNA関連リー症候群およびNARP、IV型ムコ脂質症、I型ムコ多糖症、IHA型ムコ多糖症、V型ムコ多糖症、2型多発性内分泌腫瘍症、筋眼脳病、ネマリンミオパチー、神経学的表現型、スフィンゴミエリナーゼ欠損に起因するニーマン-ピック病、C1型ニーマン-ピック病、ナイミーヘン染色体不安定症候群、PPT1関連ニューロンセロイド脂褐素症、PROP1関連脳下垂体ホルモン欠損症、パリスター-ホール症候群、先天性パラミオトニア、ペンドレット症候群、ペルオキシソーム二官能性酵素欠損症、広汎性発達障害、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ欠損症、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤I、常染色体劣性多発性囊胞腎、プロトロンビンG20210A血栓性素因、偽性ビタミンD欠乏性くる病、濃化異骨症、常染色体劣性ボスニア型網膜色素変性、レット症候群、1型肢根型点状軟骨異形成症、短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、シュバッハマン-ダイアモンド症候群、シェーグレン-ラルソン症候群、スミス-レムリ-オピツツ症候群、13型痙性対麻痺、硫酸イオントランスポーター関連骨軟骨異形成症、TFR2関連遺伝性ヘモクロマトーシス、TPP1関連ニューロンセロイド脂褐素症、致死性骨異形成症、トランスサイレチニアミロイドーシス、三官能性タンパク質欠損症、チロシンヒドロキシラーゼ欠損性DRD、I型チロシン血症、ウィルソン病、X連鎖若年性網膜分離症およびツェルウェガー症候群スペクトルを含むがこれらに限定されない。

【0086】

本明細書では、試料の解析に関する方法、デバイス、およびシステムが開示される。試料は、患者または人から得ることができ、血液、糞便、尿、唾液、または他の体液を含む。食物試料もまた、解析することができる。試料は、生物を潜在的に含む任意の組成物でありうる。試料は、核酸、例えば、疾患または生物に関する核酸を潜在的に含む任意の組成物でありうる。試料は、疾患に関する物質を含む任意の組成物でありうる。試料の供給源は、地熱地域および熱水地域、酸性土壤、硫氣孔(sulfotara)および泥間欠泉(boling mud pot, boling mud pool)、酵素が中性～アルカリ性である温泉および間欠泉(geyser)、海洋放線菌、後生動物、内共生生物および外共生生物、熱帯土壤、温帯土壤、乾燥地土壤、堆肥集積物(compost pile, manure pile)、海底堆積物、淡水堆積物、水濃縮物、過塩性極低温海氷、極地ツンドラ、サルガッソ海水、外遠洋水、海雪、微生物マット(鯨骨生物群集、湧水、および熱水噴出孔など)、昆虫および線虫、腸管微生物叢、内生植物、着生水試料、工業

10

20

30

40

50

用地内濃縮物および生息地外濃縮物を含むがこれらに限定されない。加えて、試料は、真核生物、原核生物、粘液細菌（エポチロン）、大気、水、堆積物、土壤、または岩石、植物試料、食物試料、消化管試料、唾液試料、血液試料、汗液試料、尿試料、脊髄液試料、組織試料、腔内スワブ、糞便試料、羊水試料、指紋、咳によりもたらされる飛沫を含む飛沫、皮膚試料、生検に由来する組織を含む組織、および／または口腔内洗浄液試料から単離することもできる。

【0087】

試料は、試料回収コンテナー内に回収することができる。一部の実施形態では、試料回収コンテナーを、検出されうる情報でコード化する。例えば、検出器は、バーコードを認識しうる。バーコードは、どこで試料を回収したのか、または何から個々の試料を回収したのかについての情報を有しうる。検出器は、この情報を採取し、試料に関して作成されたデータを処理または伝送するのに使用する。例えば、カメラ電話機は、試料回収コンテナーの写真を撮影しうる。カメラ電話機は、患者を同定する、コンテナー上のバーコードを認識しうる。次いで、カメラ電話機は、試料に関して作成されたデータを、試料を得た患者へと連関させうる。次いで、連関させたデータは、患者または患者の内科医へと伝送することができる。一部の実施形態では、単一の画像を、試料回収コンテナーおよび試料解析ユニットについて作成する。

10

【0088】

一部の実施形態では、本発明の方法は、対象から試料を得るステップを含む。対象が試料を得ることもでき、医療従事者が試料を得ることもできる。医療従事者の例は、内科医、救急医療技師、看護師、ファーストレスポンダー、心理士、理学療法士、看護従事者、外科医、歯科医、および他の任意の医療従事者を含むがこれらに限定されない。試料は、任意の体液、例えば、羊水、体液、胆汁、リンパ、母乳、間質液、血液、血漿、耳垢（cerumen（earwax））、カウパー腺液（尿道球腺液）、乳糜、糜粥、腔液、経血、粘液、唾液、尿、吐瀉物、涙液、腔分泌液、汗液、血清、精液、皮脂、膿、腹水、脳脊髄液、滑液、細胞内液、および硝子体液から得ることができる。例えば、試料は、医療従事者が、シリンジなどにより、対象から血液を採取する、採血により得る。次いで、体液を調べ、バイオマーカーの存在度を決定することができる。本明細書ではまたバイオマーカーとも称する生物学的マーカーは、本発明に従い限定なしに述べると、薬物、プロドラッグ、薬剤、薬物代謝物、発現したタンパク質および細胞内マーカー、抗体、血清タンパク質、コレステロール、多糖、核酸、生物学的解析物、バイオマーカー、遺伝子、タンパク質、もしくはホルモン、またはこれらの任意の組合せなどのバイオマーカーを含む。分子レベルでは、バイオマーカーは、ポリペプチド、糖タンパク質、多糖、脂質、核酸、およびこれらの組合せでありうる。

20

【0089】

本明細書では、試料を解析するために光源を援用しうる方法、デバイス、およびシステムが開示される。光源は、可視光スペクトラル内の光子を放出しうる。光源は、UVスペクトラル内の光子を放出しうる。光源は、IRスペクトラル内の光子を放出しうる。光源は、任意の波長の光子を放出しうる。一部の実施形態では、光源は、キセノン光源である。一部の実施形態では、光源は、LEDである。一部の実施形態では、光源は、アーク灯ではない。

30

【0090】

光源は、フラッシュでありうる。フラッシュは、エアギャップフラッシュでありうる。フラッシュは、マルチフラッシュでありうる。一部の実施形態では、マルチフラッシュを使用して、その後の解析のための複数の画像を創出する。

40

【0091】

光源の持続時間は、短い可能性がある。短い持続時間は、例えば、約0.0001、約0.001、約0.01、約0.1、または約1秒間でありうる。

【0092】

光源は、不安定光をもたらしうる。不安定光は、パラメータが経時的に変化している光

50

でありうる。例えば、供給源から放出される光の強度は、経時的に変化している可能性がある。例えば、供給源から放出される光の波長は、経時的に変化している可能性がある。一部の実施形態では、光源が、不安定光をもたらしている間に、画像検出器により光子を回収する。一部の実施形態では、不安定光を使用して試料をイメージングする。

【0093】

一部の実施形態では、光源は、安定光をもたらしうる。安定光は、パラメータが経時的に変化していない光でありうる。例えば、安定光は、強度が経時的に著明には変化していない光を発しうる。

【0094】

光源は、外光を含みうる。光源はまた、外光と組み合わせることもできる。一部の実施形態では、外光は、解析前に試料に達する光子のうちの10%未満、5%未満、1%未満、または0.1%未満を含む。

10

【0095】

光源は、バッテリーで作動させることができる。

【0096】

光源を、画像センサーと接続しない場合もある。例えば、光源は、セルフォーンカメラ上に配置されたフラッシュでありうる。一部の実施形態では、光源を、試料と画像センサーとの間には配置しない。一部の実施形態では、光源を、試料に対するより画像センサーに近接させる。一部の実施形態では、光源は、試料に対するより、少なくとも10倍、50倍、または100倍画像センサーに近接させる。

20

【0097】

光源は、データ集めの間、非安定でありうる。例えば、検出器は、光源シフトのパラメータとして、光子を回収することが可能である。シフトするパラメータの例は、光の強度または波長でありうる。パラメータは、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または99%を超えてシフトしうる。一例では、検出器は、フラッシュの間データを回収しており、フラッシュが途絶えた後までデータを回収している。一例では、検出器は、フラッシュが発光する前にデータを回収しており、フラッシュの間もデータを回収している。

【0098】

光源は、別個のデバイス内に含有されうる。一部の実施形態では、別個のデバイスには、別個に電源を供給し、アッセイ帰結を視覚化するための励起光および増幅を行うための熱の両方を供給することが可能である。いくつかの例では、デバイスは、いかなる望ましくない外部の光も遮断するように、自己完結型でありうる。いくつかの例では、デバイスは、試料を配置する特異的な位置および/またはホルダーを含有しうる。一例では、デバイスは、イメージングデバイスを配置する特異的な位置および/またはホルダーを含有しうる。一例では、デバイスでは、例えば、LED、電球型蛍光灯、水銀灯、白熱灯などを使用することができる。

30

【0099】

フィルターは、光源と試料との間に置くことができる。単一のフィルターを使用することができる。また、複数のフィルターも使用することができる。いくつかの場合には、1または複数のフィルターを、光源へと物理的に接続する。一部の実施形態では、1または複数のフィルターを、画像センサーへと物理的に接続する。物理的接続は、間接的であることが可能であり、例えば、フィルターは、画像センサーを含有するハウジングへと接続することができる。

40

【0100】

フィルターは、バンドパスフィルターでありうる。光学バンドパスフィルターを使用して、例えば、スペクトルの一部を選択的に伝送しながら、他の全ての波長を除去することができる。フィルターのバンド幅は、例えば、約1000~1650nm、200~400nm、500~500nm、500~600nm、または20~70nmでありうる。

フィルターは、マルチバンド蛍光バンドパスフィルターでありうる。

50

【0101】

フィルターは、ロングパスエッジフィルターでありうる。ロングパスエッジフィルターは、例えば、フィルターのカットオン波長を超える波長を伝送しうる。

【0102】

フィルターは、ショートパスエッジフィルターでありうる。ショートパスエッジフィルターは、例えば、フィルターのカットオフ波長より短い波長を伝送しうる。

【0103】

フィルターは、ノッチフィルターでありうる。ノッチフィルターは、例えば、他の全ての波長を伝送しながら、スペクトルの一部を除去しうる。

【0104】

フィルターは、減光フィルターでありうる。フィルターは、イメージングフィルターでありうる。フィルターは、ダイクロイックフィルターまたはカラーフィルターでありうる。例えば、ダイクロイックフィルター-1 F 1 B (Thorlabs, Newton, NJ)は、フラッシュ光源の前に置くことができる。これらのフィルターの透過率は、例えば、390 ~ 480 nmに対しては > 85 %、540 ~ 750 nmに対しては < 1 %であることが可能であり、カットオフは、505 ± 15 nmである。フィルターは、対物レンズへと付加することができる。例えば、Newport (Franklin, MA) 製の緑色ロングパス 5 CGA - 530 フィルターは、対物レンズへと付加することができる。これらのフィルターのブロッキングは、例えば、> 50D であり、かつ、530 nmを超える波長では、> 90 %の高透過率を示す。

10

20

【0105】

試料は、コンテナー内でイメージングすることもでき、試料含有デバイス内でイメージングすることもできる。試料含有デバイスは、最適なイメージング配向をもたらす幾何形状を有しうる。一部の実施形態では、画像センサーを、試料についての可能な最良の画像を捕捉するように、最適に位置合わせする。一部の実施形態では、画像センサーを、最適未満で配向させる。例えば、画像センサーは、最適なアライメントに照らして傾けることもでき、偏向させることもできる。

30

【0106】

ソフトウェアを使用して、最適未満のアライメントの程度が、デバイスの許容範囲内にあるのかどうかを決定することができる。例えば、最適未満で位置合わせしたデバイスの画像を解析して、画像が、デバイスの既知の許容範囲内にあるのかどうかを決定することができる。一部の実施形態では、セルフォーン、例えば、iPhone 内の加速度計または重力センサーは、画像センサーのアライメントを感知し、試料に対して許容される画像センサーのアライメントが達成された場合に、画像を収集する。一部の実施形態では、アライメントは、サイズ、形状が既知であるか、またはインジケーターが既知の配向性にある、試料含有デバイスの第 1 の画像を作成することにより決定する。次いで、デバイスは、これらの既知のパラメータに基づき形状を計算し、決定することができる。次いで、デバイスは、画像センサーが、データを作成するのに成功しうるのかどうかを決定することができる。一部の実施形態では、これらの許容範囲を、外光量、表面、または試料含有デバイスに従い調整することもでき、既往のイメージング試行の成功または不成功に基づき調整することもできる。一部の実施形態では、使用者は、デバイスの許容範囲の計算に影響を及ぼす値を入力しうる。例えば、使用者は、厳密性を増大させて、これにより、最適未満のアライメントに対するデバイスの許容範囲を低下させることができる。

40

【0107】

デバイスの配向性はまた、試料含有デバイスの特性を相殺するように変化させることもできる。例えば、一部の実施形態では、試料含有デバイスは反射性であり、画像センサー デバイス軸に対して、約 0 度および / もしくは 0 度、約 10 度および / もしくは 10 度、約 20 度および / もしくは 20 度、約 30 度および / もしくは 30 度、約 40 度および / もしくは 40 度、約 50 度および / もしくは 50 度、または約 60 度および / もしくは 60 度傾けることができる。この傾斜は、対象物への直接的な照り返しを防止し、傾斜によ

50

り、直接的な反射光を側方へと進ませることが可能である。一部の実施形態では、傾斜は、複数の平面内にある。

【0108】

さらなる構成要素を付加して、最適未満のアライメントを相殺することもでき、例えば、黒色スクリーンをデバイスの側方に付加して、フラッシュからの散乱光による、C M O Sセンサーの過飽和を阻止することができる。

【0109】

このような幾何形状およびスクリーンが、上記で記載したフィルターと組み合わされると、約50のシグナル対ノイズ比に達することが可能となる。シグナル対ノイズ比は、デバイスにより計算することができ、特定の適用に応じて、約10、20、30、40、50、60、70、80、または90でありうる。

【0110】

一部の実施形態では、試料含有デバイスは、画像センサーと物理的に連絡していない。例えば、画像センサーは、ハンドヘルド型でありながら、試料含有デバイスを表面上に配置する。

【0111】

一部の実施形態では、使用者へとフィードバックを施し、使用者に、画像センサーが、イメージングを成功させるように正確に配置されていることを知らせる。例えば、電話機ベースのカメラにより、試料または試料担体を検出し、試料または試料担体が、デバイスの許容範囲内にある場合は、使用者へとフィードバックを施すことができる。例えば、「準備のできた」シグナルを、使用者へと送信することができる。

【0112】

試料と相互作用した光子は、画像センサーを使用して回収することができる。画像センサーは、1または複数のセンサーを含みうる。画像センサーは、例えば、C C D、C M O S、またはC C D / C M O Sハイブリッド素子を含みうる。

【0113】

デバイスは、色分解用に構成することができる。例えば、画像センサーは、複数のフィルタリング処理されたピクセルを有しうる。C C Dは、例えば、B a y e rマスクを有しうる。B a y e rフィルターに対する代替法は、多様な色の改変、多様な配置の改変、および色共部位サンプリング、F o v e o n X 3センサー、またはダイクロイックミラーなど、完全に異なる技術を含む。一部の実施形態では、3つのC C Dデバイスは、画像センサーである。

【0114】

デバイスは、1つのチャネル内の試料に由来するシグナルを記録することができる。残りのチャネルは、他の目的に使用することができ、例えば、残りのチャネルは、センサーを横切るバックグラウンド光またはバックグラウンド光の変化を測定するのに使用することができる。この第2のチャネルによる測定値は、第1の試料回収チャネルを補正するのに使用することができる。第3のチャネルは、さらなる補正に使用することができる。

【0115】

デバイスは、セルフォーンカメラを伴う市販のセルフォーンでありうる。例えば、デバイスは、i P h o n eでありうる。

【0116】

ディジタルカメラは、複数のピクセルから構成される画像センサーを有しうる。例えば、カメラは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20、22、26、30、34、38、40、44、48、52、56、60、70、80、90、または100メガピクセルを超える画像センサーを有しうる。例えば、カメラは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20、22、26、30、34、38、40、44、48、52、56、60、70、80、90、または100メガピクセルを超える画像をもたらしうる。一部の実施形態では、カ

10

20

30

40

50

メラは、約 6 メガピクセル～約 20 メガピクセルの画像センサーを有しうる。一部の実施形態では、カメラでは、41 メガピクセルのセンサーを使用することが可能である。カメラでは、ピクセルサイズを $1.4 \mu\text{m}$ とする 41 メガピクセルのセンサーを使用することが可能である。

【0117】

一部の実施形態では、センサーを、試料に対して移動させることができる。画像センサーは、ソフトウェアを使用して、移動について補正することができる。

【0118】

一部の実施形態では、カメラは、ビデオカメラである。ビデオカメラは、経時的に、複数の画像を捕捉する。一部の実施形態では、ビデオカメラは、経時的に、複数の画像を捕捉し、画像のサブセットが、さらなる解析に有用であることを決定する。一部の実施形態では、ビデオカメラは、複数の画像を捕捉し、単一の画像を、さらなる解析に選択する。選択は、使用者が行うこともできる。選択は、自動化することもできる。自動化された選択は、画像の内容を解析することにより行うことができる。

10

【0119】

画像センサーは、1 または複数のレンズを含みうる。レンズは、消費者用のデジタルカメラ上またはセルフォーンカメラ上で見出されることが典型的なレンズでありうる。例えば、Carl Zeiss F2.4 の 8.02mm のレンズである。いくつかの場合には、第 2 のレンズを使用することができる。

20

【0120】

画像センサーと関連するレンズの焦点距離は、100 cm 未満、90 cm 未満、80 cm 未満、70 cm 未満、60 cm 未満、50 cm 未満、40 cm 未満、30 cm 未満、20 cm 未満、10 cm 未満、5 cm 未満、または 1 cm 未満でありうる。例えば、0.67 倍の磁気マウント広角レンズを使用することができる。これを使用して、6.5 cm の距離で試料にオートフォーカスする対物画像を得ることができる。

【0121】

画像センサーは、光源と検出器との間にオフセットを有しうる。

【0122】

例えば、画像センサーは、分解能を 41 MP とし、最大出力を 38 MP とし (アスペクト比を 4 : 3 とし)、ピクセルサイズを $1.4 \mu\text{m}$ とする、Nokia 808 PureView の 1 / 1.4 インチの CMOS センサーでありうる。

30

【0123】

画像センサーは、消費者用のデジタルカメラまたは電話機、例えば、Nokia PureView 808 セルフォーンでありうる。画像センサーは、消費者用のデジタルポータブルコンピュータまたはデジタルタブレットでありうる。画像センサーは、ビデオカメラでありうる。画像センサーは、腕時計などのデバイス内に組み入れができる。画像センサーは、例えば、iPhone、Samsung Galaxy、または Google でありうる。

【0124】

オーバーサンプリング：例えば、PureView モードで捕捉される画像は、センサーの最大分解能によるオーバーサンプリングを介して創出する。ピクセルのオーバーサンプリングにより、多くのピクセルをビニングして、はるかに大量の有効ピクセルを創出し、これにより、ピクセルの総感度を増大させる。

40

【0125】

一部の実施形態では、アッセイに蛍光色素を組み入れる。蛍光色素は、核酸の存在下で活性化させることができる。一部の実施形態では、蛍光色素を、核酸の存在下で消光させる。蛍光は、蛍光分子により吸収される波長の励起光をもたらす照明光源と、検出ユニットとを使用して検出する。検出ユニットは、発せられたシグナルを検出する光センサー (光電子増倍管または電荷結合素子 (CCD) アレイなど) と、励起光が光センサー出力に組み入れられることを防止する機構 (波長選択フィルターなど) とを含む。蛍光分子は、

50

励起光に応答してストークスシフトした光を発し、この発せられた光は、検出ユニットにより収集される。ストークスシフトとは、発せられた光と吸収された励起光との間の周波数差または波長差である。蛍光色素は、増幅反応において使用される任意の色素でありうる。蛍光色素は、一本鎖DNAに結合する色素でありうる。蛍光色素は、二本鎖DNAに結合する色素でありうる。蛍光色素は、DNAに結合する場合もあり、RNAに結合する場合もある。蛍光色素は、挿入色素でありうる。蛍光色素のいくつかの非限定的な例は、例えば、アクリジン色素、シアニン色素、フッ素色素、オキサジン色素、フェナントリジン色素、ローダミン色素、SYTO 9、カルセイン、SYTO - 13、SYTO - 16、SYTO - 64、SYTO - 82、YO - PRO - 1、SYTO - 60、SYTO - 62、SYTOX Orange、SYBR Green I、およびTO - PRO - 3、TaqMan色素、臭化工チジウム、およびEvagreenを含む。

10

【0126】

一部の実施形態では、試料シグナルは、比色シグナルでありうる。試料は、例えば、核酸が増幅されると、色を変化させうる。いくつかの場合には、反応媒体の一部は、画像センサーにより感知される比色特性を変化させうる。比色特性の変化は、試料の一部が、特異的な核酸配列または非特異的な核酸配列の存在下で色を変化させる場合の変化でありうる。比色特性の変化は、複数の色の比率の変化でありうる。比色特性の変化は、色の強度の変化でありうる。一部の実施形態では、比色シグナルは、反応媒体の一部が、無色から有色へと変化するときに検出することができる。一部の実施形態では、比色シグナルは、反応媒体の一部が、1つの色から別の色へと変化するときに検出することができる。色は、赤色、青色、緑色、紫色、黄色、橙色、藍色、董色などでありうる。対象物の色は、例えば、対象物により吸収、反射、および放出される可視光の波長のセットでありうる。加えて、比色シグナルは、色の強度の変化でもありうる。比色シグナルは、例えば、核酸配列の存在下で、反応媒体の一部が、透明から不透明へと変化するときに検出することもでき、不透明から透明へと変化するときに検出することもできる。

20

【0127】

一部の実施形態では、反射された光子を検出することもできる。一部の実施形態では、放出された光子を検出することもできる。一部の実施形態では、反射された光子と放出された光子との組合せを検出する。

30

【0128】

マルチプレックスシグナル検出には、同じ容量内で多くのシグナルの増幅を識別する能力のほか、異なる容量に由来する異なるシグナルを識別する能力もあることが確認される。

【0129】

電気化学発光(ECL)では、援用されるECL分子種の発光波長に対して高感度な光センサーを使用して検出する。例えば、遷移金属 - 配位子複合体可視光波長の光を放出するので、従来の発光ダイオードおよびCCDを、光センサーとして援用する。ECLの利点は、外光を除去すれば、ECL発光を、検出システム内に存在する唯一の光とすることができる、これにより、感度を改善することができる。

40

【0130】

一部の実施形態では、電気化学発光ベースのアッセイによる標的の検出により、励起光源、励起光学素子、および/または光学フィルターエレメントに対する必要が除去または軽減され、より小型でより廉価なアッセイシステムがもたらされる。また、任意の励起光の除去に対する要求が存在しないことにより、検出器回路も簡略化され、システムはより廉価となる。

【0131】

核酸は、試料から検出することができる。一部の実施形態では、例えば、セルフォーンカメラを使用して、ロードされ、Slipchipデバイス上にある試料中の対象の核酸を検出することができる。

【0132】

50

本明細書で互換的に使用される「核酸」および「核酸分子」という用語は、ヌクレオチド、すなわち、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはこれらの両方を含む分子を指す。用語は、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの単量体と、ポリマーの場合は、5' - 3' 連結を介して、リボヌクレオチドおよび / またはデオキシリボヌクレオチドを併せて接続したポリマーとを含む。しかし、連結は、例えば、5' - 2' 連結を含む核酸を含む、核酸合成技術で公知の連結のうちのいずれかを含みうる。核酸分子内で使用されるヌクレオチドは、自然発生の場合もあり、自然発生の塩基対との塩基対関係を形成することが可能な合成により作製された類似体の場合もある。塩基対関係を形成することが可能な非自然発生塩基の例は、アザピリミジン類似体およびデアザピリミジン類似体、アザプリン類似体およびデアザプリン類似体、ならびに他の複素環塩基類似体を含むがこれらに限定されず、この場合、プリン環およびピリミジン環の炭素原子および窒素原子のうちの 1 または複数が、例えば、酸素、硫黄、セレニウム、リンなどのヘテロ原子により置換されている。

10

【0133】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、複数のヌクレオチドを含む核酸分子を指す。オリゴヌクレオチドは、約 2 ~ 約 300 ヌクレオチドを含みうる。

