

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7144142号

(P7144142)

(45)発行日 令和4年9月29日(2022.9.29)

(24)登録日 令和4年9月20日(2022.9.20)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00

A Z N A

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q 1/6876

Z

G 0 1 N 35/10 (2006.01)

G 0 1 N 35/10

A

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

G 0 1 N 37/00

1 0 1

請求項の数 22 (全31頁)

(21)出願番号 特願2017-527737(P2017-527737)

(86)(22)出願日 平成27年11月23日(2015.11.23)

(65)公表番号 特表2017-538115(P2017-538115
A)

(43)公表日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(86)国際出願番号 PCT/US2015/062109

(87)国際公開番号 WO2016/085841

(87)国際公開日 平成28年6月2日(2016.6.2)

審査請求日 平成30年11月21日(2018.11.21)

審査番号 不服2020-9680(P2020-9680/J1)

審査請求日 令和2年7月9日(2020.7.9)

(31)優先権主張番号 62/083,681

(32)優先日 平成26年11月24日(2014.11.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 513322707

ナノストリング テクノロジーズ, イン
コーポレイティド

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0

9, シアトル, フェアビュー アベニュー

ノース 5 3 0, スイート 2 0 0 0

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100092624

弁理士 鶴田 準一

(74)代理人 100114018

弁理士 南山 知広

(74)代理人 100117019

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子精製および画像化のための方法および装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数のハイブリダイズした複合体を画像化するためのシステムであって、該システムはハイブリダイズした標的分子サンプルを精製し、ハイブリダイズした標的分子を画像化するように構成されるカートリッジを備え、該カートリッジは、

標的分子サンプルを保持するように構成されるサンプル投入エリア；

ここで、該サンプルは、

第1のプロープおよび第2のプロープとそれぞれハイブリダイズした複数の標的分子を含む複数のハイブリダイズした複合体、

複数のハイブリダイズしていない第1のプロープ、および

複数のハイブリダイズしていない第2のプロープを含む；

第1の親和性マトリックスを受容および/または含有し、かつサンプルを受容するように構成される第1の結合チャンバ；

ここで、該第1の親和性マトリックスは、第1の期間の間に、サンプルのハイブリダイズしていない第1のプロープおよびハイブリダイズした複合体と結合するように構成される第1の分子で官能化され；

前記第1の結合チャンバは、追加的に、サンプルのハイブリダイズしていない第1のプロープおよびハイブリダイズした複合体が第1の親和性マトリックスと結合した後で、サンプルからハイブリダイズしていない第2のプロープを除去するための第1のバッファ

を受容するように構成され；

第 1 の期間の後で第 1 の親和性マトリックスを受容し、かつ複数のハイブリダイズした複合体および複数のハイブリダイズしていない第 1 のプローブを含む第 1 の溶出サンプルを溶出するように第 1 の親和性マトリックスを加熱するように構成され、かつ第 1 のヒーターに対し動作可能に構成される第 1 の溶出チャンネル；

第 2 の親和性マトリックスを受容および／または含有し、かつ第 1 の溶出サンプルを受容するように構成される第 2 の結合チャンバ；

ここで、該第 2 の親和性マトリックスは、第 2 の期間の間に、ハイブリダイズした複合体と結合するように構成される第 2 の分子で官能化され；

前記第 2 の結合チャンバは、追加的に、少なくともハイブリダイズしていない第 1 のプローブを除去するための第 2 のバッファを受容するように構成され；

第 2 の期間の後で第 2 の親和性マトリックスを受容し、かつ複数のハイブリダイズした複合体を含む第 2 の溶出サンプルを溶出するように第 2 の親和性マトリックスを加熱するように構成され、かつ第 2 のヒーターに対し動作可能に構成される第 2 の溶出チャンネル；並びに、

第 2 の溶出サンプルを受容し、かつハイブリダイズした複合体に結合するように構成される活性結合表面を有する結合エリア；

を備え、

前記システムは、更に、

該システムに動作可能に連結し、かつカートリッジを保持するように構成されるカートリッジトレイ；

前記カートリッジトレイの下で画像化デバイスに動作可能に連結した磁石；

前記カートリッジトレイの上で前記システムに動作可能に連結し、かつ複数のバッファの流れを保持し制御するように構成される流体マニホールド；

前記流体マニホールドおよびカートリッジに動作可能に連結した複数のオフカードバッファ投入弁；

前記カートリッジトレイの上で前記システムに動作可能に連結した複数の廃棄弁；および、前記カートリッジトレイの上で前記画像化デバイスに動作可能に連結した撮像基準面、を備える、前記システム。

【請求項 2】

前記第 1 の親和性マトリックスおよび前記第 2 の親和性マトリックスは、それぞれ、第 1 の磁性ビーズのセットおよび第 2 の磁性ビーズのセットに対応する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記活性結合表面は、ストレプトアビジン、アビジン、およびオリゴヌクレオチドのうちの 1 つを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記カートリッジは、

バブルベント、

複数のバッファ投入エリア、

複数の第 1 の結合チャンバ、

複数の廃棄物排出エリア、および

複数のビーズパッド、を更に備え；

場合により、前記複数のバッファ投入エリアは、流体マニホールドに動作可能に連結された複数のオフカードバッファ投入弁であり、前記複数のオフカードバッファ投入弁は、流体マニホールドから第 1 のバッファおよび第 2 のバッファを受容し、かつ第 1 および第 2 のバッファをカートリッジに供給するように構成され；かつ、前記複数の廃棄物排出エリアは、第 1 および第 2 のバッファをカートリッジから回収するように構成される複数の廃棄弁である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 5】

バブルベントは、バッファ投入口および第 1 の結合チャンバを分離し、かつ気泡を除去するように構成される、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 6】

前記第 1 の磁性ビーズは、オリゴヌクレオチド結合磁性ビーズを含む、請求項 2 に記載のシステム。

【請求項 7】

前記第 2 の磁性ビーズは、オリゴヌクレオチド結合磁性ビーズを含む、請求項 2 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記結合エリアは、更に、流動により広がった後に第 2 の溶出サンプルを活性結合表面上に固定するように調合された溶液を受容するように構成される、請求項 1 に記載のシステム。

10

【請求項 9】

前記カートリッジトレイの上で前記システムに動作可能に連結した前記複数のオフカードバッファ投入弁および前記複数の廃棄弁の少なくとも一方は、空気圧により調節される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 10】

ハイブリダイズした標的分子サンプルを精製し、ハイブリダイズした標的分子を画像化する方法であって、

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のシステムを設けること；

20

ハイブリダイズしたサンプルを受け取ること、ここで、該サンプルは、第 1 のプローブと第 2 のプローブにハイブリダイズした標的分子を含む複数のハイブリダイズした複合体、複数のハイブリダイズしていない第 1 のプローブ、および複数のハイブリダイズしていない第 2 のプローブを含む；

第 1 の期間内に、第 1 の結合チャンバにおいて、サンプルのハイブリダイズしていない第 1 のプローブとハイブリダイズした複合体を第 1 の親和性マトリックスに結合すること；

サンプルのハイブリダイズしていない第 1 のプローブとハイブリダイズした複合体を第 1 の親和性マトリックスに結合させた後、第 1 のバッファを第 1 の結合チャンバに流し、ハイブリダイズしていない第 2 のプローブをサンプルから除去すること；

前記第 1 の親和性マトリックスを第 1 の溶出チャンネル内へ方向付けること；

30

前記第 1 の親和性マトリックスを加熱し、複数のハイブリダイズした複合体と複数のハイブリダイズしていない第 1 のプローブを含む第 1 の溶出サンプルを溶出すること；

第 2 の期間内に、第 2 の結合チャンバにおいて、第 1 の溶出サンプルのハイブリダイズした複合体を第 2 の親和性マトリックスに結合すること；

ハイブリダイズした複合体が第 2 の親和性マトリックスに結合した後、第 2 のバッファを第 2 の結合チャンバ内に流し、ハイブリダイズしていない第 1 のプローブを第 1 の溶出サンプルから除去すること；

前記第 2 の親和性マトリックスを加熱して複数のハイブリダイズした複合体を含む第 2 の溶出サンプルを溶出すること；並びに、

前記ハイブリダイズした複合体を画像化するために活性結合表面に結合すること；を含む、前記方法。

40

【請求項 11】

一定量の第 1 の溶出サンプルを親和性マトリックスパッドを介して第 1 の方向および第 2 の方向に移動させることを更に含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 のバッファは、前記第 1 の親和性マトリックスを第 1 のビーズパッドを介して第 1 の方向および第 2 の方向に移動させるようにポンピングされる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的分子は、核酸またはタンパク質である、請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 1 4】

前記第 1 の親和性マトリックスおよび前記第 2 の親和性マトリックスは、それぞれ、第 1 の磁性ビーズのセットおよび第 2 の磁性ビーズのセットに対応する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記活性結合表面は、ストレプトアビジン、アビジン、およびオリゴヌクレオチドのうちの 1 つを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記第 1 のプローブは、捕捉プローブを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記第 2 のプローブは、レポータープローブを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記第 1 の磁性ビーズは、オリゴヌクレオチド結合磁性ビーズを含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記第 2 の磁性ビーズは、オリゴヌクレオチド結合磁性ビーズを含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記複数のオフカードバッファ投入弁は、流体マニホールドから第 1 のバッファおよび第 2 のバッファを受容し、かつバッファをカートリッジに供給するように構成される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記結合エリア上への第 2 の溶出サンプルの流れは、圧力プロファイルに基づいて再配列される小さな段階的に行われる、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記溶液は、G フック、抗退色媒体、および基準物を含む、請求項 8 に従属する請求項 1 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

関連出願の相互参照

本出願は、2014 年 1 月 24 日に提出された米国特許第 1 1 9 条に基づき米国仮特許出願第 6 2 / 0 8 3 , 6 8 1 号の優先権を主張する。米国仮特許出願第 6 2 / 0 8 3 , 6 8 1 号の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】**配列表**

本出願は、E F S - W e b を介して A S C I I フォーマットで提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2015 年 1 月 23 日に作成された上記 A S C I I コピーは、N A T E - 0 2 3 _ S T 2 5 . t x t という名称で、815 バイトのサイズである。

【0 0 0 3】

本願発明は、一般に、分子サンプルデジタル計数に関し、より具体的には、核酸およびタンパク質サンプルの精製および関連分子バーコードの画像化のための方法および装置を含む。

【0 0 0 4】

しかし、読者に対し本願発明を理解しやすくするために、これらの発明の態様がどのように独立的に動作し、個々の発明間で相互的に動作し、および / または一緒に共同的に動作するかを明確に説明するために単一の明細書に記載しまとめられる。本願は、様々な発明間の相互関係および相乗効果をさらに説明するように記載される。これらの全ては、更に米国特許第 1 1 2 条に沿ったものである。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0005】

研究者らは、分子を精製し検出するために複数の方法を用いる。従来のシステムは、別々の機器で分子バーコードの流体学的処理および画像化を行い、1つの放出チャンネルにつき1つの照明チャンネルを有し、サンプルを精製装置や画像化装置に移動させる非効率な方法である。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、核酸またはタンパク質の精製および画像化のためのシステム、デバイスおよび方法を提供する。

10

【0007】

本発明の一態様は、ハイブリダイズした標的分子サンプルを精製し、ハイブリダイズした標的分子を画像化するように構成されるカートリッジを提供する。カートリッジは、サンプル投入エリア、第1の結合チャンバ、第1の溶出チャンネル、第2の結合チャンバ、第2の溶出チャンネル、および結合エリアを含む。

【0008】

本態様では、サンプル投入エリアは、例えば複数のハイブリダイズした複合体（第1のプローブおよび/または第2のプローブとそれぞれハイブリダイズした複数の標的分子を含む）、複数のハイブリダイズしていない第1のプローブ、および複数のハイブリダイズしていない第2のプローブを含む標的分子サンプルを保持するように構成されてもよい。第1の結合チャンバは、第1の親和性マトリックスを受容および/または含有し、および/またはサンプルを受容するように構成されてもよい。第1の親和性マトリックスは、第1の期間の間に、サンプルのハイブリダイズしていない第1のプローブおよび/またはハイブリダイズした複合体と結合するように構成される第1の分子で官能化されてもよい。また、第1の結合チャンバは、追加的に、サンプルのハイブリダイズしていない第1のプローブおよび/またはハイブリダイズした複合体が第1の親和性マトリックスと結合した後で、サンプルからハイブリダイズしていない第2のプローブを除去するための第1のバッファを受容するように構成されてもよい。第1の溶出チャンネルは、第1の期間の後で第1の親和性マトリックスを受容するように、および/または複数のハイブリダイズした複合体および/または複数のハイブリダイズしていない第1のプローブを含む第1の溶出サンプルを溶出するように第1の親和性マトリックスを加熱するように構成されてもよい。第2の結合チャンバは、第2の親和性マトリックスを受容および/または含有し、および/または第1の溶出サンプルを受容するように構成されてもよい。第2の親和性マトリックスは、第2の期間の間に、ハイブリダイズした複合体と結合するように構成される第2の分子で官能化されてもよい。また、第2の結合チャンバは、追加的に、少なくともハイブリダイズしていない第1のプローブを除去するための第2のバッファを受容するように構成されてもよい。第2の溶出チャンネルは、第2の期間の後で第2の親和性マトリックスを受容するように、および/または複数のハイブリダイズした複合体を含む第2の溶出サンプルを溶出するように第2の親和性マトリックスを加熱するように構成されてもよい。結合エリアは、第2の溶出サンプルを受容するようにおよび/またはハイブリダイズした複合体に結合するように構成される活性結合表面を有してもよい。

20

30

40

【0009】

本態様の実施形態では、標的分子は、核酸またはタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、第1の親和性マトリックスおよび/または第2の親和性マトリックスは、それぞれ、第1の磁性ビーズのセット（例えば、オリゴヌクレオチド結合磁性ビーズ、例えば、F磁性ビーズ）および/または第2の磁性ビーズのセット（例えば、オリゴヌクレオチド結合磁性ビーズ、例えば、G磁性ビーズ）に対応する。カートリッジは、複数のバッファ投入エリア、複数の第1の結合チャンバ、複数の廃棄物排出エリア、および/または複数のビーズパッドを更に含んでもよい。バブルイベントは、サンプル投入および/または第1の結合チャンバを分離するように、および/または気泡を除去するように構成さ