20

【0134】

本明細書で使用される「修飾オリゴヌクレオチド」という用語は、塩基、糖部分、ヌクレオシド間のリン酸連結のほか、ジアミン、コレステロールもしくは他の親油性基などの置換基を附加した分子、またはこれらの部位における修飾の組合せの全てまたはこれらのうちのいずれかの天然分子構造の分子レベルにおいて 1 または複数の化学修飾を伴うオリゴヌクレオチドを指す。ヌクレオシド間のリン酸連結は、ホスホジエステル連結、ホスホトリエステル連結、ホスホルアミデート連結、シロキサン連結、カーボネート連結、カルボキシメチルエステル連結、アセトアミデート連結、カルバメート連結、チオエーテル連結、架橋ホスホルアミデート連結、架橋メチレンホスホン酸連結、ホスホロチオエート連結、メチルホスホン酸連結；ホスホロジチオエート連結、架橋ホスホロチオエート連結、および / またはスルホンヌクレオチド間連結、または 3' - 3' 連結、5' - 2' 連結、もしくは 5' - 5' 連結、およびこのような類似の連結の組合せ（混合骨格修飾オリゴヌクレオチドを作製する）でありうる。修飾は、内部修飾（単一修飾または反復修飾）の場合もあり、オリゴヌクレオチド分子の末端（複数可）における修飾の場合もあり、アミノ基と末端のリボース、デオキシリボースとの間の炭素残基の数を変化させるコレステリル化合物、ジアミン化合物など、分子への、ヌクレオシド間のリン酸連結の付加、および対向鎖または会合した酵素もしくは他のタンパク質を切断するリン酸修飾、あるいは、対向鎖または会合した酵素もしくは他のタンパク質へと架橋するリン酸修飾を含みうる。リボース - ジアルデヒドなどの求電子基であれば、このようなタンパク質のリシリル残基のイブシロンアミノ基と共有結合的に連結しうるであろう。オリゴマーへとテザリングされた n - エチルマレイミドなどの求核基であれば、mRNA の 5' 端または別の求電子部位に共有結合的に接合しうるであろう。「修飾オリゴヌクレオチド」という用語はまた、これらのうちのいずれかを 5' - 3' 連結を介して併せて接続した、2' 置換されたリボヌクレオチド単量体または 2' 置換されたデオキシリボヌクレオチド単量体などの糖部分に対する修飾を含むオリゴヌクレオチドも含む。修飾オリゴヌクレオチドはまた、PNA またはモルホリノ修飾骨格も含むことが可能であり、この場合、配列の標的特異性が維持される。本発明の修飾オリゴヌクレオチドは、（1）自然発生のオリゴヌクレオチド構造を有さず、（2）天然オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするであろう。さらに、修飾は、天然オリゴヌクレオチドと比較した、（3）結合アフィニティーの増大、（4）酸耐性の増大、および（5）酵素による消化に対する安定性の増大もたらすことが好ましい。

30

40

【0135】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド骨格」という用語は、分子内のヌクレオチドを連結する化学的部分の構造を指す。本発明は、自然発生の骨格とは異なり、天然オリゴヌクレオチドが、塩基とハイブリダイズすることを可能とするように、塩基を正確な配

50

列順序で保持し、(2) 塩基を互いの間で正確な距離に保持することをさらに特徴とする骨格を含むことが好ましい。これは、ヌクレオチドを化学的に連結する、任意の全ての手段から形成される構造を含みうる。本明細書で使用される修飾骨格は、ヌクレオチドの間の化学的連結に対する修飾(天然の連結に対する)のほか、糖構造に対する修飾など、安定性およびアフィニティーを増強するのに使用しうる他の修飾も含む。例えば、デオキシリボースのa-アノマーを使用することができ、この場合、塩基を、天然のb-アノマーに対して逆行させる。好ましい実施形態では、糖基の2'-OHを、アフィニティーを損なうことなく、分解に対する耐性をもたらす、2'-O-アルキルまたは2'-O-アルキル-n(O-アルキル)へと変化させることができる。

【0136】

10

核酸は、解析の前に抽出することができる。核酸を抽出するのに使用される正確なプロトコールは、試料および実施される正確なアッセイに依存する。例えば、ウイルスRNAを抽出するためのプロトコールは、ゲノムDNAを抽出するプロトコールとは大幅に異なるであろう。しかし、核酸を標的細胞から抽出することは通例、細胞溶解ステップに続いて、核酸精製を伴う。細胞溶解ステップは、細胞膜および核膜を破壊し、遺伝子材料を放出する。これは、細胞内に存在する大量のタンパク質もまた変性させる、ドデシル硫酸ナトリウムなどの溶解洗浄剤を使用して達成されることが多い。

【0137】

20

次いで、氷冷エタノールまたはイソプロパノールが通例のアルコール沈殿ステップにより、または高濃度のカオトロピック塩の存在下にあるカラム内のシリカマトリックス上、樹脂上、または常磁性ビーズ上であることが典型的な固相精製ステップを介して核酸を精製してから、洗浄し、次いで、イオン強度の低い緩衝液中で溶出させる。核酸沈殿の前の任意選択のステップは、試料をさらに精製するための、タンパク質を消化するプロテアーゼの添加である。

【0138】

他の溶解法は、超音波振動を介する機械的溶解、および試料を94まで加熱して、細胞膜を破壊する熱溶解を含む。

【0139】

30

標的DNAまたは標的RNAは、特に、標的が病原性由来の標的である場合には、抽出された材料内に極めて少量で存在しうる。核酸增幅は、低濃度で存在する特異的な標的を、検出可能なレベルまで選択的に増幅する(すなわち、複製する)ことを可能とする。

【0140】

一部の実施形態では、アッセイは、増幅反応アッセイである。一部の実施形態では、セルフォーンカメラを使用して、増幅された核酸を、Sliipchipデバイス上で検出する。

【0141】

40

最も一般に使用される核酸増幅法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。増幅反応アッセイは、PCRでありうる。当技術分野では、PCRが周知であり、この種の反応についての包括的な記載は、E. van Pelt-Verkuilら、「Principles and Technical Aspects of PCR Amplification」、Springer、2008年において提示されている。

【0142】

PCRは、バックグラウンドの複合DNAに対して、標的DNA配列を増幅する強力な技法である。RNAを増幅する(PCRにより)場合は、まず逆転写酵素と呼ばれる酵素を使用して、RNAを、cDNA(相補的DNA)へと転写しなければならない。その後、結果として得られるcDNAを、PCRにより増幅する。

【0143】

PCRとは、反応を持続させるための条件が許容可能である限りにおいて進行する指数関数的工程である。反応成分は、

1. プライマー対：標的配列を挟む領域と相補的な約10～30ヌクレオチドを伴う、短

50

い一本鎖のDNA

2. DNAポリメラーゼ：DNAを合成する熱安定性の酵素

3. デオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)：新たに合成されるDNA鎖へと組み込まれるヌクレオチドをもたらす

4. 緩衝液：DNAを合成するのに最適な化学的環境をもたらす
である。

【0144】

PCRを使用する実施形態では、反応成分は、試料に接触させることができる。反応成分は、試料を保持するコンテナーへと添加することができる。反応成分は、コンテナー内に存在させ、試料を添加することができる。一部の実施形態では、キットは、PCR反応の成分を保持する複数の小型コンテナー、少なくとも1つのコンテナーを含みうる。キットは、S1ipChipおよび反応成分を含みうる。

【0145】

PCRは、抽出された核酸を含有する小型試験管（約10～50マイクロリットル）内にこれらの反応物質を入れるステップを伴うことが典型的である。試験管を、多様な量の時間にわたり、反応を一連の異なる温度下に置く計器である、サーマルサイクラー内に入れる。各熱サイクルのための標準的プロトコールは、変性相、アニーリング相、および伸長相を伴う。伸長相は、時にプライマー伸長相とも称される。このような3ステップのプロトコールに加えて、アニーリング相と伸長相とを組み合わせた、2ステップの加熱プロトコールを援用することもできる。変性相は、反応温度を、90～95まで上昇させて、DNA鎖を変性させるステップと；アニーリング相では、プライマーをアニールするために、温度を約50～60まで低下させるステップと；次いで、伸長相では、プライマーを伸長させるために、温度を最適なDNAポリメラーゼ活性温度である60～72まで上昇させるステップとを伴うことが典型的である。この工程は、約20～40回にわたり周期的に反復し、最終結果は、何百万コピーにも及ぶ、プライマー間の標的配列の創出である。

【0146】

増幅反応アッセイは、PCRの変形でありうる。増幅反応アッセイは、とりわけ、分子的診断法のために開発された、マルチプレックスPCR、リンクープライミングPCR、直接的PCR、タンデムPCR、リアルタイムPCR、および逆転写酵素PCRなど、標準的PCRプロトコールに対する変形の群から選択することができる。

【0147】

増幅反応アッセイは、マルチプレックスPCRでありうる。マルチプレックスPCRでは、単一のPCR混合物内で複数のプライマーセットを使用して、異なるDNA配列に特異的な、多様なサイズの単位複製配列を作製する。複数の遺伝子を同時にターゲティングすることにより、他のアッセイなら複数の実験を要求する単一の検査ランからさらなる情報を得ることができる。

【0148】

一部の実施形態では、例えば、複数のプライマーセットを反応混合物に添加し、各プライマーセットにより、それらの指定された標的を同じ容量内で増幅する、マルチプレックスPCR反応を実施する。他の実施形態では、試料を、複数の小容量へと分け、そこへ、単一のプライマーセットを導入する。

【0149】

増幅反応アッセイは、ライゲーションアダプターPCRとしてもまた公知のリンクープライミングPCRでありうる。リンクープライミングPCRとは、標的特異的プライマーに対する必要を伴わずに、複合DNA混合物中の本質的に全てのDNA配列の核酸増幅を可能とするのに使用される方法である。方法はまず、標的DNA集団を、適切な制限エンドヌクレアーゼ（酵素）で消化するステップを伴う。次いで、リガーゼ酵素を使用して、適切な突出端を伴う二本鎖オリゴヌクレオチドリンク（また、アダプターとも呼ばれる）を、標的DNA断片の末端へとライゲーションする。その後、リンクー配列に特異的な

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、核酸増幅を実施する。このようにして、リンクオリゴヌクレオチドにより挟まれるDNA供給源の全ての断片を増幅することができる。

【0150】

増幅反応アッセイは、直接的PCRでありうる。直接的PCRでは、いかなる核酸抽出も伴わずに、または最小限の核酸抽出を伴って、試料に対してPCRを直接実施するシステムが記載される。適切な化学反応および試料濃度により、最小限のDNA精製を伴うPCRまたは直接的PCRを実施することが可能である。直接的PCRのためのPCR化学反応に対する調整は、緩衝液強度の増大、活性および加工性が高いポリメラーゼならびに潜在的なポリメラーゼ阻害剤とキレートする添加剤の使用を含む。

10

【0151】

増幅反応アッセイは、タンデムPCRでありうる。タンデムPCRでは、核酸増幅の2つの異なるラウンドを活用して、正確な単位複製配列を増幅する確率を増大させる。タンデムPCRの一形態は、PCRプライマーの2つの対を使用して、単一の遺伝子座を、核酸増幅の個別のラウンドで増幅する、ネステッドPCRである。増幅反応アッセイは、ネステッドPCRでありうる。第1のプライマー対は、標的核酸配列の外側の領域で、核酸配列とハイブリダイズする。増幅の第2ラウンドで使用される第2のプライマー対（ネステッドプライマー）は、第1のPCR産物内で結合し、標的核酸を含有する第2のPCR産物であって、第1のPCR産物より短鎖である可能性がある第2のPCR産物をもたらす。この戦略の背後にある論理は、核酸増幅の第1のラウンドにおいて、誤って不適切な遺伝子座を増幅した場合、それが、第2のプライマー対により、2回目にもまた増幅される確率は極めて低く、したがって、特異性が増大することである。

20

【0152】

増幅反応アッセイは、リアルタイムPCRでありうる。増幅反応アッセイは、定量的PCRでありうる。リアルタイムPCRまたは定量的PCRは、PCR産物の量をリアルタイムで測定するのに使用する。フルオロフォア含有プローブまたは蛍光色素を、反応において、一連の基準物質と共に使用することにより、試料中の核酸の出発量を定量化することが可能である。これは、処置の選択肢が試料中の病原体負荷に応じて異なりうる、分子的診断法において特に有用である。

30

【0153】

増幅反応アッセイは、逆転写酵素PCR（RT-PCR）でありうる。逆転写酵素PCR（RT-PCR）は、DNAをRNAから増幅するのに使用する。逆転写酵素とは、RNAを、相補的DNA（cDNA）へと逆転写し、次いで、これをPCRにより増幅する酵素である。RT-PCRを、発現プロファイリングにおいて使用して、遺伝子の発現を決定するか、または転写開始部位および転写終結部位を含むRNA転写物の配列を同定することができる。RT-PCRは、ヒト免疫不全ウイルスまたはC型肝炎ウイルスなどのRNAウイルスを増幅するのに使用することができる。

【0154】

増幅反応アッセイは、等温アッセイでありうる。等温増幅とは、増幅反応時において、標的DNAの熱変性に依拠せず、このため、洗練された機構を要求しない、核酸増幅の別の形態である。したがって、等温核酸増幅法は、旧式の施設で実行することもでき、検査室環境の外で容易に行うこともできる。等温核酸増幅法の非限定的なリストは、例えば、鎖置換増幅、転写媒介増幅、核酸配列ベース増幅、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅、ローリングサークル増幅、分岐増幅、ヘリカーゼ依存等温DNA増幅、およびループ媒介等温増幅である。

40

【0155】

等温核酸増幅法は、例えば、特異的な制限エンドヌクレアーゼによるDNA分子の酵素的ニッキング、一定温度においてDNA鎖を分離する酵素の使用、または増幅時において作り出される一本鎖セグメントなどの代替法に依拠しうる。

【0156】

50

增幅反応アッセイは、鎖置換増幅 (S D A) でありうる。鎖置換増幅 (S D A) は、半修飾 D N A の非修飾鎖をニッキングする、ある種の制限酵素の能力、および伸長し、下流鎖を置換する、5' - 3' エクソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼの能力に依拠しうる。次いで、センス反応に由来する鎖置換が、アンチセンス反応のための鑄型として使用される、センス反応とアンチセンス反応とのカップリングにより、指数関数的核酸増幅を達成することができる。例えば、N . A 1 w 1 、N . B s t N B 1 、およびM 1 y 1 など、従来の様式では D N A を切断せず、D N A 鎖のうちの 1 つに対してニッキングを施すニカーゼ酵素を、この反応において使用することができる。 S D A は、熱安定性制限酵素 (A v a 1) と熱安定性エクソポリメラーゼ (B s t ポリメラーゼ) との組合せを使用することにより改善されている。この組合せは、この技法を使用して、固有の単一のコピー分子を増幅することが可能であるように、108倍の増幅から1010倍の増幅へと、反応の増幅効率を増大させることができるものである。

10

【 0 1 5 7 】

增幅反応アッセイは、転写媒介増幅 (T M A) でありうる。增幅反応アッセイは、核酸配列ベース増幅 (N A S B A) でもありうる。転写媒介増幅 (T M A) および核酸配列ベース増幅 (N A S B A) では、R N A ポリメラーゼを使用して、対応するゲノム D N A ではなく、R N A 配列をコピーすることが可能である。これらの技術では、2つのプライマーおよび2つまたは3つの酵素、R N A ポリメラーゼ、逆転写酵素、および任意選択で、R N A - H (逆転写酵素が R N A 活性を有さない場合) を使用することが可能である。1つのプライマーは、R N A ポリメラーゼに対するプロモーター配列を含有しうる。核酸増幅の第1のステップでは、このプライマーは、規定された部位において、標的のリボソーム R N A (r R N A) とハイブリダイズする。逆転写酵素は、プロモータープライマーの3' 端からの伸長により、標的である r R N A の D N A コピーを創出しうる。結果として得られる R N A : D N A 二重鎖内の R N A は、存在する場合の逆転写酵素またはさらなる R N A - H の R N A 活性により分解することができる。次に、第2のプライマーは、D N A コピーに結合する。新たな D N A 鎖は、逆転写酵素により、このプライマーの末端から合成し、二本鎖 D N A 分子を創出する。R N A ポリメラーゼは、D N A 鑄型内のプロモーター配列を認識し、転写を開始する。新たに合成された R N A 単位複製配列の各々は、工程に再度入り、新たな複製ラウンドのための鑄型として用いられる。

20

【 0 1 5 8 】

增幅反応アッセイは、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (R P A) でありうる。リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (R P A) では、対向するオリゴヌクレオチドプライマーを、鑄型 D N A へと結合させ、D N A ポリメラーゼを介してそれらを伸長させることにより、特異的な D N A 断片の等温増幅を達成する。二本鎖 D N A (d s D N A) 鑄型を変性させるのに、熱が常に要求されるわけではない。そうではなく、R P A は、リコンビナーゼ - プライマー複合体を援用して、d s D N A を走査し、コグネイト部位における鎖交換を容易としうる。結果として得られる構造は、置換された鑄型鎖と相互作用する一本鎖 D N A 結合性タンパク質により安定であり、これにより、分岐点移動によるプライマーの駆出を防止する。リコンビナーゼによる脱アセンブリーは、オリゴヌクレオチドの3' 端を、枯草菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) P o l I (B s u) の大型断片など、鎖置換性 D N A ポリメラーゼへとアクセス可能とし、プライマー伸長を後続させる。この工程の周期的反復により、指数関数的核酸増幅を達成する。

30

【 0 1 5 9 】

增幅反応アッセイは、ヘリカーゼ依存増幅 (H D A) でありうる。ヘリカーゼ依存増幅 (H D A) は、それが、プライマーのハイブリダイゼーションおよびD N A ポリメラーゼによるその後のプライマー伸長のために、D N A ヘリカーゼ酵素を使用して一本鎖鑄型を作り出すという点で、in vivo 系を模倣する。H D A 反応の第1のステップでは、ヘリカーゼ酵素は、標的 D N A に沿って移動し、2つの鎖を連結する水素結合を破壊し、次いで、これらを、一本鎖結合性タンパク質により結合させる。ヘリカーゼによる一本鎖標的領域の曝露は、プライマーがアニールすることを可能とする。次いで、D N A ポリメ

40

50

ラーゼは、遊離デオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) を使用して、各プライマーの3'端を伸長させて、2つのDNA複製物を作製する。2つの複製されたdsDNA鎖は、HDAの次のサイクルに独立に入り、標的配列の指数関数的核酸增幅を結果としてもたらす。

【0160】

增幅反応アッセイは、ローリングサークル增幅 (RCA) であります。他のDNAベースの等温法は、DNAポリメラーゼにより、プライマーを環状DNA鑄型に沿って持続的に伸長させ、多くの繰り返しこピーの環状鎖からなる長鎖のDNA産物を作り出す、ローリングサークル增幅 (RCA) を含む。反応の終了時までに、ポリメラーゼにより、何千コピーもの環状鑄型が作り出され、コピー鎖は、元の標的DNAへとテザリングされる。これにより、標的の空間的分解能およびシグナルの迅速な核酸增幅が可能となる。最大で1012コピーの鑄型を、1時間で作り出すことができる。分岐増幅は、RCAの変形であり、閉止した環状プローブ (Cプローブ: circular probe) またはパッドロックプローブおよび加工性の高いDNAポリメラーゼを活用して、等温条件下でCプローブを指数関数的に増幅する。

10

【0161】

増幅反応アッセイは、ループ媒介等温增幅 (LAMP) であります。LAMPは、高度な選択性をもたらし、DNAポリメラーゼと、標的DNA上で合計6つの異なる配列を認識する4つの特別にデザインされたプライマーのセットとを援用する。標的DNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を含有する内側プライマーにより、LAMPが開始される。外側プライマーによりプライミングされる、後続の鎖置換DNA合成により、一本鎖DNAが放出される。これは、標的の他の末端とハイブリダイズする、第2の内側プライマーおよび外側プライマーによりプライミングされるDNA合成のための鑄型として用いられ、これにより、ステムループDNA構造がもたらされる。その後のLAMPサイクリングでは、1つの内側プライマーは、産物上のループとハイブリダイズし、置換DNA合成を開始し、元のステムループDNAおよびステムの長さが2倍の新たなステムループDNAをもたらす。サイクリング反応は、1時間未満で、多くの標的コピーを蓄積させて持続する。最終産物は、標的の複数の逆行リピートを伴うステムループDNA、および同じ鎖内で交互に逆行させた標的のリピートの間のアニーリングにより形成された複数のループを伴うカリフラワー様構造である。

20

【0162】

一部の実施形態では、増幅は、HIV-1ウイルス負荷を定量化するための、1ステップのディジタル逆転写ループ媒介等温增幅 (dRT-LAMP) 反応であり、全ての反応を実施する。LAMPは、カルセイン中のマンガンのマグネシウムによる置きかえを介して、明るい蛍光シグナルをもたらす。次いで、一部の実施形態では、市販のセルフォーンカメラを使用して、この蛍光を検出およびカウントすることができる。

30

【0163】

一部の実施形態では、増幅は、HIV-1ウイルス負荷を定量化するための、2ステップdRT-LAMP反応である。2ステップdRT-LAMPでは、逆転写ステップと、その後の増幅ステップとが切り離される。逆転写ステップでは、一本鎖DNA鑄型またはcDNAを、RNAから合成する。増幅ステップでは、LAMP試薬混合物および残りのプライマーを添加し、cDNAの増幅を行う。一部の実施形態では、バックワードループプライマー (B1P) を、第1のステップへと組み込む。鎖置換合成 (例えば、cDNAの、RNA:cDNAハイブリッドからの放出) の速度は、第2のステップにおける増幅に干渉しうる。一部の実施形態では、RNアーゼHを、第2のステップへと組み込み、ハイブリッドを解体し、効率を改善する。

40

【0164】

増幅された産物を解析して、予測された単位複製配列 (標的核酸の増幅量) が作り出されたのかどうかを決定することができる。dLAMPおよびdRT-LAMPを使用する單一分子カウンティングは、等温であり、したがって、熱サイクリング装置を要求せず、

50

プラスチックに適合性であり、カルセイン検出システムに由来する明色シグナルであって、セルフォーンにより読み取り可能なシグナルをもたらすため、魅力的である。一部の実施形態では、本発明は、d R T - L A M P を活用するマルチステップ操作のためのプラットフォームを提供する。一部の実施形態では、本発明を、例えば、d L A M P および他のディジタル式単一分子反応についての機構研究のための、多くの容量のパラレルなマルチステップ操作を可能とする技術へと適用することができる。一部の実施形態では、本発明は、診断法適用のために、ディジタル式単一分子增幅を配備するための、資源の限られた設定 (R L S) 下で適用可能でありうる。

【 0 1 6 5 】

一部の実施形態では、援用される增幅は、例えば、水溶液、ポリマー性マトリックス、固体支持体など、様々な異なる媒体中で施すことができる。 10

【 0 1 6 6 】

蛍光領域は、単一分子からの增幅産物に対応しうる。一部の実施形態では、同じ画像内で複数の単一分子シグナルを検出し、分解する。蛍光領域を検出することができる。一部の実施形態では、単一分子解析により、感度の向上および定量化のためのより簡便な方法がもたらされる。一元単一分子解析は、蛍光標識化および個々の分子の検出を介して実施することができる。従来、これらの分子のカウンティングは、煩瑣な手順となっており、高価な顕微鏡上、極めて高倍率の小さな視野で実施しなければならず、試料全体をラスター走査する必要をもたらしている。 20

【 0 1 6 7 】

本明細書の工程は、バイナリー定量化と呼ぶことができる。本明細書の工程は、バイナリー解析と呼ぶことができる。バイナリー定量化の工程は、解析物を含有しうる試料と共に始まる。解析物は、定量化または探索される分子、例えば、特定の核酸、例えば、特定の核酸配列、遺伝子、またはタンパク質でありうる。試料は、多くの個別の反応容量へと分布させることができる。一部の実施形態では、反応容量は、個別の解析領域である。一部の実施形態では、個別の反応容量は、例えば、個別のウェル内、チャンバー内、スライドの表面上のエリア内、液滴中、ビーズ内、またはアリコート中に物理的に隔てられる。一部の実施形態では、個別の反応容量は、同じコンテナー内に入れることができる。例えば、解析物は、基質へと固定することもでき、ビーズへと接合することもできる。反応容量は、ビーズ上、スライドの表面上に置くこともでき、基質へと接合させることもできる。試料は、各個別の反応容量が、個々の解析物分子を含有しないか、または 1 もしくは複数の個々の解析物分子を含有するように、多くの個別の反応容量へと分布させる。1 または複数の分子とは、0 以外の数の分子を意味する場合がある。1 または複数の分子とは、1 つの分子を意味する場合がある。一部の実施形態では、1 または複数の分子とは、1 つの分子、2 つの分子、3 つの分子、4 つの分子・・・などを意味する場合がある。一部の実施形態では、各個別の反応容量は、ウェル内に含有される。一部の実施形態では、各反応容量が、平均で 1 つ未満の個々の解析物分子を含むように、試料を分布させる。一部の実施形態では、大半の反応容量が、解析物分子を含まないか、または 1 つの解析物分子を含むように、試料を分布させる。次に、定性的な「あり、または、なし」検査を行って、別々の陽性反応容量および陰性反応容量のパターンを読み取ることにより、各反応容量が、1 または複数の解析物分子を含有するのかどうかを決定することができる。陽性反応容量は、1 または複数の解析物分子を含有することが決定された反応容量でありうる。陽性反応容量は、1 または複数の解析物分子の存在と相関するシグナルを示すことが決定された反応容量でありうる。陽性反応容量は、1 または複数の解析物分子の存在と相関する閾値を上回るシグナルを示すことが決定された反応容量でありうる。一部の実施形態では、陽性反応容量を、1、または 2、3 など、1 の単純な倍数として定量化する一方で、陰性反応容量は、0 として定量化する。一部の実施形態では、陽性反応容量を、1 として定量化し、陰性反応容量を、0 として定量化する。陰性反応容量は、解析物分子を含有しないことが決定された反応容量でありうる。陰性反応容量は、1 または複数の解析物分子の存在と相関するシグナルを示さない反応容量でありうる。陰性反応容量は、1 または複数の分子を含有しないか、または 1 つの分子を含有するかを決定する。 30

40

50

解析物分子の存在と相關する閾値を上回るシグナルを示さない反応容量でありうる。各反応容量の、陽性反応容量または陰性反応容量としての決定および／または指定を、バイナリーアッセイまたはディジタルアッセイと称することができる。この「あり、または、なし検査」またはこれに類する検査を、バイナリーアッセイと称することができる。次いで、どの反応容量が陰性反応容量であり、どの反応容量が陽性反応容量であるのかについてのこの定性的解析を、ポアソン解析を使用して、試料中の解析物の定量的濃度へと変換することができる。多くの反応容量の使用を介して、大きなダイナミックレンジを達成することができる。サイズの異なる反応容量を有するデバイスを使用することにより、大きなダイナミックレンジを達成することができる。試料を、多くのウェルおよび／またはサイズの異なるウェルへと分配することにより、大きなダイナミックレンジを達成することができる。この全体的な工程を、核酸のバイナリー定量化と呼ぶことができる。この工程を、解析物分子のカウンティングと呼ぶことができる。一部の実施形態では、バイナリー定量化とは、各反応容量が、0または0以外の数の解析物分子を含有するように、試料を複数の反応容量へと分配する工程と；解析物分子に関して、どの反応容量が陽性反応容量であり、どの反応容量が陰性反応容量であるのかを決定および／または指定する工程と；陽性反応容量および陰性反応容量についての情報を、試料中の解析物分子の量または濃度についての情報へと変換する工程である。一部の実施形態では、解析物分子の絶対数を決定する。一部の実施形態では、どの反応容量が陽性反応容量であり、どの反応容量が陰性反応容量であるのかについての情報の、分子の量、絶対数、または試料中の解析物の濃度についての情報への変換を、解析物のディジタル定量化と呼ぶ。一部の実施形態では、解析物は、核酸である。一部の実施形態では、核酸のバイナリー定量化を達成する。一部の実施形態では、核酸解析物のバイナリー定量化を決定するが、この場合、試料を、複数の反応容量へと分配し、反応容量を、S l i p C h i p 上に置く。

10

20

30

40

【0168】

一部の実施形態では、試料中の解析物分子のバイナリー定量化は、試料を複数の反応容量へと空間的に隔てずに達成することができる。これらの実施形態では、解析物分子を、情報論的隔離によりカウントすることができる。一部の実施形態では、解析物分子に、情報保有分子のプールでタグ付けするか、増幅するか、またはコピーし、増幅またはコピーされた異なる情報保有分子の数をカウントして、解析物分子の出発数の定量化を行う工程（例えば、WO 2012148477を参照されたい）を介して、試料中の解析物分子にバイナリー定量化を施す。一部の実施形態では、情報保有分子は、化学的バーコードのプールでありうる。一部の実施形態では、情報保有分子は、一連の核酸配列でありうる。

【0169】

ディジタル解析は、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、組換えポリメラーゼ増幅（R P A）、およびループ媒介増幅（L A M P）を、R N A 濃度またはD N A 濃度を定量化する方途として使用して達成することができる。等温化学反応を使用しうるR P AおよびL A M Pなどの増幅は、家庭および限られた資源の設定における使用に十分に適しうる。L A M P化学反応は特に、温度許容範囲が比較的広い可能性があり、単純で廉価な化学ベースの加熱器および相変化材料と共に作動させることができあり、陽性ウェルでは蛍光を増大させうるので、家庭用または限られた資源の設定用のプラットフォームにおける使用のための魅力的な候補反応である。

【0170】

本明細書において、ある特定の実施形態では、モバイル通信デバイスを使用して、蛍光パターンを解析し、情報を伝送および処理する方法のためのデバイスが記載される。このような能力は、ディジタル核酸増幅反応についての解析を含む多くの目的のために貴重である。

【0171】

頑健性

頑健性とは、反復された一連の定量的測定が、多様な実験条件下で同様な測定値のセットを提示する程度でありうる。例えば、セルフォーンカメラを使用して、S l i p C h i

50

p 上、現実の世界において見出される様々な条件下で、同様な測定を実施するのに成功しうる。同様な測定値は、同一な測定値でありうる。同様な測定値は、同じ診断でありうる。同様な測定値は、同じ答えでありうる。同様な測定値とは、互いに実験誤差内の複数の測定値を意味する場合がある。同様な測定値は、統計学的有意性を伴う一貫した帰結をもたらしうる。同様な測定値は、数値サイズが同様でありうる、例えば、互いに 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、200 %、1,000 %以内でありうる。頑健なアッセイは、例えば、所与の条件のセットの下で測定された場合を、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、99.9 %、99.99 %超えることが多い、同様な測定値をもたらしうる。

10

【0172】

異なる種類のアッセイは、頑健なアッセイでありうる。核酸増幅アッセイおよび核酸定量化アッセイは、頑健でありうる。タンパク質、または細胞、エキソソーム、リポソーム、細菌、ウイルスなど、他の標的を検出するアッセイは、頑健でありうる。LAMPアッセイは、頑健でありうる。RT-LAMPアッセイは、頑健でありうる。dRT-LAMPアッセイは、頑健でありうる。バイナリーランプ反応は、頑健でありうる。バイナリーランプ反応は、頑健でありうる。PCR反応は、頑健でありうる。qPCRアッセイは、頑健でありうる。定量的核酸増幅反応は、頑健でありうる。定性的核酸増幅反応は、頑健でありうる。核酸配列の増幅に基づき、健康の転帰を診断する方法は、頑健でありうる。SlipChip内の工程は、頑健でありうる。LAMP反応の後におけるSlipChipのイメージングおよび解析は、頑健な工程でありうる。

20

【0173】

dRT-LAMPの絶対効率は、i)より効果的な逆転写酵素を使用し、ii) RNAアーゼHを導入して、DNA-RNAハイブリッドを解体し、iii) RTステップにおいて、BIPプライマーだけを添加することにより、10分の1を超えて、例えば、約2%～約28%増大させることができる。dRT-LAMPは、プラスチック製のSlipChipデバイスと適合性であることが可能であり、HIV RNAを定量化するのに、この2ステップ方法を使用することができる。dRT-LAMPによる定量化結果は、いくつかの場合には、患者のHIV RNAの配列に対して極めて高感度であった。

30

【0174】

アッセイは、実験変数に関して頑健でありうる。アッセイは、所与の温度範囲に関して頑健でありうる。アッセイは、温度範囲にわたり頑健でありうる。アッセイが頑健でありうるいくつかの非限定的な範囲は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、20、24、28、32、40、50、60、80、100、150、200、250、または300を含む。アッセイが頑健である温度範囲は、絶対温度スケール上の温度を中心とする。アッセイがそこまでは頑健である温度範囲の中心でありうるいくつかの非限定的な温度は、例えば、-40、-30、-20、-10、0、10、20、室温、25、30、35、体温、37、40、45、50、55、60、65、70、80、90、100、110、150、または200を含む。一部の実施形態では、バイナリーランプアッセイを使用して、試料中の核酸配列を増幅し、その後イメージングおよび定量化する。これらの実施形態では、アッセイは、約60を中心とする9の温度範囲にわたり、核酸配列の頑健な定量化でありうる。試料中の核酸配列を増幅し、その後イメージングおよび定量化するのに使用されるバイナリーランプアッセイは、約55～約66の温度範囲にわたり頑健でありうる。一部の実施形態では、SlipChipは、イメージングすることができ、データを処理して、約5～約70の温度範囲にわたり頑健な所見をもたらすことができる。

40

【0175】

アッセイは、時間に関して頑健でありうる。アッセイは、ある時間の範囲にわたり一貫した結果をもたらしうる。アッセイが要求するのは、終点のリードアウトだけでありうる

50

。バイナリーDNA增幅実験が要求するのは、終点のリードアウトだけでありうる。終点のリードアウトは、増幅が完了した時点の近傍において得ることもでき、この時点の後の時点において得ることもできる。頑健なDNA增幅アッセイは、反応終了に近い時点においておよび／または反応が完了した後の時点において、一貫した結果をもたらしうる。アッセイがその時間にわたり頑健でありうる反応時間の非限定的な範囲は、例えば、0.0 1分間、0.1分間、0.5分間、1分間、2分間、3分間、4分間、5分間、6分間、7分間、8分間、9分間、10分間、12分間、14分間、16分間、20分間、24分間、28分間、32分間、40分間、45分間、50分間、1.0時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、8時間、10時間、12時間、16時間、18時間、1日間、2日間、3日間、7日間、1カ月間、または1年間を含む。いくつかの場合には、バイナリーDNA增幅実験は、時間についての正確な知見を要求しない。バイナリーDNA增幅の出力は、最適な反応時間を超える反応時間の変化に対して頑健でありうる。一部の実施形態では、Slip Chip上のd-LAMPアッセイは、例えば、LAMP反応が始まって40分後～60分後の間の、20分間を超える時間にわたり頑健である。
10

【0176】

アッセイは、大気湿度の変化に関して頑健でありうる。一部の実施形態では、アッセイは、大気湿度に関わらず頑健でありうる。一部の実施形態では、アッセイは、ある範囲の大気湿度にわたり頑健でありうる。湿度の範囲は、約0%～100%の相対湿度でありうる。アッセイが頑健でありうる大気湿度の範囲は、約30の空気1立方メートル当たりの水約0～約40グラムでありうる。一部の実施形態では、アッセイは、例えば、約0%の湿度～約40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の湿度において頑健でありうる。一部の実施形態では、アッセイは、約40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の湿度範囲にわたり頑健でありうる。一部の実施形態では、Slip Chip内のd-LAMPアッセイランは、大気湿度約0%～約100%の湿度範囲にわたり頑健なアッセイとしてイメージングおよび解析することができる。
20

【0177】

アッセイは、実験を実施するのに使用される装置に関して頑健でありうる。例えば、アッセイは、使用されるカメラの種類に関して頑健でありうる。アッセイは、カメラにより記録される画像内のピクセルの数に関して頑健でありうる。アッセイは、データを捕捉するデバイス上で作動するソフトウェアシステムに関して頑健でありうる。アッセイは、試料コンテナーに関して頑健でありうる。アッセイは、専用装置の使用と対比して、カメラを内蔵したセルフォーンの使用に関して頑健でありうる。アッセイは、使用されるカメラデバイス上に存在するカメラフラッシュの種類に関して頑健でありうる。アッセイは、セルフォーン、タブレット、または小型ハンドヘルドコンピュータなど、非定量的消費者用電子デバイスによるイメージングの実施に関して頑健でありうる。アッセイは、外部励起光源に関して頑健でありうる。
30

【0178】

アッセイは、カメラフラッシュのばらつきに関して頑健でありうる。アッセイは、フラッシュの機構に関して頑健でありうる。例えば、アッセイは、キセノンフラッシュでも、LEDフラッシュでも、頑健で一貫した結果をもたらしうるであろう。アッセイは、フラッシュのサイズに関して頑健でありうる。アッセイは、フラッシュの方向に関して頑健でありうる。アッセイは、フラッシュの方向に関して頑健でありうる。一部の実施形態では、フラッシュが向けられる方向は、一貫した結果をもたらしうる。一部の実施形態では、フラッシュのタイミングは、ばらつくことが可能であり、アッセイは、潜在的なフラッシュのタイミングの範囲にわたり頑健でありうる。
40

【0179】

アッセイは、外部光源のばらつきに関して頑健でありうる。アッセイは、外部の光源の配向性に関して頑健でありうる。アッセイは、例えば、発光ダイオード、電球型蛍光灯、白熱電球、キセノンフラッシュなど、シグナルを発生させるのに使用される光源の種類に
50

関して頑健でありうる。アッセイは、外部光源の強度に関して頑健でありうる。アッセイは、外部の光源の色に関して頑健でありうる。

【0180】

アッセイは、イメージング時に存在するバックグラウンド光量の変化に関して頑健でありうる。一部の実施形態では、暗室内で行われるのであれ、バックグラウンド光の存在下で行われるのであれ、アッセイは、一貫した結果をもたらしうる。一部の実施形態では、d-LAMPアッセイは、バックグラウンド照度の範囲にわたり頑健でありうる。アッセイが頑健でありうるバックグラウンド照度の範囲のいくつかの非限定的な例は、例えば、約0ルクス、0.1、0.2、0.5、0.8、1.0～約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、20、24、28、32、36、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000ルクスでありうる。アッセイは、周囲外光に関して頑健でありうる。一部の実施形態では、アッセイは、暗室内のであれ、靴箱内に置かれたセルフォーンにより実行されるのであれ、頑健でありうる。

【0181】

一部の実施形態では、アッセイは、定量的な解析測定値をもたらす。例えば、本発明は、試料内の核酸配列の量および/または濃度を、定量的な量として測定および表示しうる。この測定値は、例えば、核酸配列の化学的增幅時、光学データの測定時、および/またはデータの処理時に存在する実験条件に関して頑健でありうる。実験における摂動または多様な実験条件の例は、例えば、複数の摂氏度にわたる温度の変化、大気湿度の変化、セルフォーンなどの非定量的消費者電子デバイスにより実施されるイメージング、アッセイ時間の変化、イメージング時に存在するカメラフラッシュのばらつき、サンプリングエラー、バックグラウンド光量の変化を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、バイナリーLAMPアッセイを使用して、試料中の核酸配列を增幅し、その後イメージングおよび定量化する。これらの実施形態では、測定値を、暗室へと閉じ込めないセルフォーンカメラにより得る場合、温度の変化を約55～約66とし、0～100%の大気湿度の存在下で、15分間～1.5時間にわたり、配列の正確かつ再現可能な定量化を求めることができる。アッセイは、単一の実験内の複数の実験変数の変化に関して頑健でありうる。例えば、SlipChip内で行うバイナリーLAMPアッセイは、頑健であることが可能であり、所与の試料について、反応温度、反応時間、およびイメージング時に存在するバックグラウンド光の量の範囲にわたり、一貫した結果をもたらしうる。例えば、SlipChip内で行うバイナリーLAMPアッセイは、頑健であることが可能であり、データを、靴箱内のセルフォーンによるイメージングから得る場合にも、反応時間を40分間、50分間～60分間で変化させ、6度の温度範囲（温度範囲：55～66）にわたっても、同様の結果をもたらしうる。

【0182】

試料は、試料コンテナー、例えば、SlipChipに含有または受容されうる。SlipChipとは、試料を保持しうるデバイスである。試料を保持するSlipChipは、標準的なフォトリソグラフィー法および湿式化学エッチング法を使用して作製された相補的なパターンを伴う2枚のスライドガラスからなる。クロムおよびフォトレジストコーティングを伴うソーダ石灰ガラスプレートは、Telic Company (Valencia, California.) から得た。Karl Suss、MJB3コンタクトアライナーを使用して、フォトレジストコーティングを伴うガラスプレートを、マイクロダクトおよびエリアのデザインを含有するフォトマスクと位置合わせした。フォトマスクはまた、マスクをプレートと共に位置合わせするためのマークも含有しうる。次いで、ガラスプレートおよびフォトマスクを、UV光へと、1分間にわたり曝露した。フォトマスクを取り外し、ガラスプレートを、1リットル中に0.1モルのNaOH溶液中に2分間にわたり浸漬することにより現像した。UV光へと曝露されたフォトレジストエリアだけが、溶液中に溶解した。クロムエッチング液（0.6:0.365MのHClO₄ / (NH₄)₂Ce(NO₃)₆）を用いて、ガラスプレートを1分間にわたり曝露した。

₃) ₆ 溶液)を使用して、露出された基底のクロム層を除去した。プレートを、M i l l i p o r e 水ですすぎ、窒素ガスで乾燥させ、ガラスプレートの裏面に、P V C シーリングテープ (M c M a s t e r - C a r r) でテーピングして、ガラスの裏面を保護した。次いで、テーピングされたガラスプレートを、40 の温度で、1 : 0 . 5 : 0 . 75 モル / L の H F / N H ₄ F / H N O ₃ からなる緩衝エッティング剤を伴うプラスチック製コンテナー内に注意深く浸漬して、ソーダ石灰ガラスにエッティングした。エッティング速度は、エッティング温度により制御し、エリアおよびダクト深度は、エッティング時間により制御した。エッティングの後、プレートからテープを取り外した。次いで、プレートを、M i l l i p o r e 水でよくすすぎ、窒素ガスで乾燥させた。エタノールですすぐことにより、残りのフォトレジストを除去し、プレートをクロムエッティング液中に浸漬することにより、残りのクロムコーティングを除去した。ガラスプレートの表面は、トリデカフルオロ - 1 , 1 , 2 , 2 - テトラヒドロオクチル - 1 - トリクロロシラン (U n i t e d C h e m i c a l T e c h n o l o g i e s , I n c .) によるシラン化を介して疎水性とした。直径 0 . 76 mm のダイアモンドドリルビットで、アクセス孔をドリル加工した。

【0183】

S l i p C h i p の 2 つ以上のエリアの間の流体連絡を確立する 1 つの方法は、S l i p C h i p 内に埋め込まれた、少なくとも 1 つの断面寸法がナノメートル範囲にあるチャネルである、ナノチャネルの使用を含む。ナノチャネルは、多層型 S l i p C h i p へと埋め込むことができる。ナノチャネルの高さは、ナノメートルスケールの分解能で変化させることができる。ナノチャネルの高さは、ウェル間のミクロンサイズの細胞の移動は阻止しうるが、タンパク質、小胞、ミセル、遺伝子材料、小型分子、イオン、および他の分子、ならびに細胞培養培地および分泌生成物を含む高分子の移動は可能としうる。ウェル間の輸送動態を制御するために、ナノチャネルの幅、長さ、および屈曲度もまた操作することができる。ナノチャネルは、「Bacterial metapopulations in nanofabricated landscapes」、Juan E. Keymer、Peter Galajda、Cecilia Muldoon、Sungsu Park、およびRobert H. Austin、PNAS、2006年11月14日、103巻、46号、17290 ~ 17295 頁において記載されている通りに作製することもでき、ナノチャネルを第1のガラス片内にエッティングし、第2のガラス片に接触させた後、任意選択で接着ステップを施すことにより作製することもできる。適用は、濾過、細胞および粒子の捕捉、長期にわたる細胞培養、ならびに細胞間相互作用および細胞コロニー間相互作用および組織間相互作用の制御を含む。

【0184】

P D M S / ガラス型の S l i p C h i p デバイスはまた、既に記載されているのと同様に、ソフトリソグラフィーを使用して作製することもできる。使用されるデバイスは、各層がダクトおよびエリアを伴う P D M S の薄膜からなる 2 つの層と、サイズを 75 mm × 25 mm とする 1 mm 厚の顕微鏡用スライドガラスとを含有する。デバイスを作製するために、スライドガラスを清浄化し、酸素プラズマ処理にかけた。D o w - C o r n i n g S y l g a r d 184 A 成分および B 成分を、5 : 1 の質量比で混合し、S l i p C h i p の鋳型へと注いだ。養生の前に、スライドガラスを、P D M S に貼り付けた。鉄ビーズを伴うガラスボトムをスライドガラスに貼り付けて、P D M S 膜を薄くした。室温で 7 時間にわたりデバイスを前養生し、次いで、60 のオーブンへと移動させ、一晩にわたり養生した。養生の後、デバイスを鋳型からはがし、トリデカフルオロ - 1 , 1 , 2 , 2 - テトラヒドロオクチル - 1 - トリクロロシランでシラン化した。直径 0 . 76 mm のダイアモンドドリルビットで、アクセス孔をドリル加工した。

【0185】

本発明を伴う使用に適するポリマー材料は、有機ポリマーでありうる。このようなポリマーは、ホモポリマーの場合もあり、コポリマーの場合もあり、自然発生の場合もあり、合成の場合もあり、架橋される場合もあり、架橋されていない場合もある。対象の具体的なポリマーは、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリアミド、ポリエーテル、ポリウレタン、ポリフルオロカーボン、ポリスチレン、ポリ(アクリロニトリル - ブ

10

20

30

40

50

タジエン - スチレン) (A B S)、ポリメチルメタクリレートなどのアクリレートポリマーおよびアクリル酸ポリマー、ならびに他の置換ポリオレフィンおよび非置換ポリオレフィン、ならびにこれらのコポリマーを含むがこれらに限定されない。一般に、マイクロデバイスを、生物学的流体を輸送するのに援用する場合、基質のうちの少なくとも1つまたはS l i p C h i pデバイスの一部は、生物付着耐性ポリマーを含む。ポリイミドは、特に対象であり、多数の文脈で高度に所望される基質材料であることが分かっている。ポリイミドは、例えば、K a p t o n (登録商標) (D u P o n t、W i l m i n g t o n、D e l .) およびU p i l e x (登録商標) (U b e I n d u s t r i e s, L t d .、J a p a n) という商標名の下で市販されている。ポリエーテルエーテルケトン (P E E K) もまた、所望の生物付着耐性の特性を呈示する。本発明を伴う使用に適するポリマー材料は、ポリジメチルシロキサンなどのシリコーンポリマーおよびエポキシポリマーを含む。

10

【0186】

本発明のS l i p C h i pデバイスはまた、「複合物」、すなわち、異なる材料を含む組成物からも作製することができる。複合物は、ブロック複合物、例えば、A - B - Aブロック複合物、A - B - Cブロック複合物などでありうる。代替的に、複合物は、異種の材料の組合せ、すなわち、材料が個別の相と異なる組合せの場合もあり、同種の異なる材料の組合せの場合もある。本明細書で使用される「複合物」という用語は、「ラミネート」複合物を含むように使用される。「ラミネート」は、同一な材料または異なる材料による複数の異なる接着層から形成される複合物材料を指す。他の好ましい複合物基質は、ポリマーラミネート、ポリマー - 金属ラミネート、例えば、銅でコーティングされたポリマー複合物、金属内セラミック複合物、または金属内ポリマー複合物を含む。1つの好ましい複合物材料は、D u P o n t (W i l m i n g t o n、D e l .) からもまた入手可能な、K J (登録商標) として公知である、ポリイミドの感熱粘着性形態の第2の薄層と共に共押出し成形された、K a p t o n (登録商標) などのポリイミドによる第1の層から形成されたポリイミドラミネートである。

20

【0187】

デバイスは、単独または組合せの、圧縮成形、射出成形、または真空成形などの技法を使用して作製することができる。疎水性が十分な材料は、成形後に直接活用することができる。親水性材料もまた活用しうるが、さらなる表面改変を要求しうる。さらに、デバイスはまた、C N C加工を使用して、プラスチック、金属、およびガラスを含むがこれらに限定されない、様々な材料から直接フライス加工することもできる。微細加工法を援用して、特徴サイズがマイクロメートル未満のデバイスを作製することができる。これらは、シリコンの深堀反応性イオンエッティング、シリコンのK O Hエッティング、およびガラスのH Fエッティングを含むがこれらに限定されない。ポリジメチルシロキサンデバイスはまた、機械加工による陰画掘削を使用しても作製することができる。剛性基質に加えて、可撓性基質、伸縮性基質、圧縮可能基質、および形状または寸法を変化させうる他の種類の基質を、S l i p C h i pの特定の実施形態のための材料として使用することができる。特定の実施形態では、これらの特性を使用して、例えば、スリッピングを制御または誘導することができる。

30

【0188】

いくつかの場合には、S l i p C h i pデバイスの基部、プレート、および基質を、同じ材料から作製することができる。代替的に、異なる材料を援用することもできる。例えば、一部の実施形態では、基部およびプレートは、セラミック材料からなりえ、基質は、ポリマー性材料からなりうる。

40

【0189】

一部の実施形態では、S l i p C i pデバイスは、4つの赤色のアライメントマーカーの配置を方向付ける、4つのエッティングされた丸印を含むように改変することができる。一部の実施形態では、デバイスは、試料を保持するための、約10～約10,000個の小型コンテナーを含有しうる。デバイスの2つの面を接合させる前に、チップの片面にコ

50

ンテナーを配置することができる。一部の実施形態では、約1,000～約2,000個のコンテナーを、チップの片面において使用する。一部の実施形態では、各コンテナーの容量は、4～10nLである。一部の実施形態では、2つの片面を操作して、試薬を組み合わせ、反応を開始すると、10～10,000の個別の反応が開始される。一部の実施形態では、600～2,000の個別の反応が開始される。

【0190】

一部の実施形態では、デバイス上に他の特徴を組み入れて、例えば、適正な充填および充填の完了の検出、プレートと基部との間における適正なスリッピングの検出、スリッピング時におけるエラーの検出、失効デバイスまたは不良デバイスの検出、劣化試薬の検出などを含むがこれらに限定されない、適正な操作を確認することができる。

10

【0191】

S1ipChipデバイスは、導電性材料を含有しうる。材料は、電極を形成する任意の形状の、少なくとも1つのエリアまたはパッチへと形成することができる。第1の位置では、少なくとも1つの電極が、プレート上の対面する表面上の少なくとも1つの第1のエリアへと曝露されないが、デバイスの2つの部分である基部およびプレートを、互いにに対して第2の位置へと移動させると、少なくとも1つの電極が、少なくとも1つのエリアに重なり合うように、少なくとも1つの電極を基部上の1つの表面上に配置することができる。少なくとも1つの電極は、外部の回路へと電気的に接続することができる。少なくとも1つの電極は、検出および/または合成のための電気化学反応を実行するのに使用することができる。流体連絡された1もしくは複数のエリア内の物質、または流体連絡されたエリアとダクトとの組合せの中の物質へと曝露された少なくとも2つの電極へと電圧を印加すれば、結果として得られるシステムを使用して、電気泳動による分離および/または電気化学反応および/または輸送を実行することができる。任意選択で、少なくとも1つのダクトおよび/または少なくとも1つのエリアを、少なくとも1つの電極と同じ表面に存在させることができ、第1の位置では、少なくとも1つのダクトおよび少なくとも1つの電極のうちのいずれもが対面する表面上のエリアへと曝露されないが、デバイスの2つの部分である基部およびプレートを、互いにに対して第2の位置へと移動させると、少なくとも1つのダクトおよび/または少なくとも1つのエリアならびに少なくとも1つの電極が、少なくとも1つのエリアに重なり合うように、少なくとも1つのダクトおよび/または少なくとも1つのエリアを配置することができる。

20

【0192】

一部の実施形態では、試料含有デバイス、例えば、S1ipChipのエレメントは、カメラ、例えば、iPhoneによりイメージング可能となるように構成する。例えば、コントラストの大きな材料を使用することができる。例えば、成分は、単一の平面内で目視可能となるように構築することができる。一部の実施形態では、ウインドウまたは透明材料を使用して、所定の配向性からのイメージングを可能とする。デバイスの多様な構成要素をイメージングすることにより、デバイスがさらなる解析に適する状態にあるのかどうかを決定するのに使用しうる画像を、作成することができる。一部の実施形態では、デバイスの構成要素が、試料を解析するための画像の解析に適正な配向性にあるのかどうかを決定するようにコンピュータを構成する。

30

【0193】

本発明の複数の実施形態は、少なくとも1つのダクトおよび/もしくはエリアを通る、少なくとも1つのダクトおよび/もしくはエリアへの、ならびに/または少なくとも1つのダクトおよび/もしくはエリアを横切る物質の移動を要求する。例えば、物質の移動を、イムノアッセイにおける洗浄ステップ、生成物または副生成物の除去、試薬の導入、または希釈に使用することができる。