50

れてもよい。いくつかの実施形態では、活性結合表面は、ストレプトアビジン、アビジン（例えば、ニュートラアビジンTM）、またはオリゴヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、捕捉プローブを含む。いくつかの実施形態では、第2のプローブは、レポータープローブを含む。いくつかの実施形態では、カートリッジは、流体マニホールドおよび/または複数の廃棄弁に動作可能に連結された複数のオフカードバッファ投入弁に動作可能に連結されてもよい。いくつかの実施形態では、カートリッジは、流体マニホールドに動作可能に連結された複数のオンカードバッファ投入弁をさらに備える。複数のオフカードバッファ投入弁は、流体マニホールドから第1のバッファおよび/または第2のバッファを受容し、および/またはバッファをカートリッジに供給するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、結合エリア上への第2の溶出サンプルの流れは、圧力プロファイルに基づいて再配列され得る小さな段階状に行われてもよい。いくつかの実施形態では、結合エリアは、更に、流動により広がった後に第2の溶出サンプルを活性結合表面上に固定するように調合された溶液（例えば、Gフック、抗退色媒体（anti-fade media）、および/または基準物（fiducials）を含む）を受容するように構成されてもよい。

10

【0010】

本発明の他の態様は、ハイブリダイズした標的分子サンプルを精製し、ハイブリダイズした標的分子を画像化するように構成されるカートリッジを提供する。カートリッジは、バッファ投入エリア、バブルベント、第1の結合チャンバ、第1の溶出チャンネル、第2の結合チャンバ、第2の溶出チャンネル、および結合エリアを備える。

20

【0011】

本態様では、バッファ投入エリアは、標的分子サンプルを保持するように、例えば、複数のハイブリダイズした複合体（複数の標的分子、レポータープローブ、および/または捕捉プローブを含む）、複数のハイブリダイズしていないレポータープローブ、および/または複数のハイブリダイズしていない捕捉プローブを含んで構成されてもよい。バブルベントは、サンプル投入および/または第1の結合チャンバを分離するように、および/または気泡を除去するように構成されてもよい。第1の結合チャンバは、F磁性ビーズを受容するおよび/または含有し、および/またはサンプルを受容するように構成されてもよい。また、第1の結合チャンバは、追加的に、サンプルのハイブリダイズしていないレポータープローブおよび/またはハイブリダイズした複合体がF磁性ビーズと結合した後で、サンプルからハイブリダイズしていないレポータープローブを除去するための第1のバッファを受容するように構成されてもよい。F磁性ビーズは、第1の期間の間に、サンプルのハイブリダイズしていないレポータープローブおよび/またはハイブリダイズした複合体と結合するように構成される第1の分子で官能化されてもよい。第1の溶出チャンネルは、第1の期間の後でF磁性ビーズを受容するように、および/または複数のハイブリダイズした複合体および/または複数のハイブリダイズしていないレポータープローブを含む第1の溶出サンプルを溶出するようにF磁性ビーズを加熱するように構成されてもよい。第2の結合チャンバは、G磁性ビーズを受容するおよび/または含む、および/または第1の溶出サンプルを受容するように構成されてもよい。また、第2の結合チャンバは、追加的に、少なくともハイブリダイズしていない捕捉プローブを除去するための第2のバッファを受容するように構成されてもよい。G磁性ビーズは、第2の期間の間に、ハイブリダイズした複合体と結合するように構成される第2の分子で官能化されてもよい。第2の溶出チャンネルは、第2の期間の後でG磁性ビーズを受容するように、および/または複数のハイブリダイズした複合体を含む第2の溶出サンプルを溶出するようにG磁性ビーズを加熱するように構成されてもよい。結合エリアは、第2の溶出サンプルを受容するようにおよび/またはハイブリダイズした複合体に結合するように構成される活性結合表面を有してもよい。カートリッジは、流体マニホールドに動作可能に連結された複数のオフカードバッファ投入弁に動作可能に連結されてもよい。複数のオフカードバッファ投入弁は、流体マニホールドから第1のバッファおよび/または第2のバッファを受容し、および/またはバッファをカートリッジに供給するように構成されてもよい。複数の廃棄弁は

30

40

50

、第1および/または第2のバッファをカートリッジから回収するように構成されてもよい。

【0012】

本態様の実施形態では、標的分子は、核酸またはタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、活性結合表面は、ストレプトアビジン、アビジン（例えば、ニュートラアビジンTM）、またはオリゴヌクレオチドを含んでもよい。

【0013】

本発明の更に別の態様は、複数のハイブリダイズした複合体を画像化するためのシステムを提供する。システムは、本明細書の態様または実施形態にいずれかに記載のカートリッジ、該システムに動作可能に連結し、かつカートリッジを保持するように構成されるカートリッジトレイ、カートリッジに動作可能に連結した第1のヒーター、カートリッジに動作可能に連結した第2のヒーター、カートリッジトレイの下で画像化デバイスに動作可能に連結した磁石、カートリッジトレイの上でシステムに動作可能に連結し、かつ複数のバッファの流れを保持するおよび/または制御するように構成される流体マニホールド、流体マニホールドおよびカートリッジに動作可能に連結した複数のオフカードバッファ投入弁；カートリッジトレイの上でシステムに動作可能に連結した複数の廃棄弁、および；カートリッジトレイの上で画像化デバイスに動作可能に連結した撮像基準面、を備える。

【0014】

本態様の実施形態では、第1のヒーターは、第1の溶出チャネルを加熱するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、第2のヒーターは、第2の溶出チャネルを加熱するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、磁石は、第1および/または第2の結合チャンバおよび/または第1および/または第2の溶出チャネル内で、第1の磁性ビーズおよび/または第2の磁性ビーズを移動するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、磁石は、カートリッジトレイに対し平行に移動するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、複数のオフカードバッファ投入弁は、流体マニホールドから複数のバッファを受容する、および/または複数のバッファをカートリッジに供給するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、複数の廃棄弁は、複数のバッファをカートリッジから回収するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、システムは、画像化デバイスに動作可能に連結し、かつ少なくとも1つの接触パッドに対し予備充填を可能にするように構成されるカム接触パッド、画像化デバイスの移動クランプとベース間の少なくとも1つの調節可能な接触部であって、測量基準（datum）Aの調節を可能にするよう構成される少なくとも1つの調節可能な接触部、および画像化デバイスに動作可能に連結し、移動クランプを移動するように構成されるクランプモータを更に備えてもよい。いくつかの実施形態では、カートリッジトレイの上でシステムに動作可能に連結した複数のオフカードバッファ投入弁および複数の廃棄弁の少なくとも1つは、空気圧により調節されてもよい。

【0015】

本発明の別の態様では、ハイブリダイズした標的分子サンプルを精製し、ハイブリダイズした標的分子を画像化するための方法を提供する。この方法は、

（a）ハイブリダイズしたサンプルを受け取ること、ここで、該サンプルは、第1のプロープと第2のプロープにハイブリダイズした標的分子を含む複数のハイブリダイズした複合体、複数のハイブリダイズしていない第1のプロープ、および複数のハイブリダイズしていない第2のプロープを含む；

（b）第1の期間内に、サンプルのハイブリダイズしていない第1のプロープとハイブリダイズした複合体を第1の親和性マトリックスに結合して、第1の混合物を生成すること；

（c）サンプルのハイブリダイズしていない第1のプロープとハイブリダイズした複合体を第1の親和性マトリックスに結合させた後、前記第1の混合物に第1のバッファを流し、ハイブリダイズしていない第2のプロープを該第1の混合物から除去すること；

（d）前記第1の混合物を加熱し、ハイブリダイズしていない第1のプロープおよびハ

10

20

30

40

50

イブリダイズした複合体を第 1 の親和性マトリックスから遊離させ、複数のハイブリダイズした複合体および複数のハイブリダイズしていない第 1 のプローブを含む第 1 の溶出サンプルを溶出すること；

(e) 第 2 の期間内に、第 1 の溶出サンプルのハイブリダイズした複合体を第 2 の親和性マトリックスに結合して、第 2 の混合物を生成すること；

(f) ハイブリダイズした複合体を第 2 の親和性マトリックスに結合させた後、前記第 2 の混合物に第 2 のバッファを流し、ハイブリダイズしていない第 1 のプローブを第 1 の溶出サンプルから除去すること；

(g) 前記第 2 の混合物を加熱し、ハイブリダイズした複合体を第 2 の親和性マトリックスから遊離させ、複数のハイブリダイズした複合体を含む第 2 の溶出サンプルを溶出すること；並びに、

(h) 前記ハイブリダイズした複合体を画像化するために活性結合表面に結合すること；を含む。

【 0 0 1 6 】

本態様の実施形態では、標的分子は、核酸またはタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、第 1 の親和性マトリックスおよび第 2 の親和性マトリックスは、それぞれ、第 1 の磁性ビーズのセットおよび第 2 の磁性ビーズのセットに対応してもよい。いくつかの実施形態では、活性結合表面は、ストレプトアビジン、アビジン（例えば、ニュートラアビジンTM）、またはオリゴヌクレオチドを含んでもよい。

【 0 0 1 7 】

本発明の更なる態様では、ハイブリダイズした標的分子サンプルを精製し、ハイブリダイズした標的分子を画像化する方法を提供する。この方法は、

(a) 本明細書の態様または実施形態のいずれかに記載のカートリッジを設けること；

(b) ハイブリダイズしたサンプルを受け取ること、ここで、該サンプルは、第 1 のプローブと第 2 のプローブにハイブリダイズした標的分子を含む複数のハイブリダイズした複合体、複数のハイブリダイズしていない第 1 のプローブ、および複数のハイブリダイズしていない第 2 のプローブを含む；

(c) 第 1 の期間内に、第 1 の結合チャンバにおいて、サンプルのハイブリダイズしていない第 1 のプローブとハイブリダイズした複合体を第 1 の親和性マトリックスに結合すること；

(d) サンプルのハイブリダイズしていない第 1 のプローブとハイブリダイズした複合体を第 1 の親和性マトリックスに結合させた後、第 1 のバッファを第 1 の結合チャンバに流し、ハイブリダイズしていない第 2 のプローブをサンプルから除去すること；

(e) 第 1 の親和性マトリックスを第 1 の溶出チャンネル内へ方向付けること；

(f) 第 1 の親和性マトリックスを加熱し、複数のハイブリダイズした複合体と複数のハイブリダイズしていない第 1 のプローブを含む第 1 の溶出サンプルを溶出すること；

(g) 第 2 の期間内に、第 2 の結合チャンバにおいて、第 1 の溶出サンプルのハイブリダイズした複合体を第 2 の親和性マトリックスに結合すること；

ハイブリダイズした複合体が第 2 の親和性マトリックスに結合した後、第 2 のバッファを (h) 第 2 の結合チャンバ内に流し、ハイブリダイズしていない第 1 のプローブを第 1 の溶出サンプルから除去すること；

(i) 第 2 の親和性マトリックスを加熱して複数のハイブリダイズした複合体を含む第 2 の溶出サンプルを溶出すること；並びに、

(j) 前記ハイブリダイズした複合体を画像化するために活性結合表面に結合すること；を含む。

【 0 0 1 8 】

本態様の実施形態では、標的分子は、核酸またはタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、第 1 の親和性マトリックスおよび/または第 2 の親和性マトリックスは、それぞれ、第 1 の磁性ビーズのセット（例えば、F 磁性ビーズ）および第 2 の磁性ビーズのセット（例えば、G 磁性ビーズ）に対応する。いくつかの実施形態では、活性結合表

10

20

30

40

50

面は、ストレプトアビジン、アビジン（例えば、ニュートラアビジンTM）、またはオリゴヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、レポータープローブを含む。いくつかの実施形態では、第2のプローブは、捕捉プローブを含む。いくつかの実施形態では、第1の結合チャンバは、F結合チャンバであってもよい。いくつかの実施形態では、第1の期間は、約8分の期間であってもよい。いくつかの実施形態では、第1の磁性ビーズは、約47にて約7分加熱してもよい。いくつかの実施形態では、第2の結合チャンバは、G結合チャンバであってもよい。いくつかの実施形態では、第2のバッファは、F溶出流体であってもよい。いくつかの実施形態では、第2の期間は、約7分の期間であってもよい。いくつかの実施形態では、第2のバッファを、2 μ L前方および1 μ L後方の増分で第2の結合チャンバに添加してもよい。いくつかの実施形態では、第2のバッファは、約+2.8 μ L、+2 μ L、-1 μ L、+2 μ L、-1 μ L、+1.5 μ L、および7 μ Lの増分で添加してもよい。いくつかの実施形態では、第2の磁性ビーズは、約47にて約7分加熱してもよい。いくつかの実施形態では、方法は、一定量の第1の溶出サンプルを親和性マトリックスパッドを介して第1の方向および第2の方向に移動させることを更に含んでもよい。いくつかの実施形態では、第1のバッファは、サンプル/ビーズ混合物を第1のビーズパッドを介して第1の方向および第2の方向に移動させるようにポンピングしてもよい。いくつかの実施形態では、第1のバッファは、約+15 μ Lおよび-15 μ Lの増分で添加してもよい。上述の任意の態様および実施形態を他の任意の態様および実施形態と組み合わせることもできる。

【0019】

他に規定されない限り、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、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書では、単数形は、文脈が明確に別途指示しない限り、複数形も含む。例として、用語「a」、「an」および「the」は単数または複数であると理解され、用語「または」は包括的であると理解される。例として、「1つの要素(an element)」は1つ以上の要素(one or more element)を意味する。本明細書を通して、「含む(comprising)」という用語または「含む(comprises)または(comprising)」といった変形は、記載された要素、整数、または工程、あるいは要素、整数または工程の群を含めるという意図であるが、他の要素、整数、または工程あるいは要素、整数または工程の群を除外するという意図ではないと理解される。「約」という用語は、記載された値10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%以内であると理解される。文脈から他に明らかな限り、本明細書で提供される全ての数値は、用語「約」によって修飾される。