40

【0194】

物質のローディングは、本明細書で記載される、いくつかの方法により実施することができる。ローディングは、例えば、物質が流出口に達したときの流動抵抗を増大させよう流出口をデザインすることにより、デバイスのダクトおよびエリアを充填するよう

50

実施することができる。この手法は、容量限定試料に貴重であるか、または任意選択で解析物を物質から捕捉しながら、流出口を通して過剰容量を流動させるのに貴重である。解析物は、マイクロスケールシステムを通して流動させうる、本質的に任意の別々の材料でありうる。解析物の捕捉は、デバイスのエリアに、例えば、エリア内に捕獲される捕捉エレメント（磁力を介して、または幾何形状により、またはビーズおよびダクトの相対サイズにより、または膜などによりエリア内に保持される粒子、ビーズ、またはゲル）をプレロードすることにより達成することができ、これにより、これらのビーズまたはゲルを吸収するか、これらに吸着するか、またはこれらと反応するいかなる解析物もまた捕獲される。次いで、これらのエリアは、それらが曝露された物質のうちのある量または成分または解析物を保持するであろう。これはまた、エリア表面の官能化、エリア上の材料の沈着、エリアへの重合化反応（ペプチドまたはDNAの合成など）における単量体の接合などによっても行うことができる。

10

【0195】

捕捉エレメントの他の例は、抗体、アフィニティータンパク質、アプタマー、ビーズ、粒子、および生体細胞を含む。ビーズは、例えば、ポリマービーズ、シリカビーズ、セラミックビーズ、クレービーズ、ガラスビーズ、磁気ビーズ、金属ビーズ、無機ビーズ、および有機ビーズでありうる。ビーズまたは粒子は、本質的に任意の形状、例えば、球形、螺旋形、不規則系、回転橙円形、杆体形態、円錐形態、円盤形態、立方体形、多面体形、またはこれらの組合せを有しうる。捕捉エレメントは、任意選択で、試薬、アフィニティーマトリックス材料など、例えば、核酸合成試薬、ペプチド合成試薬、ポリマー合成試薬、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオ塩基、ヌクレオシド、ペプチド、アミノ酸、単量体、細胞、生体試料、合成分子、またはこれらの組合せへとカップリングする。捕捉エレメントは、任意選択で、プランク粒子、ダミー粒子、較正粒子、試料粒子、試薬粒子、検査粒子、および、例えば、低濃度の試料を捕捉する分子的捕捉粒子として作用することを含む、デバイス内の多くの目的に用いられる。加えて、捕捉エレメントは、粒子保持エレメントをもたらすのにも使用することができる。捕捉エレメントは、選択されたダクトまたは膜（または他のマイクロスケールエレメント）を通って流過するかまたは流過しないようなサイズである。したがって、粒子またはビーズのサイズは、適用に応じて、ある範囲にわたる。

20

【0196】

30

物質は、反応エリアおよびダクトの大半を充填するように導入することができる。充填は、エリアおよびダクトの容量より多量の過剰試料をもたらすように、さらに持続させることができる。エリアおよびダクトの容量を超える容量の物質を導入すれば、捕捉されうる解析物の量を増大させることになろう。物質を導入した後で、洗浄用流体の導入を実施して、捕捉エレメントおよび捕捉エレメントに結合した解析物を洗浄することができる。後続のさらなるスリッピングを実施して、反応および解析物の解析を実行することができる。

【0197】

40

上記で記載した手法は、解析物濃度が小さな試料、例えば、希少核酸または希少タンパク質、遺伝子疾患または感染性疾患のマーカーおよびバイオマーカー、環境汚染物質など（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国出願第10/823,503号を参照されたい）を解析する場合に有益である。別の例は、循環がん細胞または出産前診断法のための、母体血液中の循環胎児細胞など、希少細胞についての解析を含む。この手法は、血液中、痰中、骨髄吸引物中、ならびに尿中および脳脊髄液中など、他の体液中の微生物細胞を捕捉し、さらに解析することによる、感染の迅速で早期の診断法に有益である。ビーズおよび細胞の両方を解析することにより、確率論的閉じ込めから利益を得ることができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、PCT/US08/71374を参照されたい）。

【0198】

50

バーコードとは、光学マシンで読み取り可能なデータまたは情報の表示である。バーコー

ドは、線形バーコードでありうる。線形バーコードのいくつかの非限定的な例は、例えば、Codabar、Code 25、Code 11、Code 39、Code 93、Code 128、Code 128A、Code 128B、Code 128C、CPC Binary、DUN 14、EAN 2、EAN 5、EAN-8、EAN-13、Facing Identification Mark、GS1-128、EAN 128、USC 128、GS1 DataBar、RSS、HIBC、HIBCC、Intelligent Mailバーコード、ITF-14、JAN、潜像バーコード、MSI、Pharmacode、PLANET、Plessey、PostBar、POSTNET、RM4SCC/KIX、Telepen、U.P.C.を含む。

【0199】

10

バーコードは、QR(登録商標)コードなどの二次元バーコードまたはマトリックスでありうる。線形バーコードのいくつかの非限定的な例は、3-DI、ArrayTag、AugTag、Aztec Code、Small Aztec Code、Codablock、Code 1、Code 16k、Code 49、ColorCode、Color Construct Code、Compact Matrix Code、CP Code、CyderCode、dタッチ、DataGlyphs、Data Matrix、Datastrip Code、デジタルペーパー、Dot Code A、EZコード、Grid Matrix Code、HD Barcode、High Capacity Color Barcode、HueCode、INTACTA CODE、InterCode、JAGTAG、Maxicode、mCode、Minicode、MicroPDF417、MMCC、Nintendo e-reader #Dotコード、Optar、PaperDisk、PDF417、PDFMark、QR(登録商標)Code、QuickMark Code、Secure Seal、SmartCode、Snowflake Code、ShotCode、SPARQCode、Stickybits、SuperCode、Trillcode、UltraCode、UnisCode、VeriCode、VSCode、WaterCodeを含む。バーコードは、ホログラフなど、三次元もありうる。

20

【0200】

30

1または複数のバーコードを試料へと接合させることができる。1または複数のバーコードを試料の一部を含有するデバイスへと接合させることもできる。バーコードは、試料のうちの少なくとも一部を保持するコンテナーへと接合させることもできる。バーコードは、対象物の材料内または試料を保持しうるデバイス内に埋め込むことができる。一部の実施形態では、バーコードは、対象物または試料を保持するデバイスの表面上に置くことができる。バーコードは、恒常に固定することもでき、可逆的に接合させることもでき、刻印することもでき、エッチングすることもでき、線描することもでき、印刷することもできる。

【0201】

40

一部の実施形態では、デバイスは、複数の空間的に異なる解析領域を含むことが可能であり、この場合、各解析領域は試料の一部を保持する。これらの実施形態では、マシンで読み取り可能なデータの表示は、例えば、デバイス上の解析領域の形状、色、量、および/または空間的分布でありうる。

【0202】

バーコードは、試料に関するデータまたは情報を含有しうる。試料に関する情報は、試料を得た日付、時間、および/または場所などの情報を含みうる。バーコードは、試料を得た生物に関する情報を含有しうる。一部の実施形態では、試料は、人から得ることができ、バーコードは、人の氏名、人の年齢、人の体重、人の身長、試料回収の時点、試料中の細胞型、試料中の体液の種類、試料の濃度、試料のバッチ数、医療提供者の名称、予測される結果、過去の試料情報および/または他の医療記録に関する情報を含有しうる。

【0203】

50

バーコードは、それを接合させたデバイスの内容物に関する情報、例えば、デバイス上

またはデバイス内の解析領域の数、色、および／または空間的分布を含有しうる。バーコードは、解析領域の内容物に関する情報、例えば、試薬または化学分子種、酵素、色素、溶媒、および／または核酸の種類を含有しうる。バーコードは、試料中の核酸の増幅に関する情報、例えば、反応時間、反応温度、存在する試薬の同定、試薬の量を含有しうる。

【0204】

本明細書で記載される例示的な方法およびシステムは、多様な形態のハードウェア内、ソフトウェア内、ファームウェア内、特殊目的のプロセッサー内、またはこれらの組合せに実装しうることを理解されたい。これらの命令およびプログラムは、実行し、かつ／またはコンピュータで読み取り可能な非一過性媒体上に保存することができる。本明細書の方法は、1または複数のプログラム保存デバイス上で具体化されるアプリケーションプログラムとしてのソフトウェア内に実装することができる。アプリケーションプログラムは、適切なアーキテクチャーを含む任意のマシン、デバイス、またはプラットフォームにより実行することができる。図中に描示されるシステムおよび方法のうちのいくつかは、ソフトウェア内に実装されるため、システム構成要素（または工程ステップ）間の実際の接続は、本発明をプログラムする様式に応じて異なりうることをさらに理解されたい。

10

【0205】

バックグラウンド補正は、ソフトウェアを使用して実施することができる。一部の実施形態では、第1の1または複数の画像の連鎖を撮影して、バックグラウンドの量、例えば、外光または自己蛍光の量を確立する。この1または複数の画像は、試料の画像内のバックグラウンドについて補正するのに使用することができる。一部の実施形態では、第1の1または複数の画像を、試料の1または複数の画像を撮影する前に撮影する。一部の実施形態では、第1の1または複数の画像を、試料の1または複数の画像を撮影するのと同時に撮影する。いくつかの例では、第1の1または複数の画像は、個別の一連の検出器（例えば、波長の異なる検出器）を使用することにより、または個別のフィルターのセットを使用して撮影する。例えば、緑色のチャネルは、赤色のチャネルを使用して試料をイメージングしている場合に、バックグラウンドを検出し、これについて補正するのに使用することができる。

20

【0206】

画像および／または処理された画像および／または結果として得られるデータは、さらなる解析のために、例えば、バックグラウンド補正のために中央コンピュータへと伝送することができる。

30

【0207】

1または複数の形状を使用して形状の検出を実施して、画像の忠実度を決定することができる。例えば、ウェルの形状は、イメージングし、予測される形状と比較することができる。この比較は、イメージングの品質を決定するのに使用することができる。1または複数の形状を使用する形状の検出は、解析される領域を決定するのに使用することができる。例えば、ウェルの境界は、解析前に決定することができる。1または複数のアルゴリズムを使用して形状を検出することにより、イメージングデバイス上の陽性領域を決定する。

40

【0208】

画像の処理および／もしくは解析ならびに／またはデータ解析は、中央コンピュータ上で行うことができる。画像の処理および／もしくは解析ならびに／またはデータ解析は、クラウドコンピュータ上で行うことができる。画像の処理および／もしくは解析ならびに／またはデータ解析は、イメージングを実施する同じデバイス上、例えば、セルフォーン上で行うことができる。

【0209】

一部の実施形態では、画像および／またはデータをローカルで、または遠隔データベース上でアーカイブ化する。アーカイブ化される画像を使用して、例えば、複数の使用者へと分配されたデバイスのバッチまたはロットの品質について点検することができる。一部の実施形態では、試料の供給源に関する情報を含まない品質管理データを評価する、例え

50

ば、いかなる個人同定データも、品質管理のためのデータを解析する前に除去することができる。

【0210】

ポアソン統計解析を適用することにより、蛍光領域および非蛍光領域の数を定量化する。異なる容量のウェルに由来する結果を組み合わせることにより、標準誤差を十分に最小化し、極めて大きなダイナミックレンジにわたる高品質の解析をもたらす。2つの異なる濃度を認識することにより、偽陽性および偽陰性の両方を考慮に入れる。

【0211】

ポアソン統計解析を適用することにより、蛍光領域および非蛍光領域の数に基づき、濃度を定量化する。

10

【0212】

本明細書で記載されるコンピュータの構成要素、ソフトウェアのモジュール、機能、データの保存およびデータの構造は、互いへと直接的または間接的に接続して、それらの操作に必要とされるデータの流れを可能とすることができます。また、モジュールという用語の意味が、ソフトウェアの操作を実施し、例えば、コードのサブルーチンユニットとして実装することもでき、コードのソフトウェア機能ユニットとして実装することもでき、オブジェクト（オブジェクト指向性パラダイム内のオブジェクト）として実装することもでき、アプレットとして実装することもでき、コンピュータスクリプト言語により実装することもでき、別の種類のコンピュータコードとして実装することもできるコードのユニットを含むがこれらに限定されないことも注目される。ソフトウェアの構成要素および/または機能性は、手近の状況に応じて、単一のコンピュータ上に配置することもでき、複数のコンピュータにわたり分布させることもできる。さらに別の態様では、コンピュータで読み取り可能な命令を含む、コンピュータで読み取り可能な媒体も提供され、この場合、コンピュータで読み取り可能な命令により、プロセッサーに、本明細書で記載される方法を実行するように指示する。命令は、ソフトウェアランタイム環境内で作動しうる。さらに別の態様では、ネットワークを使用して伝送しうるデータシグナルも提供することもでき、この場合、データシグナルは、本明細書で記載される方法のステップで計算されるデータを含む。データシグナルは、有線ネットワークまたは無線ネットワークを介して伝送されるパケット化されたデータもさらに含みうる。ある態様では、コンピュータで読み取り可能な媒体は、コンピュータで読み取り可能な命令を含み、この場合、命令は、実行されると、試料から得られるデータに基づき、患者における医学的状態の確率の計算を実行する。コンピュータで読み取り可能な命令は、プロセッサーのソフトウェアランタイム環境内で作動しうる。一部の実施形態では、ソフトウェアランタイム環境は、ソフトウェアパッケージにより要求される、一般に使用される機能および便益をもたらす。ソフトウェアランタイム環境の例は、コンピュータオペレーティングシステム、バーチャルマシン、または分布型オペレーティングシステムを含むがこれらに限定されず、ランタイム環境の他の複数の例も存在する。コンピュータで読み取り可能な命令は、ソフトウェア製品、アプリ、またはソフトウェアパッケージの一部としてパッケージ化し、市販することができる。例えば、命令は、アッセイキットと共にパッケージ化することができる。

20

【0213】

コンピュータで読み取り可能な媒体は、保存ユニットでありうる。コンピュータで読み取り可能な媒体はまた、サーバー、プロセッサー、またはコンピュータによりアクセスされうる、利用可能な任意の媒体でもありうる。コンピュータで読み取り可能な媒体は、コンピュータベースのシステムの一部として組み込むことができ、コンピュータベースで医学的状態を評価するのに援用することができる。

30

【0214】

一部の実施形態では、本明細書で記載される計算は、コンピュータシステム上で実行することができる。コンピュータシステムは、以下：プロセッサー、保存ユニット、ソフトウェア、ファームウェア、ネットワーク通信デバイス、ディスプレイ、データ入力部、およびデータ出力部のうちのいずれかまたは全てを含みうる。コンピュータシステムは、サ

40

50

ーバーでありうる。サーバーは、ネットワークにわたり、複数の入力デバイスおよび／または複数の出力デバイスと通信する中央サーバーでありうる。サーバーは、ハードドライブなど、少なくとも1つの保存ユニット、プロセッサーまたは外部のデバイスによりアクセスされる、情報を保存するための他の任意のデバイスを含むことが可能であり、この場合、保存ユニットは、1または複数のデータベースを含みうる。ある実施形態では、データベースは、数百～数百万の試料に由来するデータに対応する数百～数百万のデータ点を保存しうる。保存ユニットはまた、外部のデータベースから、または使用者による入力に応じて読み取られる履歴データも保存しうる。ある実施形態では、保存ユニットにより、サーバーと通信しているかまたは通信した入力デバイスから受信されたデータを保存する。保存ユニットは、複数のデータベースを含みうる。ある実施形態では、複数のデータベースの各々は、複数の試料の各々に対応する。別の実施形態では、複数のデータベースの各々は、複数の異なるイメージングデバイス、例えば、異なる消費者ベースのセルフォンの各々に対応する。個々のデータベースはまた、複数の可能な試料含有ユニットについての情報も含みうる。さらに、コンピュータシステムは、複数のサーバーも含みうる。プロセッサーは、保存ユニットに由来するデータまたは入力デバイスに由来するデータにアクセスして、データからの出力の計算を実施しうる。プロセッサーは、使用者によりもたらされるかまたはコンピュータシステムもしくはサーバーによりもたらされる、ソフトウェアまたはコンピュータで読み取り可能な命令を実行しうる。プロセッサーは、患者データを入力デバイスから直接受信するための手段、対象データを保存ユニット内に保存する手段、およびデータを処理するための手段を有しうる。プロセッサーはまた、使用者または使用者インターフェースから命令を受信するための手段も含みうる。プロセッサーは、ランダムアクセスメモリなどのメモリを有しうる。一実施形態では、プロセッサーと連絡した出力が提供される。計算を実施した後、プロセッサーは、計算に由来する出力などの出力を、例えば、入力デバイスもしくは保存ユニットへと戻すこともでき、同じコンピュータシステムもしくは異なるコンピュータシステムの別の保存ユニットへともたらすこともでき、または出力デバイスへともたらすこともできる。プロセッサーからの出力は、データディスプレイにより表示することができる。データディスプレイは、ディスプレイスクリーン（例えば、ディジタルデバイス上のモニターまたはスクリーン）、プリントアウト、データシグナル（例えば、パケット）、アラーム（例えば、点滅光または音）、グラフィック使用者インターフェース（例えば、ウェブページ）、または上記のいずれかの組合せでありうる。ある実施形態では、出力を、ネットワーク（例えば、無線ネットワーク）を介して、出力デバイスへと伝送する。使用者は、出力デバイスを使用して、データ処理コンピュータシステムからの出力を受信することができる。使用者は、出力を受信した後で、使用者が医療職員である場合は、医療処置など、一連の措置を決定することもでき、医療処置など、一連の措置を実行することもできる。一部の実施形態では、出力デバイスは、入力デバイスと同じデバイスである。出力デバイスの例は、電話機、無線電話機、モバイルフォン、PDA、フラッシュメモリドライブ、光源、サウンドジェネレーター、コンピュータ、コンピュータモニター、プリンター、およびウェブページを含むがこれらに限定されない。使用者ステーションは、プリンターまたはディスプレイモニターと連絡して、サーバーにより処理される情報を出力することができる。

【0215】

本発明の実施形態では、クライアント・サーバー型のリレーショナルデータベースアーキテクチャーを使用することができる。クライアントサーバー型のアーキテクチャーとは、ネットワーク上の各コンピュータまたはプロセスが、クライアントコンピュータもしくはクライアントプロセスまたはサーバーコンピュータもしくはサーバープロセスである、ネットワーク型のアーキテクチャーである。サーバーコンピュータとは、管理ディスクドライブ（ファイルサーバー）、プリンター（プリントサーバー）、またはネットワークトラフィック（ネットワークサーバー）に専門化させた強力なコンピュータであることが典型的である。クライアントコンピュータは、使用者がアプリケーションを作動させるPC（パーソナルコンピュータ）、セルフォン、またはワークステーションのほか、本明細

10

20

30

40

50

書で開示される出力デバイスの例を含む。クライアントコンピュータは、ファイル、デバイス、およびまた処理力などのリソースについて、サーバーコンピュータに依拠する。本発明の一部の実施形態では、サーバーコンピュータは、データベース機能性の全てに対処する。クライアントコンピュータは、全てのフロントエンドデータ管理に対処し、また、使用者からのデータ入力も受信するソフトウェアを有しうる。

【0216】

対象データは、プロセッサーまたは使用者による認識のための固有の識別子と共に保存することができる。別のステップでは、プロセッサーまたは使用者は、特定の患者データについて、少なくとも1つの基準を選択することにより、保存されるデータの検索を実行しうる。次いで、特定の患者データを回収することができる。コンピュータシステム内のプロセッサーは、入力されたデータを、コンピュータシステムに利用可能なデータベースに由来する履歴データと比較することにより計算を実施しうる。次いで、コンピュータシステムは、計算からの出力をデータベース内に保存することもでき、かつ/または出力を、ネットワークを介して、ウェブページ、文章データ、または電子メールなどの出力デバイスへと通信することもできる。使用者は、コンピュータシステムからの出力を受信した後で、出力に従い、医療措置のコースを施すことができる。例えば、使用者が、内科医であり、出力が、閾値を上回るがんの確率である場合、内科医は、疑われる組織の生検を実施するかまたは命じることができる。一連の使用者は、ウェブブラウザーを使用して、バイオマーカーアッセイに由来するデータを、ウェブページのグラフィック使用者インターフェースへと入力することが可能である。ウェブページとは、フロントエンドサーバーと関連するグラフィック使用者インターフェースであり、この場合、フロントエンドサーバーは、使用者の入力デバイス（例えば、コンピュータ）およびバックエンドサーバーと通信しうる。フロントエンドサーバーは、任意の種類のデータ、例えば、使用者アカウント情報、使用者による入力、および使用者へと出力される報告書を保存することが可能なフロントエンドデータベースを有する保存デバイスを含む場合もあり、これと連絡する場合もある。次いで、各使用者からのデータを、データを操作して、結果を作成することが可能なバックエンドサーバーへと送信することができる。例えば、バックエンドサーバーは、類似のセルフォーンについての補正を計算することもでき、類似の試料回収ユニットから作成されたデータをコンパイルすることもできる。次いで、バックエンドサーバーは、操作または計算の結果を、フロントエンドサーバーへと返信することができ、ここで、結果は、データベース内に保存することもでき、報告書を作成するのに使用することもできる。結果は、フロントエンドサーバーから、出力デバイス（例えば、ウェブブラウザーを伴うコンピュータまたはセルフォーン）へと伝送して、使用者へと送達することができる。異なる使用者は、データを入力することもでき、データを受信することもできる。ある実施形態では、結果は、報告書により送達する。別の実施形態では、結果は、使用者に警告しうる出力デバイスへと直接送達する。

【0217】

アッセイに由来する情報は、定量的であることが可能であり、本発明のコンピュータシステムへと送信することができる。情報はまた、使用者により、またはリーダーシステムもしくはコンピュータシステムにより自動的に定量的な尺度へと変換されうるパターンまたは蛍光の観察など、定性的でもあることも可能である。ある実施形態では、対象はまた、人種、身長、体重、年齢、性別、眼の色、毛髪の色、家族の医療履歴、本人識別、居住地、および使用者に有用でありうる他の任意の情報など、試料アッセイ情報以外の情報も、コンピュータシステムへともたらしうる。

【0218】

一部の実施形態では、デバイスと関連するセンサーにより、さらなる情報がもたらされる。画像センサーを含むデバイスにより、例えば、全地球測位データ、加速度データ、気圧、または湿度レベルを測定することができる。本発明のコンピュータシステムにより、このさらなる情報を使用することができる。

【0219】

10

20

30

40

50

情報は、画像センサーに由来するデータを読み取るかまたはこれをもたらすデバイスにより、コンピュータシステムへと自動的に送信することができる。別の実施形態では、入力デバイスを使用して、使用者（例えば、対象または医療従事者）が、情報を、コンピュータシステムへと入力する。入力デバイスは、パーソナルコンピュータ、モバイルフォン、または他の無線デバイスの場合もあり、ウェブページのグラフィック使用者インターフェースの場合もある。例えば、J A V A（登録商標）でプログラムされたウェブページは、使用者が文章データを追加しうる異なる入力ボックスを含むことが可能であり、この場合、使用者により入力される文章は、次いで、処理のためにコンピュータシステムへと送信される。対象は、様々な様式でデータを入力することもでき、様々なデバイスを使用してデータを入力することもできる。データは、別のコンピュータまたはデータ入力システムからコンピュータへと自動的に得、入力することができる。データをデータベースへと入力する別の方法は、データをデータベースへと直接入力するために、キーボード、タッチスクリーン、トラックボール、またはマウスなどの入力デバイスを使用する方法である。

10

【0220】

ある実施形態では、コンピュータシステムは、保存ユニット、プロセッサー、およびネットワーク通信ユニットを含む。例えば、コンピュータシステムは、パーソナルコンピュータ、ラップトップコンピュータ、または複数のコンピュータでありうる。コンピュータシステムはまた、1または複数のサーバーでもありうる。ソフトウェアまたはファームウェアなど、コンピュータで読み取り可能な命令は、コンピュータシステムの保存ユニット上に保存することができる。保存ユニットはまた、コンピュータシステムにより受信および作成された情報を保存および構成するための少なくとも1つのデータベースも含みうる。ある実施形態では、データベースは、履歴データを含み、この場合、履歴データは、別のデータベースから自動的に追加投入することもでき、使用者が入力することもできる。

20

【0221】

ある実施形態では、コンピュータシステムのプロセッサーは、データベースのうちの少なくとも1つにアクセスすることも可能であり、処理される情報の供給源としての入力デバイスに直接由来する情報を受信することも可能である。プロセッサーは、情報供給源上で計算を実施しうる、例えば、ダイナミックスクリーニング法または確率計算法を実施することができる。計算の後、プロセッサーは、結果をデータベースへと伝送することも可能であり、出力デバイスへと直接伝送することも可能である。結果を受信するためのデータベースは、入力データベースまたは履歴データベースと同じでありうる。出力デバイスは、ネットワークを介して、本発明のコンピュータシステムと通信しうる。出力デバイスは、処理された結果を使用者へと送達することが可能な任意のデバイスでありうる。

30

【0222】

デバイス間または本発明のコンピュータシステム間の通信は、例えば、インターネットを介する方法を含む、ディジタル通信の任意の方法でありうる。ネットワーク通信は、無線の場合もあり、イーサーネットベースの通信の場合もあり、光ファイバー通信の場合もあり、ファイヤーワイヤー、U S B、または通信が可能な他の任意の接続を介する場合もある。ある実施形態では、本発明のシステムまたは方法により伝送される情報は、暗号化することができる。

40

【0223】

システムおよび方法は、1または複数のデータ処理デバイスまたはデータ保存デバイスとの通信のためのネットワーク（例えば、ローカルエリアネットワーク、ワイドエリアネットワーク、インターネット）、光ファイバーメディア、搬送波、無線ネットワークを介して送られるデータシグナルを含みうることがさらに注目される。データシグナルは、デバイスへともたらされるかまたはデバイスからもたらされる、本明細書で開示されるデータのうちのいずれかまたは全てを搬送しうる。