【0020】

本明細書に記載された方法および材料と類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれるが、本明細書で引用した参考文献は、特許請求された発明の先行技術であると認めるという意味ではない。矛盾がある場合、定義を含め本明細書が支配する。さらに、材料、方法、および実施例は例示に過ぎず、限定する意図ではない。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および請求項から明らかになるであろう。

【0021】

特許または特許出願には、カラーで記載される少なくとも1つの図面が含まれる。カラー図面付きの特許または特許出願の刊行物のコピーは、要求により必要な料金を支払えば庁によって提供される。

【0022】

添付書類および/または図面は、本明細書にかかる様々な非限定的な例示的かつ革新的な態様を示す。

【図面の簡単な説明】

【0023】

10

20

30

40

50

【図 1 A】図 1 A は、いくつかの実施形態にかかる主要なプロセスのブロック図を示す。

【 0 0 2 4 】

【図 1 B】図 1 B は、いくつかの実施形態にかかる基本的な化学原理を示すブロック図を示す。

【図 1 C】図 1 C は、いくつかの実施形態にかかる基本的な化学原理を示すブロック図を示す。

【図 1 D】図 1 D は、いくつかの実施形態にかかる基本的な化学原理を示すブロック図を示す。

【図 1 E】図 1 E は、いくつかの実施形態にかかる基本的な化学原理を示すブロック図を示す。

10

【 0 0 2 5 】

【図 2】図 2 は、いくつかの実施形態にかかる精製および画像化プロセスを示す詳細な論理フロー図である。

【 0 0 2 6 】

【図 3 A】図 3 A は、流体カートリッジの写真に脚注をつけたものを示す。

【 0 0 2 7 】

【図 3 B】図 3 B は、2 つの精製を行う流体層を示す。

【 0 0 2 8 】

【図 4】図 4 は、いくつかの実施形態にかかるカートリッジを構築するための層の積み重ねを説明する絵図を示す。

20

【 0 0 2 9 】

【図 5】図 5 は、流体機能および画像化機能の両方を実行する装置を説明する絵図を示す。

【 0 0 3 0 】

【図 6 A】図 6 A は、いくつかの実施形態に係るカートリッジ内へのサンプル投入箇所を説明する絵図を示す。

【 0 0 3 1 】

【図 6 B】図 6 B は、いくつかの実施形態に応じて（クロスコンタミネーションを防止するために）、サンプル投入後にテープを貼る場所、テープをパッファポートから除去する場所を示す。

【 0 0 3 2 】

30

【図 7】図 7 は、いくつかの実施形態に係る機器を説明する絵図を示す。

【図 8】図 8 は、いくつかの実施形態に係る機器を説明する絵図を示す。

【図 9 A】図 9 A は、いくつかの実施形態に係る機器を説明する絵図を示す。

【図 9 B】図 9 B は、いくつかの実施形態に係る機器を説明する絵図を示す。

【 0 0 3 3 】

【図 1 0】図 1 0 は、いくつかの実施形態に係る画像化カートリッジを説明する絵図を示す。

【 0 0 3 4 】

【図 1 1】図 1 1 は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

40

【 0 0 3 5 】

【図 1 3 A】図 1 3 A は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

【 0 0 3 6 】

【図 1 5】図 1 5 は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

【図 1 6】図 1 6 は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、いくつかの実施形態に係るサンプルの精製を説明する絵図を示す。

50

【 0 0 3 7 】

【 図 1 8 】 図 1 8 は、いくつかの実施形態に係る精製したサンプルの画像化表面への移動を説明する絵図を示す。

【 0 0 3 8 】

【 図 1 9 A 】 図 1 9 A は、いくつかの実施形態に係るサンプルの画像化表面への添加を説明するグラフを示す。

【 図 1 9 B 】 図 1 9 B は、いくつかの実施形態に係るサンプルの画像化表面への添加を説明するグラフを示す。

【 0 0 3 9 】

【 図 2 0 】 図 2 0 は、いくつかの実施形態に係る精製サンプルの画像化表面への結合を説明する絵図を示す。

10

【 図 2 1 】 図 2 1 は、いくつかの実施形態に係る精製サンプルの画像化表面への結合を説明する絵図を示す。

【 0 0 4 0 】

【 図 2 2 】 図 2 2 は、3種のnCounter（登録商標）PanCancer パネルについて、nCounter（登録商標）Analysis Systemにより得られた結果と、本発明のいくつかの実施形態により得られた結果の比較を示すグラフである。

【 0 0 4 1 】

【 図 2 3 】 図 2 3 は、発明のいくつかの実施形態により得られた遺伝子示差的発現のデータを示すグラフである。

20

【 0 0 4 2 】

【 図 2 4 】 図 2 4 は、全RNAまたは生細胞溶解物の検出を示すグラフである。

【 0 0 4 3 】

【 図 2 5 】 図 2 5 は、新鮮凍結組織またはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織の全遺伝子発現の検出を示すグラフである。

【 0 0 4 4 】

【 図 2 6 】 図 2 6 は、PanCancer Progression パネルについて、nCounter（登録商標）Analysis Systemにより得られた結果と、本発明のいくつかの実施形態により得られた結果の比較を示すグラフである。

【 0 0 4 5 】

30

【 図 2 7 】 図 2 7 は、Human Immunology パネルについて、nCounter（登録商標）Analysis Systemにより得られた結果と、本発明のいくつかの実施形態により得られた結果の比較を示すグラフである。

【 0 0 4 6 】

【 図 2 8 】 図 2 8 は、コピー数多型（CNV）解析において、nCounter（登録商標）Analysis Systemにより得られた結果と、本発明のいくつかの実施形態により得られた結果の比較を示すグラフである。

【 0 0 4 7 】

【 図 2 9 】 図 2 9 は、miRNA解析において、nCounter（登録商標）Analysis Systemにより得られた結果と、本発明のいくつかの実施形態により得られた結果の比較を示すグラフである。

40

【 0 0 4 8 】

【 図 3 0 】 図 3 0 は、RNA - タンパク質プロファイリングデータについて、nCounter（登録商標）Analysis Systemにより得られた結果と、本発明のいくつかの実施形態により得られた結果の比較を示すグラフである。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 9 】

図面内の各参照番号の先頭の数字は、その参照番号が導入および／または詳細化された図面番号を示す。このように、参照番号 1 0 1 の詳細な議論が図 1 に見られるおよび／または導入されるであろう。同様に、参照番号 2 0 1 は図 2 に導入され、この後もまた然り

50

である。

【 0 0 5 0 】

本開示のいくつかの実施形態を詳細に説明する前に、そのような実施形態は、記載された特定の変形例に限定されず、当然改変し得ることが理解されるべきである。ここに開示された本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、記載された実施形態に様々な変更を加えることができ、均等物を置換することもできる。さらに、特定の状況、材料、組成物、プロセス、プロセス行為または工程を適合させるために、本開示の目的、精神または範囲に多くの改変をすることができる。そのような改変はすべて、本開示によってサポート任意のそしてすべての請求項の範囲内にあるものとする。

【 0 0 5 1 】

本明細書に列挙された方法は、論理的に可能な列挙された任意の順序、および列挙された順序で実行されてもよい。さらに、ある範囲の値を示す場合、その範囲の上限と下限との間のすべての値、並びにその記載された範囲内の他の記載または介在値も、本開示の実施形態に包含されることが理解される。また、本明細書に記載された開示された実施形態のいずれか 1 つおよび / または他の任意の特徴は、独立して、または本明細書に記載される任意の 1 つ以上の特徴と組み合わせて説明および請求され得ることが企図される。

【 0 0 5 2 】

単数品目への言及は、複数の同じ品目が存在する可能性を含む。より具体的には、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるような単数形「a」、「and」、「said」、および「the」は、文脈がそうでないことを明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。さらに、任意の要素を排除するように請求項に記載することができることに留意されたい。したがって、この記述は、請求項の構成要素の列挙または「否定的」制限の使用に関連して、「専ら(solely)」、「のみ(only)」などのような排他的な用語を使用するための前提としての意図である。本明細書中で他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、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、サンプル（例えば、核酸サンプル）を読み取るユーザは、サンプルを精製および検出するために単一のデバイスを使用することを望むことがある。いくつかの実施形態では、両方の目的のために単一のデバイスを使用することにより、処理時間、汚染の可能性、画像解析の実施コストを低減し、システム全体のコストを削減し、手 / 時間 / ステップを低減することができる。

【 0 0 5 4 】

図 1 A ~ E は、いくつかの実施形態に係る精製および画像化プロセスを説明するブロック図を示す。例えば、機器のユーザは、プロセッシングのためにサンプルをハイブリダイズおよび / または他の方法で調製してもよい。図 1 B を参照すると、いくつかの例では、ユーザは、例えば標的核酸 1 1 4 に結合するように構成され、磁性ビーズに結合するように構成される親和性タグを含むプローブを用いて標的核酸 1 1 4 をハイブリダイズしたいと希望することがある。標的核酸 1 1 4 は、全ての形態の核酸（例えば、RNA、DNA、および / またはマイクロ RNA など）を含んでもよい。タンパク質および / または捕捉プローブおよび / またはレポータープローブに結合することができる任意の他の分子（例えば、核酸中間体により検出可能であってもよい）を解析のためにハイブリダイズさせてもよい。例えば、ハイブリダイゼーションは、標的核酸を捕捉プローブ 1 1 6 およびレポータープローブ 1 2 0 と混合することを含んでもよい。捕捉プローブ 1 1 6 は、複合体を画像化表面に結合させるために使用されるビオチン部分、および / または F 磁性ビーズに結合するように構成される F タグを含んでもよい。レポータープローブ 1 2 0 は、画像化プロセスで使用される蛍光バーコード、および / または G 磁性ビーズに結合するように構成される G タグを含んでもよい。標的核酸 1 1 4 がレポータープローブおよび捕捉プローブに結合すると、ハイブリダイズした三成分複合体 1 2 4 が形成されてもよく、その後、この複合体を画像化および / または同様のプロセスのために精製してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

図 1 B に示すように、2 つの約 5 0 塩基対のプロープが溶液中の各標的分子に直接ハイブリダイズして、ハイブリダイズした三成分複合体を形成する。レポータープロープは特定の蛍光バーコードを担持し、捕捉プロープは後に三者複合体を画像化表面に結合させるビオチン部分を含む。両方のプロープに、磁性ビーズによる精製および固定に必要とされる親和性タグ（「F」または「G」と呼ぶ）が含まれる。

【 0 0 5 6 】

図 1 A を参照すると、ユーザは、サンプルをピペッティングにより、（例えば、ハイブリダイズした核酸サンプルおよび／または同様にハイブリダイズした生物学的サンプル）を、機器のカートリッジトレイ内に配置されるように構成されるサンプルカートリッジに投入してもよい（1 0 2）（本開示の態様／実施形態により自動的に操作してもよい）。ハイブリダイズした生物学的サンプルは、遺伝子に結合していないと思われるハイブリダイズしていないプロープ（例えば、過剰のプロープ）を含んでもよい。カートリッジは、磁性ビーズを保持するように構成されるパッド（例えば、ガラスファイバーパッド）を有してもよい。磁性ビーズは、F ビーズ、G ビーズ、および／または同様の複数の異なる種類のものであってもよい。いくつかの実施形態では、F ビーズは、捕捉プロープ上に見られる反復配列の逆相補物である DNA オリゴヌクレオチドに結合した磁性ビーズであり、精製中にハイブリダイズした複合体および遊離の捕捉プロープおよび／またはレポータープロープを分離するための親和性マトリックスとして使用される。磁性ビーズは、ビーズを安定化させ、サンプル中に懸濁させるために、バッファおよび糖（例えば、トレハロース）と共に乾燥させてもよい。カートリッジは、オフカードバッファ弁（例えば、図 9 A の 9 0 2 を参照）からバッファを受容するように構成されるオンカードバッファ投入弁と、結合チャンバ、溶出チャンバ、および／または精製プロセスに使用される同様のエリアと、使用済み溶出流体を保持するように構成される廃棄容器との間の流れを制御するように構成される空気圧バルブとを含めて構成してもよい。

【 0 0 5 7 】

カートリッジは、以下の構成要素を含む多層カートリッジ（例えば、図 4 の 4 0 2 参照）であってもよい：

【 0 0 5 8 】

【表 1】

層	材料	色
1	250 μ m Melinex (登録商標)	白
2	250 μ m ACA	青
3	250 μ m PDMS	黄色
4	120 μ m PDMS	赤
5	250 μ m ACA	緑
6	3 mm PMMA	灰色

【 0 0 5 9 】

図 1 A を参照すると、ハイブリダイズしたサンプルから少なくとも 1 種類の過剰なプロープ（例えば、レポータープロープ）を除去するように構成される乾燥磁性ビーズ（例えば、捕捉プロープ上の反復配列に相補的な 15 - mer DNA オリゴヌクレオチド、5' - GCT GTG ATG ATA GAC - 3'（配列番号 1）を結合した F 磁性ビーズ（例えば、F ビーズ、抗 F 磁性ビーズ））にサンプルを導入してもよい（例えば、図 1 A の

104を参照)。Fビーズは、パッド上で5×SSPEおよび40%トレハロース中で乾燥させてもよい(例えば、図3Aの309を参照;ビーズパッドは、部分的にバブルベントの下に隠れている)。いくつかの実施形態では、Fビーズおよびサンプルは、ハイブリダイズした三成分複合体分子へのFビーズの結合を促進するように(例えば、図1Cの126を参照)、そしてハイブリダイズしていないプローブ(例えば、レポータープローブ)の少なくともいくつかはサンプルから洗い流されるようにビーズを洗浄可能なように(例えば、図1Cの128を参照)構成される結合チャンバ内で結合されてもよい(例えば、図3Aおよび3Bの308を参照)。結合チャンバは、ビーズが加熱され(例えば、47に)、サンプルが溶出する(例えば、図1Cの130を参照)ことを可能にする溶出チャンネル(例えば、図3Aおよび図3Bの310参照)で構成されてもよい。