【0224】

加えて、本明細書で記載される方法およびシステムは、デバイス処理サブシステムによ

50

り実行可能なプログラム命令を含むプログラムコードを介して、多くの異なる種類の処理デバイス上で実装することができる。ソフトウェアプログラム命令は、処理システムに本明細書で記載される方法を実施せしめるように作動可能な、ソースコード、オブジェクトコード、マシンコード、または他の任意の保存されるデータを含みうる。しかし、本明細書で記載される方法およびシステムを実行するように構成されたファームウェア、なおまたは適切にデザインされたハードウェアなど、他の実装もまた、使用することができる。

【0225】

コンピュータシステムは、対象から値を得るのに使用される計器とは物理的に別個でありうる。ある実施形態ではまた、グラフィック使用者インターフェースも、コンピュータシステム、例えば、ネットワークと連絡した無線デバイスの一部から遠隔でありうる。別の実施形態では、コンピュータと計器とは、同じデバイスである。

10

【0226】

コンピュータシステムの出力デバイスまたは入力デバイスは、当技術分野で公知のグラフィック使用者インターフェースにおいて日常的に見出される、ボタン、プルダウンメニュー、スクロールバー、文章データを入力するためのフィールドなどのインターフェースエレメントを含むグラフィック使用者インターフェースを含む、1または複数の使用者デバイスを含みうる。使用者インターフェース上で入力される要望は、システム内のアプリケーションプログラム（ウェブアプリケーションなど）へと伝送される。一実施形態では、システム内の使用者デバイスの使用者は、システムのウェブブラウザーおよびウェブサーバーによりもたらされるHTMLインターフェースを使用して、データに直接アクセスすることが可能である。

20

【0227】

グラフィック使用者インターフェースは、オペレーティングシステムまたはサーバーの一部としてのグラフィック使用者インターフェースコードにより作成することができ、データを入力し、かつ／または入力されたデータを表示するのに使用することができる。処理されたデータの結果は、インターフェース内または異なるインターフェース内で表示することもでき、システムと連絡されたプリンター上で印刷することもでき、メモリデバイス内に保存することもでき、かつ／またはネットワークを介して伝送することもできる。使用者インターフェースとは、使用者へと提示されるグラフィック情報、文章データ情報、または聴覚情報を指す場合があり、また、キーストローク、移動、または選択など、プログラムまたはデバイスを制御するために使用される制御配列も指す場合がある。別の例では、使用者インターフェースは、使用者が本発明のシステムと相互作用することを可能とする、タッチスクリーン、モニター、キーボード、マウス、または他の任意のアイテムでありうる。

30

【0228】

さらに別の態様では、使用者が医療措置のコースを施す方法であって、試料解析に基づき医療措置のコースを開始するステップを含む方法も提供される。医療措置のコースは、医療処置を前記の対象へと送達することでありうる。医療処置は、以下：医薬療法、外科療法、臓器切除療法、および放射線療法からなる群から選択することができる。医薬は、例えば、がん療法のための化学療法化合物を含みうる。医療措置のコースは、例えば、医療検査の実施、前記の対象に対する医療的イメージング、医療処置を送達するための特別な時間の設定、生検、および医療従事者による診察を含みうる。医療措置のコースは、例えば、上記で記載した方法の反復を含みうる。方法は、前記の使用者が、前記の試料により、対象の医学的状態を診断することをさらに含みうる。システムまたは方法は、医療処置を送達するかまたは医療措置のコースを開始するステップを伴う。疾患を本発明の方法またはシステムにより評価または診断する場合、医療従事者は、評価または診断を査定し、自身の査定に従い医療処置を送達することができる。医療処置は、疾患または疾患の症状を処置することを意図する任意の方法または生成物でありうる。ある実施形態では、システムまたは方法により、医療措置のコースを開始する。医療措置のコースは、本発明のコンピュータシステムのプロセッサーからの結果を査定する医療従事者が決定するこ

40

50

とが多い。例えば、医療従事者は、医療従事者に、対象が特定の医学的状態を有する確率が97%であることを知らせる出力情報を受信しうる。この確率に基づき、医療従事者は、生検、手術、医療処置、または無措置など、医療措置の最も適切なコースを選択することができる。ある実施形態では、本発明のコンピュータシステムは、医療措置のコースの複数の例をデータベース内に保存することが可能であり、処理された結果は、使用者へと出力される措置のコースの1または複数の例の送達を開始しうる。ある実施形態では、コンピュータシステムは、情報および医療措置のコースの例を出力する。別の実施形態では、コンピュータシステムは、適切な医療措置のコースを開始しうる。例えば、処理された結果に基づき、コンピュータシステムは、医薬を対象へと送達しうるデバイスへと通信しうる。別の例では、コンピュータシステムは、処理の結果に基づき、救急職員または医療従事者に接触しうる。患者に施しうる医療措置のコースは、薬物の自己投与、軟膏の適用、勤務スケジュールの変更、睡眠スケジュールの変更、休息、食餌の変更、包帯の除去、または予約および/または医療従事者への来院のスケジューリングを含む。医療従事者は、例えば、内科医、救急医療職員、薬剤師、精神科医、臨床心理士、カイロプラクター、鍼師、皮膚科医、泌尿器科医、肛門科医、足治療医、がん専門医、婦人科医、神経科医、臨床病理医、小児科医、放射線科医、歯科医、内分泌科医、胃腸科専門医、血液科医、腎臓専門医、眼科医、理学療法医、栄養専門医、または外科医でありうる。

【0229】

画像は、クラウドへとアップロードすることができる。一部の実施形態では、画像は、使用者による相互作用を伴わずに、クラウドへと自動的にアップロードすることができる。クラウドへとアップロードされた画像は、1または複数のローカルコンピュータまたはデバイスへと送信することができる。画像は、複数のコンピュータおよび/またはデバイスの間で同期化することができる。画像のアップロードおよび同期化は、ソフトウェアにより制御することができる。例えば、Nokia 808カメラが作動するSymboliaソフトウェアは、クラウドベースの保存サービスである、Microsoft製のSkydriveへとアクセスし、次いで、アップロードされたファイルを、Skydriveアプリケーションをインストールし、同じアカウントへとログインさせた全てのコンピュータと同時に同期化する。これは、他のプラットフォーム上で達成することができる。例えば、AndroidアーキテクチャーまたはiOSアーキテクチャーを使用して、画像を、クラウドへと、自動的にアップロードし、同期化することができる。既存のソフトウェアソリューションの非限定的例は、box.net、dropbox、skydrive、およびiCloudを含む。モバイルデバイスからコンピュータへの画像の自動式移動のためのクラウドベースのアーキテクチャーを使用することにより、事実上任意の市販のスマートフォンを、現在市販されている多様なオペレーティングシステムおよびハンドセットに対する、ソフトウェアのいかなる微調整もマイナーチェンジも伴わずに、本発明者らの自動式解析ソフトウェアへと直結することができる。セルフォーンから画像を抽出するクラウドベースのサービスを使用することにより、画像および生データの容易なアーカイブ化およびトレーサビリティーが可能となる。

【0230】

一部の実施形態では、画像を、画像センサーを含むデバイス上で維持し、クラウドへと送信したり同期化させたりしない。ソフトウェアは、画像センサーを含むデバイス上で直接的な画像解析を行うように書き込むことができる。オフサイトで処理された画像に対処することにより、電話機からの画像を伝送するためのバンド幅またはさらなるファイルのための空き容量がないセルフォーンのサイズ制限に対応することなく、処理された画像を保存することも可能となる。また、セルフォーン上の部分的または完全な画像処理も直接実施することができる。

【0231】

以下のワークフローを伴う特注のLabviewプログラムにより、画像解析を実施する。画像は、セルフォーン上で撮影されると、Skydriveクラウドを介して、世界中の任意のコンピュータへと自動的に転送される。この間、Labviewプログラムは

10

20

30

40

50

、フィルタリングされた特殊なカテゴリー（すなわち、*.jpg、*.png、*.tif）に当てはまる新たなファイルについて、コンピュータ上の任意のフォルダー「を見張り」、これらのファイルを自動的に解析するように書き込まれる。プログラムは、ソフトウェアの「ウォッチャー」および「アナライザー」が、中断せずに同時に作動しうるよう、マルチスレッドである。新たなファイルが見張られたフォルダー（クラウド同期化を介して）に付加されると、これを、アナライザーが見張る待ち行列へと付加する。待ち行列は、その中で待機する複数のファイルを有しうるので、ソフトウェアが対処しうるより速く画像が撮影されつつある場合も、見張られたフォルダーに、いまだ解析されていない一連のファイルを追加するだけの場合も問題とならない。したがって、解析ソフトウェアはまた、いかなる特殊なプラットフォームへも直結されず、セルフォーンであれ、小型カメラであれ、dsLRであれ、顕微鏡などであれ、任意のデバイスからの画像を解析するように容易に改変することができる。

10

【0232】

アップロードされたファイルは、待ち行列に追加されると、ソフトウェアの解析部分に入力される。次いで、ソフトウェアは、RGB画像を撮影し、それを、色に基づき、3つのチャネルへと分割するであろう。本発明者らの場合、青色はCMOSイメージングセンターに達する前に完全にフィルタリングされるので、青色チャネルは使用しない。デバイスは、それらの各々が、それらの寸法に合わせて切断されてそれらに貼り付けられた赤色テープの小片を有する、直径4mmの4つの丸印を伴ってエッティングされた。テープは、緑色である蛍光イメージングに干渉しないように、赤色とする。次いで、これらの4つの丸印を使用して、赤色のチャネル内のあるサイズの4つの異なる丸印を検索することにより、完全な画像が撮影されたのかどうかを決定する。次いで、その前に、画像を回転させることにより、2つのドットの間の直線が、画像軸と平行になるまで、画像内のいかなる傾斜も補正したら、ソフトウェアが理解しうる様式で丸印を並べ替える。この補正の後、次いで、ウェルを含有するチップの部分を、ドットからの距離に基づき決定する。

20

【0233】

本発明者らは、カルセインを蛍光化合物として使用しているので、蛍光シグナルは、緑色のチャネルに現れ、赤色のチャネルは、散乱光パターンを含有する。したがって、本発明者らは、緑色のチャネルから赤色のチャネルを差し引きすることによる標準化を使用して、陽性ウェルのバックグラウンド補正された画像を得ることができる。次いで、画像を、3つの異なる様式でフィルタリングして、陽性ウェルの強度を増大させてから、閾値化する、すなわち、平均化フィルターをかけて、任意の過剰露出されたピクセルを曖昧化し、細部強調フィルターをかけて、陽性ウェルをより明確とし、次いで、メジアンフィルターをかけて、陰性ウェルの強度を低下させてから、閾値化する。次いで、閾値化を実施して、陰性ウェルの大半を画像から除去した後、小さな不具合を除去するアルゴリズムにかける。次いで、ルックアップテーブルを使用して、画像をバイナリー画像から変換し戻してから、どれが陽性であるのかを決定するウェルを含有することが既に決定されている画像の部分に残った特徴に対するパターンマッチを行った。

30

【0234】

陽性ウェルの数を決定したら、チップ内の試料の元の濃度を決定するように、ポアソン統計および問題のチップについての既往の知見を使用してこの数を処理する。次いで、この情報を、電子メールを介して、任意の妥当な電子メールアカウントへと自動的に送信し、次いで、彼らが、画像解析を実施するコンピュータに対して世界のどこにいるのかに関わらず、画像を撮影した元の人に受信させる。実際の時間は、セルフォーンによるネットワーク上のアップロード速度およびコンピュータによるネットワーク上のダウンロード速度の下に置かれるが、画像の撮影と電子メールによる確認の受信との間の経過時間は、1分間を十分に下回っている。4つのスポット全てを見出すことが可能でないエラーなどのエラーが解析のコースにおいて検出される場合、使用者には、別の画像を撮影しなければならないことを迅速に警告する必要があるため、これは、重要である。ソフトウェアは、このようなことを行うようにプログラムされており、使用者は、1分間未満のうちに別の

40

50

画像を撮影するように知らされることが典型的である。電子メールにより通知する可能性により、文章データを介して通知する可能性がもたらされうる。セルフオーンプロバイダーは、文章データとして電子メールの本体を具体的な使用者へと送信するサービスを施しうる。他のサーバーは、S M S メッセンジャーとして活用されうる。解析工程では、コンピュータによる自動化を使用して、使用者に、画像を使用しうるのかどうかを通知することが可能である。通知は、例えば、S M S メッセージ、電子メールメッセージ、電話による通話、ウェブサイトへの投稿、または電子メッセージでありうる。一部の実施形態では、画像のアップロードから、使用者が通知されるまでの時間の長さを、解析工程と称することができる。解析工程は、例えば、5分間、4分間、3分間、2分間、1分間、50秒間、45秒間、40秒間、30秒間、20秒間、10秒間、9秒間、8秒間、7秒間、6秒間、5秒間、4秒間、3秒間、2秒間、1秒間、0.5秒間、0.4秒間、0.3秒間、0.2秒間、または0.1秒間未満かかりうる。一部の実施形態では、解析工程は、1分間未満かかる。

10

【0235】

較正発光をもたらすための少なくとも1つの較正光源と、較正発光を感知するための少なくとも1つの較正発光ダイオードとが提供されるが、この場合、制御回路は、較正発光ダイオードの出力を、検出発光ダイオードの出力の各々から差し引くための差動回路を有する。

20

【0236】

通信インターフェースは、アウターケーシングが、U S B ドライブとして構成されるように、ユニバーサルシリアルバス（U S B ）接続とすることができます。

30

【0237】

いくつかの場合には、情報を、イメージングのために使用されたモバイルデバイスへと返送する。例えば、画像を得、解析のために別個のコンピュータへと送信することができる。次いで、画像または画像に関する日付を、モバイルデバイスへと返送することができる。一部の実施形態では、使用者の画像および／または処理された画像および／または結果として得られるデータを、別個のデバイスへと伝送し、例えば、内科医のモバイルデバイスにより、情報を受信しうる。いくつかの場合には、2つ以上の情報のセットを、2つ以上のデバイスへと伝送する。2つ以上の情報のセットは、同じ情報でありうるか、または一部の実施形態では、個別のデータを各使用者へと送信する。例えば、患者が、画像に関するなんらかの情報を受信しうる一方で、患者の医師は、内科医の解析により適する情報を受信する。

30

【0238】

画像についての解析を「クラウド」へとオフロードすることにより、生データのトレーサビリティーおよびアーカイブ化、グローバルアクセス、ならびに事実上全てのスマートフォンオペレーティングシステムとの適合性を含むいくつかの利益がもたらされるが、これは、十分に大きなバンド幅の無線データ接続を要求するので、いくつかの状況では、直接的な電話機上の解析が好ましい場合もある。

40

【0239】

一部の実施形態では、化学加熱器を使用して試料を加熱する。例えば、化学加熱器は、イメージング前に、またはイメージング時に、試料含有デバイス（例えば、S l i p C h i p ）を加熱しうる。化学加熱器は、発熱反応を使用して機能しうる。発熱反応とは、熱を発生させる反応、例えば、M g + 2 H 2 O → M g (O H) 2 + H 2 + 熱、C a O (固体) + H 2 O (液体) → C a (O H) 2 (固体) 、またはC a O (固体) + H 2 O (液体) → C a (O H) 2 (固体) である。反応は、マグネシウム粒子（例えば、米国特許第4,017,414号および同第4,264,362号を参照されたい）と混合された金属鉄粒子および食塩（N a C l ）を含みうる。一部の実施形態では、化学加熱器は、イメージングすることが可能であり、加熱が適切に生じたのかどうかについての表示を示しうる。

【0240】

キットは、S l i p C h i p デバイスと、核酸增幅に関与するように選択された試薬の

50

供給とを含みうる。一部の実施形態では、試薬は、第1の成分の導管、第2の成分の導管、またはこれらの両方と係合するように適合させたコンテナー内に配置することができる。このようなコンテナーは、ピペット、シリンジなどでありうる。一部の実施形態では、キットは、加熱器を含む。

【0241】

一部の実施形態では、デバイスおよび／またはキットはまた、第1の成分および第2の成分へと熱を供給するかまたは第1の成分および第2の成分から熱を除去することができるデバイスも含みうる。このようなデバイスは、加熱器、冷却デバイス、近赤外光ランプまたは可視光ランプなどを含む。一部の実施形態では、キットはまた、第1のウェル集団、第2のウェル集団、またはこれらの両方のうちの少なくともいくつかについての画像を収集することができるデバイスも含みうる。一部の実施形態では、デバイスは、モバイル通信デバイスまたはタブレットを含む。一部の実施形態では、キットは、デバイスが画像を収集する一助となる付属品を含みうる。一部の実施形態では、キットは、モバイルデバイスまたはタブレットを介する解析のためのソフトウェアへのアクセスを可能とするコードを含みうる。一部の実施形態では、キットは、S1i p C h i p、増幅反応のための試薬、および試料を加工するための指示書を含む。一部の実施形態では、キットは、S1i p C h i p、増幅反応のための試薬、試料のイメージングを実行するソフトウェア、および試料を加工するための指示書を含む。

10

【0242】

デバイスの一部の実施形態では、同種タンパク質検出アッセイを使用して、特定の緩衝液中の粗細胞溶解物中または精製タンパク質中の特異的タンパク質を検出する。これらのアッセイでは、抗体またはアプタマーを使用して、標的タンパク質を捕捉することができる。

20

【0243】

1つの種類のアッセイでは、特定のタンパク質に結合するアプタマーを、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）反応または電気化学発光共鳴エネルギー移動（ERET）反応のドナーおよびアクセプターとして機能しうる、2つの異なるフルオロフォアまたはルミノフォアで標識する。ドナーおよびアクセプターのいずれも同じアプタマーへと連結すると、標的タンパク質へと結合したときのコンフォメーション変化により、隔たりが変化する。例えば、標的の非存在下におけるアプタマーは、ドナーとアクセプターとが近接するコンフォメーションを形成するが、標的へと結合すると、新たなコンフォメーションの結果として、ドナーとアクセプターとの間に大きな隔たりがもたらされる。アクセプターが消光剤であり、ドナーがルミノフォアである場合、標的への結合の効果は、250または862における発光の増大である。

30

【0244】

第2の種類のアッセイでは、標的タンパク質の異なる非重複エピトープまたは異なる非重複領域に独立に結合するはずの2つの抗体または2つのアプタマーを使用する。これらの抗体またはアプタマーを、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）反応または電気化学発光共鳴エネルギー移動（ERET）反応のドナーおよびアクセプターとして機能しうる、異なるフルオロフォアまたはルミノフォアで標識する。フルオロフォアまたはルミノフォアは、長鎖の可撓性リンカーを介して抗体またはアプタマーへと接合させた、短鎖の相補的オリゴヌクレオチド対の一部を形成する。抗体またはアプタマーが標的タンパク質に結合したら、相補的オリゴヌクレオチドは、互いを見出し、互いとハイブリダイズする。これにより、ドナーとアクセプターとが互いに近接する結果として、標的タンパク質を検出するためのシグナルとして使用される効率的なFRETまたはERETが得られる。

40

【0245】

2つの抗体またはアプタマーへと接合させたオリゴヌクレオチドが、それらのタンパク質への結合の非存在下において互いとハイブリダイズする結果としてのバックグラウンドシグナルは見られないか、または極めて小さいことを確認するには、二重鎖についての解離定数（ k_d ）が比較的大きく（約5 μM）なるように、相補的オリゴヌクレオチドの長

50

さおよび配列を注意深く選択することが必要である。したがって、これらのオリゴヌクレオチドで標識された遊離抗体またはアプタマーを、それらの k_d を大きく下回るナノモル濃度で混合する場合、二重鎖が形成され、FRETシグナルまたはERETシグナルが発生する可能性は、無視できる程度である。しかし、両方の抗体または両方のアプタマーが標的タンパク質に結合すると、オリゴヌクレオチドの局所濃度は、それらの k_d よりはるかに大きくなる結果として、ほぼ完全なハイブリダイゼーションおよび検出可能なFRETシグナルまたはERETシグナルの発生がもたらされる。

【0246】

粗細胞溶解物は、混濁し、自己蛍光発光する物質を含有しうることが多い。このような場合には、蛍光発光または電気化学発光が長時間にわたり持続する分子および最大のFRETまたはERETをもたらすように最適化されたドナー-アクセプター対の使用が所望される。このような1つの対は、ユーロピウムによるキレート剤およびCycl 5による対であり、これは既に、干渉するバックグラウンド蛍光、電気化学発光、または散乱光が減衰した後において、シグナルの読み取りを可能とすることにより、このような系におけるシグナル対バックグラウンド比を、他のドナー-アクセプター対と比較した場合に著明に改善することが示されている。また、ユーロピウムによるキレート剤およびAlexa Fluorまたはテルビウムキレート剤およびフルオレセインによるFRET対またはERET対も良好に働く。この手法の感度および特異度は、酵素免疫測定アッセイ(ELISA)の感度および特異度と同様であるが、試料操作は要求されない。

【0247】

デバイスの一部の実施形態では、異種タンパク質検出アッセイを使用して、特定の緩衝液中の粗細胞溶解物中または精製タンパク質中の特異的タンパク質を検出する。これらのアッセイでは、抗体またはアプタマーを使用して、標的タンパク質を捕捉することができる。抗体のうちの1つまたはアプタマーのうちの1つを、ウェルの底部または磁気ビーズへと接合させ、タンパク質溶解物を、溶解時に、または化学溶解セクション内において、他の抗体またはアプタマーと組み合わせて、第1の抗体またはアプタマーへの結合を容易としてから、ウェルに入れる。プロテオームアッセイチャンバー内で要求されるコンジュゲーションイベントまたはハイブリダイゼーションイベントが1つだけであるので、これにより、その後、検出可能なシグナルが発生する速度が増大する。リードアウトのためのシグナルを発生させるために、1または複数の酵素分子、フルオロフォア、オリゴ、またはナノ粒子を、第2の抗体またはアプタマーへと接合させる。次いで、シグナルを発生させ、これを、例えば、蛍光、化学発光、光を散乱させる可能性などとして視覚化することができる(Rissin, David M.ら、「Simultaneous detection of single molecules and singulated ensembles of molecules enables immunoassays with broad dynamic range」、Analytical chemistry、83巻6号(2011年)、2279~2285頁; Walt, David R.、「Optical Methods for Single Molecule Detection and Analysis」、Analytical chemistry、85巻3号(2012年)、1258~1263頁; Shon, Min JuおよびAdam E. Cohen、「Mass Action at the Single-Molecule Level」、Journal of the American Chemical Society、134巻35号(2012年)、14618~14623頁; Kan, Cheuk W.ら、「Isolation and detection of single molecules on paramagnetic beads using sequential fluid flows in microfabricated polymer array assemblies」、Lab on a Chip、12巻5号(2012年)、977~985頁; Zhang, Huaibinら、「Oil-sealed femtoliter fiber-optic arrays for single molecule analysis」、Lab on a chip、12巻12号(2012年)、2229~2239頁)。

【0248】

デバイスの一部の実施形態を、例えば、核酸標識を使用して、タンパク質、細菌、ウイルス、感染作用物質など、異なる生物学的標的を検出するのに使用しうるであろう。一部の実施形態では、標的を、検出に使用しうるオリゴヌクレオチドでタグ付けする。オリゴヌクレオチドタグは、例えば、PCR、LAMP、RPA、NASBA、RCAなど、い

10

20

30

40

50

くつかの異なる核酸増幅戦略のうちのいずれか1つを使用してさらに増幅することができる。オリゴヌクレオチドタグはまた、例えば、Chen (Huang, SuxianおよびYong Chen、

【0249】

「Polymeric Sequence Probe for Single DNA Detection」、Analytical chemistry、83巻19号(2011年)、7250~7254頁)により示される通り、蛍光プローブを使用して視覚化することもできるであろう。

【0250】

現在のところ、定量的解析測定の大半は、反応速度フォーマットにおいて実施され、反応速度自体または反応速度の測定値に影響を及ぼす摂動に対して頑健でないことが公知である。本発明者らは、「デジタル」(単一分子)フォーマットで実施した同じ測定が、このような摂動に対する頑健性の増大を示すことを裏付けた(図1)。

【0251】

一部の実施形態では、本発明者は、HIV-1 RNAを標的分子として選択し、等温デジタル逆転写ループ媒介増幅(dRT-LAMP)を、増幅化学反応として選択した。LAMP増幅化学反応は、3つの理由:i)定性的リードアウトで実施すると、少なくとも1つの例では、いくつかの摂動を許容することが公知であるので、定量的リードアウトによる頑健性の問題は、有意味な問題であること;i) LAMPは、自己触媒性の指數関数的増幅化学反応であるが、その開始相または増殖相がより大きな摂動の影響を受けるのかどうか、したがって、デジタルフォーマットまたは反応速度フォーマットがより大きな摂動の影響を受けるのかどうかは明らかとならなかった程度に、その機構は十分に複合的であること;i)デジタルLAMPは近年、多様なマイクロ流体プラットフォーム上で裏付けられていることにより選択した。単純な閉じ込めおよび単一分子の増幅に十分に適し、単一分子上でマルチステップ反応を実施するのに好都合であり、dRT-LAMPにより妥当性が確認されているため、本発明者らは、マイクロ流体S1ipChipデバイス_ENREF_41を使用した。使用される特異的な配列のために、1ステップRT-LAMPより効率的でありうるため、2ステップRT-LAMPプロトコールを使用した。また、RT-LAMPは、熱サイクリング装置を要求せず、電気を要求しない化学加熱器を使用して実行しうるため、限られた資源の設定の下で魅力的な増幅化学反応もある。さらに、RT-LAMPは、高度に蛍光発光性のカルセインベースのリードアウト化学反応にも適合性である。

【0252】

一部の実施形態では、本発明は、デジタル式単一分子操作を支援する任意のマイクロ流体プラットフォームを使用して実施することができる。一部の実施形態では、本発明は、生体系、例えば、温度変動に対する体内時計の頑健性の研究へと適用することができる。一部の実施形態では、本発明は、極めて迅速であり、特異的であり、明るい陽性シグナルおよび薄暗い陰性シグナルをもたらし、実験における摂動に対して頑健であるため、限られた資源の設定の下における定量的測定に使用することができる。