10

【0060】

次に、サンプルは、ハイブリダイズした三成分複合体分子(例えば、図1Cの132を参照)のレポータープローブに結合可能な(レポータープローブ上の反復配列に相補的な15-mer DNAオリゴヌクレオチド、5'-GGTCTGTGTGATGTT-3'(配列番号2)に結合した別の磁性ビーズのセット(例えば、G磁性ビーズ、Gビーズおよび/または抗G磁性ビーズとしても知られる)を保持するように構成されてもよい、第2の磁性ビーズ結合チャンバに送達される(例えば、図1Aの106および図3Aと図3Bの304を参照)。第2の磁性ビーズ結合チャンバ(例えば、図3Aおよび図3Bの314参照)は、ハイブリダイズしたサンプルから別のタイプのプローブ(例えば、捕捉プローブ)の過剰分子を除去するようにサンプルを洗浄可能であってもよい。Gビーズは、20×SSPEおよび40%トレハロースのパッド上で乾燥させてもよい(例えば、図3Aの312参照)。また、Gビーズ結合チャンバは、ビーズからのハイブリダイズした三成分複合体分子の溶出(例えば、47での溶出)(例えば、図1Cの136を参照)を促進し得る溶出チャンネル(例えば、図3Aおよび図3Bの315参照)で構成されてもよい。

20

【0061】

図1Cに示すように、ベンチトップハイブリダイゼーション後、サンプルをnCounter(登録商標)機器に移す。過剰なプローブは、磁性ビーズによる2回の精製によって除去される。第一に、抗F磁性ビーズは、三成分複合体ならびに結合していない捕捉プローブに結合する。結合していないレポータープローブは洗い流され、残りの成分は溶出される。第二に、抗G磁性ビーズはレポータープローブに結合する。この状態で、全ての残りのレポータープローブは、それぞれの標的核酸にハイブリダイズする。結合していない捕捉プローブは洗い流される。最終的な溶出工程により、精製された三成分複合体のみが残る。

30

【0062】

別の例は、磁性ビーズの代わりに多孔性ポリマーマトリックスを使用する。表面は、オリゴヌクレオチドを付着させることによって活性化することができる。これらの多孔性ポリマー材料は、非常に安価な基材であり、磁性ビーズと比較して大幅なコスト削減をもたらす。1つの有効な多孔質ポリマーマトリックスは、25mm、75mm、および125mmの公称孔径を有する高密度ポリエチレンである。

【0063】

図1Aを参照すると、次に、サンプル(現時点で、過剰なプローブ分子から精製されている)は、画像化表面(例えば、ストレプトアビジン表面)に送達され(108)、画像化のため拡げて固定化する(110)。例えば、図1Dを参照すると、三成分複合体内の捕捉プローブ中のビオチン部分が、画像化表面に結合できる(138)。機器は、次に、バッファ流体および/または同様の流体を、マイクロ流体カートリッジ(例えば、図3Aの316を参照)の画像化表面上に流し、該表面上で複合体を伸長しアラインさせることができる(140)。いくつかの実施形態では、バッファ流体および/または同様の流体は、三成分複合体中のレポータープローブの画像化表面への結合を促進し得る分子(例えば、ビオチン化抗Gオリゴヌクレオチドおよび/または同様の分子)も含んでもよい(142)。次いで、機器は、サンプル中の複合体を検出して、得られる検出された分子の図

40

50

的および／または数値的な値を生成できる（１１２）。例えば、機器は、三成分複合体中のレポータープローブの蛍光バーコードを計数し、対応する分子標的に計数したカウントを照合させてサンプル中の分子を同定するように構成される（例えば、図１Ｅ参照）落射蛍光顕微鏡を含んでもよい。

【００６４】

図１Ｄに示すように、精製後、サンプルは、ストレプトアビジンで被覆された画像化表面に移動する。各捕獲プローブ上のビオチン部分は画像化表面に結合する。次いで、マイクロ流体カートリッジ内の流れにより、三成分複合体が伸長しアラインする。固定化バッファは、レポータープローブを画像化表面に固定するビオチン化抗Ｇオリゴヌクレオチドを含有する。

【００６５】

図１Ｅに示すように、サンプルは、nCounter（登録商標）機器を備えた落射蛍光顕微鏡によって画像化される。バーコードを計数し、対応する標的と照合する。各標的のカウントは、コンマ区切りの値のファイルにエクスポートされる。

【００６６】

図２は、いくつかの実施形態に係る精製および画像化プロセスを説明するブロック図を示す。例えば、ユーザは、サンプル（例えば、生物学的サンプル；図１Ｂの１１４を参照）を、過剰の捕捉プローブおよびレポータープローブ（例えば、図１Ｂの１１４参照）に約６５でハイブリダイズさせてもよい（２０２）。その後、ユーザは、ハイブリダイズしたサンプルを（例えば、ハイブリダイズしたサンプルの一部をピペティングすることにより）、生物学的サンプルを保持するように構成されるサンプル投入エリア（例えば、図３Ａの３０２、図６Ａの６０２を参照）に載置する（２０４）。サンプル投入エリア内のサンプル投入ポートは、ピペット操作を容易にするために、円錐形であってもよい。ユーザは、サンプルを移動するためにシングルチャンネルまたはマルチチャンネルピペットを使用してもよい。いくつかの実施形態では、ユーザは、（例えば、図６Ｂの６０４に示すような透明なテープを用いて）サンプル投入口をシールし、機器からバッファを受けるように構成されるバッファ投入エリア（例えば、図３Ａの３０４参照）からシール（例えば、図６Ｂの６０６に示すような不透明テープ）を除去してもよい。

【００６７】

ユーザは、機器内のカートリッジトレイ（例えば、図７のトレイ７０２）上にカートリッジを載置してもよい（２０６）。図８～９Ｂは、クランプモータおよび／またはカートリッジを保持し、移動させ、加熱し、サンプルをカートリッジ上で画像化し、流体をカートリッジに投入・排出する他の機構を示す。例えば、カートリッジトレイは、トレイが機器の内部を移動するときに機器ネストに装填されてもよく、流体マニホールドとカートリッジの上に動作可能に接続された撮像基準面に接続してもよく、ここでヒーターおよび底部接触点がカートリッジの下に配置され、カートリッジを流体マニホールドに対して押し上げ、カム機構およびバネを用いて基準物を結像するように構成されてもよい（例えば、図８および図９Ｂ参照）。さらに、機器は、カードに接続して流体をカートリッジに供給するか、またはカートリッジから使用済みの流体をそれぞれ取り除くことが可能なオフカードバッファ投入弁９０２および廃棄弁９０４に動作可能に連結された流体マニホールド９０６を含んでもよい。

【００６８】

デバイスは、カートリッジが正しく装填されたかどうかを自動的に判定し、試薬（例えば、バッファ）および廃棄ボトル（例えば、図５の５０２）がカートリッジに正しく接続されていることと、試薬ボトルが十分なレベルのバッファおよび／又同様の流体を有することを確認してもよい。いくつかの実施形態では、ユーザは、より多くの流体が必要な場合および／または同様の場合、（例えば、図５のスクリーン５０４を介して）ユーザは試薬ボトルを交換するように促されてもよい。

【００６９】

次いで、機器は、サンプルを、サンプル投入エリアから流体の流れ（例えば、３０μL

10

20

30

40

50

により、気泡を含むバブルベントおよび/またはトラップ（例えば、疎水性膜；図 3 A の 3 0 6 参照）を介して移動することにより、サンプルをバッファから分離してもよい。この気泡は、液体を 2 つに分離することによってサンプルの分散を防止する。いくつかの実施形態では、結合チャンバ（例えば、F 結合チャンバおよび G 結合チャンバなど）は、磁性ビーズおよび/またはサンプルを精製するための他の分子結合装置を保持することができる。F 結合チャンバは、ハイブリダイズしたサンプル中の過剰プローブ分子（例えば、過剰レポータープローブ分子）に結合するように構成されてもよい乾燥 F 磁性ビーズを保持してもよい（例えば、図 1 C の 1 2 6 を参照）。機器は、余分な捕捉プローブおよびサンプル分子への F ビーズの再懸濁および結合をより促進するために、多孔性ビーズパッド上のポンプでサンプルおよびビーズ（例えば、15 μ L を前後に繰り返して）を移動させてもよい（2 1 0）（例えば図 1 1 参照）。F ビーズを溶液から沈殿させてもよい。したがって、それらを溶液中に懸濁させるための移動が必要な場合がある。バブルベント（例えば、図 1 0 の 1 0 0 2 を参照）は、サンプル投入エリア（例えば、図 1 0 の 1 0 0 4 参照）と F 結合チャンバ（例えば、図 3 A および図 3 B の 3 0 8 参照）との間に物理的に配置されてもよく、気泡、特に、混合および結合が終了した後のサンプルとバッファとの間の大きな気泡を除去するように構成することができる。しかし、バブルベントを通して空気を引き込む代わりにサンプルを引き戻すのに十分な背圧を維持するために、サンプルとバッファとの間の気泡は、この混合プロセス中にバブルベントを通過しないことが重要である。

10

【0070】

20

いくつかの実施形態では、サンプルを前後に流して移動させる代わりに、一対の磁石をチャンバに通して前後に移動させてもよい。磁石は、混合に適した複素磁場を生成するために対で使用してもよい。磁石の上および磁石間のデッドスポットは、良好な混合のために重要であることがある。磁石の速度は、チャンバの大きさおよびビーズの量（例えば）に関連することがある。

【0071】

結合プロセスは、いくつかの実施形態では、少なくとも 8 分（例えば）持続させてもよい。次いで、F ビーズへハイブリダイズしたサンプルを混合する間に、バブルベントからの気泡を除去してもよい（2 1 2）。カートリッジに平行に移動するように構成される機器内の磁石（例えば、F マグネット；図 1 2 の 1 2 0 2 参照）により、F ビーズを F 結合チャンバの下に移動して回収し（2 1 4）、バッファ投入エリアから添加した溶出バッファで洗浄する際に保持（2 1 6）してもよい。溶出バッファにより、F ビーズから少なくとも 1 つの種類のハイブリダイズしていないプローブ（例えば、ハイブリダイズしていないレポーターまたは捕捉プローブ）の除去を促進してもよい（例えば、図 1 C の 1 2 8 参照）。多段洗浄工程の間、磁石を移動させることによってビーズを F 結合チャンバ内で移動させることができる（例えば、図 1 3 A の 1 3 0 2 参照）。この移動およびビーズの広がりにより、捕捉されたビーズのより良好な洗浄が可能になるようにしてもよい。

30

【0072】

次いで、ビーズを磁石により F 溶出チャンネル（例えば、図 3 A および図 3 B の 3 1 0 も参照）に押し込んでよく（2 1 8）、F 溶出チャンネルをヒーター（例えば F ヒーター；図 1 3 B の 1 3 0 4 参照）に接続して F ビーズを加熱する（例えば、4 分間 47 $^{\circ}$ C に）（2 2 0）ように構成し、F ビーズからサンプル分子を溶出させてもよい（例えば、図 1 C の 1 3 0 参照）。溶出サンプルが第 2 の結合チャンバ（例えば、図 3 A または 3 B の G 結合チャンバ、3 1 4 参照）内に移動されるとき（2 2 4）、加熱プロセス後の F ビーズを、第 2 の磁性ビーズのセット（例えば、G 磁性ビーズ）のハイブリダイズした三成分複合体分子への結合を容易にするように構成されている F 結合チャンバ（例えば、図 1 4 参照）に戻してもよい（2 2 2）。

40

【0073】

適切なビーズの再懸濁およびサンプルの結合を達成するために、G 磁性ビーズおよび溶出サンプルと共に段階的な流体導入および流体混合プロセスを利用してもよい（2 2 6）

50

。G磁性ビーズは、レポータープローブおよび/またはサンプル分子に依然として付着している可能性のある他のプローブに結合してもよい(例えば、図1Cの132参照)。例えば、G結合チャンバへのF溶出サンプルの導入は、2 μ L前進させその後1 μ L後退させる小さな段階を繰り返し行ってもよい。流体を前後させると、Gビーズを再懸濁させるのに役立ち、ビーズパッド/ビーズポケットサイズの小さな差異に対するシステムの感度が低減する。この前後の混合は、多孔性のパッドを介して行うことができる。いくつかの実施形態では、正確なフロープロファイルは、+ 5 μ L、- 4 μ L、+ 5 μ L、- 4 μ L、+ 5 μ Lであってもよい。特定の期間、結合を行い、その後更に7 μ Lを導入してもよい。いくつかの実施形態(例えば、図15参照)では、すべての溶出物がレーンに流入するまで(1504)、溶出物を一度に1つのレーンに流してもよい(1502)(例えば、プロセスは7分かかる)。

10

【0074】

分子(例えば、トレハロースおよび遊離アビジン)を除去するために、Gビーズが溶出サンプルに結合している間、画像化チャンバを洗浄してもよい(228)。全てのGビーズを回収し、それらを磁石(例えば、G磁石;図12の1204参照)でG結合チャンバの下に移動させ(230)、F結合および溶出チャンバを加熱する(例えば、35 に)(232)ヒーター(例えば、Fヒーター)として保持してもよい。一方、Gビーズから過剰のハイブリダイズしていない捕捉プローブ(例えば、図1Cの134参照)の除去を促進するために、溶離バッファ(例えばヒーターによって加温された)をGビーズ上で洗浄してもよい。次いで、ビーズを、磁石を介してG溶出チャンバ(例えば、図3Aおよび3Bの315および図16の1602および1604を参照)に移動し(234)、Gビーズから精製された試料(例えば、三成分複合体)を放出するように構成されている第2のヒーター(例えば、Gヒーター;図13Bの1306、図17の1702参照)をつけてもよい(236)。

20

【0075】

Gヒーターは、サンプルをビーズから放出させるために47 で4分間運転してもよい(例えば、図1Cの136を参照)。次いで、Gビーズを結合チャンバに戻すよう磁石を移動し(238)、精製されたサンプルを、SA表面の結合エリア(例えば、図3Aおよび図3Bの316参照)に移動させてもよい(例えば、図18参照)(240)。チャンバへの流速は、チャンバの体積の約半分以下の量(例えば、78秒毎に約0.25 μ L)であるステップで実行されてもよい。小さな溶出量と制御されたフロー(重力の代わりにシリンジポンプを使用)を用いると、より迅速かつ効率的な結合を可能にする。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、SA表面に結合する溶出サンプルの流量を等しくするために、12レーンの動的シーケンシングを行ってもよい。例えば、各レーンにつき76秒ごとに約0.25 μ Lを流してもよい。ステップは順番通りに行ってもよい、各レーン(例えば、レーン1~12)につき順番に6.3 μ 秒ごとに0.25 μ Lステップを実行してもよく、各0.25 μ Lステップごとに1レーンにつき12 \times 6.3 = 75.6秒の待機時間になることがあってもよい。12個の弁は12個の別々のレーンに対し順番に開閉し、小さな体積しか移動させないことがあるので、個々の弁の排出量のずれがレーン間のレポーターカウント数を大きく変動させることがある。ポンプからの排出量のずれそれ自体は、さほどばらつきに影響しないかもしれないが、弁による排出量のずれが、はらつきに大きな影響を与える可能性がある。各弁の排出量を、弁の閉鎖対開放状態の圧力読み取り値の違いを利用することによって推定してもよい(例えば、図19Aの1902参照)。レーン間のばらつきを最小限に抑えるには、レーンを並べ替えることによって排気量のずれを最小限に抑える必要があり得る。はらつきを最小限に抑えるために、機器により、排出量が最大の弁から押し始め、次に2番目に高い弁という順番で、排出量が最小の弁で終わるようにしてもよい。最小のものから最大のものへ移るのは、最も悪影響を及ぼし得る。補正するために、機器を単一のレーンに対し0.083 μ L過剰に(例えば、0.25 μ Lではなく0.333 μ L;図19Bの1904参照)押すように構成してもよい。

40

50

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態（例えば、図 2 0 ）では、S A 表面はストレプトアビジンで被覆された表面であってもよく、サンプル 2 0 0 2 内のハイブリダイズしたプローブに結合してもよい（例えば、図 1 D の 1 3 8 も参照）。そこで、少なくとも G フック（ビオチン化された抗 G 1 5 m e r オリゴ）、マウント媒体（抗退色）、および基準物（マルチスペクトルビオチン化蛍光 1 0 0 n m ビーズ、つまり回折が限定されている）を含む単一の溶液を特定の流量で S A 表面に添加することにより（例えば、利用可能な流量を示すグラフである図 2 1 の 2 1 0 4 参照）、精製された第 2 溶出サンプル中の分子を S A 表面上で伸張り固定化してもよい（例えば、図 2 1 の 2 1 0 2、図 1 D の 1 4 0 および 1 4 2 を参照）。G フックは、伸張中にレポーターの第 2 の端部を固定するために使用される。マウント媒体は、（D N A 骨格を破壊し得るフリーラジカルを生成する色素との光相互作用に起因する）D N A の光退色および光破壊を防止するために存在する。基準物は、画像をアラインするために使用される（すべてのチャンネルで）蛍光信号を生成する。従前のエレクトロ拡張ベースの固定化プロセスでは、G フック、マウント媒体、基準物および拡張バッファは、別個の溶液中に存在することが必要であった。いくつかの実施形態では、本プロセスは 4 つのバッファを使用しなくて済み、電極および電源の必要性を排除することができる。これはまた、G フックが従来の設計では電極に滑り込み、その後のサンプルランに持ち越されることによって引き起こされる G フックの汚染問題を解消することもできる。次いで、機器は、カートリッジ上の S A 表面から広がった分子を検出し、ユーザのための出力（例えば、画像、レポートなど）を生成することができる（2 4 4 ）（例えば、図 1 E の 1 4 4 を参照）。いくつかの実施形態では、機器は、3 つの L E D 照明システムを使用する低コストの光学サブコンポーネントを有してもよい。

10

20

【 0 0 7 8 】

機器は、密度に基づく結合勾配および面積最適化を実行することもできる。ストレプトアビジン表面への結合は、一方の端部（入口）での密度が高く、他方の端部（出口）に向かって徐々に減少する、チャンネル上のレポーター結合勾配を生成し得る。最初の走査的測量によって決定されたレポーター密度に基づいて、最適なデータ収集のための画像化領域の位置を選択することができる。高密度側（入口端に近い）に最終的な走査領域を選択すると、一般により多くのデータを収集することができる。しかしながら、結合密度が高すぎる場合、走査領域を入口端から遠くに移動させることにより、走査をより密度の低い領域から開始してもよい。このスキームは、サンプル濃度の動的範囲を増加させる。

30

【 0 0 7 9 】

画像化の間に、マウント媒体を交換し、遊離レポーターを排除することによって残存する非機能的レポーターの非特異的結合を最小限に抑え、光破壊を最小限にすることができる。遊離レポーターが画像化チャンバ内に浮遊状態で残っている場合、画像化バッファの流れによりそれらを洗い流し、溶液中の G フックを介した結合を妨げる。

【 0 0 8 0 】

本発明に関連する追加の教示は、各々が参照によりその全体が本明細書に援用される米国特許出願第 2 0 1 1 / 0 0 8 6 7 7 4 号、米国特許出願第 2 0 1 1 / 0 1 4 5 1 7 6 号、米国特許出願第 2 0 1 1 / 0 2 0 1 5 1 5 号、米国特許出願第 2 0 1 1 / 0 2 2 9 8 8 号、米国特許出願第 2 0 1 3 / 0 0 0 4 4 8 2 号、米国特許出願第 2 0 1 3 / 0 0 1 7 9 7 1 号、米国特許出願第 2 0 1 3 / 0 1 7 8 3 7 2 号、米国特許出願第 2 0 1 3 / 0 2 3 0 8 5 1 号、米国特許出願第 2 0 1 3 / 0 3 3 7 4 4 4 号、米国特許出願第 2 0 1 3 / 0 3 4 5 1 6 1 号、米国特許出願第 2 0 1 4 / 0 0 0 5 0 6 7 号、米国特許出願第 2 0 1 4 / 0 0 1 7 6 8 8 号、米国特許出願第 2 0 1 4 / 0 0 3 7 6 2 0 号、米国特許出願第 2 0 1 4 / 0 0 8 7 9 5 9 号、米国特許出願第 2 0 1 4 / 0 1 5 4 6 8 1 号、米国特許出願第 2 0 1 4 / 0 1 6 2 2 5 1 号、米国特許出願第 2 0 1 4 / 0 3 7 1 0 8 8 号、米国特許出願第 2 0 1 5 / 0 0 7 2 0 2 1 号、米国特許出願第 2 0 1 5 / 0 2 5 2 4 4 0 号、米国特許第 7 , 4 7 3 , 7 6 7 号、米国特許第 7 , 9 1 9 , 2 3 7 号、米国特許第 7 , 9 4 1 , 2 7 9 号、米国特許第 8 , 1 4 8 , 5 1 2 号、米国特許第 8 , 4 1 5 , 1 0 2 号、米国

40

50

特許第 8, 492, 094 号、米国特許第 8, 519, 115 号、米国特許第 8, 986, 926 号、米国特許第 9, 066, 963 号、および米国特許第 9, 181, 588 号の 1 つ以上に記載される。

【0081】

以下の実施例は、例示のために設けるものであって、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0082】

本開示の実施形態は、遺伝子発現およびタンパク質合成の優れた検出および定量を提供する。

【0083】

図 22 に示すように、実施形態では、3 つの nCounter (登録商標) PanCancer パネル (PanCancer Pathways パネル、PanCancer Progression パネル、および PanCancer Immune Profiling パネル) から標的を効果的に検出する。ここで、実施形態から得られたデータ (「nCounter SPRINT Profiler」として識別される) は、nCounter (登録商標) Analysis system から得られたデータと相関する。図 23 に示すように、実施形態は、リンパ腫サンプルにおいて示差的に発現される遺伝子の同定を可能にする。図 24 に示すように、実施形態は、精製された全 RNA または生細胞溶解物中の遺伝子発現を検出することができる。解析が必要とするサンプルの調製は限定的であることは注目に値する。図 25 に示すように、実施形態は、新鮮な凍結組織およびホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を含むが、これらに限定されない様々なサンプルタイプによる遺伝子発現の信頼性の高い検出を提供する。図 26 に示すように、実施形態は、PanCancer Progression パネルの遺伝子発現を効果的に検出し、nCounter (登録商標) Analysis system で得られた結果に関して高度に相関した結果を検出する。本発明の実施形態 (「SPRINT」として識別される) が、nCounter (登録商標) Analysis system で使用されるもの (「Analysis system」として識別される) の半分のサンプル投入量 (重量による) しか使用していないことは注目に値する。図 27 に示すように、実施形態は、ヒト免疫学パネルにおいて標的を効果的に検出する。ここで、実施例から得られたデータ (「nCounter SPRINT Profiler」として識別される) は、nCounter (登録商標) Analysis system から得られたデータと相関する。実施形態は、コピー数多型 (CNV) 解析において標的を効果的に定量化する。同等のコピー数データが、本発明の実施形態 (「nCounter SPRINT Profiler」として識別される) および nCounter (登録商標) Analysis system 上で実行される DNA サンプルについて得られた。ここで、各遺伝子のコピー数データは、X 軸上の目盛りに記載される。したがって、(本発明の実施形態からのデータ) および (nCounter (登録商標) Analysis system からのデータ) を含む垂直関連対 (vertically-related pair) が、特定の遺伝子のデータを表す。図 29 に示すように、実施形態は miRNA 標的を効果的に検出する。ここで、実施形態から得られたデータは、nCounter (登録商標) Analysis system から得られたデータと相関する。図 30 に示すように、実施形態は RNA およびタンパク質標的を効果的に検出する。ここで、実施形態 (「nCounter SPRINT Profiler」として識別される) から得られたデータは、nCounter (登録商標) Analysis system から得られたデータと相関する。

【0084】

本出願に示す特許、特許出願、記事、ウェブページ、書籍などを含むがこれらに限定されない刊行物または他の文書における記載事項の一部または全部は、その主題が本開示の実施形態のものと矛盾する可能性がある (この場合、本明細書に記載されているものが優先する)。参照される項目は、本出願の出願日前の開示規定のためにのみ提供される。本明細書に開示された発明が先行発明により先行する資格がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

【0085】

デバイス、システムおよび方法の例示的な実施形態を本明細書で説明したが、他の変更も可能である。他の箇所に記載されているように、これらの実施形態は、例示の目的での

10

20

30

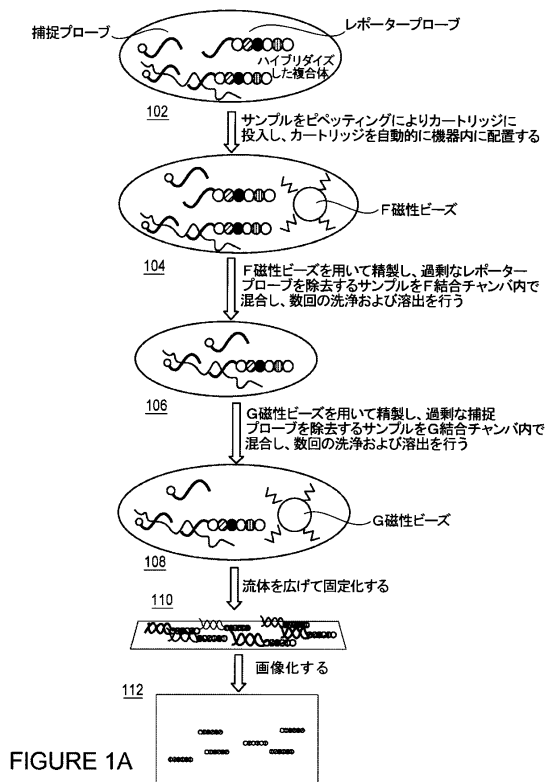
40

50

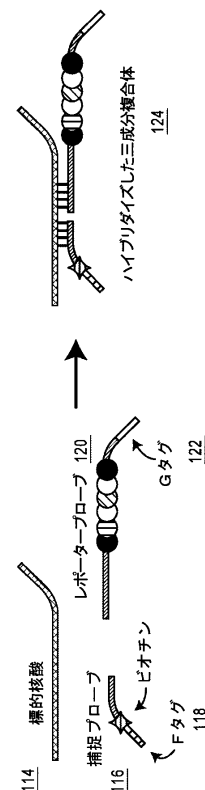
み記載されており、限定するものではない。本明細書に含まれる教示から明らかであるように、他の実施形態も可能であり、本開示の範囲に包含される。したがって、本開示の範囲および範囲は、上記の実施形態のいずれによっても限定されるべきではなく、本開示がサポートする請求項およびそれらの均等物によってのみ規定されるべきである。さらに、上記の開示および/または添付の図面に示す任意の論理フローは、望ましい結果を達成するために示された特定の順序または連続的な順序を必要としなくともよい。さらに、本開示の実施形態は、遺伝子精製および画像化に対応する任意のそして全ての要素を含め、任意の他の開示された方法、システム、およびデバイスからの任意のそして全ての要素をさらに含んでもよい方法、システムおよびデバイスを含めてもよい。言い換えれば、開示された1つのおよび/または別の実施形態の要素は、他の開示された実施形態の要素と交換可能である。加えて、開示された実施形態の1つまたは複数の特徴/要素を削除しても、依然として特許可能な主題をもたらす(したがって、本開示のさらに多くの実施形態をもたらす)こともある。さらに、本開示のいくつかの実施形態は、先行技術に開示されている1つの特徴および/または別の特徴を明示することを必要せず(例えば、一部の実施形態は否定的な制限を含み得る)先行文献と区別される。本明細書で開示される実施形態のいくつかは、本開示によってサポートされる多数の請求項の特許請求の範囲の少なくとも一部の範囲内にある。