【実施例】

【0253】

これらの実施例は、例示的な目的のためだけに提示されるものであり、本明細書で提示される特許請求の範囲を限定するために提示されるものではない。

【0254】

(実施例1)

S1ipChipの形成

ソーダ石灰ガラスを使用して、所望されるガラス製S1ipChipを作製する手順は、既往の研究に基づいた。2ステップの曝露-エッチングプロトコールを、2つの異なる深さのウェル(熱増殖ウェルでは5μm、他の全てのウェルでは55μm)を創出するように適合させた。エッチングの後、ガラスプレートを、ピラニア酸および脱塩水でよく清浄化し、窒素ガスで乾燥させた。次いで、ガラスプレートをプラズマ清浄器内で10分間

10

20

30

40

50

にわたり酸化処理し、1時間にわたるシラン化のために乾燥機へと速やかに移した。ガラスプレートを、クロロホルム、アセトン、およびエタノールでよくすすぎ、窒素ガスで乾燥させてから使用した。

【0255】

プラスチックポリカーボネート製のSlipChipデバイスを、microfluidic Chip Shop GmbHから受領した後、プラズマ清浄器内で、15分間にわたり直接酸化処理し、次いで、90分間にわたるシラン化のために、乾燥機へと移した。SlipChipデバイスを、テトラデカン中に、65で15分間にわたり浸漬し、次いで、エタノールでよくすすぎ、次いで、窒素ガスで乾燥させてから使用した。プラスチック製のSlipChipデバイスは、再使用しなかった。

10

【0256】

SlipChipは、脱気油（鉱物油：テトラデカンを1:4(v/v)とする；Fisher Scientific）下でアセンブルした。上側プレートおよび下側プレートの両方を、油相へと浸漬し、対面させた。2枚のプレートを、示される通りに、立体鏡（Leica, Germany）下で位置合わせし、大型クリップを使用して固定した。流体注入口として用いられるように、上側プレートに2つの貫通孔をドリル加工した。試薬溶液を、注入口を介して、ピペティングによりロードした。

【0257】

（実施例2）

SlipChip内の單一分子增幅

20

HIV-1ウイルス負荷を定量化するために、デジタル逆転写ループ媒介等温增幅(dRT-LAMP)反応を使用した。LAMPは、カルセイン中のマンガンのマグネシウムによる置きかえを介して、明るい蛍光シグナルを発生させる。

【0258】

デジタルLAMP実験は、既に記載されている。p24遺伝子をターゲティングするプライマーを使用した。ウイルス負荷の定量化は、抗レトロウイルス療法(ART)の有効性をモニタリングするのに必要である。HIVウイルスは、ウイルスRNAをcDNAへと転換するそのエラープローン逆転写酵素に起因して、薬物療法の圧力下で急速に突然変異する。これらの複数の突然変異は、突発的な薬物耐性株の出現を可能とするが、これは、別のARTへとスイッチすることにより制御しうるであろう。

30

【0259】

デジタルLAMP実験のステップは、エッティングされたウェルを伴う2枚のガラスプレートからなるSlipChipデバイスへの試料のローディングを含み、炭化水素油の層で潤滑化されたチャネルにより、試薬のローディング、コンパートメント化、インキュベーション、および混合を可能とした。第1のスリッピングでは、ローディングの後で、鋳型、プライマーのうちの1つ、およびRT酵素を含有する溶液を、ウェルへとコンパートメント化した（確率論的に閉じ込めた）。この確率論的閉じ込めは、各ウェル内の活性RNAの濃度を効果的に増大させ、反応を各ウェル内で極めて効率的とすることを可能とする。cDNAは、逆転写ステップにおいて、各コンパートメント内のRNAから合成した。短いインキュベーションの後、第2のスリッピングにより、残余のプライマーを伴うLAMP試薬からなる第2の溶液をロードすることを可能とした。最後に、第3のスリッピングによりLAMP反応を開始し、デバイス全体を、63で1時間にわたりインキュベートした。

40

【0260】

40ウェルSlipChipのデザインについて述べると、ローディングのために使用された溶液中の各プライマーの濃度は、0.15μMであった。プライマー溶液に、内径50μmのより細型のPTFEチューブ(Zeus Industrial Products Inc.、Raritan、NJ)を末端とする、内径200μmのTeflonチューブ(Weico Wire & Cable Inc.、Edgewood、NY)内を流動させた。溶液は、テトラデカンを充填した50μLのHamiltonガラ

50

スシリンジで駆動した。Harvardシリンジポンプにより制御された容量0.1 μLのプライマー溶液を、各丸型ウェルに入れた。反応のために、100 pg/μLの濃度の鑄型溶液を含有するPCRミックスを、チャネルへと注入した。

【0261】

40ウェルSlipChipのデザイン(図3)について述べると、プライマー1は、*E. coli*のnlp遺伝子(F:ATA ATC CTC GTC ATT TGC AG; R:GACTTC GGGTGA TTG ATA AG)であり；プライマー2は、*Pseudomonas aeruginosa*のvic遺伝子(F:TTC CCC T CGC AGA GAA AAC ATC; R:CCT GGT TGA TCA GGT CGA TCT)であり；プライマー3は、*Candida albicans*のcalb(F:TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A; R:ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG)であり；プライマー4は、*Pseudogeneral 16S*(F:GAC GGG TGA GTA ATG CCT A; R:CAC TGG TGT TCC TTC CTA TA)であり；プライマー5は、*Staphylococcus aureus*のnuc遺伝子(F:GCGA TTGATGGTGATACGGTT; R:AGCCAAGCCTTGA CGAAC TA AGC)であった。プライマーは、Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)から注文した。

【0262】

初期の95で5分間にわたるステップを使用して、反応のために酵素を活性化させた。次に、合計38サイクルにわたる増幅を、以下の通りに実施した：95で1分間にわたるDNA変性ステップ、55で30秒間にわたるプライマーアニーリングステップ、および72で45秒間にわたるDNA伸長ステップ。最終サイクルの後、DNA伸長ステップを、72で5分間にわたり実施した。次いで、SlipChipを、4でサイクラー内に保持してからイメージングを行った。

【0263】

(実施例3)

セルフォーンカメラによるSlipChipのイメージング

インキュベーション後、実施例2によるデバイスを、小型ウィンドウを伴う靴箱内に置いて、暗室を模倣し、Nokia 808セルフォーンによりイメージングした。

【0264】

Nokia Pureview 808セルフォーンを使用して、増幅産物を含有するマイクロウェルをイメージングおよびカウントした。このセルフォーンは、100~450マイクロ秒のパルス幅(PW)で100,000ルクス超を発生させるキセノンフラッシュを伴うCMOSセンサーを特色とする。Nokia 808 PureViewの1/1.4インチの大型CMOSセンサーは、41MPの分解能を有し、最大出力を38MPとし(アスペクト比を4:3とし)、ピクセルサイズを1.4 μmとする。カメラは、Carl Zeiss F2.4の8.02mmのレンズを有する。PureViewモードで捕捉される画像は、センサーの最大分解能によるオーバーサンプリングを介して創出する。ピクセルオーバーサンプリングでは、多くのピクセルをピニングして、はるかに大量の有効ピクセルを創出し、これにより、ピクセルの総感度を増大させる。

【0265】

カメラの焦点距離は、クローズアップモードで15cmであるので、セルフォーンの対物レンズを使用して、カメラをイメージングされるデバイスへと近接させた。カメラフラッシュにより蛍光を励起するために、2つのさらなるダイクロイックフィルター1F1B(Thorlabs、Newton、NJ)を、セルフォーンフラッシュの前に取り付けた。これらのフィルターは、390~480nmに対して>85%の透過率であり、540~750nmに対して<1%の透過率であり、カットオフは、505 ± 15nmである。蛍光を検出するには、Newport(Franklin、MA)製の2つの緑色ロングパス5CGA-530フィルターを、対物レンズへと付加した。これらのフィルターは

10

20

30

40

50

、>50Dの優れたブロッキングを示し、かつ、530nmを超える波長では、>90%の高透過率を示した。2つの励起フィルター(FD1B)を積み重ね、カメラフラッシュの前に接合させた。蛍光を検出するために、2つの5CGA-530ロングパスフィルターを、磁気マウントレンズへと挿入した。

【0266】

反射性の大きなガラス製デバイスは、セルフォーンレンズ-デバイス軸に対して約10度傾けて、対象への直接的な照り返しを防止し、傾斜により、直接的な反射光を側方へと進ませた。加えて、黒色スクリーンをデバイスの側方に付加して、フラッシュからの散乱光による、CMOSセンサーの過飽和も遮断した。このような幾何形状が、上記で記載したカラーフィルターと組み合わされて、50に近いS/N比に達することが可能となった。

10

【0267】

(実施例4)

クラウドへと送信され、他のデバイスと同期化された画像

実施例3で捕捉された画像はまず、セルフォーン上に保存した。Nokia 808カメラが作動するSymbianソフトウェアは、クラウドベースの保存サービスである、Microsoft製のSkydriveへとアクセスした。このクラウドベースのサービスにより、使用者相互作用を伴わずに、電話機で撮影された全ての画像を、サービスへと自動的にアップロードする選択肢がもたらされた。この選択肢を選択し、各画像を、クラウドベースの保存サービスであるSkydriveへと自動的にアップロードし、Skydriveアプリケーションをインストールし、同じアカウントへとログインさせた全てのコンピュータと同時に同期化させた。

20

【0268】

(実施例5)

個別のデバイス上の画像の処理

個別のコンピュータは、実施例4で使用されたSkydriveアカウントからファイルを受信するための適正なログインパスワードを伴うフォルダーを有するように構成した。この構成により、実施例3のデバイスにより捕捉される新たな画像の各々を、このコンピュータへと自動的に転送した。加えて、コンピュータを、Labviewで書き込まれたソフトウェアプログラムにより構成して、フォルダー内の新たなファイルを検出し、任意のフィルタリングされた特殊なカテゴリー(すなわち、*.jpg、*.png、*.tif)に当たはまる新たなファイルを自動的に解析した。プログラムは、Skydrive Folder内の画像を検出および解析するように構成した。プログラムは、ファイルの検出およびファイルについての解析が中断せずに同時に作動しうるように、マルチスレッドである。新たなファイルが見張られたフォルダー(クラウド同期化を介して)に付加されると、これを、アナライザーが見張る待ち行列へと付加する。待ち行列は、その内で待機する複数のファイルを有することが可能であったので、ソフトウェアが対処しうるより速く画像が撮影されつつある場合も、見張られたフォルダーに、いまだ解析されていない一連のファイルを追加するだけの場合も機能し続ける。したがって、解析ソフトウェアはまた、いかなる特殊なプラットフォームへも直結されなかったので、セルフォーンであれ、小型カメラであれ、dsLRであれ、顕微鏡などであれ、任意のデバイスからの画像を解析するように容易に改変することができる。実施例3による画像ファイルは、このソフトウェアを作動させるコンピュータと同期化させ、待ち行列に入力した。アップロードされたファイルは、待ち行列に追加された後で、ソフトウェアの解析部分に入力された。ソフトウェアは、画像を採取し、これを、各個別の色に応じて、3つの単色の8ビット画像へと分割した。赤色チャネルの画像を使用して、デバイス上のマーカー(この場合は、テープによる4つの赤色の丸印)を検索することにより、チップの全体をイメージングしたか否かを決定した。全ての丸印が見出された場合は、デバイスが画像ボックスの上部と平行となるように画像を回転させ、任意の回転バイアスを除去した。次いで、赤色チャネルの単色の画像を、緑色チャネルの単色の画像から差し引いて、バックグラウンド

30

40

50

補正された画像を作成したが、これは、蛍光情報を含有した。次いで、画像を、フィルタリング工程にかけて、陽性ウェルの強度を増大させた。フィルタリング工程は、以下のステップを、以下の順序：i) 3 × 3 「局所平均」フィルター、ii) 2 × 2 「メジアン」フィルター、iii) 11 × 11 「細部強調」フィルター、およびiv) 5 × 5 「メジアン」フィルターで含んだ。次いで、フィルタリングされた画像を、エントロピーアルゴリズムを使用して閾値化した。閾値化の後、画像の一部（マーカーの位置により規定される）を解析し、全ての個々のスポットを、サイズフィルタリングアルゴリズムにかけた。これにより、最終的な総カウント数がもたらされ、次いで、これを、濃度へと、統計学的に変換してから、使用者または適正な管理者へと電子メール送信した。実施例4のS1ipChippデバイスは、それらの各々が、それらの寸法に合わせて切断されてそれらに貼り付けられた赤色テープの小片を有する、直径4mmの4つの丸印を伴ってエッチングされた。テープは、緑色である蛍光イメージングに干渉しないように、赤色とした。次いで、これらの4つの丸印を使用して、赤色のチャネル内のあるサイズの4つの異なる丸印を検索することにより、完全な画像が撮影されたのかどうかを決定した。次いで、その前に、画像を回転させることにより、2つのドットの間の直線が、画像軸と平行になるまで、画像内のいかなる傾斜も補正したら、ソフトウェアが理解しうる様式で丸印を並べ替えた。この補正の後、次いで、ウェルを含有するチップの部分を、ドットからの距離に基づき決定した。

10

【0269】

試料反応内のカルセインに由来する蛍光シグナルは、緑色のチャネルで発せられ、赤色のチャネルは、散乱光パターンを含有する。したがって、本発明者らは、緑色のチャネルから赤色のチャネルを差し引きすることによる標準化を使用して、陽性ウェルのバックグラウンド補正された画像を得た。次いで、画像を、3つの異なる様式でフィルタリングして、陽性ウェルの強度を増大させてから、閾値化した、すなわち、平均化フィルターをかけて、任意の過剰露出されたピクセルを曖昧化し、細部強調フィルターをかけて、陽性ウェルをより明確とし、次いで、メジアンフィルターをかけて、陰性ウェルの強度を降下させてから、閾値化した。次いで、閾値化を実施して、陰性ウェルの大半を画像から除去した後、小さな不具合を除去するアルゴリズムにかけた。

20

【0270】

(実施例6)

30

処理された画像からの結論記載の決定

次いで、ルックアップテーブルを使用して、実施例5で処理された画像をバイナリー画像から変換し戻してから、どれが陽性であるのかを決定するウェルを含有することが既に決定されている画像の部分に残った特徴に対するパターンマッチを行った。陽性ウェルの数を決定したら、チップ内の試料の元の濃度を決定するように、ポアソン統計およびチップについての知見を使用してこの数を処理した。

【0271】

(実施例7)

エラー警告工程

次いで、この情報を、電子メールを介して、任意の妥当な電子メールアカウントへと自動的に送信し、次いで、彼らが、画像解析を実施するコンピュータに対して世界のどこにいるのかに関わらず、画像を撮影した元の人に受信させた。実際の時間は、セルフォンによるネットワーク上のアップロード速度およびコンピュータによるネットワーク上のダウンロード速度の下に置かれたが、画像の撮影と電子メールによる確認の受信との間の経過時間は、1分間を十分に下回っていた。4つのスポット全てを見出すことが可能でないエラーなどのエラーが解析のコースにおいて検出された場合、使用者には、別の画像を撮影しなければならないことを迅速に警告する必要があるため、これは、重要であった。ソフトウェアは、このようなことを行うようにプログラムされてあって、使用者は、1分間未満のうちに別の画像を撮影するように知らされることが典型的である。文章データ、SMSメッセージ、および電子メールを、使用者に、エラーが検出されたのかどうかを

40

50

迅速に警告する手段として使用した。

【0272】

(実施例8)

画像処理の一般的なワークフロー

画像を処理するためのワークフローは、以下のステップで進める。セルフォーンにより生画像を得る。ステップ1では、4つの明色マーカーの位置に基づき、ソフトウェアは、解析される正しい領域を認識する。ステップ2では、赤色チャネルの緑色チャネルからの差し引きを行う。ステップ3～5では、フィルタリングアルゴリズムを実行し、画像を処理した後で画像を作成する。ステップ6では、「陽性」カウンティングを行う。ステップ7では、カウントされた「陽性」により最終画像を作成する。エラーが生じる場合は、文10章データ、電子メール、またはSMSメッセージを介して、使用者に画像を撮影し直すように警告する。

10

【0273】

(実施例9)

dR T - L A M P およびマルチプレックスPC実験のためのS l i p C h i p の作製

S l i p C h i p は、クロムおよびフォトレジスト (T e l i c C o m p a n y 、 V a l e n c i a 、 C A) でコーティングされたソーダ石灰ガラスプレートから作製した。標準的プロトコールに従い、ガラスプレートを、ウェルのためのデザインを含有するフォトマスクと位置合わせし、A Z 1 5 0 0 フォトレジストをUV光へと曝露した。曝露の直後に、UV光へと曝露されたフォトレジストのエリアを、1リットル中に0.1モルのN a O H 溶液により除去した。クロムエッティング液を適用して、露出された基底のクロム層を除去した。次いで、ガラスプレートを、M i l l i p o r e 水ですすぎ、窒素ガスで乾燥させた。次いで、ガラスプレートを、ガラスエッティング溶液下に浸漬して、前出のステップでクロムコーティングが除去されたガラス表面をエッティングした。エッティングの後、ガラスプレートを、ジクロロジメチルシラン (S i g m a - A l d r i c h) でシラン化した。S l i p C h i p の上側プレートおよび下側プレートは、脱気油 (d R T - L A M P には鉱物油 : テトラデカンを1:4 (v/v) とし、P C R には純粋な鉱物油とした) 下でアセンブルした。上側プレートおよび下側プレートの両方を、油相へと浸漬し、対面させた。2枚のプレートを、示される通りに、立体鏡 (L e i c a 、 G e r m a n y) 下で位置合わせし、大型クリップを使用して固定した。デッドエンド充填における流体注入入口および油流出口として用いられるように、上側プレートに貫通孔をドリル加工した。試薬溶液を、注入口を介して、ピペティングによりロードした。

20

【0274】

2ステップの曝露 - エッティングプロトコールを、2つの異なる深さのウェル (熱増殖ウェルでは5 μm あり、d R T - L A M P デバイス内の他の全てのウェルでは55 μm ; 热増殖ウェルでは40 μm あり、マルチプレックスPCRデバイス内の他の全てのウェルでは75 μm) を創出するように適合させた。エッティングの後、S l i p C h i p デバイスを、同じガラスシラン化工程にかけたが、ここでは、まず、ガラスプレートを、ピラニアミックスでよく清浄化し、200 ブルーフのエタノールおよび窒素ガスで乾燥させ、次いで、プラズマ清浄器内で10分間にわたり酸化処理し、ジメチルジクロロシランによるシラン化のために、1.5時間にわたり真空乾燥機へと速やかに移した。シラン化の後、デバイスを、クロロホルム、アセトン、およびエタノールでよくすすぎ、窒素ガスで乾燥させてから使用した。ガラス製のS l i p C h i p を再使用する必要がある場合は、まず、ピラニア酸で清浄化し、次いで、上記で記載した、同じシラン化手順およびすすぎ手順にかけた。

30

【0275】

(実施例10)

アライメントマーカーを伴うS l i p C h i p のデザイン

使用されるS l i p C h i p デバイスのデザインは、実施例1におけるデザインと同じとしたが、わずかな改変を伴った。デバイスは、4つの赤色のアライメントマーカーの配

40

50

置を方向付ける、4つのエッティングされた丸印を含むように改変した。デバイスは、チップの片面に、合計1,280個のウェル（各々6nLの容量を伴う）を含有したが、2つの半面を操作して、試薬を組み合わせて反応を開始した場合、開始された個々の反応は、1,200だけであった。

【0276】

(実施例11)

リアルタイムdRT-LAMPアッセイ

改変HIVウイルス（1mL当たり500万コピー、1mL当たりAcroMetrix（登録商標）HIV-1 Panelコピーの一部）を含有する400μLの血漿を、iPrep（商標）PureLink（登録商標）Virusカートリッジへとロードした。製造業者の指示書に従い、カートリッジを、iPrep（商標）精製装置に入れ、精製プロトコールを実施した。溶出容量は、50μLであった。精製されたHIVウイルスRNAを、1mg/mLのBSA溶液中10、10²、10³倍に希釈し、アリコートにし、さらなる使用のために-80で保存した。また、患者血漿から精製されたHIVウイルスRNAも、受領時にアリコートにし、-80で保存した。

10

【0277】

(実施例12)

SlipChip内のデジタルLAMPアッセイ

1mL当たりAcroMetrix（登録商標）HIV-1 PanelコピーからのHIV-1ウイルスRNA精製プロトコールを使用して、HIV-1 RNAのコピーを作り出した。2ステップdRT-LAMP法を使用してHIV-1 RNAを増幅するために使用される第1の溶液は、以下：10μLのRM、1μLのBSA、0.5μLのEXPRESS SYBR（登録商標）GreenE R（商標）RTモジュール（EXPRESS One-Step SYBR（登録商標）GreenE R（商標）Universalの一部）、0.5μLのBIPプライマー（10μM）、多様な量の鑄型、および容量を20μLとするのに十分なヌクレアーゼ非含有水を含有した。第2の溶液は、10μLのRM、1μLのBSA、2μLのEM（LoopAmp（登録商標）RNA増幅キットによる）、1μLまたは2μLのFD、2μLの他のプライマー混合物（20μMのFIP、17.5μMのFIP、10μMのLoop_B/Loop_F、および2.5μMのF3）、1μLのHybridase（商標）Thermosstable RNA-ゼH、および容量を20μLとするのに十分なヌクレアーゼ非含有水（Fisher Scientific）を含有した。第1の溶液を、SlipChipデバイスへとロードし、50で10分間にわたりインキュベートし、次いで、第2の溶液を、同じデバイスへとロードし、第1の溶液と混合した。充填された全デバイスを、60で60分間にわたりインキュベートした。反応は、57および63で60分間にわたり繰り返した。

20

【0278】

(実施例13)

2ステップRT-LAMPアッセイ

2ステップRT-LAMP増幅のために、10μLのRM、1μLのBSA、0.5μLのEXPRESS SYBR（登録商標）GreenE R（商標）RTモジュール、0.5μLのBIPプライマー（10μM）、多様な量の鑄型、およびヌクレアーゼ非含有水を含有する第1の溶液（20μL）を、まず、50で10分間にわたりインキュベートし、次いで、10μLのRM、1μLのBSA、2μLのEM、1μLまたは2μLのFD、2μLの他のプライマー混合物、1μLのHybridase（商標）Thermosstable RNA-ゼH、およびヌクレアーゼ非含有水を含有する第2の溶液（20μL）と混合した。40μLの混合物を、4つのアリコートへと分割し、EcoリアルタイムPCRマシン（Illumina, Inc）へとロードした。1ステップRT-LAMP増幅では、40μLのRT-LAMPミックスは、以下：20μLのRM、2μLのBSA（20mg/mL）、2μLのEM、2μLのFD、2μLのプライマー混合物

30

30

40

50

、多様な量の鋳型溶液、およびヌクレアーゼ非含有水を含有した。混合物を、4つのアリコートへと分割し、EcoリアルタイムPCRマシンへとロードした。データ解析は、Ecoソフトウェアを使用して実施した。

【0279】

(実施例14)

SlipChip上の2ステップdRT-LAMP增幅

SlipChip上で2ステップdRT-LAMP增幅を実施するため、第1の溶液(上記で記載した溶液と同等な溶液)を、SlipChipデバイスへとロードし、50で10分間にわたりインキュベートした。次いで、第2の溶液(上記で記載した溶液と同等な溶液)を、同じデバイスへとロードし、第1の溶液と混合した。充填された全デバイスを、60で60分間にわたりインキュベートした。反応は、57および63で60分間にわたり繰り返した。

10

【0280】

(実施例15)

マルチプレックス化されたSlipChip上のPCR增幅

マルチプレックス化されたSlipChip上でStaphylococcus aureusゲノムDNAを増幅するために使用されるPCR混合物は、以下: 10 μLの2倍濃度のSsoFast Evagreen SuperMix(BioRad、CA)、1 μLのBSA(20 mg/mL; Roche Diagnostics)、1 ng/μLのgDNA 1 μL、0.5 μLのSYBR Green(10倍濃度)、および7.5 μLのヌクレアーゼ非含有水を含有した。プライマーは、既に記載された技法を使用して、チップへとあらかじめロードした。PCR増幅は、初期の95で5分間にわたりステップにより実施し、次いで、(i) 95で1分間、(ii) 55で30秒間、および(iii) 72で45秒間による40サイクルを後続させた。72で5分間にわたりさらなるステップを実施して、dsDNAの完全な伸長を可能とした。ゲノムDNA(Staphylococcus aureus、ATCC番号6538D-5)は、American Type Culture Collection(Manassas、VA)から購入した。

20

【0281】

(実施例16)

30

HIV cDNAの合成

HIV cDNAは、製造業者の指示書に従い、SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMixを使用して、精製されたAcrometrix(登録商標)HIV RNAを逆転写させることにより創出した。略述すると、精製HIV RNA(直接的な溶出から10倍に希釈された)、100 nMのB3プライマー、1倍濃度のアニーリング緩衝液、および水による混合物を、5分間にわたり、65まで加熱し、次いで、1分間にわたり氷上に置いた。反応物ミックスおよびSuperScript III/RNase Out酵素ミックスを、40 μLの最終容量となるように反応物へと添加し、混合物を、50で50分間にわたり静置した。次いで、混合物を、5分間にわたり、85まで加熱して、逆転写酵素を不活化し、氷上で冷却し、5 μLのアリコートへと分割し、さらなる使用まで、-20で凍結させた。ビオチンで標識されたDNAは、希釈率1:50のHIV cDNA、500 nMのビオチン-B3プライマーおよびビオチン-F3プライマー、500 μMのdNTP、1 U/μLのPhusion DNAポリメラーゼ、および1倍濃度の会合HF緩衝液ミックスを含有するPCR反応物中で創出した。初期の98で1分間にわたり酵素活性化ステップの後、反応を、98で10秒間、58で15秒間、および72で15秒間の39回にわたりサイクリングさせ、72で5分間にわたりポリッシングステップで終了させた。結果として得られるDNA産物は、TBE緩衝液中に1.2%のアガロースゲル上で泳動させ、0.5 μg/mLの臭化エチジウムで染色した。製造業者の指示書に従い、Wizard SV gel and PCR cleanupキットを使用して、特異