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

20

30

40

50

【図 1 C】

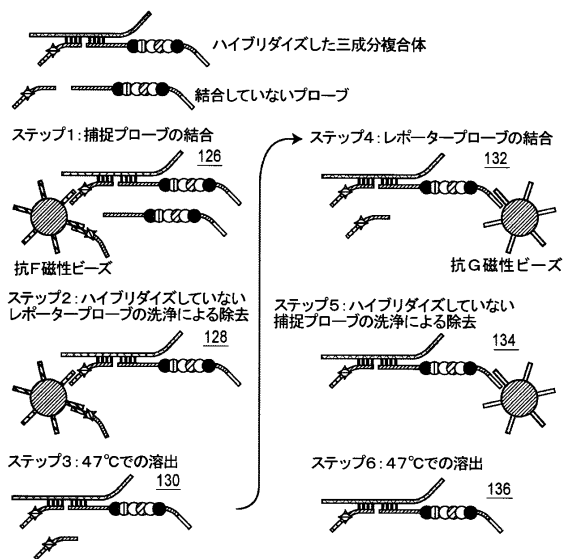


FIGURE 1C

【図 1 D】

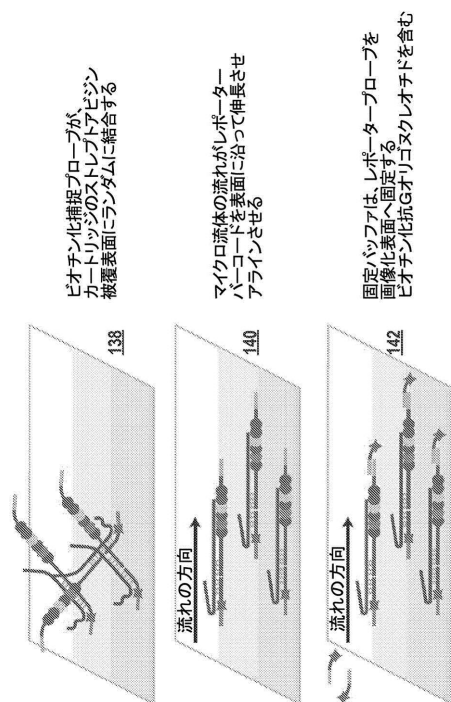


FIGURE 1D

【図 1 E】

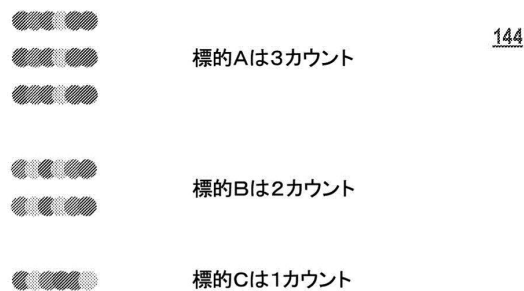


FIGURE 1E

【図 2】

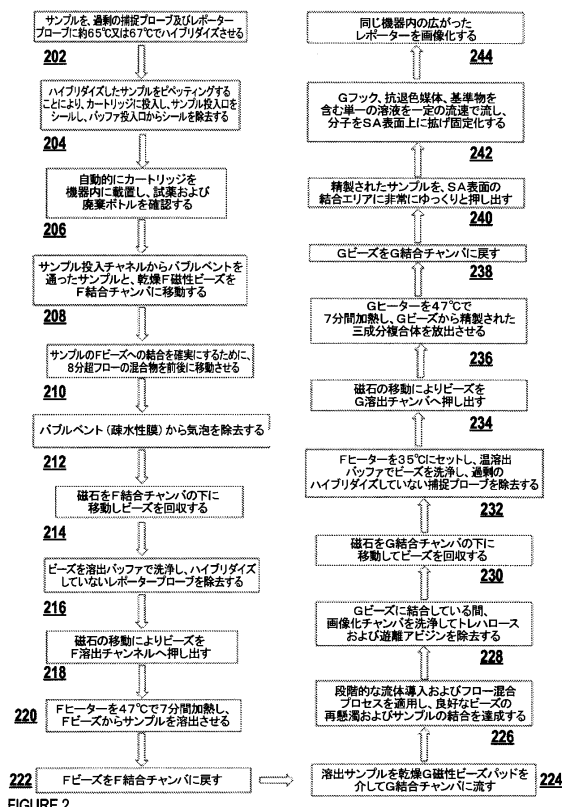


FIGURE 2

10

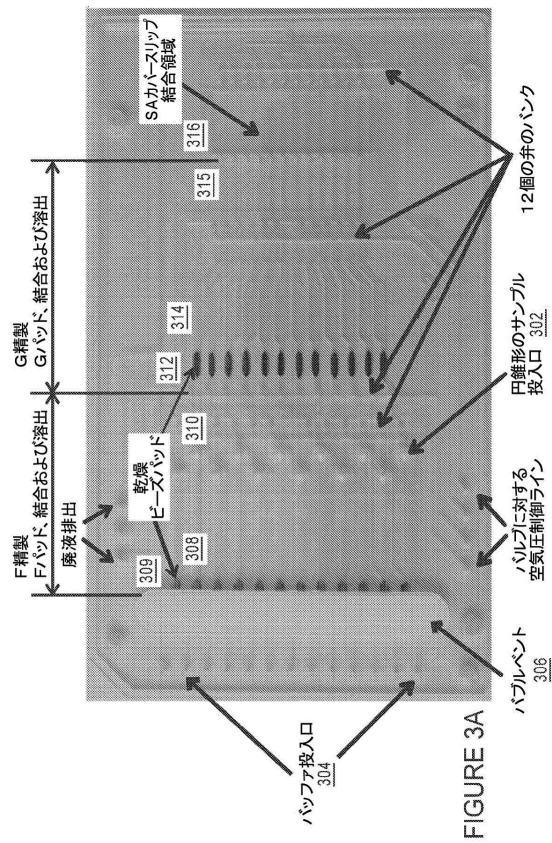
20

30

40

50

【図 3 A】



【図 3 B】

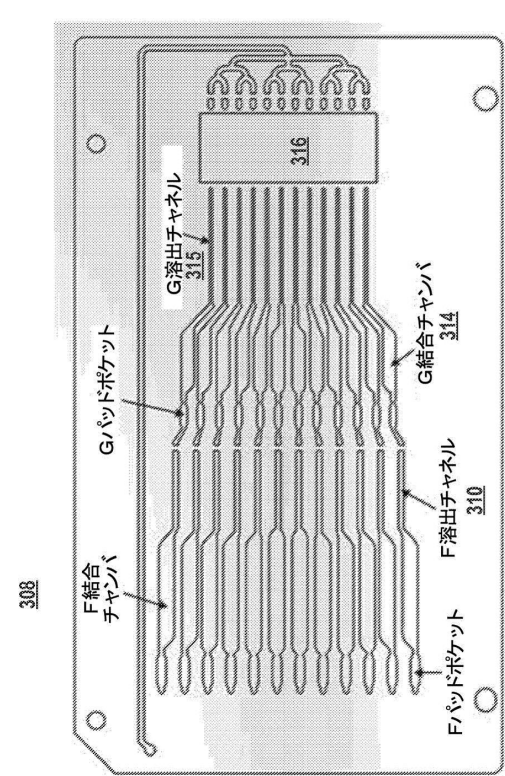


FIGURE 3B

【図 4】

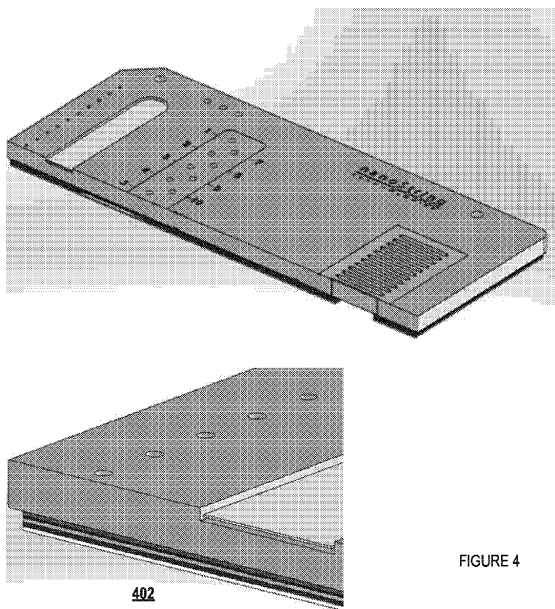


FIGURE 4

【図 5】

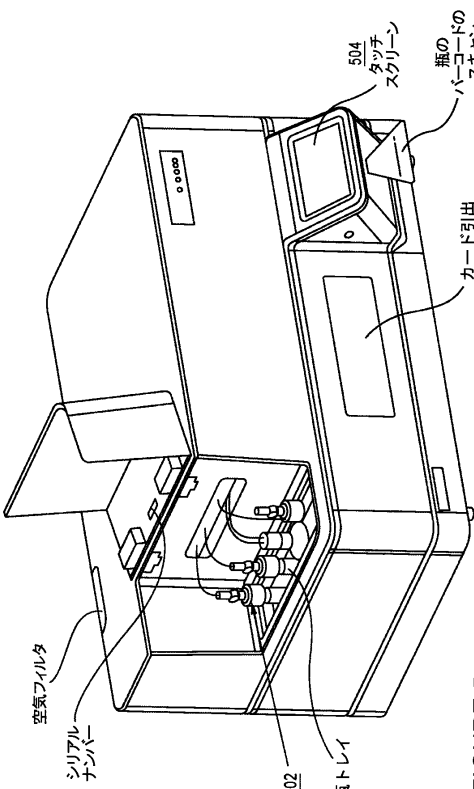


FIGURE 5

【図 6 A】

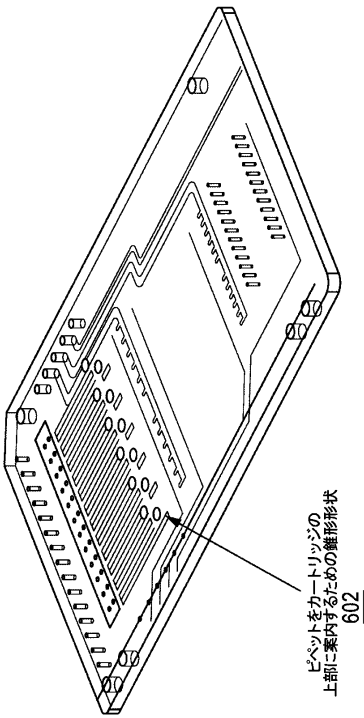


FIGURE 6A

【図 6 B】

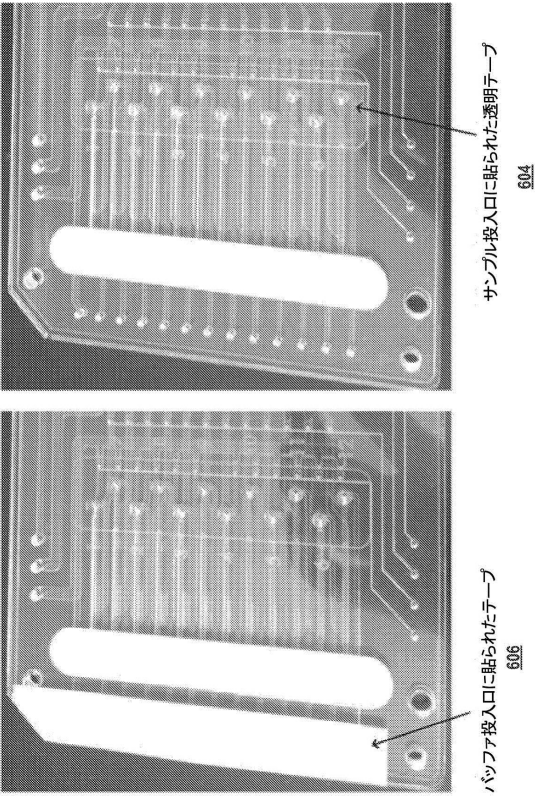


FIGURE 6B

【図 7】

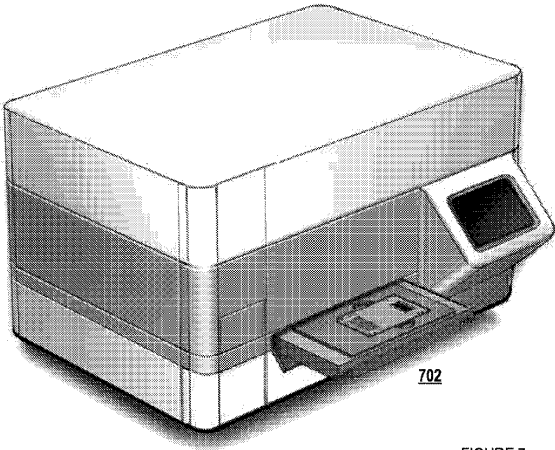


FIGURE 7

【図 8】

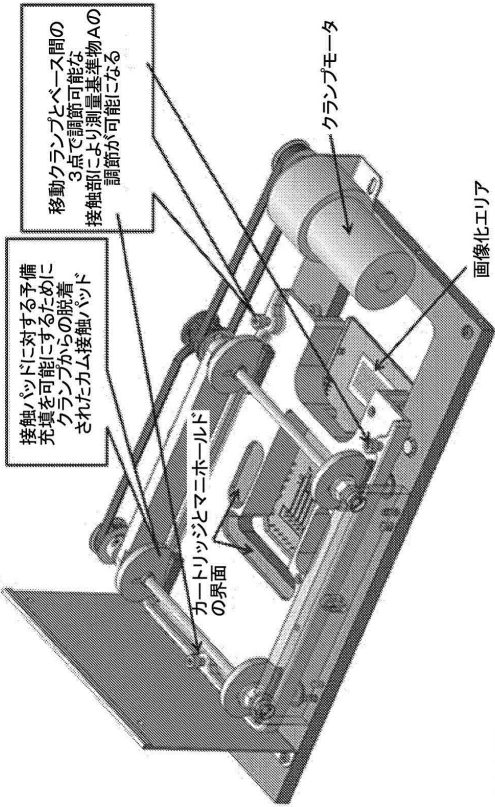


FIGURE 8

10

20

30

40

50

【図 9 A】

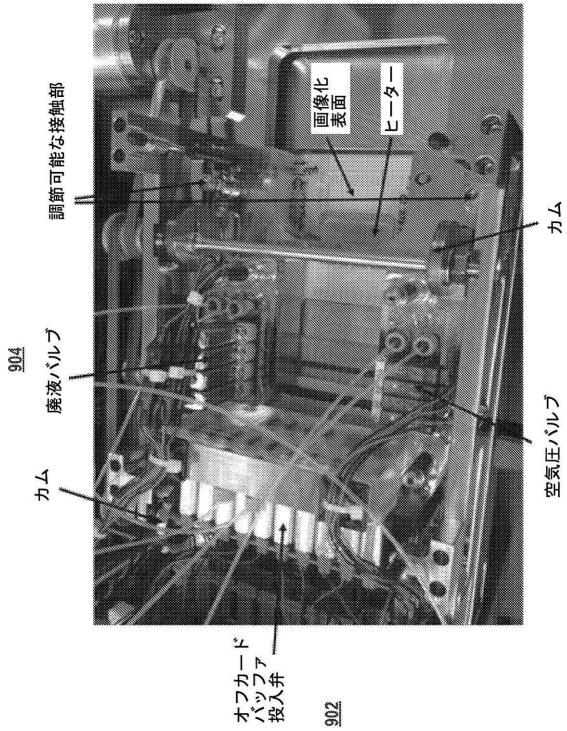


FIGURE 9A

【図 9 B】

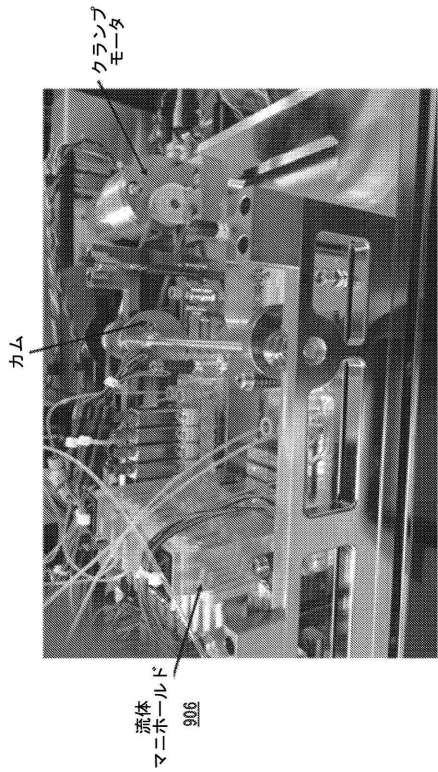


FIGURE 9B

【図 1 0】

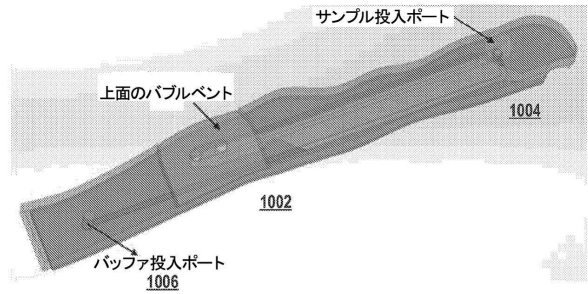


FIGURE 10

【図 1 1】

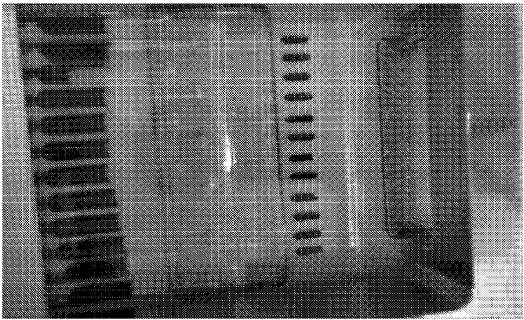
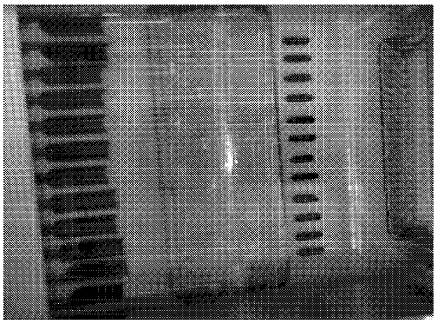


FIGURE 11

10

20

30

40

50

【図 1 2】

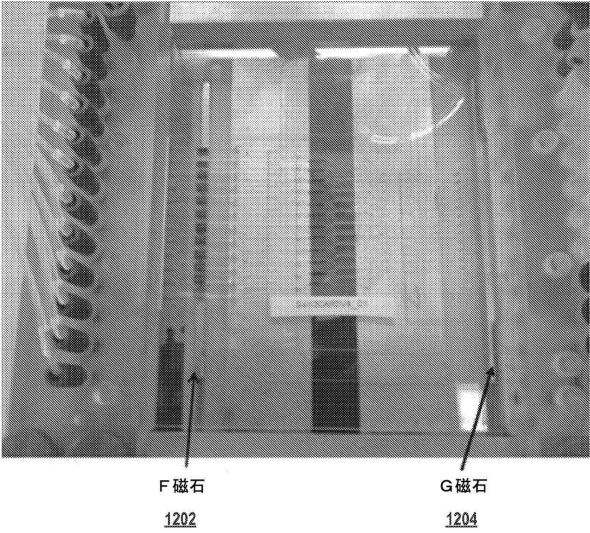


FIGURE 12

【図 1 3 A】

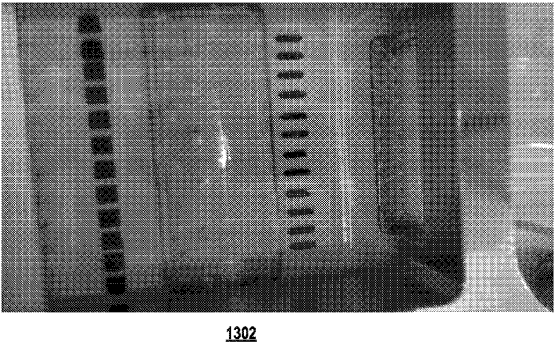


FIGURE 13A

【図 1 3 B】

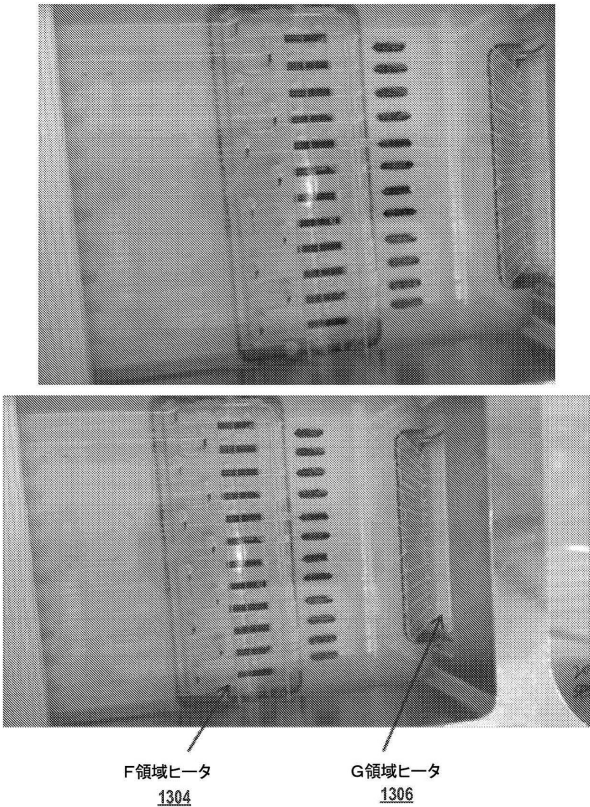


FIGURE 13B

【図 1 4】

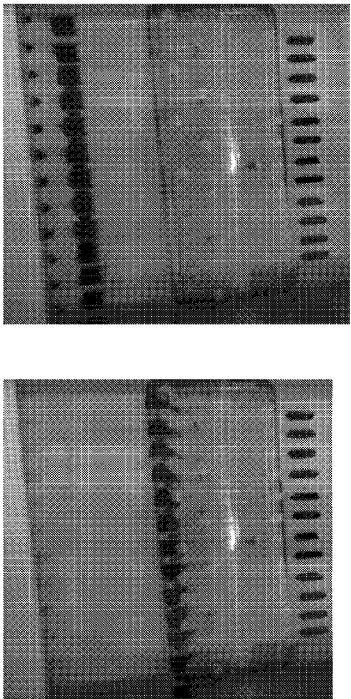


FIGURE 14

10

20

30

40

50

【図 15】

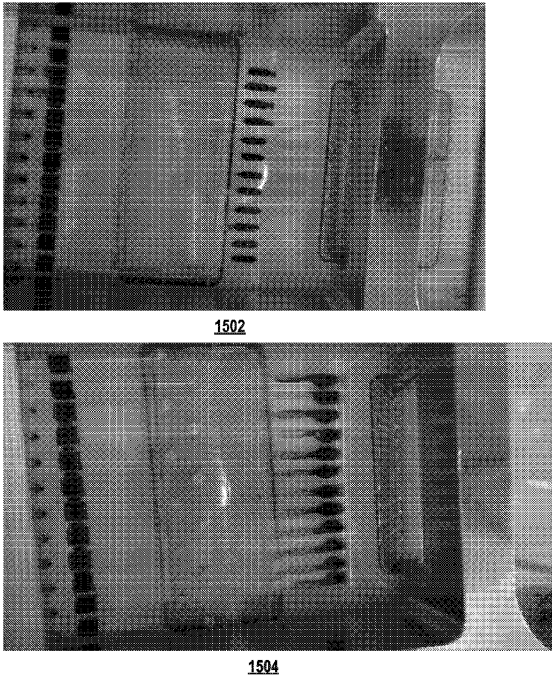


FIGURE 15

【図 16】

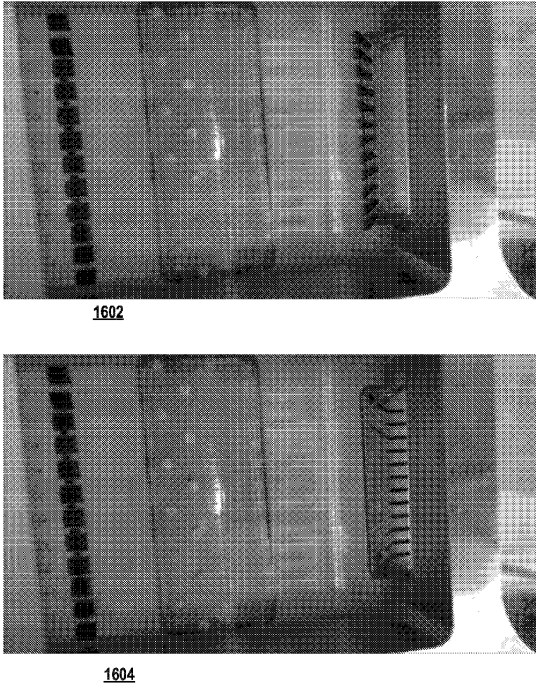


FIGURE 16

【図 17】

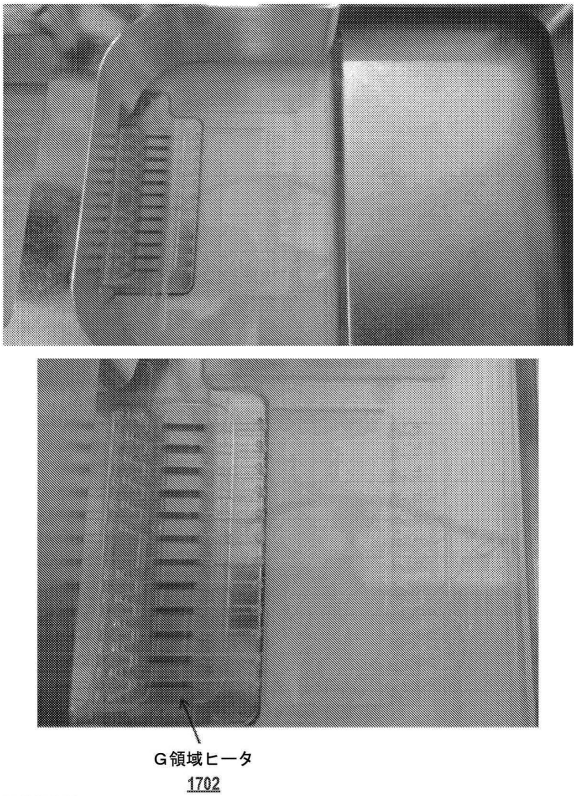


FIGURE 17

【図 18】

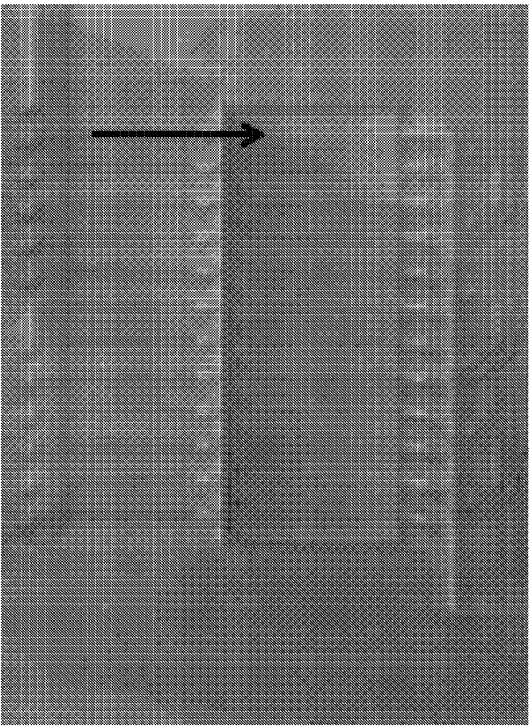


FIGURE 18

10

20

30

40

50

【図 19 A】

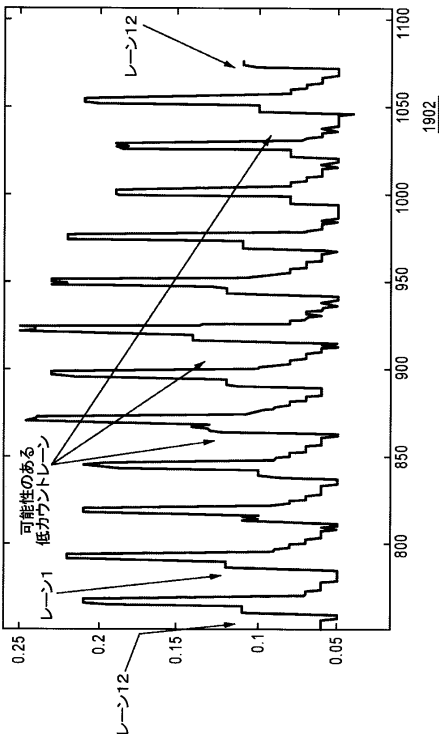


FIGURE 19A

【図 19 B】

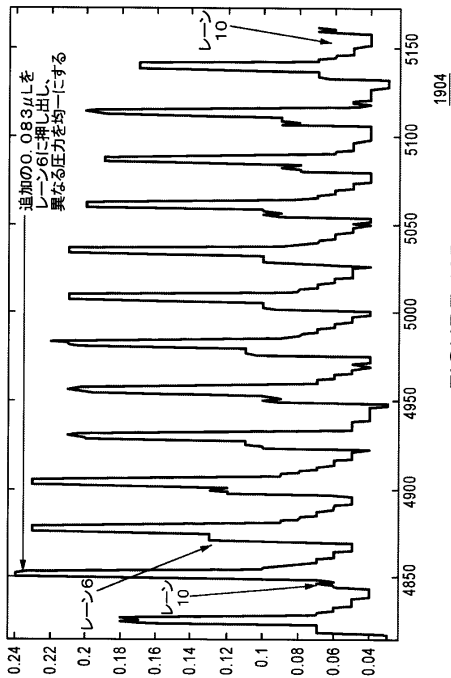


FIGURE 19B

【図 20】

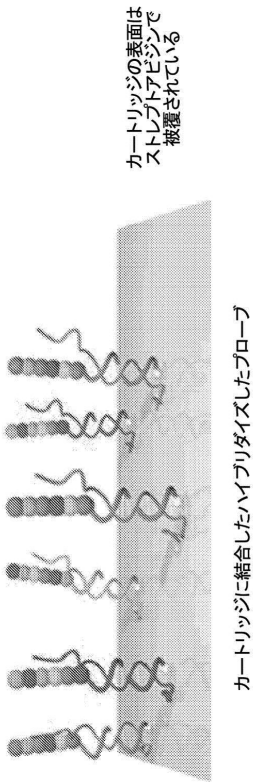


FIGURE 20

【図 21】

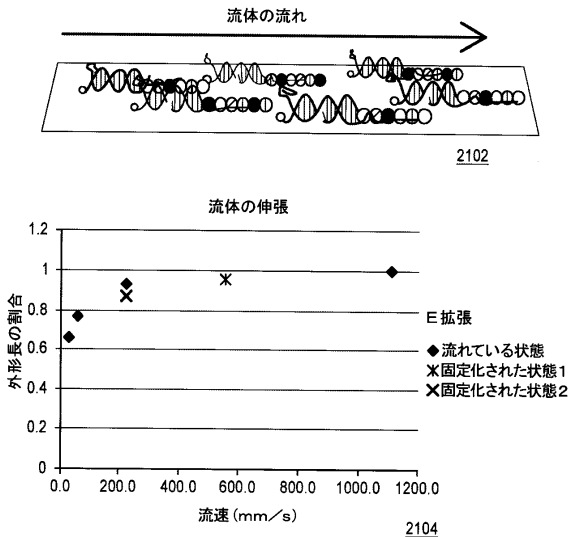


FIGURE 21

10

20

30

40

50

【図 2 2】

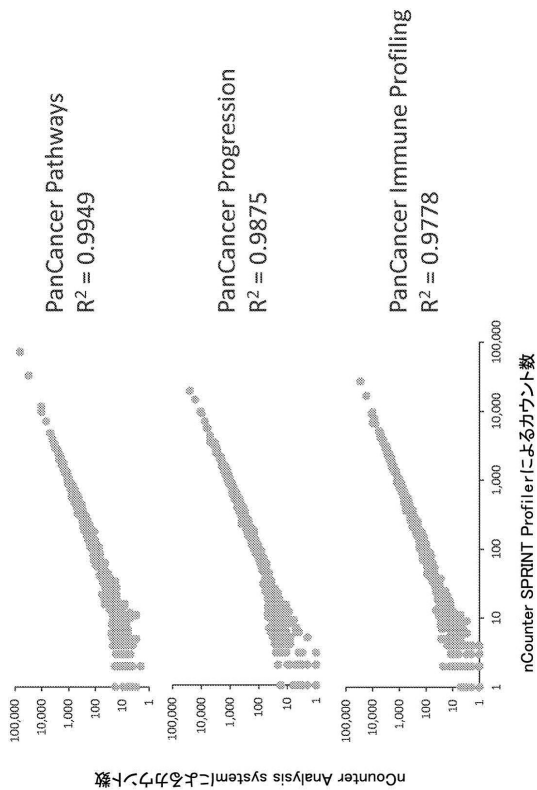


FIGURE 22

【図 2 3】

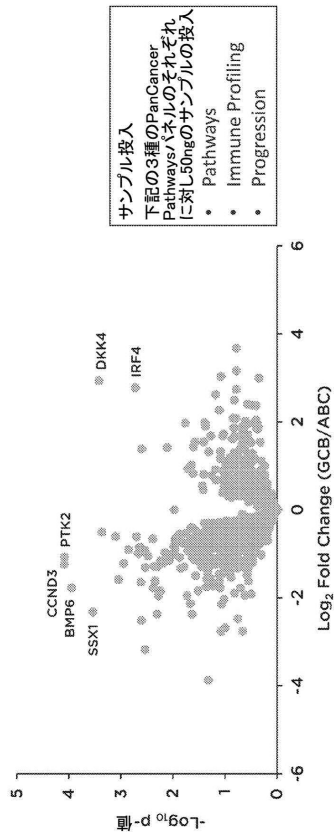


FIGURE 23

【図 2 4】

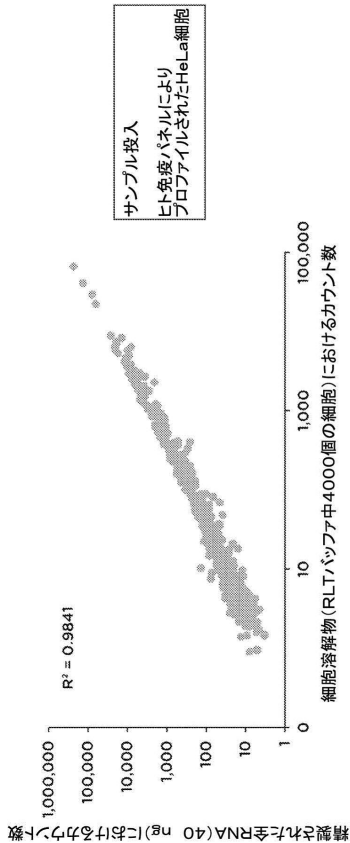


FIGURE 24

【図 2 5】

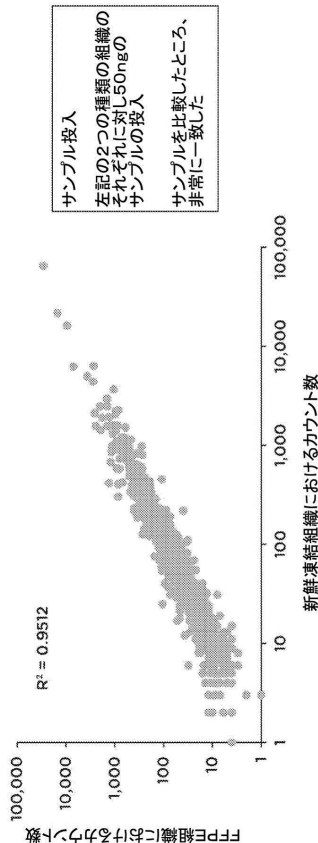


FIGURE 25

10

20

30

40

50

【図 26】

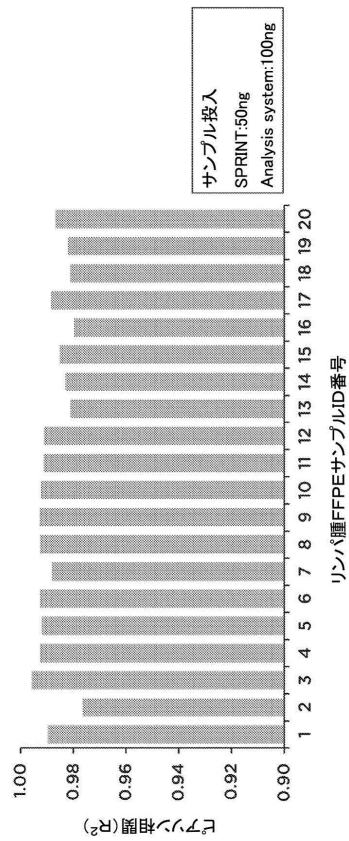


FIGURE 26

【図 27】

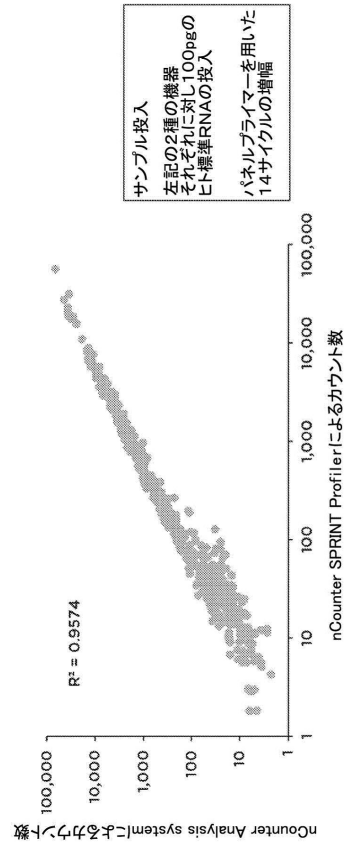


FIGURE 27

【図 28】

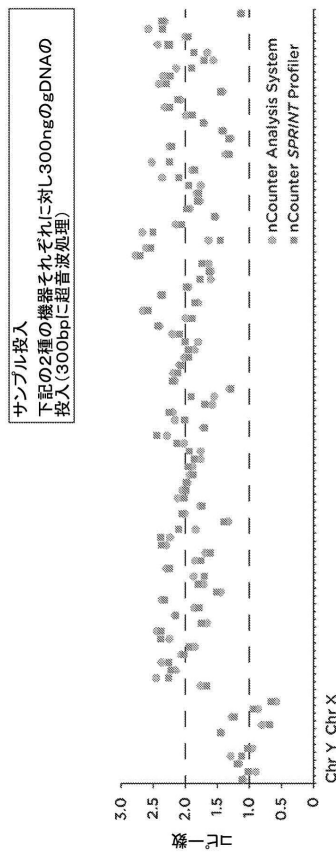


FIGURE 28

【図 29】

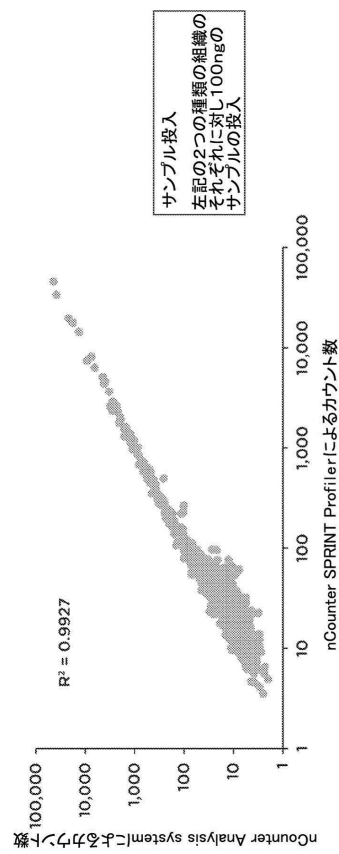