40

50

的なバンドを切り出し、精製し、50 μL のヌクレアーゼ非含有水へと溶出させた。50 μL のストレプトアビジン My One T1 磁気ビーズは、20 mM の NaOH 中で、緩徐傾斜回転により、24 時間にわたりプライミングした。ビーズを水で1回洗浄し、結合緩衝液 (5 mM のトリス、0.5 mM の EDTA、1 M の NaCl、0.05% の Tween-20) で4回にわたり洗浄し、2倍濃度の濃縮結合緩衝液 30 μL 中に再懸濁させた。30 μL の PCR 産物をビーズへと添加し、静かに回転させながら、15 分間にわたりインキュベートして、DNA の磁気ビーズへの結合を可能とした。ビーズを磁石で分離し、上清を除去し、ビーズを、20 mM の NaOH 40 μL 中に再懸濁させ、ローター上で10 分間にわたりインキュベートして、ビオチニル化していない鎖を分離した。次いで、ビーズを磁石で分離し、ssDNA を含有する上清を回収し、40 mM の HCl 20 μL と混合した。次いで、結果として得られた ssDNA を、ssDNA / RNA cleaner and concentrator キットを使用して精製し、20 μL の水中で溶出させ、Agilent RNA nano bioanalyzer 上で泳動させて、最終産物のサイズおよび完全性を確認した。

10

【0282】

(実施例 17)

1ステップ RT - LAMP 法を使用する、HIV ウィルス RNA の増幅

1ステップ RT - LAMP 法を使用して、HIV ウィルス RNA を増幅するために、RT - LAMP ミックスは、以下：20 μL の RM、2 μL の BSA (20 mg / mL)、2 μL の EM、2 μL の FD、2 μL のプライマー混合物 (20 μM の BIP / FIP、10 μM の Loop_B / Loop_F、および 2.5 μM の B3 / F3)、多様な量の錆型溶液、および容量を 40 μL とするのに十分なヌクレアーゼ非含有水を含有した。溶液を、SlipChip へとロードし、63 で 60 分間にわたり加熱した。

20

【0283】

(実施例 18)

2ステップ RT - LAMP 法を使用する、HIV ウィルス RNA の増幅

2ステップ RT - LAMP 法を使用して、HIV ウィルス RNA を増幅するために、第1の溶液は、以下：10 μL の RM、1 μL の BSA、0.5 μL の EXPRESS SYBR (登録商標) GreenER (商標) RT モジュール (EXPRESS One-Step SYBR (登録商標) GreenER (商標) Universal の一部)、0.5 μL の BIP プライマー (10 μM)、多様な量の錆型溶液、および容量を 20 μL とするのに十分なヌクレアーゼ非含有水を含有した。第2の溶液は、10 μL の RM、1 μL の BSA、2 μL の DNA ポリメラーゼ溶液 (LoopAmp (登録商標) DNA 増幅キットによる)、1 μL または 2 μL の FD、2 μL の他のプライマー混合物 (20 μM の FIP、17.5 μM の FIP、10 μM の Loop_B / Loop_F、および 2.5 μM の F3)、1 μL の Hybridase (商標) Thermostable RNAse H、および容量を 20 μL とするのに十分なヌクレアーゼ非含有水を含有した。第1の溶液を、SlipChip デバイスへとロードし、37 または 50 でインキュベートし、次いで、第2の溶液を、同じデバイスへとロードし、第1の溶液と混合し、デバイス全体を、63 で 60 分間にわたりインキュベートした。

30

【0284】

(実施例 19)

デジタル LAMP 法を使用する、DNA の増幅

DNA を増幅するために、LAMP ミックスは、以下：20 μL の RM、2 μL の BSA (20 mg / mL)、2 μL の DNA ポリメラーゼ、2 μL の FD、2 μL のプライマー混合物 (20 μM の BIP / FIP、10 μM の Loop_B / Loop_F、および 2.5 μM の B3 / F3)、多様な量の錆型溶液、および容量を 40 μL とするのに十分なヌクレアーゼ非含有水を含有した。上記と同じローディングプロトコールを実施し、デバイスを、63 で 70 分間にわたりインキュベートした。

40

【0285】

50

(実施例 20)

デジタル LAMP 法を使用する、ssDNA の增幅

ssDNA を增幅するために、LAMP ミックスは、以下：20 μL の RM、2 μL の BSA、2 μL の DNA ポリメラーゼ、2 μL の FD、2 μL のプライマー混合物（20 μM の BIP / FIP、10 μM の Loop_B / Loop_F、および 2.5 μM の B3 / F3）、多様な量の鑄型溶液、および容量を 40 μL とするのに十分なヌクレアーゼ非含有水を含有した。上記と同じローディングプロトコールを実施し、デバイスを、63 で 60 分間にわたりインキュベートした。

【0286】

(実施例 21)

SlipChip 上の、HIV ウィルス RNA の dRT - PCR 増幅

HIV ウィルス RNA を增幅するために、RT - PCR ミックスは、以下：2 倍濃度の EvaGreen SuperMix 20 μL、2 μL の BSA、1 μL の EXPRESS SYBR（登録商標）GreenER（商標）RT モジュール、1 μL ずつの各プライマー（10 μM）、2 μL の鑄型、および容量を 40 μL とするのに十分なヌクレアーゼ非含有水を含有した。增幅は、10 分間にわたる短縮型逆転写ステップを除き、以前に報告された条件と同じ条件で実施した。

【0287】

(実施例 22)

4 つの異なるデジタル式化学反応による、HIV ウィルス RNA 結果の定量化

SlipChip デバイスを使用して、4 つの異なるデジタル式化学反応による、HIV ウィルス RNA の定量化結果を比較し（2 つのプライマー対による dRT - PCR と、1 ステップ dRT - LAMP および 2 ステップ dRT - LAMP と）で、HIV ウィルス RNA を、4 つの希釈率で定量化した。HIV ウィルス RNA 濃度は、単一のデバイス上で観察された陽性ウェルの数（「デジタルカウント」）に基づき、既往の論考で論じられているポアソン解析法に従い計算した。全ての実験は、2 連で実施し、HIV ウィルス RNA を添加しない陰性対照実験も、並行して実施したところ、陰性対照では、陽性ウェルが観察されなかった。

【0288】

(実施例 23)

dRT - LAMP を実施するための、ガラス製の SlipChip のデザイン

dRT - LAMP を実施するための、ガラス製の SlipChip デバイスを、2 ステップでデザインした。デバイスは、それらの対面し合う面上にウェルおよびチャネルをエッティングした 2 枚のガラスプレートからなった（図 7A）。チップのプレートをアセンブルし、位置合わせして、複数のステップによる、試薬のローディング、コンパートメント化、インキュベーション、および混合を可能とした。このチップは、デジタル RPA についてかつて記載されたチップに類似していたが、これと同じではなかった。まず、鑄型、プライマー、および RT 酵素を含有する緩衝溶液を、チップ上のウェルへとロードした（図 7B）。次に、チップのプレートを、互いに対してスリッピングさせて、単一の HIV ウィルス RNA 分子を、液滴へと閉じ込めた（図 7C）。ここで、第 1 のインキュベーションステップを実施して、逆転写を可能とした。cDNA は、逆転写ステップにおいて、各コンパートメント内の RNA から合成した。次いで、LAMP 試薬混合物および他のプライマーを含有する第 2 の溶液をロードし（図 7D）、スリッピングによりコンパートメントへと分割した（図 7E）。最後に、cDNA 分子を含有するコンパートメントの各々を、LAMP 試薬を含有するコンパートメントと組み合わせ、増幅のために、デバイス全体を 63 でインキュベートした。

【0289】

(実施例 24)

プラスチック製の SlipChip デバイスによる、dRT - LAMP 化学反応の適合性

プラスチック製の SlipChip デバイスによる、この dRT - LAMP 化学反応の

10

20

30

40

50

適合性を調べるために、ガラス製のデバイスとデザインが同じプラスチック製の S l i p C h i p デバイス上における、H I V ウィルス R N A の 2 ステップ d R T - L A M P を使用し、実施例 1 8 の方法を使用した（図 8 C ）。

【 0 2 9 0 】

（実施例 2 5 ）

突然変異の存在下における d R T - L A M P の感度

突然変異の存在に対する、この d R T - L A M P 法の感度を査定するため、患者試料から精製された H I V ウィルス R N A を使用して、2 ステップ d R T - L A M P の効能について調べ、これらの結果を、 d R T - P C R による測定値と比較した（図 9 ）。 R o c h e T N A I キットを使用して、4 例の異なる患者に由来する血漿試料を精製した。 p 2 4 プライマーによる 2 ステップ d R T - L A M P および L T R プライマーによる d R T - P C R の両方を実施して、 R N A 濃度を定量化した。 d R T - L A M P の定量化結果は、対応する d R T - P C R 結果に対して、それぞれ、 4 6 % 、 1 3 4 % 、 2 4 % 、および 0 . 7 4 % であった。精製された H I V ウィルス R N A の p 2 4 領域をシークエンシングした。試料番号 1 、 2 、 3 、および 4 それぞれのプライミング領域内では、 3 、 2 、 4 、および 5 力所の点突然変異が見られた。

【 0 2 9 1 】

（実施例 2 6 ）

顕微鏡画像の収集および解析

蛍光画像は、 5 倍 / 0 . 1 5 N A の対物レンズを伴う Leica D M I 6 0 0 0 B 落射蛍光顕微鏡および L 5 フィルターを、室温で使用して得た。リアルタイム d R T - L A M P 実験における明視野画像および蛍光画像は、 Leica M Z 1 2 . 5 S t e r e o m i c r o s c o p e を使用して得た。全ての画像は、 Met a M o r p h ソフトウェア（ M o l e c u l a r D e v i c e s 、 S u n n y v a l e 、 C A ）を使用して解析した。各実験において撮影された画像を統合し、 1 1 0 単位のブラックノイズバックグラウンド値を差し引いてから、画像を閾値化した。陽性ウェルの数は、統合型形態解析ツールを使用して、強度およびピクセルエリアに基づき、自動式でカウントした。 H I V - 1 R N A の濃度は、既往の刊行物において記載されている通り、ポアソン分布に基づき計算した。

【 0 2 9 2 】

陰性ウェルに典型的な蛍光値は、 8 0 ± 1 0 であった。陽性ウェルの蛍光値は、 3 5 0 ± 1 0 0 を中心とした。

【 0 2 9 3 】

（実施例 2 7 ）

異なる温度で得られるデータセットについての統計学的解析

t 検定を使用して、2 つの異なるデータセットの平均が、統計学的に異なるのかどうかを査定した。この工程で得られる p 値は、帰無仮説が真であると仮定したときに所与の結果を得る確率であった。 p = 0 . 0 5 に対応する 9 5 % の信頼水準または 5 % の有意性レベルを一般に許容可能とした。 p < 0 . 0 5 の場合、2 つの試料の濃度は異なることが典型的に仮定された。この場合、2 ステップ d R T - L A M P の効能を査定する p 値は、多様なイメージング条件（顕微鏡を伴うイメージング条件、セルフォーンおよび靴箱を伴うイメージング条件、および薄暗がりの中のセルフォーンを伴うイメージング条件）で使用した。異なる温度に由来する 1 つの濃度についての全てのデータをプールし、それらを、別の濃度で得られるデータに対して比較したところ、3 つのイメージング条件の間で最大の p 値は、 6 . 7 × 1 0 - 7 であった。したがって、2 つの濃度は明らかに識別可能であり、両方の濃度が同等であることを言明する帰無仮説は棄却された。また、2 つの近似するサブセット（ 5 7 で 1 m L 当たり 2 × 1 0 5 コピーのサブセットおよび 6 3 で 1 m L 当たり 1 × 1 0 5 コピーのサブセット）も比較し、イメージング条件の各セットの下におけるそれらの p 値を計算した。 p 値は、3 つの条件全てについて、なおも 0 . 0 5 を下回った。

10

20

30

40

50

【0294】

加えて、データを解釈するための視覚的な指針として、正規分布も使用した。データから標準偏差を決定したところ、2つの濃度に対応するデータセットの間の目視可能な重なり合いが認められなかつたため、理論的t分布の代わりに、正規分布を使用した。

【0295】

(実施例28)

セルフォーンカメラによる、SlipChip dRT-LAMPデバイスのイメージング

セルフォーンによるdRT-LAMPデバイスのイメージングは、フラッシュのレンズへの直接的な反射を防止するために、デバイスを、セルフォーン平面に対して約10度および/もしくは10度傾けて実施した。全ての画像は、標準的セルフォーンカメラアプリケーションを使用して撮影した。ホワイトバランスは、自動に設定し、ISOは、800に設定し、露光値は、+2に設定し、焦点モードは、「クローズアップ」に設定し、分解能は、8MPへと調整した。

10

【0296】

(実施例29)

セルフォーンカメラによる、SlipChipマルチプレックスPCRデバイスのイメージング

セルフォーンによるマルチプレックスPCRデバイスのイメージングは、デバイスを黒色に塗った靴箱内でイメージングすることにより実施した。ホワイトバランスは、自動に設定し、ISOは、1600に設定し、露光値は、+4に設定し、焦点モードは、「クローズアップ」に設定し、分解能は、8MPへと調整した。画像は、インターネット上で入手可能なフリーウェアのFiji画像処理パッケージを使用して処理した。

20

【0297】

(実施例30)

dRT-LAMPの温度に関する頑健性の測定

dRT-LAMP法の、温度変化に対する頑健性について、57 ~ 66 の温度範囲で調べた。第1の逆転写ステップは、全ての実験において、50 で10分間にわたり実施し、第2のステップは、異なる温度で実施した。デバイスは、立体顕微鏡を使用して、1分ごとにイメージングして、リアルタイムのデジタルカウントの測定値を得た。

30

未満では、反応は、60分後までに、観察可能なデジタルカウントをもたらすのに十分な程度に急速に進行し、結果は、57 ~ 63 の温度範囲にわたり同等であることが観察された。であるが、最大の反応速度は、57 で観察され、63 では、わずかに大きなデジタルカウントが得られた。66 では、反応は、ゆっくりと進行し、60分後に観察された陽性ウェルは、ごく少数であった。90分間にわたる反応時間の後、デジタルカウントは増大したが、依然として63 におけるカウントより小さかった(図8B)。反応時間をさらに引き延ばしたところ、偽陽性がもたらされた。57 ~ 63 の範囲にわたるデジタルカウントの類似性は、RPAについて既に観察された通り、デジタルLAMPが、小さな温度変動にも関わらず、妥当な程度に頑健な結果をもたらすことを示唆する。

40

【0298】

(実施例31)

リアルタイムRT-LAMPの温度に関する頑健性の測定

リアルタイムRT-LAMPアッセイによる定量的測定値の頑健性を、温度の変化に関して調べた。市販の計器を使用して、2ステップリアルタイムRT-LAMPアッセイの、温度変動に対する頑健性について調べた(図2a)。EcoリアルタイムPCRマシン上で測定されるこれらの2つの濃度についての反応時間を比較することにより、6度の温度範囲にわたる3つの温度(57、60、63)において、HIV-1 RNAの2つの濃度(1mL当たり 1×10^5 コピーおよび1mL当たり 2×10^5 コピー)を測定するためのアッセイの精度について調べた。各個別の温度において、リアルタイムRT

50

- LAMP アッセイは、2つの濃度の間の識別に成功すること（57で $p = 0.007$ 、60で $p = 0.01$ 、63で $p = 0.04$ であり、帰無仮説は、2つの濃度が同一なことである）が可能であった。しかし、アッセイは、温度変動に対して頑健でなかった：3の変化は、投入された濃度の2倍の変化より大きな、アッセイリードアウト（反応時間）の変化を導入した。したがって、温度を精密に制御しないと、このリアルタイム RT - LAMP アッセイにより、投入された HIV - 1 RNA の濃度の2倍の変化を分解することはできない。

【0299】

（実施例32）

dRT - LAMP とリアルタイム RT - LAMP との間の頑健性の比較

10

デジタル RT - LAMP アッセイの頑健性を、温度の変化に関して、リアルタイム RT - LAMP と比較した（図2b）。dRT - LAMP 実験では、HIV - 1 RNA の濃度を、60分間にわたる反応の後における、各チップ上の陽性ウェルの数をカウントし、次いで、ポアソン統計を使用することにより決定した。dRT - LAMP アッセイはまた、各温度において、2つの濃度の間を識別することも可能であった（57で $p = 0.03$ 、60で $p = 0.02$ 、63で $p = 0.02$ ）。リアルタイムアッセイとは対照的に、dRT - LAMP アッセイは、これらの変動にも関わらず、これらの温度変化に対して頑健であり、2倍の濃度の変化を分解した（ $p = 7 \times 10^{-7}$ ）。これらの実験では、Hamamatsu ORCA R - 2 冷却CCDカメラを装備したLeica DM I - 6000 顕微鏡を使用して、dRT - LAMP デバイスをイメージングした。このセットアップは、均一照度視野をもたらし、これにより、陽性ウェルの強度は、位置の関数とならなかった。

20

【0300】

（実施例33）

反応時間に関する頑健性の測定

dRT - LAMP アッセイの頑健性を、反応時間の変動に関して調べた。dRT - LAMP 反応は、濃度を 1 mL 当たり 1×10^5 コピーおよび 1 mL 当たり 2×10^5 コピーとして、63の反応温度で実施し、反応のイメージングは、Leica MZFLII 蛍光立体顕微鏡を使用して、1分ごとに行った。各時点において、陽性反応の数をカウントし、3連にわたり結果を平均した（図2c）。2つの濃度の各々について、40分間にわたる反応時間後における生カウント、50分間にわたる反応時間後における生カウント、および60分間にわたる反応時間後における生カウントを併せて群分けした。統計学的解析を使用して、これらの群が同じであるという帰無仮説を棄却した（ p 値は 8.5×10^{-7} ）。

30

【0301】

（実施例34）

イメージング条件に関する頑健性の測定

簡便な光学的付属品を伴うNokia 808 PureView セルフォーンを使用して、劣悪なイメージング条件に対するdRT - LAMP アッセイの頑健性について調べた。セルフォーンのフラッシュ機能を使用して、電話機へと取り付けた励起フィルターを通る蛍光を励起し、セルフォーンのカメラを使用して、これもまた、セルフォーンへと取り付けた発光フィルターを通る蛍光をイメージングした。セルフォーンにより得られる結果を、顕微鏡により得られる結果と比較した（図2d）。セルフォーンのイメージング能力を、2つの照度条件下で調べた：第1に、dRT - LAMP アッセイを靴箱内で撮影し、第2に、隅に単一の蛍光作業を伴う、薄暗い室内で撮影した。AEMC Instruments Model 810 露出計で測定された、薄暗い室内の、測定を行った地点における光強度は、約3ルクスであった。

40

【0302】

セルフォーンによるイメージングが、頑健な結果をもたらすのかどうかを査定するため、2つの照度条件の各々の下でセルフォーンイメージングにより得られるデータについて

50

の統計学的解析を実施した。靴箱によるイメージングでは、3つの温度全てにわたり、第1の濃度(1 mL当たり 1×10^5 コピー)で得られる全てのデータを、第1のセットへと群分けし、3つの温度全てにわたり、第2の濃度(1 mL当たり 2×10^5 コピー)で得られる全てのデータを、第2のセットへと群分けした。次に、2つのセットについての 1.3×10^{-8} の p 値(帰無仮説は、2つの濃度が同一なことである)を計算したところ、このイメージング法は、一定温度において、かつ、温度変化に関わらず、2つの濃度の間を差別化するのに使用しうることが示唆された。薄暗い室内でイメージングするためのこの手順を繰り返し、 1.9×10^{-8} の p 値を計算したところ、2つの濃度は、この状況においても同様に、統計学的有意性を伴って識別しうることが指し示された。したがって、この d R T - L A M P アッセイは、理想的でないイメージング条件と温度変動との二重の擾動に対して頑健であった。

10

【0303】

(実施例 35)

デジタル PCR (dPCR) アッセイおよび LAMP アッセイとの比較

デジタル PCR (dPCR) など、他のデジタルアッセイが、劣悪なイメージング条件に対して十分に頑健であるのかどうかを、セルフォーンにより解析する。陰性から陽性への反応遷移時に、Eva greenなどの挿入色素によりモニタリングされる PCR 増幅によりもたらされる蛍光強度の変化は、2~4倍であるに過ぎない。dPCR の陽性反応における蛍光の絶対強度は、カルセイン色素によりモニタリングされる d R T - L A M P の陽性反応における蛍光の絶対強度の約 15 分の 1 であった。d R T - L A M P アッセイにおける反応容量と同じ反応容量を使用する dPCR 実験を行い、チップを、顕微鏡を使用してイメージングしたところ、予測される通り、本発明者らは、陽性カウントを陰性カウントから容易に識別することができたが、セルフォーン法では蛍光シグナルを観察することができなかった。この限界が、蛍光強度の欠如に起因することを確認するために、空間的にマルチプレックス化された PCR チップの結果をイメージングするセルフォーンの能力について調べた。このチップでは、大反応容量(6 nL に対して 78 nL)を使用するので、より大きな蛍光を発光させ、ウェルごとに回収することが可能となる。このチップ(図 3 a、b、および 4)では、複数のプライマー対を、ウェルのセットへとあらかじめロードし、試料を、第2のウェルのセットへとロードし、「スリッピング」により、2つのウェルセットを組み合わせ、これにより、その後の PCR 増幅を可能とする。ここでは、1つのプライマーセットが、S. aureus ゲノム(図 3 b)に特異的である、5 プレックスアッセイを使用した。S. aureus ゲノム DNA を、デバイスへとロードし、PCR 反応を実施したところ、非特異的な増幅は観察されず、デバイス上の、デザインされたパターンの出現により、陽性結果が指し示された。これらの大型のウェルにおける PCR 増幅により形成されたこのパターンは、セルフォーンにより視覚化することができた(図 3 c)。これらの実験は、セルフォーンイメージングに対する d R T - L A M P 増幅の頑健性が、セルフォーンの特定の特徴に起因するものではなく、LAMP によりもたらされる明るいリードアウトシグナルに起因するものであることを指し示した。

20

30

【0304】

(実施例 36)

40

d R T - L A M P イメージングの、自動化された処理および解析に関する頑健性

d R T - L A M P 増幅化学反応とセルフォーンイメージングとの組合せを、自動化された画像の処理およびデータ解析に対する頑健性について調べた。顕微鏡により撮影される画像など、高品質の画像が利用可能である場合、画像処理および陽性シグナルの定量化は、結果として得られる、この閾値を超える画像について、強度の閾値を設定し、次いで、スポットの数をカウントすることによるだけで実施することができる。例えば、顕微鏡により得られるデータには、190 a.u. の閾値を設定し、この閾値を 150 単位まで調整することにより、同様の結果を得た(図 5)。

【0305】

しかし、セルフォーンにより撮影された画像はまず、2つの理由：(i) 焦点距離が短

50

い(6cm)ために、フラッシュの照明強度の著明な変化がもたらされること；および(i)イメージングセンサーのシグナル対ノイズ比は、研究用計器において典型的に見出されるシグナル対ノイズ比よりはるかに小さいことにより適さなかった。これらの難題を克服するために、Labviewソフトウェアに特注の画像処理アルゴリズムを書き込み、実装した。画像を撮影したら、これを、「クラウド」内の遠隔サーバーへと自動的に転送した(図6b)。アップロードされたファイルは、サーバーで自動的に解析し、次いで、結果は、電子メールを介して報告した。本発明者らは、特注アルゴリズム内にエラー検出を組み入れて、画像がデバイスをその全体において含むことを確認した(図6c)。この検出アルゴリズムは、デバイス上の4つの赤色の丸印を検索し(図6a)、見出される丸印が4つより少なければ、エラーメッセージを発生させた(図6c、下パネル)。Metamorphにより定量化される顕微鏡画像結果を、100倍を超える濃度範囲にわたり、Labviewにより定量化されるセルフォーン画像と直接比較することにより、自動化された処理に対するこのセルフォーンイメージング手順の頑健性を調べた(図6d)。比較されたデータについての最良の当てはめ線は、0.968の傾きおよび0.997のR²値を有することが見出されたことから、このデジタルアッセイは、劣悪なイメージング条件下であってもなお、自動化された画像処理に対して頑健であることが示唆される。

10

【0306】

(実施例37)

SlipChipイメージングおよび解析において使用されるバーコード

20

以下の情報：患者名、固有のID番号、アッセイの日付、使用されるSlipChipの種類、SlipChip上の小型反応ベッセル(または解析領域)アレイの間隔を含むするQR(登録商標)二次元バーコードがデザインされている。バーコードは、接着型標識へと印刷し、SlipChipへと固定する。少量の試料を患者から採取し、SlipChipへと注入する。SlipChip内では、DNA增幅などのアッセイを行う。セルフォーンを使用して、SlipChipの画像および添付されたバーコードを撮影する。クラウドを介して、生画像を、別のデバイスと同期化させる。バーコードの画像を、コンピュータ上のソフトウェアにより処理し、コード化された情報を、データベースへと保存する。残りの画像をどのようにして処理するのかについてのさらなる情報を、コード化されたデータから抽出し、次いで、ソフトウェアに、どのようにして画像解析を進行させるのかについて指示するのに使用する。画像は、本明細書で記載される方法を使用して解析し、情報をバーコードから脱コード化して、アッセイの結論を決定する。結論記載は、データベース内に保存して、所望に応じて表示、伝送、またはダウンロードする。

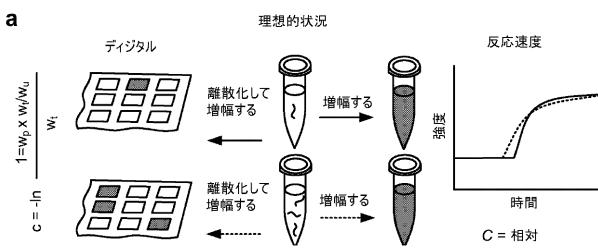
30

【0307】

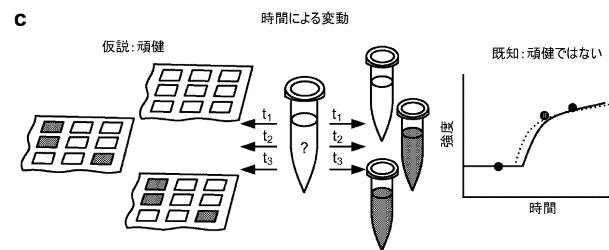
本明細書では、本発明の好ましい実施形態を示し、記載してきたが、当業者には、このような実施形態は、例だけを目的として提示されていることが明らかであろう。今や、当業者は、本発明から逸脱することなく、多数の変更、変化、代用を施すであろう。本発明を実施するには、本明細書で記載される本発明の実施形態に対する多様な代替物を援用することを理解されたい。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲を規定するものであり、これらの特許請求の範囲およびそれらの同等物の範囲内にある方法および構造を対象とすることが意図される。

40

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



【図 1 - 2】

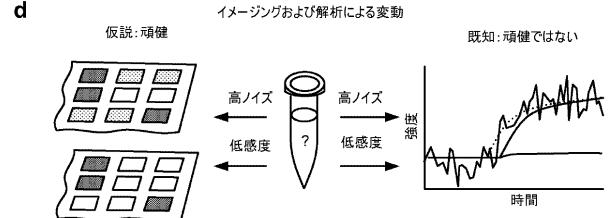
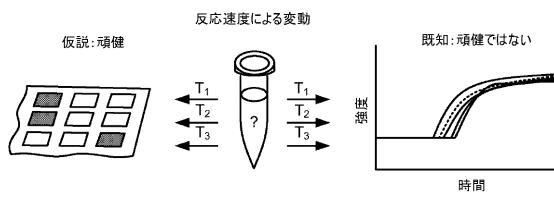
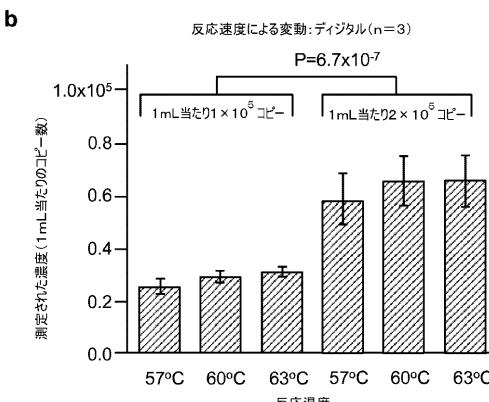
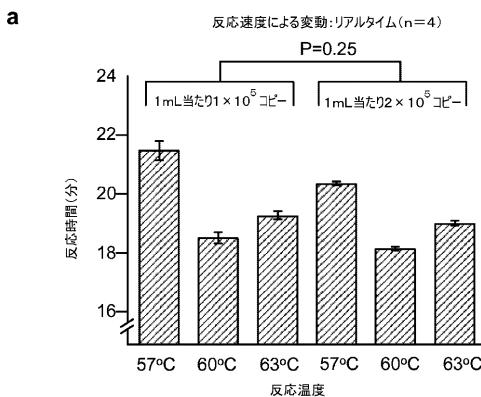


FIG. 1

FIG. 1

【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

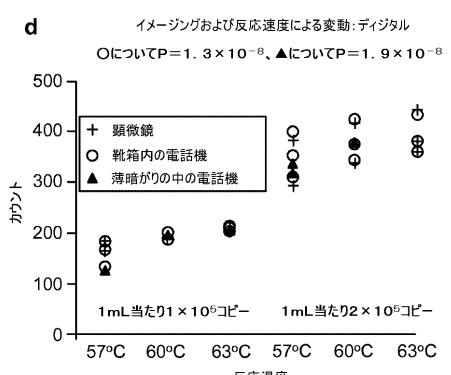
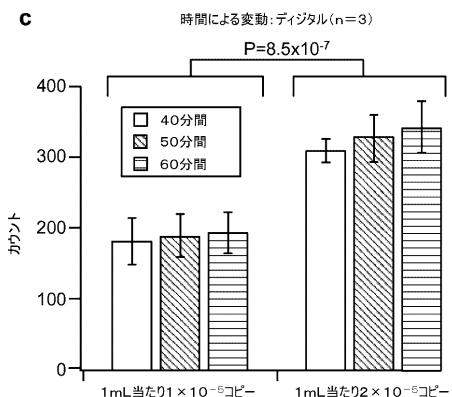
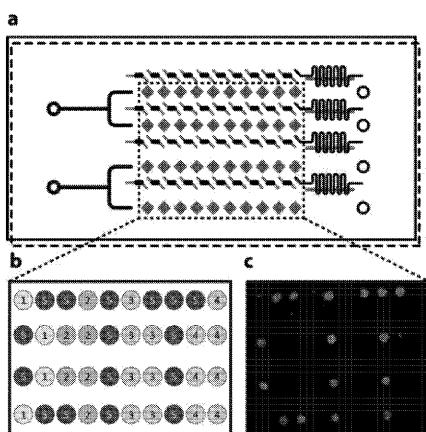


FIG. 2

FIG. 2

【図3】

FIGURE 3



【図5】

a 解析および反応速度による変動: デジタル

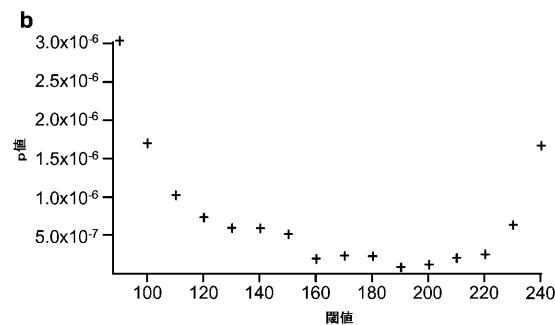
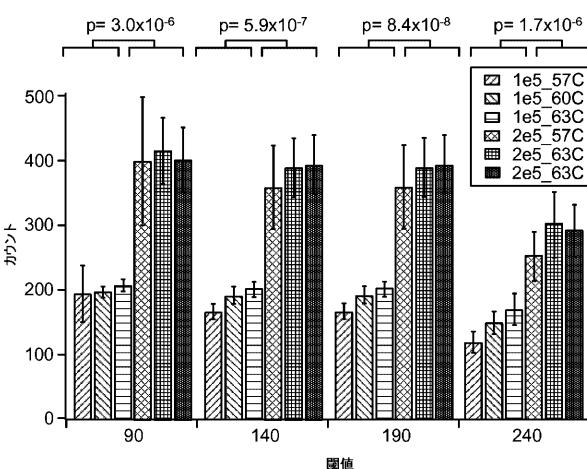


FIG. 5

【図7】

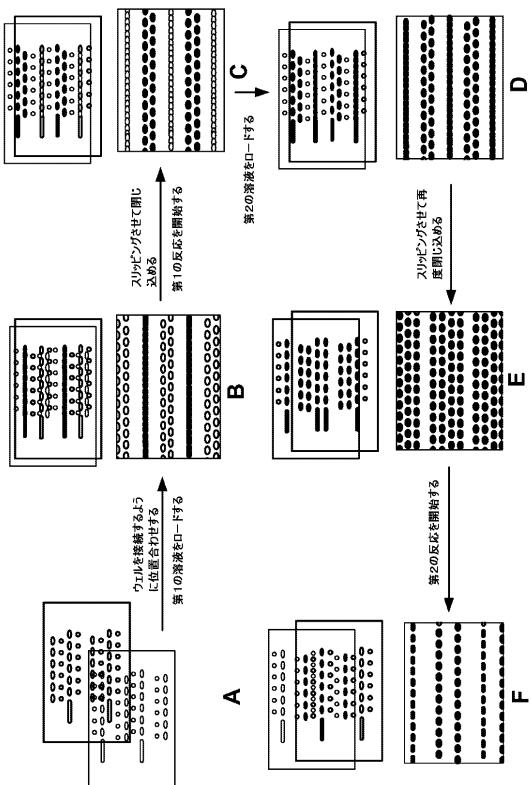


FIG. 7

【図8】

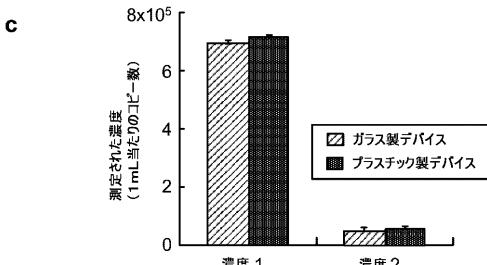
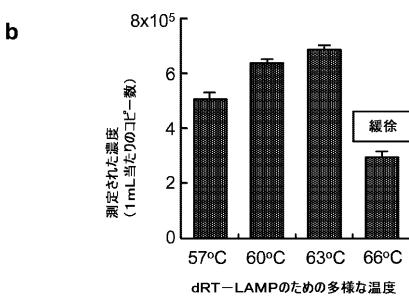
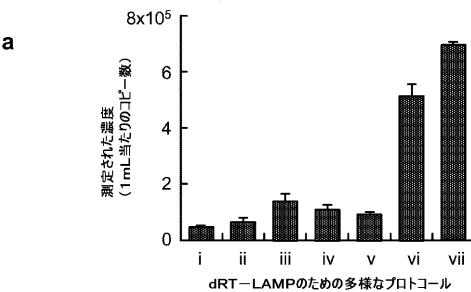


FIG. 8

【図9】

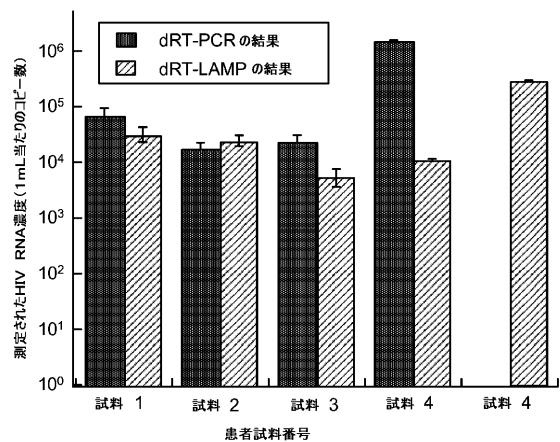
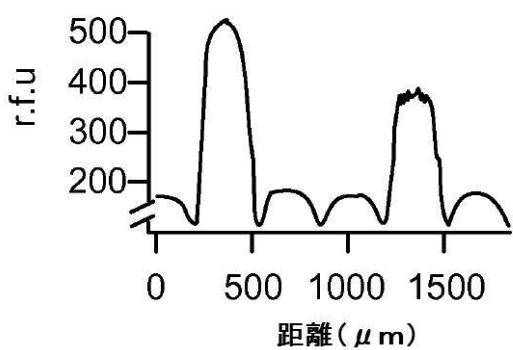
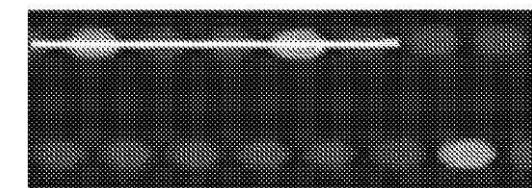


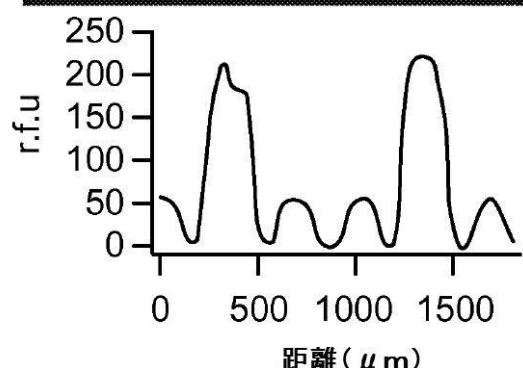
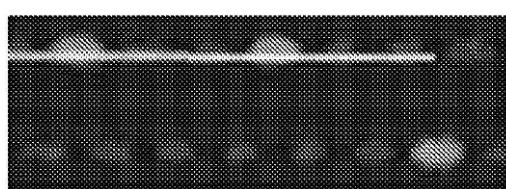
FIG. 9

【図 2 - 3】

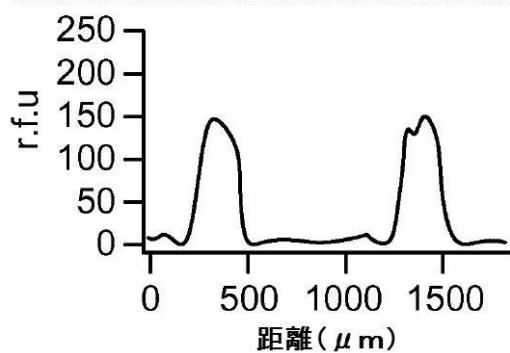
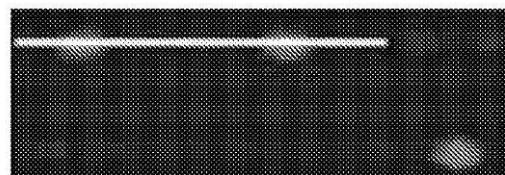
e 顕微鏡による画像



f 靴箱内のセルフォーンによる画像



g 薄暗がりの中のセルフォーンによる画像

**FIG. 2**

【図4】

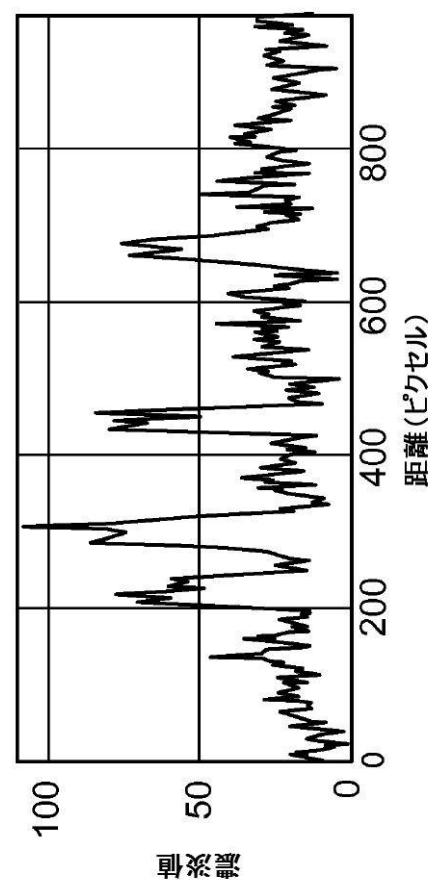
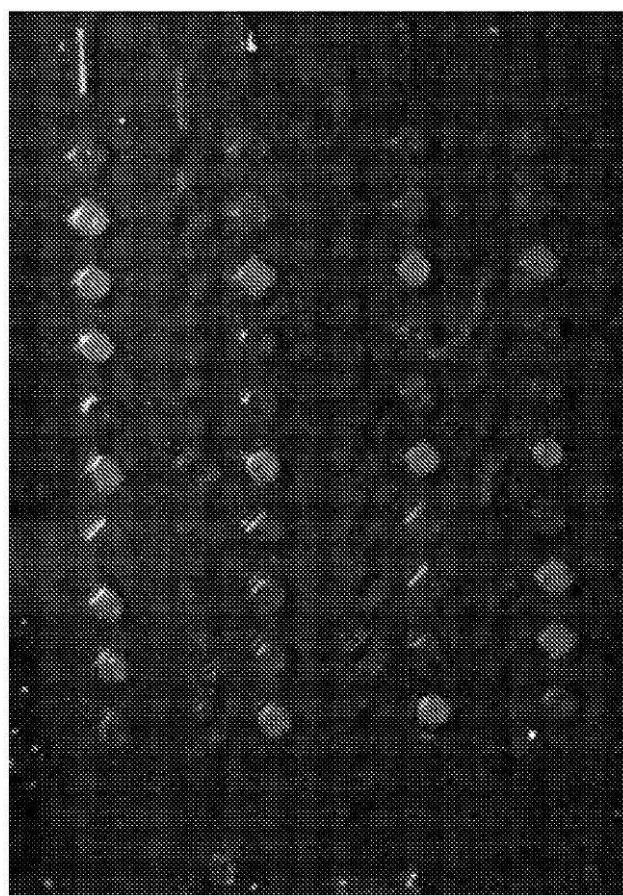
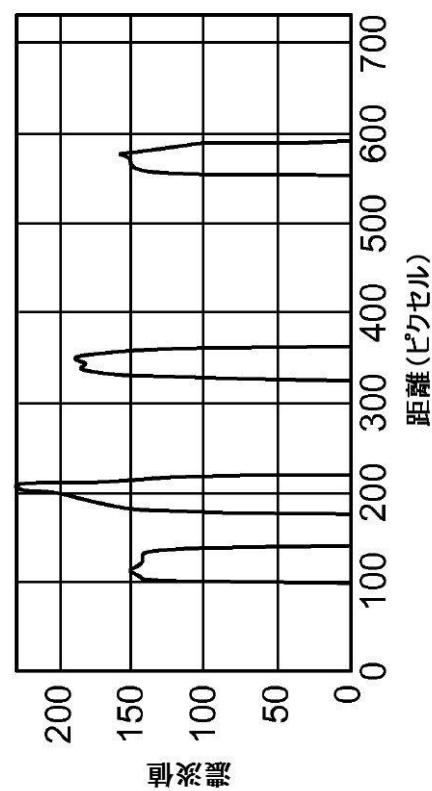
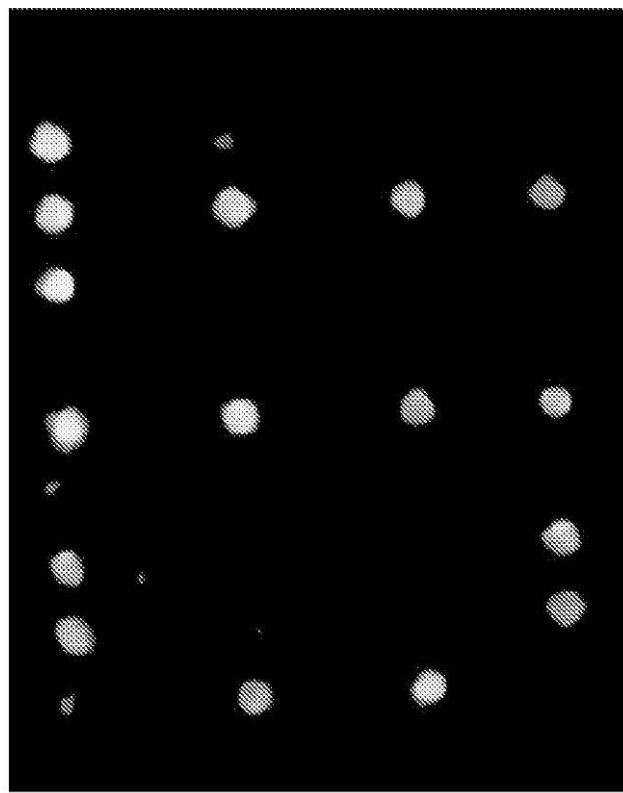
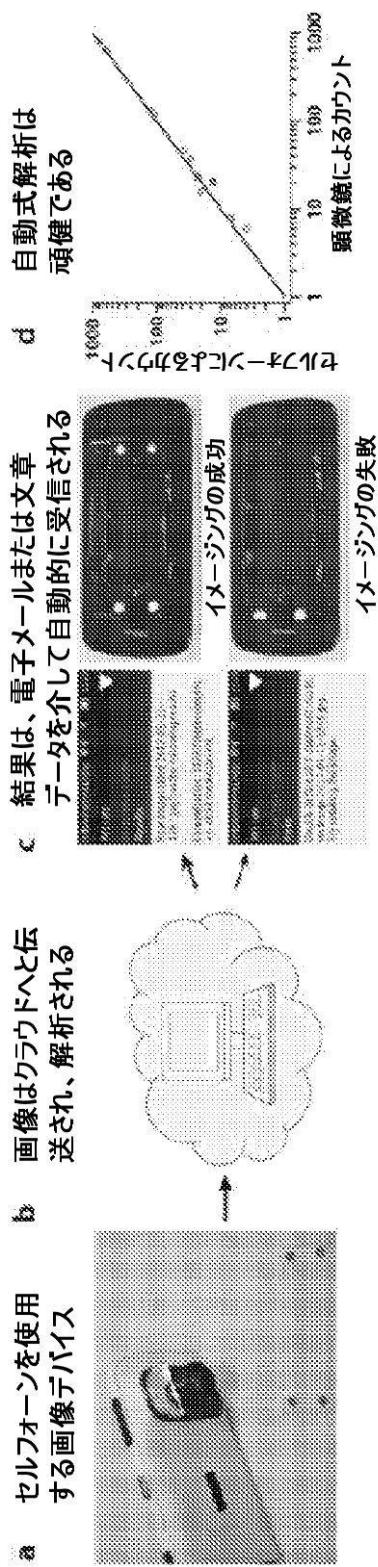


FIG. 4

【図 6】

FIGURE 6



【配列表】
2016500002000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/063594
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/68; C40B 20/00; G01N 33/52; C12M 1/00; C40B 40/06; C12P 19/34; B01J 19/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: short burst, photon, binary quantification, amplification		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2012-0245038 A1 (LINTON et al.) 27 September 2012 See abstract, claims 310, 319-323, paragraphs [0038], [0044], [0089], [0093], [0101]-[0103], [0123], [0127], [0134] and figures 17, 18, 23.	100-104 1-75, 77-83, 88 , 90-99, 105
A	US 7888017 B2 (QUAKE et al.) 15 February 2011 See abstract, claims 1, 3 and column 1.	1-75, 77-83, 88 , 90-105
A	SOPER et al. 'Single-molecule spectroscopy in solution' Los Alamos Science, 1992, No.20, pp.286-296. See pages 286, 296.	1-75, 77-83, 88 , 90-105
A	US 2011-0171741 A1 (WANG et al.) 14 July 2011 See abstract and claims 1, 7.	1-75, 77-83, 88 , 90-105
A	US 2012-0028342 A1 (ISMAGILOV et al.) 2 February 2012 See abstract and claim 1.	1-75, 77-83, 88 , 90-105
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 13 December 2013 (13.12.2013)	Date of mailing of the international search report 13 December 2013 (13.12.2013)	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140	Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/063594

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/063594

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 76,84-87,89 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet)

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/063594

(Continuation of Box No.II)

Claim 1 relates to a method, but claim 76 dependent on claim 1 relates to a device. As claim 76 does not clearly define the matter for which protection is sought, this claim does not meet the requirement of PCT Article 6.

Claims 84 and 85 are worded in reference to the analysis process of claim 1, but said analysis process has not been worded in claim 1.

Claim 86 is worded in reference to the software algorithm of claim 85, but said software algorithm has not been worded in claim 85.

Claim 87 is worded in reference to the data analysis of claim 1, but said data analysis has not been worded in claim 1.

Claim 89 is worded in reference to the portable digital device of claim 1, but said portable digital device has not been worded in claim 1.

Therefore, claims 84-87 and 89 do not meet the requirement of PCT Article 6.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2013/063594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012-0245038 A1	27/09/2012	AU 2004-302254 A1 CA 2521999 A1 EP 1608952 A2 US 2004-0208792 A1 US 2009-0062134 A1 US 2009-0062152 A1 US 7682565 B2 WO 2004-074818 A2 WO 2004-074818 A3	09/09/2004 02/09/2004 28/12/2005 21/10/2004 05/03/2009 05/03/2009 23/03/2010 02/09/2004 20/01/2005
US 7888017 B2	15/02/2011	EP 1981995 A2 EP 1981995 A4 EP 2385143 A2 EP 2385143 A3 EP 2423334 A2 EP 2423334 A3 US 2007-0202525 A1 US 2009-0170113 A1 US 2009-0170114 A1 US 2010-0124751 A1 US 2010-0124752 A1 US 2010-0255492 A1 US 2010-0255493 A1 US 2010-0256013 A1 US 8008018 B2 US 8293470 B2 WO 2007-092473 A2 WO 2007-092473 A3	22/10/2008 02/09/2009 09/11/2011 21/12/2011 29/02/2012 18/04/2012 30/08/2007 02/07/2009 02/07/2009 20/05/2010 20/05/2010 07/10/2010 07/10/2010 07/10/2010 30/08/2011 23/10/2012 16/08/2007 13/11/2008
US 2011-0171741 A1	14/07/2011	WO 2010-053980 A2 WO 2010-053980 A3	14/05/2010 21/10/2010
US 2012-0028342 A1	02/02/2012	AU 2011-229490 A1 CA 2756463 A1 CN 102439717 A EP 2412020 A1 IL 215160 D0 JP 2012-521219 A WO 2010-111265 A1	20/10/2011 30/09/2010 02/05/2012 01/02/2012 29/12/2011 13/09/2012 30/09/2010

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/483 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
	G 0 1 N 33/483	C

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(特許序注: 以下のものは登録商標)

1. i Phone
2. ANDROID
3. TEFLOON

(72) 発明者 セルック, デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91801, アルハンブラ, イー ベイ ステート ストリート 411 ナンバー 74

(72) 発明者 カリモフ, ミハイル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91775, サン ガブリエル, アーケディア アベニュー 9036, アパートメント 51

(72) 発明者 スン, ピン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91106, パサデナ, コルドバ ストリート 1115 アパートメント 118

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA22 AA25 AA28 AA31 CA25 CB03 CB04 CB07
 CB09 CB11 CB12 CB14 CB15 CB20 CB21 CB30 DA13 DA14
 DA30 DA36 DA60 FA16 FA19 FA26 FA29 FB01 FB02 FB12
 FB15 GC15 JA01 JA07
 4B024 AA11 CA01 CA11 DA01 DA02 DA05 DA20 HA14
 4B029 AA07 BB01 BB02 BB11 BB12 BB13 BB15 BB20 CC01 CC08
 FA03 FA12 GA08 GB02 GB06 GB10
 4B063 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ05 QQ42 QQ52 QQ61 QR08 QR32
 QR62 QS02 QS25 QS34 QS39 QX02