FIGURE 29

10

20

30

40

50

【図 30】

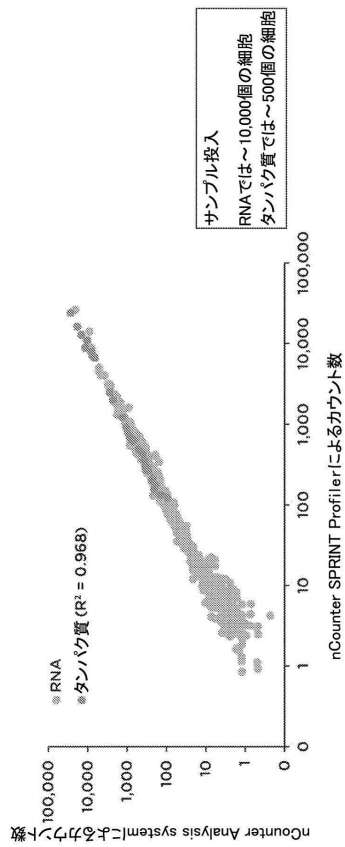


FIGURE 30

【配列表】

0007144142000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 渡辺 陽一
 (74)代理人 100173107
 弁理士 胡田 尚則
 (72)発明者 ドウェイン ダナウェイ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シアトル, ノース イースト ナインティーフォース
 ストリート 2751
 (72)発明者 ルステム ハフィゾフ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98109, シアトル, マーサー ストリート 1200, アパート
 メント 212
 (72)発明者 チエン メイ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98109, シアトル, マーサービュー アパートメンツ 1200
 , #207
 (72)発明者 ルーカス デニス
 アメリカ合衆国, ワシントン 98026, エドモンズ, セブンティースックス プレイス ウエ
 スト 23601
 (72)発明者 マイケル クラウス
 アメリカ合衆国, ワシントン 98122, シアトル, トゥエンティース アベニュー 700
 (72)発明者 ジョーセフ エム・ピーチェム
 アメリカ合衆国, オレゴン 97405, ユージーン, リッジライン ドライブ 46
 (72)発明者 アイザック スプレイグ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98033, シアトル, ワンハンドレッド アンド シックスティー
 ンス アベニュー ノース イースト 7014, #ディー
- 合議体
 審判長 上條 肇
 審判官 川合 理恵
 審判官 長井 啓子
- (56)参考文献 特表2013-519378(JP,A)
 特開2004-147658(JP,A)
 特表2009-529883(JP,A)
 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 201
 1, Supplement 94, 25B.10.1-25B.10.17
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
 C12Q 1/00-3/00
 C12M 1/00-3/10
 G01N 33/48-33/98
 CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS(STN)
 JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamII)