

(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2019-508043

(P2019-508043A)

(43) 公表日 平成31年3月28日 (2019. 3. 28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6844 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/6844 Z	2 G 0 5 8
G 0 1 N 37/00 (2006. 01)	G 0 1 N 37/00 1 O 1	4 B 0 2 9
G 0 1 N 35/08 (2006. 01)	G 0 1 N 35/08 A	4 B 0 6 3
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A	
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)	C 1 2 M 1/34 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)		

(21) 出願番号 特願2018-546635 (P2018-546635)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月3日 (2017. 3. 3)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年10月17日 (2018. 10. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/020782
 (87) 国際公開番号 W02017/152122
 (87) 国際公開日 平成29年9月8日 (2017. 9. 8)
 (31) 優先権主張番号 62/303, 934
 (32) 優先日 平成28年3月4日 (2016. 3. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512051941
 アリーア サン ディエゴ, インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21, サン ディエゴ, サマーズ リ
 ッジ ロード 9975
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

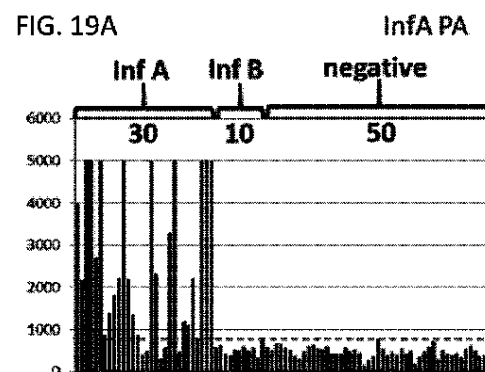
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自動化ネステッドリコンビナーゼポリメラーゼ増幅

(57) 【要約】

サンプルモジュール、マイクロ流体核酸増幅デバイス、および分析装置を含み、サンプルモジュールを介して核酸増幅デバイスに送達されるサンプルにおける全自動ネステッドリコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (RPA) を促進するインフルエンザアッセイシステム。アッセイはサンプルをマイクロ流体デバイスに加え、サンプルにおける標的ポリヌクレオチド配列を増幅することを含む。標的ポリヌクレオチド配列を増幅することは、サンプルに増幅の第一ラウンドを実施して第一増幅産物を得、第一増幅産物に増幅の第二ラウンドを実施して第二増幅産物を得ることを含む。第二増幅産物は、増幅の第一ラウンドの増幅の際に産生される第一増幅産物内に完全に含まれる、より小さい配列を含む。

【選択図】 図 19 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルをマイクロ流体デバイスに加え、前記サンプルにおける標的ポリヌクレオチド配列を増幅することを含む方法であって、前記増幅が、前記サンプルに増幅の第一ラウンドを実施して第一増幅産物を産生し、前記第一増幅産物に増幅の第二ラウンドを実施して第二増幅産物を産生することを含み、前記第二増幅産物は増幅の前記第一ラウンドの際に産生される前記第一増幅産物内に完全に含まれる、より小さい配列を含む、方法。

【請求項 2】

前記第二増幅産物を検出することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第二増幅産物の検出が、前記第二増幅産物をフルオロフォアおよびクエンチャーと連結された第一オリゴヌクレオチドによって標識して標識第二産物を得、前記標識第二増幅産物からクエンチャーを切断し、フルオロフォアからのシグナルを光学的に検出することを含み、検出可能なシグナルが前記第二増幅産物の存在の指標である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記クエンチャーを切断することがヌクレアーゼを用いて実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ヌクレアーゼが二本鎖 DNA を標的にする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ヌクレアーゼがホルムアミドピリミン-DNA グリコシラーゼである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第二増幅産物の検出が、前記第二増幅産物を酸化還元部分と連結された第一オリゴヌクレオチドによって標識して標識第二増殖産物を得、前記標識第二増幅産物から酸化還元部分を切断し、前記切断酸化還元部分からシグナルを電気化学的に検出することを含み、検出可能なシグナルが前記第二増幅産物の存在の指標である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記酸化還元部分がフェノチアジン、フェノキサジン、フェロセン、フェリシアン化物、ルテニウム (III)、オスミウム (II)、アントラキノン、フェナジン、およびこれらの誘導体からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記酸化還元がヌクレアーゼを用いて実施される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ヌクレアーゼが二本鎖 DNA を標的にする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ヌクレアーゼがホルムアミドピリミン-DNA グリコシラーゼである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第二増幅産物に増幅の第三ラウンドを実施して第三増幅産物を産生し、前記第三増幅産物を検出することをさらに含み、前記第三増幅産物は増幅の第二ラウンドの際に産生される前記第二増幅産物内に完全に含まれる、より小さい配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記サンプルが動物から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

動物から得られる前記サンプルが前記動物の血液、喀痰、粘液、唾液、涙、または尿から得られる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記サンプルがヒトから得られる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記標的ポリヌクレオチド配列が、標的核酸に含まれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記標的核酸が、動物病原体から得られる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記動物病原体が、一本鎖 DNA ウイルス、二本鎖 DNA ウイルス、または一本鎖 RNA ウイルスである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記動物病原体が細菌である、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記標的核酸が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、または RNA である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記標的核酸が、ゲノム DNA、プラスミド DNA、ウイルス DNA、ミトコンドリア DNA、cDNA、合成二本鎖 DNA、および合成一本鎖 DNA からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記標的核酸がウイルス DNA またはウイルス RNA である、請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記動物病原体が、インフルエンザ A ウイルスまたはインフルエンザ B ウイルスである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記サンプルにおける 2 種類以上の標的ポリヌクレオチド配列が増幅される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

インフルエンザ A 遺伝子配列を含む標的ポリヌクレオチド配列およびインフルエンザ B 遺伝子配列を含む標的ポリヌクレオチド配列が増幅される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

2 種類以上の増幅産物が検出される、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 27】

インフルエンザ A 遺伝子配列を含む第二増幅産物およびインフルエンザ B 遺伝子配列を含む第二増幅産物が検出される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

(i) 第一反応チャンバーであって、前記反応チャンバーにおけるサンプル流体に第一核酸増幅を実施して第一増幅産物を生成するように構成される第一反応チャンバー、および

(ii) 1 つ以上の第二反応チャンバーであって、前記第一増幅産物に第二核酸増幅を実施して第二増幅産物を生成するように構成される各第二反応チャンバー

40

を含む、カード本体、

前記サンプル流体を前記第一反応チャンバーに供給するための通路、

前記 1 つ以上の第二反応チャンバーと流体接続される 1 つ以上の検出チャンバー、ならびに

各検出チャンバーと結合される検出モジュール

を含む、診断カード。

【請求項 29】

前記検出モジュールが光学的モジュールである、請求項 28 に記載の診断カード。

【請求項 30】

前記検出モジュールが蛍光検出器である、請求項 28 に記載の診断カード。

50

【請求項 3 1】

前記蛍光検出器が、照明光を前記 1 つ以上の検出チャンバーに向ける単一光パイプ、および各検出チャンバーから反射した光を受容する個別光パイプを含む、請求項 3 0 に記載の診断カード。

【請求項 3 2】

前記検出モジュールが電極モジュールである、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 3 3】

前記検出モジュールが、各検出チャンバー用の電極で終結する一連の伝導路を含む、請求項 3 2 に記載の診断カード。

【請求項 3 4】

前記デバイスが追加の伝導路および電極を含んでマイクロ流体カード全体を通して液体の位置を検出する、請求項 3 2 に記載の診断カード。

【請求項 3 5】

前記増幅がリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（R P A）反応を含む、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 3 6】

混合手段、ポンプ、およびサンプルモジュールに接続するための接続ポートをさらに含む、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 3 7】

前記第一反応チャンバーがヒーターと結合される、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 3 8】

前記第一反応チャンバーが混合手段を含む、または混合手段と結合される、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 3 9】

各第二反応チャンバーが試薬を含む、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 4 0】

前記試薬が R P A 試薬を含む、請求項 3 9 に記載の診断カード。

【請求項 4 1】

前記 R P A 試薬が凍結乾燥されている、請求項 4 0 に記載の診断カード。

【請求項 4 2】

前記第一反応チャンバーが試薬を含む、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 4 3】

前記試薬が R P A 試薬を含む、請求項 4 2 に記載の診断カード。

【請求項 4 4】

前記 R P A 試薬が凍結乾燥されている、請求項 4 3 に記載の診断カード。

【請求項 4 5】

前記サンプル流体が動物から得られるサンプルである、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 4 6】

動物から得られる前記サンプルが、前記動物の血液、喀痰、粘液、唾液、涙、または尿から得られる、請求項 4 5 に記載の診断カード。

【請求項 4 7】

前記サンプル流体がヒトから得られるサンプルである、請求項 4 5 に記載の診断カード。

【請求項 4 8】

前記サンプル流体が標的核酸を含む、請求項 2 8 に記載の診断カード。

【請求項 4 9】

前記標的核酸が動物病原体から得られる、請求項 4 8 に記載の診断カード。

【請求項 5 0】

前記動物病原体が、一本鎖 D N A ウイルス、二本鎖 D N A ウイルス、または一本鎖 R N

10

20

30

40

50

A ウイルスである、請求項 49 に記載の診断カード。

【請求項 51】

前記動物病原体が細菌である、請求項 49 に記載の診断カード。

【請求項 52】

前記標的核酸が二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、または RNA である、請求項 48 に記載の診断カード。

【請求項 53】

前記標的核酸が、ゲノム DNA、プラスミド DNA、ウイルス DNA、ミトコンドリア DNA、cDNA、合成二本鎖 DNA、および合成一本鎖 DNA からなる群から選択される、請求項 48 に記載の診断カード。

【請求項 54】

前記標的核酸がウイルス DNA またはウイルス RNA である、請求項 48 に記載の診断カード。

【請求項 55】

前記動物病原体が、インフルエンザ A ウイルスまたはインフルエンザ B ウイルスである、請求項 49 に記載の診断カード。

【請求項 56】

前記第二増幅産物が、前記サンプル流体の前記診断カードへの送達後、30 分以内、15 分以内、10 分以内、または 5 分以内で産生される、請求項 28 に記載の診断カード。

【請求項 57】

前記診断カードが使い捨てである、請求項 28 に記載の診断カード。

【請求項 58】

さらに追加の反応チャンバーを含み、それぞれが核酸増幅反応の追加のラウンドを実施して追加の増幅産物を生成し、これによって増幅の各連続した $n+1$ ラウンドから得られる前記増幅産物は、前 n 回目ラウンドの前記増幅産物内に完全に含まれる、より小さい配列である、請求項 28 に記載の診断カード。

【請求項 59】

請求項 28 に記載の診断カードを受容するように構成されるリーダーであって、前記リーダーが前記第二反応チャンバーにおける前記第二増幅産物の存在を検出するように構成される検出器を含む、リーダー。

【請求項 60】

第一流入口および第一流出口と流体接続される第一反応チャンバー、
第二流入口および第二流出口と流体接続される第二反応チャンバー、
検出チャンバー、

第一ポンプ、ここで前記第一流入口が前記第一ポンプを介して前記第一反応チャンバーと流体接続され、前記第一流出口が第一反応チャンバーと流体接続され、

第二ポンプ、ここで前記第一反応チャンバーが前記第二ポンプを介して前記第二反応チャンバーと流体接続され、前記第二流出口が前記第二反応チャンバーと流体接続され、

第三ポンプ、ここで前記第二流入口は前記第三ポンプを介して前記第二反応チャンバーと流体接続される、

を含む、核酸増幅デバイス。

【請求項 61】

前記核酸増幅デバイスがマイクロ流体デバイスである、請求項 60 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 62】

前記第一反応チャンバーが試薬を含む、請求項 60 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 63】

前記第一反応チャンバーが触媒を含む、請求項 62 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 64】

前記触媒がマグネシウムを含む、請求項 63 に記載の核酸増幅デバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 65】

試薬リサーバをさらに含み、前記第二ポンプおよび前記第三ポンプが第一試薬リサーバを介して各第二反応チャンバーと流体接続される、請求項 60 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 66】

前記第二ポンプおよび前記第三ポンプが第一試薬リサーバおよび第二試薬リサーバを介して各第二反応チャンバーと流体接続される、請求項 60 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 67】

前記第一試薬リサーバおよび前記第二試薬リサーバが直列である、請求項 66 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 68】

前記第一試薬リサーバがオリゴマーを含む、請求項 67 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 69】

前記第二試薬リサーバがマグネシウムを含む、請求項 67 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 70】

各第二反応チャンバーが検出チャンバーである、請求項 66 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 71】

各検出チャンバーの一部が光学的に透明である、請求項 70 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 72】

各検出チャンバーと接続される電極をさらに含む、請求項 70 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 73】

3つの電極が各検出チャンバーに接続される、請求項 72 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 74】

流体検出領域をさらに含む、請求項 60 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 75】

前記第一ポンプおよび前記第一反応チャンバーが第一検出領域を介して接続される、請求項 74 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 76】

前記第二ポンプおよび前記第二反応チャンバーが第二検出領域を介して接続される、請求項 74 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 77】

前記第三ポンプおよび前記第二反応チャンバーが第三検出領域を介して接続される、請求項 74 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 78】

前記第三ポンプおよび前記第一反応チャンバーが第四検出領域を介して接続される、請求項 74 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 79】

各検出領域の一部が光学的に透明である、請求項 74 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 80】

各検出領域と接続されるフロー検出チャンバーをさらに含む、請求項 74 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 81】

前記第一反応チャンバーと接続されるヒーターをさらに含む、請求項 60 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 82】

前記第一反応チャンバーがスターラーを含む、請求項 60 に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項 83】

10

20

30

40

50

前記第一ポンプが、前記核酸増幅デバイスに送達されるサンプルを、前記第一流入口を介して前記第一反応チャンバーに供給するように構成される、請求項60に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項84】

前記第二および第三ポンプが、前記第二流入口を介して核酸増幅デバイス本体に送達される試薬を、前記第一反応チャンバーからの産物と混合して反応物混合を生じるように構成される、請求項60に記載の核酸増幅デバイス。

【請求項85】

前記第二および第三ポンプが、前記反応物混合の一部を前記第二反応チャンバーのそれぞれに供給するように構成される、請求項84に記載の核酸増幅デバイス。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連案件の相互参照

本出願は、2016年3月4日に出願された米国特許出願第62/303、934号、名称「自動化ネステッドリコンビナーゼポリメラーゼ増幅」の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の権利の記載

本発明は米国保健福祉省によって認可されたHHSO100201400011Cの下で政府支援がなされた。政府は本発明に特定の権利を有する。

20

【0003】

技術分野

本発明はインフルエンザアッセイシステム、特に、サンプルモジュール、マイクロ流体核酸増幅デバイス、および分析装置を含み、サンプルモジュールを介して核酸増幅デバイスに送達されるサンプルにおける全自動ネステッドリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)を促進するシステムに関する。

【背景技術】

【0004】

背景

ポリヌクレオチド配列の微量検出は、病原体および遺伝性疾患の検出において重要な役割を担うでき、特定の感染または遺伝子型に対して適応する治療処方計画を立てるのに役立つ。特定の等温核酸増幅法は、標的ポリヌクレオチド配列を微量から非常に高い検出可能な量まで短時間で増幅することができる。このような等温法、例えば、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)、またはニッキングおよび伸長増幅反応(NEAR)は、使用者が微量の特定配列を検出することができるようにし、ポイントオブケア検査を促進し、診断の利用し易さおよび速さを高める。

30

【発明の概要】

【0005】

本明細書で開示される核酸増幅デバイスは、第一および第二反応チャンバーを検出チャンバーと相互接続するマイクロ流体チャネルの列を含むように構成される。一体化されたポンプモジュールも、適切な時にデバイスを通る液体の選択的な移動を可能にするように備えられる。RPAの第一ラウンドを生じる第一反応チャンバーが備えられ、対象の標的ポリヌクレオチド配列の増幅をもたらす。RPAの第一ラウンド後、サンプル液体が特異的RPAプライマーと混合され、第二反応チャンバーに移動される。第二増幅の際、第一反応産物に完全に含まれる配列が増幅されて第二反応産物を生成し、続いて第二反応産物の検出が実施される。検出は光学的または電気化学的手段を用いて達成され得る。

40

【0006】

RPAの第一ラウンドから得られる産物混合物は複数流に分離されて試薬容器を通過され得、そして産物混合物は同一または異なるRPAプライマーと混合されてから複数の第

50

二反応チャンバーに導入される。この方式では、核酸増幅デバイスは対象の1つを超える標的を検出するために使用され得る（例えば、インフルエンザAウイルスおよびインフルエンザBウイルス）。場合によっては、第二反応チャンバーの一つはコントロールとして使用され得る。

【0007】

第一の一般的態様は、サンプルをマイクロ流体デバイスに加え、サンプル中の標的ポリヌクレオチド配列を増幅させることを含む。標的ポリヌクレオチド配列を増幅することは、サンプルに増幅の第一ラウンドを実施して第一増幅産物を生じ、第一増幅産物に増幅の第二ラウンドを実施して第二増幅産物を生じることを含む。第二増幅産物は、増幅の第一ラウンドの際に産生される第一増幅産物内に完全に含まれる、より小さい配列を含む。

10

【0008】

第一の一般的態様の実施は、次の特徴の1つ以上を含み得る。

【0009】

いくつかの実施態様は、第二増幅産物を検出することを含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、第二増幅産物を検出することは、第二増幅産物をフルオロフォアおよびクエンチャーと結合された第一オリゴヌクレオチドによって標識して標識第二産物を得、標識第二増幅産物からクエンチャーを切断して、フルオロフォアから生じるシグナルを光学的に検出することを含み得、ここで検出可能なシグナルは第二増幅産物の存在の指標である。クエンチャーを切断することはヌクレアーゼを用いて実施され得る。ヌクレアーゼは二本鎖DNAを標的にし得る。場合によっては、ヌクレアーゼはホルムアミドピリミン-DNAグリコシラーゼである。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、第二増幅産物を検出することは、第二増幅産物を酸化還元部分と結合された第一オリゴヌクレオチドによって標識して標識第二増幅産物を得、標識第二増幅産物から酸化還元部分を切断して、切断した酸化還元部分から生じるシグナルを電気化学的に検出することを含み、ここで検出可能なシグナルは第二増幅産物の存在の指標である。酸化還元部分は一般的に、フェノチアジン、フェノキサジン、フェロセン、フェリシアン化物、ルテニウム（III）、オスミウム（II）、アントラキノン、フェナジン、およびこれらの誘導体からなる群から選択される。酸化還元部分を切断することはヌクレアーゼを用いて実施され得る。ヌクレアーゼは二本鎖DNAを標的にし得る。場合によっては、ヌクレアーゼはホルムアミドピリミン-DNAグリコシラーゼである。

30

【0012】

いくつかの実施態様は、第二増幅産物に増幅の第三ラウンドを実施して第三増幅産物を得、第三増幅産物を検出することを含み、ここで第三増幅産物は増幅の第二ラウンドの際に産生される第二増幅産物内に完全に含まれる、より小さい配列を含む。

【0013】

サンプルは動物から得ることができる。例えば、サンプルは動物の血液、喀痰、粘液、唾液、涙、または尿から得ることができる。場合によっては、サンプルはヒトから得られる。

40

【0014】

標的核酸は標的ポリヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、標的核酸は動物病原体から得られる。動物病原体は一本鎖DNAウイルス、二本鎖DNAウイルス、または一本鎖RNAウイルスであり得る。動物病原体は細菌であり得る。標的核酸は、二本鎖DNA、一本鎖DNA、またはRNAであり得る。場合によっては、標的核酸はゲノムDNA、プラスミドDNA、ウイルスDNA、ミトコンドリアDNA、cDNA、合成二本鎖DNA、および合成一本鎖DNAからなる群から選択される。標的核酸はウイルスDNAまたはウイルスRNAであり得る。特定の例では、動物病原体はインフルエンザAウイルスまたはインフルエンザBウイルスである。

【0015】

50

いくつかの実施態様では、サンプル中の２種類以上の標的ポリヌクレオチド配列が増幅される。一つの例では、インフルエンザ A 遺伝子配列を含む標的ポリヌクレオチド配列およびインフルエンザ B 遺伝子配列を含む標的ポリヌクレオチド配列が増幅される。

【0016】

いくつかの実施態様では、２種類以上の増幅産物が検出される。特定の実施態様では、インフルエンザ A 遺伝子配列を含む第二増幅産物、およびインフルエンザ B 遺伝子配列を含む第二増幅産物が検出される。

【0017】

第二の一般的態様では、診断カードはカード本体を含む。カード本体は、第一反応チャンバー、１つ以上の第二反応チャンバー、サンプル流体を第一反応チャンバーに供給するための通路、１つ以上の第二反応チャンバーと流体接続される１つ以上の検出チャンバー、および各検出チャンバーと連結される検出モジュールを含む。第一反応チャンバーは、反応チャンバーにおいてサンプル流体に第一核酸増幅を実施して第一増幅産物を生成するように構成される。各第二反応チャンバーは、第一増幅産物に第二核酸増幅を実施して第二増幅産物を生成するように構成される。

【0018】

第二の一般的態様の実施は、次の特徴の１つ以上を含み得る。

【0019】

いくつかの実施形態では、検出モジュールは蛍光検出器のような光学的モジュールである。蛍光検出器は、１つ以上の検出チャンバーに照明光を送る単一光パイプ、および各検出チャンバーから反射する光を受容する別の光パイプを含み得る。

【0020】

いくつかの実施形態では、検出モジュールは電極モジュールである。検出モジュールは各検出チャンバー用の電極で終結する一連の伝導路を含み得る。デバイスは、マイクロ流体カード全体における流体の位置を検出するために、追加の伝導路および電極を含み得る。

【0021】

いくつかの実施態様では、増幅はリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）反応を含む。

【0022】

いくつかの実施態様では、診断カードは混合手段、ポンプ、およびサンプルモジュールに接続するための接続ポートを含む。第一反応チャンバーはヒーターと結合され得る。第一反応チャンバーは混合手段を含み得、あるいは混合手段と結合され得る。場合によっては、第一反応チャンバーは試薬を含む。試薬はRPA試薬を含み得る。RPA試薬は凍結乾燥され得る。

【0023】

いくつかの実施態様では、各第二反応チャンバーは試薬を含む。試薬はRPA試薬を含み得る。RPA試薬は凍結乾燥され得る。

【0024】

いくつかの実施態様では、サンプル流体は動物から得られる。サンプルは動物の血液、喀痰、粘液、唾液、涙、または尿から得ることができる。場合によっては、サンプル流体はヒトから得られるサンプルである。サンプル流体は標的核酸を含み得る。標的核酸は動物病原体から得ることができる。動物病原体は一本鎖DNAウイルス、二本鎖DNAウイルス、または一本鎖RNAウイルスであり得る。場合によっては、動物病原体は細菌である。標的核酸は、二本鎖DNA、一本鎖DNA、またはRNAであり得る。特定の例では、標的核酸はゲノムDNA、プラスミドDNA、ウイルスDNA、ミトコンドリアDNA、cDNA、合成二本鎖DNA、および合成一本鎖DNAからなる群から選択される。標的核酸はウイルスDNAまたはウイルスRNAであり得る。動物病原体はインフルエンザAウイルスまたはインフルエンザBウイルスであり得る。

【0025】

いくつかの実施態様では、第二増幅産物は、サンプル流体の診断カードへの送達後、30分以内、15分以内、10分以内、または5分以内に産生される。診断カードは一般的には使い捨てである。

【0026】

いくつかの実施態様では、診断カードは追加の反応チャンバーを含み、それぞれは核酸増幅反応の追加ラウンドを実施して追加増幅産物を生成するように構成され、これによって、増幅の各連続した $n+1$ ラウンドから得られる増幅産物は、前 n 回目ラウンドの増幅産物内に完全に含まれる、より小さい配列である。

【0027】

第三の一般的な態様は、第二の一般的態様の診断カードを受容するように構成されるリーダーを含む。リーダーは第二反応チャンバー内の第二増幅産物の存在を検出するように構成される検出器を含む。

10

【0028】

第四の一般的態様は核酸増幅デバイスを含む。核酸増幅デバイスは、第一流入口および第一流出口と流体接続された第一反応チャンバー、第二流入口および第二流出口と流体接続された第二反応チャンバー、検出チャンバー、第一ポンプ、第二ポンプ、ならびに第三ポンプを含む。第一流入口は第一ポンプを介して第一反応チャンバーと流体接続され、第一流出口は第一反応チャンバーと流体接続される。第一反応チャンバーは第二ポンプを介して第二反応チャンバーと流体接続され、第二流出口は第二反応チャンバーと流体接続される。第二流入口は第三ポンプを介して第二反応チャンバーと流体接続される。

20

【0029】

第四の一般的態様の実施は、次の特徴の1つ以上を含み得る。

【0030】

いくつかの実施態様では、核酸増幅デバイスはマイクロ流体デバイスである。第一反応チャンバーは一般的に試薬を含む。場合によっては、第一反応チャンバーは触媒を含む。触媒はマグネシウムを含み得る。

【0031】

いくつかの実施態様では、核酸増幅デバイスは試薬リサーバを含み、第二ポンプおよび第三ポンプは各第二チャンバーに第一試薬リサーバを介して流体接続される。第二ポンプおよび第三ポンプは各第二反応チャンバーに第一試薬リサーバおよび第二試薬リサーバを介して流体接続される。場合によっては、第一試薬リサーバおよび第二試薬リサーバは直列である。第一試薬リサーバはオリゴマーを含み得る。第二試薬リサーバはマグネシウムを含み得る。

30

【0032】

いくつかの実施態様では、各第二反応チャンバーは検出チャンバーである。各検出チャンバーの一部は光学的に透明である。場合によっては、電極は各検出チャンバーと接続される。一つの例では、3つの電極が各検出チャンバーと接続される。

【0033】

いくつかの実施態様では、核酸増幅デバイスは流体検出領域を含む。第一ポンプおよび第一反応チャンバーは、第一検出領域を介して接続され得る。第二ポンプおよび第二反応チャンバーは、第二検出領域を介して接続され得る。第三ポンプおよび第二反応チャンバーは、第三検出領域を介して接続され得る。第三ポンプおよび第一反応チャンバーは、第四検出領域を介して接続され得る。場合によっては、各検出領域の一部は光学的に透明である。流体検出チャンバーは各検出領域と接続され得る。

40

【0034】

いくつかの実施態様では、核酸増幅デバイスは第一反応チャンバーと接続されるヒーターを含む。第一反応チャンバーはスターラーを含み得る。特定の実施態様では、第一ポンプは第一流入口を介して核酸増幅デバイスに送達されるサンプルを第一反応チャンバーに供給するように構成される。第二および第三ポンプは核酸増幅デバイス本体に送達される試薬を、第二流入口を介して第一反応チャンバーからの産物と混合して反応物混合を生じ

50

るように構成され得る。第二および第三ポンプは反応物混合の一部を第二反応チャンバーのそれぞれに供給するように構成され得る。

【0035】

本発明の他の特性および利点は、次に詳細される説明および図から、そして請求項から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】核酸増幅デバイスにサンプルモジュールを介して送達されたサンプルに全自動ネステッドRPAを実施するためのシステムの構成要素を示す図である。

【図2】図1に示すシステムの代替えとなるワークフローを示す図である。

10

【図3】サンプルモジュールの受容器モジュール部分の斜視図を示す図である。

【図4】サンプルモジュールの移送モジュール部分の斜視図を示す図である。

【図5】接続した受容器モジュールおよび移送モジュールを有するサンプルモジュールにサンプルを加えるワークフローを示す図である。

【図6】別々の受容器モジュールおよび移送モジュールを有するサンプルモジュールにサンプルを加えるワークフローを示す図である。

【図7】ヒンジ式サンプルモジュールの斜視図を示す図である。

【図8】代替えとなるサンプルモジュールを示す図である。

【図9】図8Aおよび8Bで示されるサンプルモジュールにサンプルを加えるワークフローを示す図である。

20

【図10】光学的プローブの検出のためのマイクロ流体核酸増幅デバイスの分解図を示す図である。

【図11】図10に示すマイクロ流体核酸増幅デバイスの機能構成要素を示す図である。

【図12】電気化学的プローブの検出のためのマイクロ流体核酸増幅デバイスの分解図を示す図である。

【図13】図12に示すマイクロ流体核酸増幅デバイスの中間層の上面透視図を示す図である。

【図14】図12に示すマイクロ流体核酸増幅デバイスのセンサー層を通る上面透視図を示す図である。

【図15】分析装置に挿入された核酸増幅デバイスの斜視図を示す図である。

30

【図16】光学的分析装置の透視図を示す図である。

【図17】図16に示す光学的分析装置における光パイプの詳細図を示す図である。

【図18】図16に示す光学的分析装置に関して説明する励起および放出座標系を示す図である。

【図19A】本明細書で説明されるネステッドRPA増幅の結果を示す図である。

【図19B】本明細書で説明されるネステッドRPA増幅の結果を示す図である。

【図19C】本明細書で説明されるネステッドRPA増幅の結果を示す図である。

【図19D】本明細書で説明されるネステッドRPA増幅の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

40

図1A～1Dは、マイクロ流体核酸増幅デバイスに加えられたサンプルに全自動ネステッドRPAを実施するためのシステム100の構成要素を示す。図1Aはサンプルモジュール102を示し、受容器モジュール104および移送モジュール106を含む。図1Bはマイクロ流体核酸増幅デバイス110を示す。図1Cに示すように、サンプルモジュール102および核酸増幅デバイス108は接続されて核酸増幅アセンブリ110を形成する。図1Dはシステム100を示し、サンプルモジュール102から核酸増幅デバイス108に加えられるサンプルにおける標的核酸の存在の評価のための分析装置112に挿入される核酸増幅アセンブリ110を含む。

【0038】

システム100は、サンプルモジュール102の受容器モジュール104に加えられる

50

サンプルにおける標的核酸の存在の評価に使用される。サンプルモジュール102の受容器モジュール104および移送モジュール106、ならびに核酸増幅デバイス108は、RPAの第一ラウンド、続いて標的核酸がサンプルに存在する場合に増幅するためのRPAの第二ラウンドを実施するのに必要とされる試薬を含む。サンプルモジュール102および核酸増幅デバイス108を接続することによって、サンプルモジュールと核酸増幅デバイスの間に流路が生じ、RPA反応混合物の核酸増幅デバイスへの送達を可能にする。場合によっては、システム100はサンプルにおける2種類以上の標的核酸の存在を評価するために使用される。一つの例では、システム100はサンプルにおけるインフルエンザAウイルスおよびインフルエンザBウイルスの存在を評価するために使用される。特定の例では、サンプルモジュール102および核酸増幅デバイス108は、ネステッドRPAの3回以上のラウンドを実施するように構成される。

10

【0039】

図2A~2Eは、システム100の代替えとなるワークフローを示す。図2Aに示されるように、核酸増幅デバイス108は分析装置112に挿入される。図2Bでは、サンプルモジュール102が分析装置中の核酸増幅デバイス108に向けて進められる。分析装置112接触面の位置決め形状がサンプルモジュール102を接続前に二次元で制限し、サンプルモジュールと核酸増幅デバイス108を嵌合させて、流体をサンプルモジュールから核酸増幅デバイス、およびこの逆で通過させる通路を形成させる。図2Cは分析装置112における核酸増幅アセンブリ110を示す。サンプルモジュール102を核酸増幅デバイス108に接続することによって、サンプルモジュールから核酸増幅デバイスへの反応物の流れを開始し得、それによってサンプルにおける標的核酸の存在の評価を開始する。評価が終了すると、図2Dに示すように、分析装置112の位置決め形状は核酸増幅アセンブリ110を解放するように噛み合わされ得る。図2Eは分析装置112から解放後の核酸増幅アセンブリ110を示す。核酸増幅アセンブリ110は、分析装置112から解放された後に処分され得る。

20

【0040】

図3Aおよび3Bはサンプルモジュール102の受容器モジュール104の実施形態の斜視図を示す。図3Aは受容器モジュール104の斜視図を示し、試薬を含むサンプル、または両方を受容するためにチャンバー300を有する。受容器モジュール104はまた、受容器モジュールを移送モジュール106と一列に配置するための位置決め形状302を含む。図3Bは図3Aの裏側斜視図を示し、チャンバー300の底304の外面を示す。

30

【0041】

図4Aおよび4Bは受容器モジュール104と結合するように構成される移送モジュール106の実施形態の斜視図を示す。図4Aはチャンバー400を有する移送モジュール106の斜視図を示し、各チャンバーは流入口402および流出口404を有する。移送モジュール106はまた、移送モジュールを受容器モジュール104と一列に配置するための位置決め形状406を含む。図4Bは図4Aの裏側の斜視図を示し、底408、ならびにチャンバー400の流入口402および流出口404の外面を示す。

【0042】

図5A~5Gは、結合された受容器モジュール502および移送モジュール504を有するサンプルモジュール500にサンプルを加えるワークフローを示す。図5Aに示すように、サンプルモジュール500は、密封ポーチ506で提供され得る。密封ポーチ506はホイルポーチであり得る。図5Bはポーチ506から取り出した後のサンプルモジュール500を示し、ヒンジ508を開いて受容器モジュール502および移送モジュール504のそれぞれ密封シール510および512を露出させる。

40

【0043】

図5Cで示されるように、シール510は受容器モジュール502から取り除かれて、サンプルモジュール514およびブランクチャンバー516を露出し得る。サンプルチャンバー514およびブランクチャンバー516は一般的に緩衝溶液のような液体メディウ

50

ムを含む。サンプル（例えば、体液）は、サンプルチャンバー 5 1 4 にデバイス 5 1 8（例えば、綿棒）を介して送達され得、これによってサンプルをサンプルチャンバー 5 1 4 中の液体メディウムに導入する。ブランクチャンバー 5 1 6 は閉塞構成要素 5 2 0 でカバーされてブランクチャンバーへのサンプルの挿入を防止し得る。ガスケット 5 2 2 および 5 2 4 がそれぞれサンプルチャンバー 5 1 4 およびブランクチャンバー 5 1 6 の外部の周りに配置され得、サンプルチャンバー 5 1 4 にサンプルが加えられた後、受容器モジュール 5 0 2 と移送モジュール 5 0 4 の間の密封形成を促進する。受容器モジュール 5 0 2 上の位置決め形状 5 2 6 は、移送モジュール 5 0 4 上の相当する位置決め形状と嵌合するように構成される。

【0044】

図 5 D および 5 E で示されるように、シール 5 1 2 が移送モジュール 5 0 4 から取り除かれて、サンプルモジュール 5 2 8 およびブランクチャンバー 5 3 0 を露出し得る。保持構成要素 5 3 2 および 5 3 4 はそれぞれサンプルチャンバー 5 2 8 およびブランクチャンバー 5 3 0 に配置され、サンプルチャンバー、ブランクチャンバー、または両方に固体試薬を保持し得る。一つの例では、保持構成要素 5 3 2 は、サンプルチャンバー 5 2 8 に試薬ペレットを保持する。試薬ペレットは R P A 反応用のオリゴマーを含み得る。場合によっては、ペレットは凍結乾燥ペレットである。ブランクチャンバー 5 3 0 は固体試薬を無含有であり得る。保持構成要素 5 3 2 および 5 3 4 は一般的に、孔のような開口を定める。場合によっては、保持構成要素 5 3 2 および 5 3 4 はフリットである。フリットは受容器モジュール 5 0 2 から移送モジュール 5 0 4 への流体の移送を容易にするために選択される。一つの例では、保持構成要素 5 3 2 および 5 3 4 は親水性フリットである。移送モジュール 5 0 4 は、受容器モジュール 5 0 2 の位置決め形状 5 2 6 と嵌合するように構成される位置決め形状 5 3 6 を含む。

【0045】

シール 5 1 2 が移送モジュール 5 0 4 から取り除かれた後、図 5 F に示されるように、移送モジュールはヒンジ 5 0 8 を中心に回転されて受容器モジュール 5 0 2 に固定され得、保持構成要素 5 3 2 および 5 3 4 は、それぞれサンプルチャンバー 5 2 8 およびブランクチャンバー 5 3 0 に存在する試薬を保持する。受容器モジュール 5 0 2 および移送モジュール 5 0 4 が互いに押し付けられるとき、図 5 G に示されるように、位置決め形状 5 2 6 および 5 3 6 が係止的に噛み合い、ガスケット 5 2 2 がサンプルチャンバー 5 1 4 および 5 2 8 をともに密封し、ガスケット 5 2 4 がブランクチャンバー 5 1 6 および 5 3 0 をともに密封する。サンプルモジュール 5 0 2 が示されるように回転されて、受容器モジュール 5 0 2 の上に移送モジュール 5 0 4 を有するとき、反転が生じている前に、サンプルチャンバー 5 1 4 およびブランクチャンバー 5 1 6 中の液体メディウムは受容器モジュール中にあり続け、それぞれ移送モジュール 5 0 4 におけるサンプルチャンバー 5 2 8 およびブランクチャンバー 5 3 0 に向けて流れない。位置決め形状 5 2 6 および 5 3 6 は、不可逆的に受容器モジュール 5 0 2 および移送モジュール 5 0 4 を密封するように構成され得、サンプルモジュール 5 0 0 は意図せずに開くことができない。

【0046】

サンプルモジュール 5 0 0 を核酸増幅デバイスと結合する前に、サンプルモジュールを反転させて受容器モジュール 5 0 2 における液体メディウムの移送モジュール 5 0 4 に向けた移動を生じさせ、これによって移送モジュール内の固体試薬を水和化して水和化反応混合物を調製する。一つの例では、移送モジュール中の凍結乾燥 R P A 試薬は水和化された水和化反応混合物を生成する。

【0047】

図 6 A ~ 6 H は、サンプルを分離した受容器モジュール 6 0 2 および移送モジュール 6 0 4 を有するサンプルモジュール 6 0 0 に加える、代替えとなるワークフローを示す。図 6 A に示されるように、受容器モジュール 6 0 2 および移送モジュール 6 0 4 は、別々の密封ポーチ 6 0 6、6 0 6' でそれぞれ提供され得る。密封ポーチ 6 0 6 はホイルポーチであり得る。

【0048】

図6Bは密封ポーチ606'から取り出された後の移送モジュール604を示す。移送モジュール604はシール612で密封される。図6Cはポーチ606から取り出された受容器モジュール602を示す。受容器モジュール602はシール610で密封される。シール610を移送モジュール602から取り除いた後、図6Dに示されるように、サンプルチャンバー614およびブランクチャンバー616が露出される。サンプルチャンバー614およびブランクチャンバー616は一般的に緩衝溶液のような液体メディウムを含む。サンプル（例えば、体液）は、サンプルチャンバー614にデバイス618（例えば、綿棒）を介して送達され得、これによってサンプルをサンプルチャンバー中の液体メディウムに導入する。ブランクチャンバー616は閉塞構成要素620でカバーされてブランクチャンバーへのサンプルの挿入を防止し得る。ガasket622および624がそれぞれサンプルチャンバー614およびブランクチャンバー616の外部の周りに配置され得、受容器モジュール602と移送モジュール604の間の密封形成を促進する。受容器モジュール602上の位置決め形状626は、移送モジュール604上の相当する位置決め形状と嵌合するように構成される。

10

【0049】

図6Eに示されるように、シール612は移送モジュール604から取り除かれ得る。シール612を移送モジュール604から取り外し、サンプルチャンバーおよびブランクチャンバーを露出させる（図示なし）。保持構成要素（図示なし）はそれぞれサンプルチャンバーおよびブランクチャンバーに配置され、サンプルチャンバー、ブランクチャンバー、または両方に固体試薬を保持し得る。一つの例では、固体試薬はRPA反応用のオリゴマーを含む。場合によっては、固体試薬は凍結乾燥ペレットである。ブランクチャンバーは固体試薬を無含有であり得る。保持構成要素は一般的に孔のような開口を定める。場合によっては、保持構成要素はフリットである。フリットは受容器モジュール602から移送モジュール604への流体の移動を容易にするために選択される。一つの例では、保持構成要素は親水性フリットである。移送モジュール602は、受容器モジュール602の位置決め形状626と嵌合するように構成される位置決め形状636を含む。

20

【0050】

シール612を移送モジュール604から取り除いた後、図6Fに示されるように、移送モジュールは位置決め形状626および636を一行に配置するように反転され得る。この反転の際、移送モジュール604における保持構成要素は、移送モジュールのサンプルチャンバーおよびブランクチャンバーに存在する試薬を保持する。受容器モジュール602および移送モジュール604が互いに押し付けられるとき、図6Gに示されるように、位置決め形状626および636が係止的に噛み合い、ガasket622が受容器モジュールおよび移送モジュールのサンプルチャンバーをともに密封し、ガasket624が受容器モジュールおよび移送モジュールのブランクチャンバーをともに密封する。図6Gに示されるように受容器モジュール602の上に移送モジュール604があることにより、サンプルチャンバー614およびブランクチャンバー616中の液体メディウムは受容器モジュール中にあり続け、それぞれ移送モジュールにおけるサンプルチャンバーおよびブランクチャンバーに向けて流れない。位置決め形状626および636は、図6Hに示されるように、不可逆的に受容器モジュール602および移送モジュール604を密封するように構成され得、サンプルモジュール600は意図せずに開くことができない。

30

40

【0051】

サンプルモジュール600を核酸増幅デバイスに結合する前に、サンプルモジュールを反転させて受容器モジュール602における液体メディウムの移送モジュール604に向けた移動を生じさせ得、これによって移送モジュール内の固体試薬を水和化して水和化反応混合物を調製する。一つの例では、移送モジュール中の凍結乾燥RPA試薬は水和化されて水和化反応混合物を生成する。

【0052】

図7はサンプルモジュール500の斜視図である。移送モジュール500は、核酸増幅

50

デバイスと結合するように構成される移送モジュールの一部をカバーするシール700によってパッキングされ得る。シール700は流入口702および704ならびに流出口706および708の開口をカバーするために不透明表面を備えるホイルシールであり得る。シール700は反転時にサンプルモジュール500における水和化反応混合物を保持し得る。場合によっては、シール700がサンプルモジュール500から取り除かれ、核酸増幅デバイスはサンプルデバイスと結合され、サンプルモジュール500はこれが核酸増幅デバイスと密封化された後に初めて反転される。流入口702および704ならびに流出口706および708は核酸増幅デバイスに挿入されるように構成される先細端（すなわち、低い形状のルーアーコネクタ）を有し得る。場合によっては、ガasket 710、712、714、および716はそれぞれ流入口702、704、706、および708に配置されて、核酸増幅デバイスと気密を形成し得る。

10

【0053】

図8Aおよび8Bは、サンプルモジュールの代替えとなる実施形態を示す。図8Aは受容器モジュール802および移送モジュール804を含むサンプルモジュール800の斜視図である。図8Bはサンプルモジュール800の断面斜視図である。図8Bに示されるように、受容器モジュール802は開口808を有するサンプルチャンバー806を定める。サンプルチャンバー806は液体メディウム810を保持する。液体メディウム810は緩衝溶液であり得る。受容器モジュール802は流入口812および流出口814を含む。受容器モジュール802はまた、移送モジュール804の位置決め形状と噛み合うように構成される位置決め形状816を含む。

20

【0054】

移送モジュール804は、伸長820を有して、受容器モジュール802のサンプルチャンバー806を受容するように構成される開口822を定めるハウジング818を含む。ラム824はハウジングに配置され、ラムのアーム826に配置される伸長820を有する。アーム826はスプリング828内に配置され、スプリングは係脱830を有する負荷位置に保持される。多孔性構成要素832はラム824と開口822の間に配置される。多孔性構成要素832は固体試薬（例えば、凍結乾燥RPA試薬）を含む。位置決め形状834は受容器モジュール802の位置決め形状816と噛み合うように構成され、ガasket 836が受容器モジュールと移送モジュール804の間の密封を形成する。示されるように、受容器モジュール802は移送モジュール804の開口822内で密封される。位置決め形状816および834は、受容器モジュール802および移送モジュール804をガasket 836を介して密封するように係止的に噛み合う。位置決め形状816および834は、不可逆的に受容器モジュール802および移送モジュール804を密封するように構成され得、サンプルモジュール800は意図せずに開くことができない。

30

【0055】

図9A～9Eは、サンプルをサンプルモジュール800に加えるためのワークフローを示す。図9Aでは、シール900は受容器モジュール802から取り外される。図9Bでは、サンプルは受容器モジュール802のサンプルチャンバー806における液体メディウム810に開口808を通して加えられる。図9Cでは、移送モジュール804が受容器モジュール802に向けて進められ、位置決め形状816と834を係止的に噛み合わせる。受容器モジュール802が移送モジュール804にガasket 836を介して密封された後、力が係脱830に加えられて、図9Dに示されるようにスプリング負荷ラム824を解放し得る。スプリング負荷ラム824を解放すると多孔性構成要素832が開口822を通して進み、多孔性構成要素における固体試薬が受容器モジュール802の液体メディウム810中で水和化される。図9Eは受容器モジュール802において停止しているラム824を有する密封サンプルモジュール800を示し、固体試薬多孔性構成要素832を液体メディウム810に押し進めている。密封サンプルモジュール800は核酸増幅デバイスと結合されて、受容器モジュール802に加えられるサンプル中の標的核酸の存在が評価され得る。

40

50

【0056】

図10は、光学的検出のための核酸増幅デバイス1000の分解図を示す。核酸増幅デバイス1000は積層化マイクロ流体デバイスであり、天面層1002、中間層1004、および基底層1006を含む。基底層1006は1つを超える構成部品を含み得る。示されるように、基底層1006は2つの構成部品1008および1010を含む。

【0057】

中間層1004は、流入口1012および1014ならびに流出口1016および1018を含み、それぞれサンプルモジュールの流出口および流入口に接続する。中間層1004は一般的にRPA試薬のような試薬を含む。図10に示されるように、第一反応チャンバー1020は固体試薬1022（例えば、酢酸マグネシウムの形態で Mg^{2+} ）を含む。中間層1004は試薬リサーバ1024および1026を含み、固体試薬1028および1030を含む。一つの例では、固体試薬1028は乾燥した（例えば、凍結乾燥）オリゴマーを含み、固体試薬1030は Mg^{2+} （例えば、酢酸マグネシウムの形態）を含む。第二反応チャンバー1032もまた、標的核酸が分析装置によって光学的シグナルを介して検出される検出チャンバーとしても機能し得る。第二反応チャンバー1032は光学的に透明なカバーを有し、フルオロフォアとクエンチャーがエクソヌクレアーゼによって分離されるときに生じる蛍光シグナルを、核酸増幅デバイスが挿入されるように構成される分析装置の光学的センサーによって検出することができる。位置決め形状1036によって、分析装置に核酸増幅デバイス1000が位置合わせされる。

【0058】

中間層1004もまた、フロー検出チャンバー1034を含み、それぞれが透明カバーを有し、それを通して流体の存在が分析装置によって光学的にモニタリングされて液流を検出する。核酸増幅デバイス1000を受容するように構成される分析装置は、構成される各フロー検出チャンバーに向けられる光源を含む。分析装置は各フロー検出チャンバーにおける液体の存在を検出するように（例えば、光散乱によって）構成される。フロー検出チャンバーにおける液体の検出は様々な操作を引き起こし得（例えば、ポンピングの開始または終了）、分析装置のコントローラーはフロー検出チャンバーにおける液体の検出に基づいて様々なパラメータ（例えば、ポンピング時間、反応時間、混合時間、フロー時間）を実行するように構成され得、試薬は所定容量で加えられ、所定時間反応させられる。

【0059】

核酸増幅デバイス1000は図10に示されないポンプおよびマイクロ流体経路のような追加の特徴を含み得る。ポンプの1つ以上は蠕動ポンプまたはシリンジポンプであり得る。ポンプは光学的分析装置における光学的センサーによって検出されるフロー検出チャンバーを通る経過時間または流体流量に基づいてサンプルモジュールおよび第一反応チャンバー1020から第二反応チャンバー1032に向けて試薬を選択的に駆動し得、必要に応じて小分けを計量する。

【0060】

サンプルモジュールを有する核酸増幅デバイス1000の操作は、図11と関連して説明される。サンプルモジュールが核酸増幅デバイス1000と接続されるとき、サンプルモジュールの流出口は核酸増幅デバイスの流入口1012および1014と接続され、サンプルモジュールの流入口は核酸増幅デバイスの流出口1016および1018と接続される。サンプルモジュールの試薬は核酸増幅デバイス1000の流入口1012および1014にサンプルモジュールの流出口を介して流入し、核酸増幅モジュールから移された流体（例えば、ガス、液体、または両方）が核酸増幅モジュールの流出口1016および1018を介してサンプルモジュールの流入口に流入する。

【0061】

より詳細には、サンプルおよび緩衝液は、移送モジュールのサンプルチャンバーにおけるRPA試薬（例えば、乾燥オリゴマー）を水和化するために、受容器モジュールのサンプルチャンバーから流出口を通して流入口1012に流入する。第一ポンプ1040はこ

の第一反応混合物を第一フロー検出チャンバー1042に通して進める。

【0062】

フロー検出チャンバーから、第一反応混合物が混合チャンバー1044を通して第二フロー検出チャンバー1046まで第一ポンプに引き出され、第一反応チャンバー1020に流入する。第一反応チャンバー1020はRPA試薬1022（例えば、酢酸マグネシウムの形態における Mg^{2+} ）を含み、ヒーターおよび混合装置と接続される。混合装置は磁気混合装置1048として存在し得る。十分な混合時間後、第一ポンプ1040は第一反応チャンバー1020で産生される産物を第三フロー検出チャンバー1050に前進させる。第三フロー検出チャンバー1050から、エアーおよび第一反応チャンバーからの第一RPA反応産物の一部が、流出口1016を介してサンプルモジュールに向けて流れる。

10

【0063】

第一反応チャンバー1020からの産物の小分けが第二ポンプ1054によって分岐1052から引き出され、第四フロー検出チャンバー1056に向けて流れる。第三ポンプ1058が第二RPA反応用の試薬（例えば、緩衝液）を、移送モジュールの流出口を介して移送モジュールのブランクチャンバーから核酸増幅デバイス1000の流入口1014に引き出し、第五フロー検出チャンバー1060に通す。第四フロー検出チャンバー1056および第五フロー検出チャンバー1060は、Y字接合点1062で合流し、第一RPA反応からの産物の選択された量を第二RPA反応用の試薬と混合する。この混合物は第二ポンプ1054および第三ポンプ1058によって、混合構成要素の第一シリーズ1064および混合構成要素の第二シリーズ1066を通してポンプによって送られる。混合構成要素1066を通過後、混合物は接合点1068で分岐され、再度接合点1070で分岐されて反応混合物の4つの流れを生じる。各液流は反応混合物を試薬1028（例えば、酢酸マグネシウムの形態における Mg^{2+} ）と混合するように構成される混合シリンドラー1072を有する第一試薬リサーバ1024を通して流れる。第一試薬リサーバ1024から、各混合物が試薬1030を含む第二試薬リサーバ1026を通して流れる。第二試薬リサーバ1026における試薬1030は同一または異なり得る。一つの例では、試薬1030の少なくとも2つは、インフルエンザAウイルスおよびインフルエンザBウイルスのような、対象の特定標的に対する異なるRPAプライマーを含む。

20

【0064】

第二試薬リサーバ1026から、第三ポンプ1058が混合物を混合構成要素1074に通して第二反応チャンバー1032に移動させる。第二増幅が第二反応チャンバー1032で生じる。第二反応チャンバー1032はまた、検出チャンバーとして機能し得る。核酸増幅デバイス1000では、第二反応チャンバー1032は光学的に透明なカバーを有し、フルオロフォアとクエンチャーがエクソヌクレアーゼによって分離されるときに生じる蛍光シグナルを、図15～18と関連して説明される分析装置のような、核酸増幅デバイスが挿入されるように構成される分析装置において光学的に検出することができる。

30

【0065】

図12は、電気化学的検出のための核酸増幅デバイス1200の分解図を示す。核酸増幅デバイス1200は積層化マイクロ流体デバイスであり、センサー層1201、天面層1202、中間層1204、および基底層1006を含む。基底層1206は1つを超える構成部品を含み得る。示されるように、基底層1206は2つの構成部品1208および1210を含む。

40

【0066】

中間層1204は、流入口1212および1214ならびに流出口1216および1218を含み、それぞれサンプルモジュールの流出口および流入口に接続する。中間層1204は一般的にRPA試薬のような試薬を含む。図12に示されるように、第一反応チャンバー1220は固体試薬1222（例えば、酢酸マグネシウムの形態で Mg^{2+} ）を含む。スターラー1223が固体試薬1222に埋め込まれ得る。一つの例では、スターラーは磁気バックである。第二反応チャンバー1232はまた、検出チャンバーとして機能

50

し得、天面層 1202 に開口 1225 を有して、反応チャンバー中の液体をセンサー層 1201 の裏面で電極と接触させる。中間層 1204 はまた、フロー検出チャンバー 1234 を含み、流体の存在が天面層 1202 の開口の上に重ねられるセンサー層 1201 における電極によって電氣的にモニタリングされ、フロー検出チャンバーを通して流れる液体が電極と接触する。位置決め形状 1236 によって、分析装置に核酸増幅デバイス 1200 が位置合わせされる。

【0067】

核酸増幅デバイス 1200 は図 12 に示されないポンプおよびマイクロ流体経路のような追加の特徴を含み得る。ポンプの 1 つ以上は蠕動ポンプまたはシリンジポンプであり得る。ポンプは電氣的な分析装置におけるセンサーによって検出されるフロー検出チャンバー 1220 から第二反応チャンバー 1232 に向けて試薬を選択的に駆動し得、必要に応じて小分けを計量する。

【0068】

サンプルモジュールを有する核酸増幅デバイス 1200 の操作は、中間層の上部透視図を示す図 13 と関連して説明される。サンプルモジュールが核酸増幅デバイス 1200 と接続されるとき、サンプルモジュールの流出口は核酸増幅デバイスの流入口 1212 および 1214 と接続され、サンプルモジュールの流入口は核酸増幅デバイスの流出口 1216 および 1218 と接続される。サンプルモジュールの試薬は、サンプルモジュールの流出口を介して核酸増幅デバイス 1200 の流入口 1212 および 1214 に流入し、核酸増幅モジュールから移された流体（例えば、ガス、液体、または両方）が核酸増幅モジュールの流出口 1216 および 1218 を介してサンプルモジュールの流入口に流入する。

【0069】

より詳細には、サンプルおよび緩衝液は、移送モジュールのサンプルチャンバーにおける RPA 試薬（例えば、乾燥オリゴマー）を水和化するために、受容器モジュールのサンプルチャンバーから流出口を通して流入口 1212 に流入する。第一ポンプ 1240 はこの第一反応混合物をフロー検出チャンバー 1242 を通して第一ポンプに進め、混合チャンバー 1244 を通って第二フロー検出チャンバー 1246 まで進めて、第一反応チャンバー 1220 に流入させる。第一反応チャンバー 1220 は、RPA 試薬 1222（例えば、酢酸マグネシウムの形態で Mg^{2+} ）を含み、ヒーターおよび混合装置と接続される。混合装置は磁気混合装置 1248 として存在し得る。十分な混合時間後、第一ポンプ 1240 は第一反応チャンバー 1220 で産生される産物を第三フロー検出チャンバー 1250 に進める。第三フロー検出チャンバー 1250 から、エアーおよび第一反応チャンバーからの第一 RPA 反応産物の一部が流出口 1216 を介してサンプルモジュールに向けて流れる。

【0070】

第一反応チャンバー 1220 からの産物の小分けが第二ポンプ 1254 によって分岐 1252 から引き出され、第四フロー検出チャンバー 1256 に向けて流れる。第三ポンプ 1258 が第二 RPA 反応用の試薬（例えば、緩衝液）を、移送モジュールの流出口を介して移送モジュールのブランクチャンバーから核酸増幅デバイス 1200 の流入口 1214 に引き出し、第五フロー検出チャンバー 1260 に通す。第四フロー検出チャンバー 1256 および第五フロー検出チャンバー 1260 は、Y 字接合点 1262 で合流し、第一 RPA 反応からの産物の選択された量を第二 RPA 反応用の試薬と混合する。この混合物は第二ポンプ 1254 および第三ポンプ 1258 によって混合構成要素の第一シリーズ 1264 および混合構成要素の第二シリーズ 1266 を通ってポンプによって送られる。混合構成要素 1266 を通過後、混合物は接合点 1268 で分岐され、再度接合点 1270 で分岐されて反応混合物の 4 つの流れを生じる。各液流は反応混合物を試薬 1228（例えば、酢酸マグネシウムの形態における Mg^{2+} ）と混合するように構成される混合シリンダー 1272 を有する第一試薬リサーバ 1224 を通って流れる。第一試薬リサーバ 1224 から、各混合物が試薬 1230 を含む第二試薬リサーバ 1226 を通って流れる。

第二試薬リサーバ1226における試薬1230は同一または異なり得る。一つの例では、試薬1230の少なくとも2つは、インフルエンザAウイルスおよびインフルエンザBウイルスのような、対象の特定標的に対する異なるRPAプライマーを含む。

【0071】

第二試薬リサーバ1226から、第三ポンプ1258が混合物を混合構成要素1274に通して第二反応チャンバー1232に移動させる。第二増幅が第二反応チャンバー1232で生じる。第二反応チャンバー1232はまた、検出チャンバーとして機能し得る。核酸増幅デバイス1200では、第二反応チャンバー1232における液体がセンサー層1201の裏側の電極と接触し、米国第62/300,242号で報告されているように、酸化還元活性化合物によって標識されているRPAプローブから切断されている酸化還元活性化合物の酸化から生じる電子が、核酸増幅デバイスが挿入されるように構成される分析装置によって検出される。

10

【0072】

図14は天面層1202および中間層1204の開口の上に重ねられるセンサー層1201における電極を有する核酸増幅デバイス1200の上部透視図を示す。電極はセンサー層1201の裏側に配置され、フローセンサー検出器1246、1250、1256、および1260、ならびに反応チャンバー1232における液体と接触する。一つの例では、感知電極ならびに分析装置と電氣的に接続する末端に感知電極を電氣的に接続する伝導路は、センサー層に第一伝導層を配置することによって形成され得る。別の例では、第一伝導層はセンサー層で第二伝導層の上に配置され得る。電極は伝導層をマスキングして暴露される領域に誘電層を配置することによって電氣的に分離され得る。一つの例では、第一伝導材はカーボンを含む。別の例では、第二伝導材は銀を含む。本明細書で使用されるとき、「配置する」はスクリーンプリンティングのようなプリンティング法を含む。銀層がカーボン層の下に配置されるとき、得られる伝導路は一般的にカーボンが単独で用いられて形成される伝導路と比べて低い抵抗を有する。両例では、電気化学的測定はカーボン表面で実施される。

20

【0073】

フローセンサー検出器1246および1250はそれぞれ2つの液体感知電極と電氣的に接続される。フローセンサー検出器1246では、液体感知電極1400および1402は配線1404および1406と電氣的に接続され、それぞれ連結1408および1410と電氣的に接続される。フローセンサー検出器1256および1260はそれぞれ4つの液体感知電極と電氣的に接続される。フローセンサー検出器1260では、液体感知電極1412および1414は配線1420および1422と電氣的に接続され、それぞれ連結1428および1430と電氣的に接続され、電極1416および1418は配線1424および1426と電氣的に接続され、それぞれ連結1432および1434と電氣的に接続される。各検出チャンバー1232は3つの測定電極と接続され、参照電極1436、作用電極1438、および対電極1440を含み、各電極は配線を介して連結と電氣的に接続される。配線は伝導材（例えば、銀）を含む伝導路であり得る。連結は分析装置における末端と係合するように構成される。

30

【0074】

液体感知電極は伝導性の原理で作用する。すなわち、電圧が末端を通して加えられ、流体が各チャンバー内の感知電極と接触するとき、電流が流体を通り、分析装置が電流を検出する。測定電極のため、電位は対電極と作用電極の間に加えられ、参照電極は加えられた電位が予測通りであることを確実にするために作用する。電流測定モードで操作されるとき、電流は作用電極と接触する電気活性種の濃度に比例して流れる（標的種の酸化または還元が特異的電位で生じるかどうか依存して効果的に電子が受容または供与される）。示差パルスボルタメトリモードでは、電位は一つの電圧から別に変えられ、記録される得られる電流が電気活性種の酸化または還元の結果としてピークへの上昇および／または谷をもたらす。

40

【0075】

50

図15は核酸増幅システム1500を示し、分析装置1504に挿入される核酸増幅デバイス1502を含む。核酸増幅デバイス1502および分析装置は、RPA産物の光学的または電気化学的検出のために構成され得る。場合によっては、分析装置における核酸増幅デバイスの挿入は、核酸増幅デバイスに加えられたサンプルにおける標的核酸の存在の評価を開始する。他の例では、核酸増幅デバイスへのサンプルモジュールのその後の接続が、サンプルにおける標的核酸の存在の評価を開始する。さらに別の例では、核酸増幅デバイスに加えられたサンプルにおける標的核酸の存在の評価は、核酸増幅デバイスまたはアセンブリの分析装置への挿入後に使用者によって開始される。

【0076】

図16に示されるように、核酸増幅デバイス1502および分析装置1504は、RPA産物の光学的検出のために構成される。特に、分析装置1504は核酸増幅デバイス1502の検出チャンバーにおけるRPA産物と結合される蛍光プローブからの蛍光を検出するように構成される。分析装置1504は、光源、各光源に対応する励起光ガイド1600、各放出光ガイド1602に対応する放出光ガイド、および光検出器を含む。光源は一般的に光放出ダイオード(LED)であり、LED放出ピークと標的蛍光標識の吸収の間の優れた適合性を達成するように選択される。分析装置1504は傾斜形状を取り入れて、単一光源放出フィルターを用いて複数の反応セルからの蛍光測定を可能にする。

【0077】

図17は図16の一部の拡大図を示す。図17に示されるように、分析装置1504は4つの光源を含み、核酸増幅デバイス1502における4つの検出チャンバー1700から蛍光測定を可能にする。励起光ガイド1600は光を光源から検出チャンバー1700に向かわせ、放出光ガイド1602は蛍光放出を検出チャンバーから光学的フィルターを介して共通光ダイオードに向かわせる。4つの測定チャンネル間は4つの光源の時分割多重化によって区別される。各励起光ガイド1600は光源の1つからの入射光を平面における標的に向けるように構成され、入射光と平面の間の角度は30°と60°の間(例えば、40°)であり、各放出光ガイド1602は放出光を標的から光検出装置に向けるように構成され、放出光の間の角度は40°と60°の間(例えば、30°)である。分析装置1504は一般的に各光源に対応する第一レンズおよび第二レンズを含み、その相当する光源から第一レンズを通して送られる光を調整し、全内部反射を介して、調整された光を第二レンズに対する角度で向かわせるように構成されるそれぞれに相当する励起光ガイドを有する。

【0078】

図18A~18Cは分析装置1504の傾斜形状を示す。図18A~18Cに示される角度は、例示的なものであり、説明を容易にするために選択されているが、これらの角度は分析装置1500の実施形態で変更され得る。図18Aに示されるように、回転軸は反応チャンバー1700の中心と接続するラインに対して45°で方向付けられる。この構成は励起光ガイドと放出光ガイドの間の位置的な衝突を避け易くする。図18Bは検出チャンバー表面基準に対して30°の光学的な励起軸を示す(y軸を中心としてx面で回転させる)。図18Cは検出チャンバー表面基準に対して40°の光学的な放出軸を示す(回転の直交軸を中心として、すなわち、x軸を中心としてをyz面で回転させる)。回転の中心は基準液体表面位置の下である(例えば、0.1~1mm下)。傾斜角度の他の組み合わせを下表1に示す。励起光ガイドと放出光ガイドにおける最大屈曲角度は、一般的に45°以下である。

【表 1】

表 1. 励起および放出光ガイドの傾斜角度

放出光ガイド角 (°)	励起光ガイド角 (°)
20	45
30	40
34	34
40	30
45	20

10

【0079】

分析装置 1504 は光源および光検出器と作動的に連結されるコントローラーを含む。コントローラーは光源によって入射光の発生を開始し、検出チャンバーから放出された光の収集を開始する。分析装置 1504 は一般的に単一光検出器および放出光ガイドと光検出器の間に作動的に配置される単一放出フィルターを含むが、いくつかの実施形態では、1 つ以上の追加の光検出器、放出フィルター、または両方が存在し得る。

【0080】

本明細書で説明されるデバイスおよび方法はリコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (RPA) 技術の適用として説明されているが、標的核酸を増幅して検出するための他の等温技術も本明細書で説明されるデバイスで実施され得、例えばニッキングおよび伸長増幅反応 (NEAR) 技術が挙げられる。本明細書で説明される RPA 増幅および RPA 増幅産物の検出の方法は、米国特許第 7, 399, 590 号、第 8, 580, 507 号、第 7, 270, 981 号、第 7, 399, 590 号、第 7, 666, 598 号、第 7, 435, 561 号、第 9, 469, 867 号、第 9, 057, 097 号、第 8, 071, 308 号、第 8, 637, 253 号、および第 8, 062, 850 号で詳細に報告されている。NEAR 法は米国特許出願公開第 2009/0081670 号および第 2009/0017453 号で報告されている。前述の参照文献のそれぞれは、その全体が本明細書に参照により組み込まれ、本開示の一部と考えられる。

20

【0081】

本明細書で説明されるように、RPA はオリゴヌクレオチドプライマーを鋳型二本鎖核酸における相同配列と対を形成することができる、リコンビナーゼとして知られている酵素を使用する。RPA は、2 種類のプライマーを鋳型とともに二本鎖 DNA に挿入するためのリコンビナーゼ、DNA の置換された鎖を安定化してプライマーが置換されることを防ぐための一本鎖 DNA 結合タンパク質、および鋳型 DNA に結合されるプライマーを伸長するための鎖置換ポリメラーゼを導入する。この方法では、DNA 合成は鋳型二本鎖核酸における定められた地点に向けられる。2 種類以上の配列特異的 (例えば、遺伝子特異的) プライマーを用いて、鋳型核酸が存在する場合、指数関数的増幅反応が開始される。反応は急速に進行し、数分で鋳型核酸のわずかな数コピーから検出可能な増幅産物の量まで、鋳型二本鎖核酸内に存在する配列の特異的増幅をもたらす。RPA プロセスは生理学的な温度 (例えば、37~42 °C) 下の等温条件で進行する。RPA 法は、例えば、US 7, 270, 981、US 7, 399, 590、US 7, 666, 598、US 7, 435, 561、US 2009/0029421、および WO 2010/141940 で開示されており、そのすべてが本明細書に参照により組み込まれている。

30

40

【0082】

RPA は細胞 DNA 複製および修復機構の成分を組み入れ、特定の密集剤の存在下で達成される高レベルの組換え活性を維持するリコンビナーゼの負荷および解除の両方の十分な速度を有する、「動的」組換え環境を確立する。RPA は、感度、特異性、および PCR のほとんど他の特徴を併せもつが、サーモサイクリングを必要とせず、驚くほどの速度および温度非設定に対する頑強性を有する。RPA は、耐熱性である同等物、一本鎖 DN

50

A結合タンパク質のようなアクセサリタンパク質を伴わない不十分な調節、またはこれらの組み合わせの少なくとも部分的な必要性のため、他のプロセスによって使用されていない既知の修復エンドヌクレアーゼのような、幅広い様々な核酸処理酵素の使用の可能性による利点を有する。

【0083】

簡単に説明すると、RPAは次のステップを含む。最初に、リコンビナーゼ剤を第一および第二核酸プライマーと接触させて第一および第二核タンパク質プライマーを形成させる。第二に、第一および第二核タンパク質プライマーを二本鎖標的配列と接触させて第一鎖の第一部分に第一二本鎖構造を形成させ、第二鎖の第二部分に二本鎖構造を形成させ、そして当該第一核酸プライマーおよび当該第二核酸プライマーの3'端を所定の鋳型DNA分子で互い同士に向き合わせる。第三に、第一および第二核タンパク質プライマーの3'端がDNAポリメラーゼによって伸長されて、第一および第二二本鎖核酸、ならびに核酸の第一および第二置換鎖を産生する。第二および第三ステップは、所望の増幅度に達するまで繰り返される。

【0084】

本開示はまた、マイクロ流体カートリッジまたはデバイス内でネステッドRPAを実施する方法を提供する。ネステッドRPAでは、核酸の第一領域はRPAによって増幅され、第一増幅領域を形成する。ついで、完全に第一増幅領域内にある核酸の第二領域を、RPAを用いて増幅して第二増幅領域を形成する。このプロセスは複数回反復され得る。例えば、核酸の第三領域は、完全に第二領域内であり、第二増幅領域からRPAによって増幅され得る。

【0085】

本明細書で開示されるRPA試薬は、標的核酸配列を増幅するプライマーセットを含むことができる。プライマーは標的核酸配列と相補的である、または標的核酸配列と1つ以上の位置で異なる核酸を含むことができる。本明細書で説明されるように、標的核酸配列と1つ以上の位置で異なるプライマーによるRPAの増幅産物は、1つ以上の位置で標的配列と異なり得る。本明細書で説明されるRPA反応の増幅産物は、標的切断配列を含むことができる。

【0086】

RPAプライマーセットは、標的核酸配列を増幅する、または標的核酸配列と1つ以上の位置で異なる配列を導入することができる。この導入された配列は標的切断配列からなることができる。第一プライマーは標的核酸配列と相補的であることができる。第二プライマーは標的核酸配列と相補的である第一部分、および標的核酸配列と1つ以上の位置で異なる第二部分を含むことができる。2つのプライマーが核酸配列を増幅するとき、第二プライマーは1つ以上の異なる位置を増幅産物に組み込む。この増幅領域は標的核酸配列と1つ以上の位置で異なり、標的切断配列からなることができる。

【0087】

本明細書で開示されるRPA組成物はリコンビナーゼを含み、原核生物、ウイルス、または真核生物起源を由来とし得る。例示的なリコンビナーゼには、RecAおよびUvsX（例えば、いずれかの種から得られるRecAタンパク質またはUvsXタンパク質）、およびこれらのフラグメントまたは変異体、ならびにこれらの組み合わせが含まれる。RecAおよびUvsXタンパク質はいずれかの種から得ることができる。RecAおよびUvsXフラグメントまたは変異体タンパク質はまた、利用可能なRecAおよびUvsSタンパク質および核酸配列、ならびに分子生物学技術（例えば、米国特許第8,071,308号に記載されるUvsXの変異型を参照）を用いて産生することができる。例示的なUvsXタンパク質にはミオウイルス科由来のものが含まれ、T4、T2、T6、Rb69、Aeh1、KVP40、アシネトバクターファージ133、アエロモナスファージ65、シアノファージP-SSM2、シアノファージPSSM4、シアノファージSPM2、Rb14、Rb32、アエロモナスファージ25、ビブリオファージnt-1、phi-1、Rb16、Rb43、ファージ31、ファージ44RR2.8t、Rb4

9、ファージ R b 3、およびファージ L Z 2 が挙げられる。追加の例示的なリコンビナーゼタンパク質には、古細菌 R A D A および R A D B タンパク質、ならびに真核生物（例えば、植物、哺乳動物、および真菌）R a d 5 1 タンパク質（例えば、R A D 5 1、R A D 5 1 B、R A D 5 1 C、R A D 5 1 D、D M C 1、X R C C 2、X R C C 3、および r e c A）が挙げられる（例えば、L i n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 1 0 3 : 1 0 3 2 8 - 1 0 3 3 3 , 2 0 0 6 を参照）。

【0088】

本開示のいずれかのプロセスでは、リコンビナーゼ（例えば、U v s X）は変異体またはハイブリッドリコンビナーゼであり得る。いくつかの実施形態では、変異体 U v s X は、R b 6 9 U v s X アミノ酸配列に少なくとも 1 つの変異を含む R b 6 9 U v s X であり、ここで変異は 6 4 位でのヒスチジンではないアミノ酸、6 4 位でのセリン、C 端での 1 つ以上のグルタミン酸残基の付加、C 端での 1 つ以上のアスパラギン酸残基の付加、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。他の実施形態では、変異体 U v s X は T 6 U v s X アミノ酸配列に少なくとも 1 つの変異を有する T 6 U v s X であり、ここで変異は、（a）6 6 位でのヒスチジンではないアミノ酸、（b）6 6 位でのセリン、（c）C 端での 1 つ以上のグルタミン酸残基の付加、（d）C 端での 1 つ以上のアスパラギン酸残基の付加、および（e）これらの組み合わせからなる群から選択される。ハイブリッドリコンビナーゼタンパク質が使用される場合、ハイブリッドタンパク質は、例えば、異なる U v s X 種由来のアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの領域を含む U v s X タンパク質であり得る。領域は、例えば、U v s X の D N A 結合ループ 2 領域であり得る。

【0089】

本明細書で開示される D N A ポリメラーゼは、真核生物または原核生物ポリメラーゼであり得る。真核生物ポリメラーゼの例には、p o l - α、p o l - β、p o l - δ、p o l - ι、およびこれらの変異体またはフラグメント、あるいはこれらの組み合わせが含まれる。原核生物ポリメラーゼの例には、大腸菌 D N A ポリメラーゼ I（例えば、クレノウフラグメント）、バクテリオファージ T 4 g p 4 3 D N A ポリメラーゼ、バシルス・ステアロサーモフィルスポリメラーゼ I 大型フラグメント、P h i - 2 9 D N A ポリメラーゼ、T 7 D N A ポリメラーゼ、バシルス・スプチリス P o l I、スタフィロコックス・アウレウス P o l I、大腸菌 D N A ポリメラーゼ I、大腸菌 D N A ポリメラーゼ I I、大腸菌ポリメラーゼ I I I、大腸菌 D N A ポリメラーゼ I V、大腸菌 D N A ポリメラーゼ V、およびこれらの変異体またはフラグメント、あるいはこれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、D N A ポリメラーゼは 3' - 5' エクソヌクレアーゼ活性を欠如する。いくつかの実施形態では、D N A ポリメラーゼは鎖置換特性、例えば、クラス p o l I または p o l V の原核生物ポリメラーゼの大型フラグメントを有する。

【0090】

さらに、1 つ以上の一本鎖 D N A 結合タンパク質を、反応中に進行する様々な交換反応の際に核酸を安定化するために使用することができる。1 つ以上の一本鎖 D N A 結合タンパク質はいずれかの種、例えば、原核生物、ウイルス、または真核生物種由来、またはこれらから得ることができる。非限定的な例の一本鎖 D N A 結合タンパク質には、大腸菌 S S B およびミオウイルス科ファージ由来のものが含まれ、T 4、T 2、T 6、R b 6 9、A e h 1、K V P 4 0、アシネトバクターファージ 1 3 3、アエロモナスファージ 6 5、シアノファージ P - S S M 2、シアノファージ P S S M 4、シアノファージ S - P M 2、R b 1 4、R b 3 2、アエロモナスファージ 2 5、ビブリオフィアージ n t - 1、p h i - 1、R b 1 6、R b 4 3、ファージ 3 1、ファージ 4 4 R R 2 . 8 t、R b 4 9、ファージ R b 3、およびファージ L Z 2 が挙げられる。一本鎖 D N A 結合タンパク質の追加の例には、A . デニトリフィカンス A l i d e _ 2 0 4 7、パークホルデリア・タイランデンシス B t h a B _ 3 3 9 5 1、プレボテラ・パレンス H M P R E F 9 1 4 4 _ 0 1 2 4、および真核生物一本鎖 D N A 結合タンパク質複製タンパク質 A が含まれる。

【0091】

本開示のRPAプロセスのいずれかは密集剤の存在下で実施され得る。いくつかの実施形態では、密集剤はポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、フィコール、デキストラン、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）、トライトン-X、およびアルブミンの1種類以上を含み得る。いくつかの実施形態では、密集剤は200,000ダルトン未満の分子量を有する。本明細書で説明される態様のいずれかのいくつかの実施形態では、組成物はポリエチレングリコール（PEG）（例えば、PEG1450、PEG3000、PEG8000、PEG10000、PEG14000、PEG15000、PEG20000、PEG25000、PEG30000、PEG35000、PEG40000、15,000と20,000ダルトンの間の分子量を有するPEG化合物、またはこれらの組み合わせ）、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、トライトン-X、およびフィコールからなる群から選択される密集剤を含む。いくつかの実施形態では、密集剤は反応混合物の重量または容量で1~15%の濃度で反応混合物中に存在し、例えば、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10.0%、10.5%、11.0%、11.5%、12.0%、12.5%、13.0%、13.5%、14.0%、14.5%、および15.0%から選択されるいずれかの2濃度値の間である。

10

【0092】

20

リコンビナーゼ含有タンパク質が使用される場合、リコンビナーゼ含有タンパク質は原核生物、ウイルス、または真核生物由来のものであり得る。例示的なリコンビナーゼ含有タンパク質には、大腸菌RecO、大腸菌RecR、UvsY、およびこれらの変異体またはフラグメント、あるいはこれらの組み合わせが含まれる。例示的なUvsYタンパク質にはミオウイルス科ファージ由来のものが含まれ、T4、T2、T6、Rb69、Aeh1、KVP40、アシネトバクターファージ133、アエロモナスファージ65、シアノファージPSSM2、シアノファージPSSM4、シアノファージS-PM2、Rb14、Rb32、アエロモナスファージ25、ビブリオファージnt-1、phi-1、Rb16、Rb43、ファージ31、ファージ44RR2.8t、Rb49、ファージRb3、およびファージLZ2が挙げられる。本開示のプロセスのいずれかでは、リコンビナーゼ含有剤はミオウイルス科ファージ由来であり得る。ミオウイルス科ファージは、例えば、T4、T2、T6、Rb69、Aeh1、KVP40、アシネトバクターファージ133、アエロモナスファージ65、シアノファージPSSM2、シアノファージPSSM4、シアノファージS-PM2、Rb14、Rb32、アエロモナスファージ25、ビブリオファージnt-1、phi-1、Rb16、Rb43、ファージ31、ファージ44RR2.8t、Rb49、ファージRb3、またはファージLZ2であり得る。

30

【0093】

本発明の方法における使用に適した増幅方法は、増幅の際に二本鎖ポリヌクレオチドを変性させるのに十分な温度にポリヌクレオチドをさらすことなく実施される増幅方法を含む。例えば、ポリヌクレオチドの増幅は、増幅の際に約90℃、約80℃、約70℃、または約60℃を超える温度にポリヌクレオチドをさらすことなく実施され得る。実施形態では、ポリヌクレオチドの増幅は、増幅の際に二本鎖ポリヌクレオチドを変性させるのに十分な条件にポリヌクレオチドをさらすことなく実施される。例えば、増幅はポリヌクレオチドを増幅の際に二本鎖ポリヌクレオチドを変性させるのに十分な物理的、化学的、または温度的条件にポリヌクレオチドをさらすことなく実施され得る。

40

【0094】

本発明の方法における使用に適した増幅方法は、サンプルに存在する二本鎖ポリヌクレオチドを変性させるのに十分な温度に、ポリヌクレオチドを最初にさらすことなく実施される増幅方法を含む。例えば、ポリヌクレオチドの増幅は、約90℃、約80℃、約70℃、約60℃、または約55℃を超える温度に、ポリヌクレオチドを最初にさらすことな

50

く実施され得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドおよび／またはこのアンプリコンはこのような過剰な温度に、ポリヌクレオチドを最初にさらすことなく検出される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの増幅は、サンプルに存在する二本鎖ポリヌクレオチドを変性させるのに十分な条件に、ポリヌクレオチドを最初にさらすことなく実施される。例えば増幅は、サンプルに存在する二本鎖ポリヌクレオチドを変性させるのに十分な物理的、化学的、または温度的条件に、ポリヌクレオチドを最初にさらすことなく実施され得る。

【0095】

本発明の方法における使用に適した増幅方法は、増幅を実施するのに十分な試薬とポリヌクレオチドを混合するステップで開始し、増幅がポリヌクレオチドまたはこのアンプリコンの定性的または定量的測定を可能にするのに十分な量まで進行しているときに終了する全時間（T）で実施される増幅方法を含む。このような実施形態のいずれかでは、全時間Tは約45分以内、約30分以内、約20分以内、または約15分以内であり得る。

【0096】

ポリヌクレオチドの増幅は、例えば、ポリヌクレオチドを少なくとも約 10^6 倍、少なくとも約 10^7 倍、少なくとも約 10^8 倍、少なくとも約 10^9 倍、少なくとも約 10^{10} 倍、少なくとも約 10^{11} 倍、または少なくとも約 10^{12} 倍で増幅することを含む。このような増幅は時間T以内で実施され得る。

【0097】

本発明の方法における使用に適した増幅方法は、当業者に知られている「リアルタイム」または「定量的」ポリヌクレオチド増幅方法を含む。このような方法は反応が進行するときにリアルタイムで各増幅サイクル後のポリヌクレオチド増幅産物の蓄積を検出し、増幅動態を測定することができる。リアルタイム法は、増幅される産物の特異的閾値濃度に到達する時間（例えば、サイクル数）が標的ポリヌクレオチドの最初のコピー数と直接的に関連するため、定量的である。いくつかの実施形態によれば、増幅反応は本明細書で説明されるオリゴヌクレオチドプローブを用いた電気化学的検出によってモニタリングされる。

【0098】

例

例1：ネステッドRPA増幅

図19A～19Dは本明細書で説明されるマイクロ流体カードでネステッドRPAを実施する方法を用いて行われた分析結果を示す。結果は異なる既知標的を有するサンプル間を区別するネステッドRPAアッセイの能力を示す。サンプルはインフルエンザ陽性およびインフルエンザ陰性サンプル材料の供給業者から得た。一連の測定を全90例のサンプルを用いて実施し、30例のサンプルはインフルエンザA（InfA）が陽性であることが分かっており、10例のサンプルはインフルエンザB（InfB）が陽性であることが分かっており、50例のサンプルはインフルエンザAまたはBが含まれないこと（陰性）が分かっていた。各サンプルを単一のアッセイデバイスに加え、測定をアッセイカードの4つの検出チャンバーのそれぞれから得た。

【0099】

図19A～19Dに示されるそれぞれの実験では、反応産物の検出を蛍光的に標識したプローブを用いて実施した。標識プローブによるRPA試薬の検出は、既に説明されているが、一般的に、標的が存在している場合、増幅される標的の検出用の検出可能な標識を有する少なくとも1種類のプローブを含む。プローブは蛍光およびクエンチャーを含み得、増幅反応産物が存在する場合、プローブが相補的なポリヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションするときにヌクレアーゼによる切断によって分離される。同様な結果（図示なし）は、サンプルを電気化学的に標識したプローブを用いて試験したとき、サンプルがインフルエンザA陽性、インフルエンザB陽性、または陰性コントロールかどうかの特定に関して90例のサンプルで得られた。

【0100】

蛍光および電気化学的プローブ測定の結果を表 2 A～2 D に示す。各表はインフルエンザサンプル材料の供給業者によって実施された標準的な市販 qPCR アッセイを用いてなされた比較測定を含む。qPCR はサンプル材料の供給業者によるサンプル取得時に実施され、結果を用いてサンプルを陽性または陰性、同様に flu A および flu B に分類し、分類したサンプルは適切に保存され、ウイルス輸送メディウム (VTM) で供給された。RPA の実施において VTM の明らかな影響はなかった。

【表 2】

表 2 A. インフルエンザ A サンプルの蛍光検出

InfA 蛍光	qPCR : 陽性	qPCR : 陰性	適中度
陽性	30	0	陽性適中度 100% (85.9～100)
陰性	0	60	陰性適中度 100% (92.5～100)
無効			無効率
性能	感度 100% (85.9～100)	特異性 100% (92.5～100)	合計 90

10

20

【表 3】

表 2 B. インフルエンザ B サンプルの蛍光検出

InfB 蛍光	qPCR : 陽性	qPCR : 陰性	適中度
陽性	10	0	陽性適中度 100% (85.6～100)
陰性	0	80	陰性適中度 100% (94.3～100)
無効			無効率
性能	感度 100% (85.9～100)	特異性 100% (94.3～100)	合計 90

30

40

【表 4】

表 2 C. インフルエンザ A サンプルの電気化学的検出

InfA 蛍光	qPCR：陽性	qPCR：陰性	適中度
陽性	30	0	陽性適中度 100% (85.6～100)
陰性	0	59	陰性適中度 100% (92.4～100)
無効		1	無効率 3.33%
性能	感度 100% (85.9～100)	特異性 100% (92.4～100)	合計 90

10

【表 5】

表 2 D. インフルエンザ B サンプルの電気化学的検出

InfB 蛍光	qPCR：陽性	qPCR：陰性	適中度
陽性	10	0	陽性適中度 100% (85.6～100)
陰性	0	79	陰性適中度 100% (94.2～100)
無効		1	無効率 3.33%
性能	感度 100% (55.5～100)	特異性 100% (94.2～100)	合計 90

20

30

【0101】

インフルエンザ A の核酸配列は年ごとに頻繁に変化することが知られており、RPA アッセイは、サンプルをインフルエンザ A について陽性に特定する可能性を最大にする異なるヌクレオチド領域に向けられる、2 種類の異なるプライマーおよびプローブセットを組み込むように開発された。

40

【0102】

本明細書で説明される RPA アッセイで使用されたプライマーおよびアッセイを SEQ ID NO. 1～21 として下記に示す。ネステッド増幅の第一ラウンドの際、第一プライマー配列を第一反応チャンバーで全サンプルと接触させるために使用して、第一増幅を実施した。そして第一増幅産物を使用して個別第二反応チャンバー内で第二プライマーおよびプローブと接触させ、InfA PA、InfA PB2、InfB PA、および IC を用いて各標的種を特異的に増幅して、FluA または fluB が患者サンプルに

50

存在する場合に、シグナルを生じた。プローブが蛍光測定を行うために使用されるとき、これらはヌクレアーゼエクソヌクレアーゼ I I I (E x o) によって切断されるように設計され、電気化学で使用するプローブはヌクレアーゼ 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ (f p g) を用いて使用するよう設計された。適切な電気化学的プローブの例は、2017年2月24日に出願された同時係属中の出願 P C T / U S 2 0 1 7 / 0 1 9 4 4 6 で説明され、その全体が参照によって本明細書に組み込まれている。

I n f A [P A] 第一増幅プライマー

> F l u A P A R 1 1 1

T G C A T G T G T G A G G A A G G A G T T G A A C C A A G * A (S E Q I D
N O . 1)

10

> F l u A P A F 5 2 3

A A A T T G C T T C T C A T T G T T C A G G C A C T T A G G G * A (S E Q I D
N O . 2)

I n f A [P B 2] 第一増幅プライマー

> F l u A P B 2 F 2 0 1

G A A C T G A G T A A C C T T G C A A A R G G G G A A A A G G * C (S E Q I
D N O . 3)

> F l u A P B 2 F 2 1 8

G A A C T G A G T A A C C T T G C A A A A G G G G A A A A A G * C (S E Q I D
N O . 4)

20

> F l u A P B 2 R 1 0 3

A Y T A A T T G A T G G C C A T C C G A A T T C T T T T G G T C G C T * G (S
E Q I D N O . 5)

I n f B [P A] 第一増幅プライマー

> F l u B P A F 4 4

A A G G A T T G G C T G A T G A T T A C T T T T G G A A A A A G A A A * G (S E
Q I D N O . 6)

> F l u B P A R 4 2

T A A T T C A G C C T G A A G T T C T G T G A G T C T G C T T A G * C (S E Q
I D N O . 7)

30

X c o n 第一増幅プライマー

> X C o n F 7

A A T C A T G A A C C T C A T G G C A T C T T C C C T C G C C G C * C (S E Q
I D N O . 8)

> X C o n R 6

A C A A T G C A A T C A T A T G C T T T C T G C T A T G T T A A G C * G (S E Q
I D N O . 9)

I n f A [P A] 第二増幅プライマー

> F L U P A F 5 0 7 i i

A A C C T G G G A C C T T T G A T C T T G G G G G G C T A T A T * G (S E Q I
D N O . 1 0)

40

> F L U A P A R 1 0 6 i i

A T G T G T T A G G A A G G A G T T G A A C C A A G A A G C A T * T (S E Q I
D N O . 1 1)

I n f A [P A] E x o プローブ

> F l u A P A E x o P 1 2 d F A M F = d T - F A M 、 H = T H F (脱塩基部位模倣
体) 、 Q = d T - B H Q - 1 、 3 ' = ブロック C 3 スペーサー

G A A C C A A G A T G C A T T R A G C A A A A C C C A G G G A F H A Q T A A T C
A G G C A C T C (S E Q I D N O . 1 2)

I n f A [P B 2] 第二増幅プライマー

50

> F l u A P B 2 F 4 0 3
 A A T G T G C T A A T Y G G G C A A G G A G A C G T G G T G T T G * G (S E Q
 I D N O . 1 3)
 > F l u A P B 2 R 7 0 3
 G G C C A T C C G A A T T C T T T T G G T C G C T G T C T G G * C (S E Q I D
 N O . 1 4)
 I n f A [P B 2] E x o プローブ
 > F l u A P B 2 E x o P 2 F = d T - F A M、H = T H F (脱塩基部位模倣体)、Q
 = d T - B H Q - 1、3 ' = ブロック C 3 スペース
 C G A A T T C T T T T G G T C G C T G T C T G G C T G T C A G T A A G F H Q G C 10
 T A G A G T C C C G (S E Q I D N O . 1 5)
 I n f B [P A] 第二増幅プライマー
 > M S F B P A _ F 6 + 1 - 2
 G G A A A A A G A A A G A A A A G C T G G G A A A T A G C A T G * G (S E Q I
 D N O . 1 6)
 > M S F B P A _ R 6 + 1
 G C T T A G C A C T C T C C C T T T C C C T T C C T C A T C C A A T * G (S E Q
 I D N O . 1 7)
 I n f B [P A] E x o プローブ
 > M S F B P A x 1 F = d T - F A M、H = T H F (脱塩基部位模倣体)、Q = d T - 20
 B H Q - 1、3 ' = ブロック C 3 スペース
 A C T G A T G A T A T T C A G C T A C A A T C A A G A C F A H Q C G T T A A G T
 A A T G A A (S E Q I D N O . 1 8)
 X c o n 第二増幅プライマー
 > X C o n R 1 3
 T T C C A G T C A G T C C T A G T C A G A A A C G G T C C T T A G A C * G (S
 E Q I D N O . 1 9)
 > A P O B E X T F
 G C C A G G T T T A T A G C A C A C T T T G T C A C C T A * C (S E Q I D N O
 . 2 0) 30
 X c o n E x o プローブ
 > A P O B 1 F A M F = d T - F A M、H = T H F (脱塩基部位模倣体)、Q = d T -
 B H Q - 1、3 ' = ブロック C 3 スペース
 G C C A G G T T T A T A G C A C A C T T T G T C A C C T A C A Q T H C F G A T T G
 G T G G A C T C T (S E Q I D N O . 2 1)

【0103】

図19Aはサンプル90例が I n f A P A R P A プライマーおよびプローブに暴露
 されたときに得られた結果を表す。結果は、I n f A P A プライマーが I n f A 陽性サ
 ンプル30例中24例を検出し、I n f B または陰性サンプルは I n f A P A プライマ
 ーによる反応を示さなかったことを示す。図19Bは I n f A サンプルのすべてが I n f 40
 A P B 2 プライマーおよびプローブに暴露されたときに陽性反応をもたらし、I n f B
 および陰性サンプルは I n f A P B 2 プライマーおよびプローブともにいずれの反応も
 示さなかったことを表す。図19Cは I n f B サンプルのすべてが I n f B P A プライ
 マーおよびプローブに暴露されたときに陽性反応をもたらし、I n f A および陰性コント
 ロールサンプルはいずれも反応しなかったことを示す。図19Dは、陰性コントロールプ
 ライマー (X c o n) およびプローブが使用されたとき、陽性シグナルを示すサンプルは
 なかったことを示す。

【0104】

図19A～19Dのそれぞれにおいて、破線はベースライン閾値を示し、最大陰性結果
 より3標準偏差高いものとして決定された。データは、I n f A P A および I n f A 50

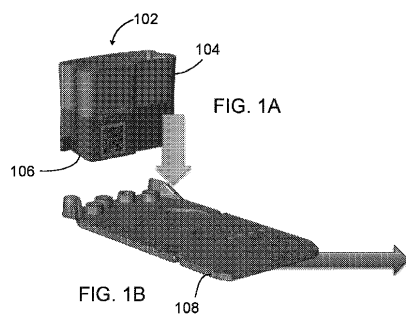
P B 2 領域に対する R P A プライマーおよびプローブの組み合わせた使用がインフルエンザ A 陽性サンプルの 1 0 0 % 同定をもたらし、異なるヌクレオチド配列を有するインフルエンザウイルスの存在を首尾よく測定する本明細書で説明されるアッセイ方式の能力を実証する。

【 0 1 0 5 】

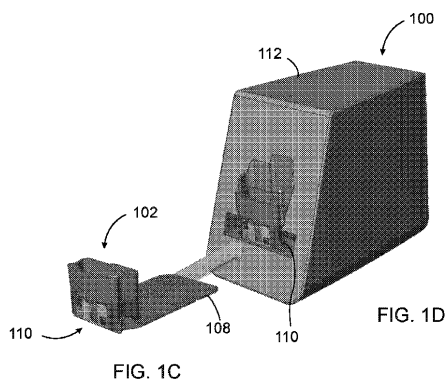
他の実施形態

本発明の多くの実施形態が説明されている。しかし、様々な変更が本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解されるであろう。従って、他の実施形態は後述の請求項の範囲内である。

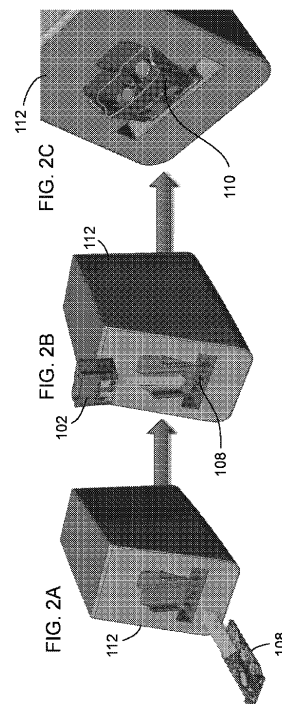
【 図 1 A - 1 B 】



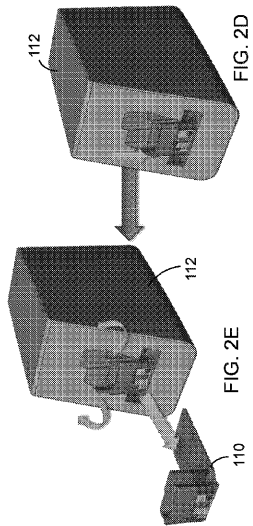
【 図 1 C - 1 D 】



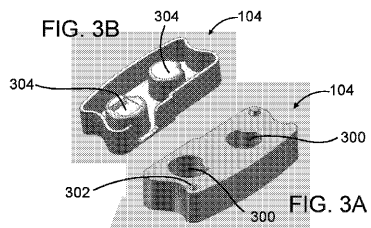
【 図 2 A - 2 C 】



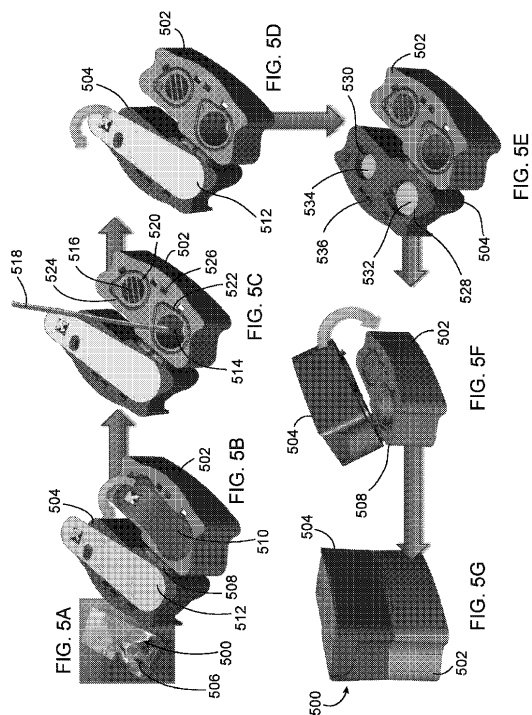
【図 2 D - 2 E】



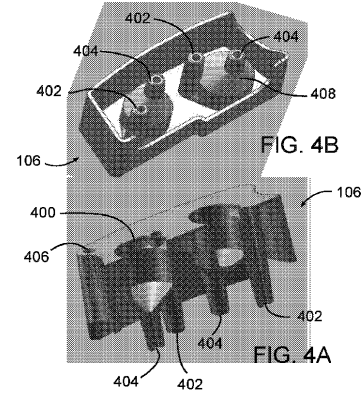
【図 3 A - 3 B】



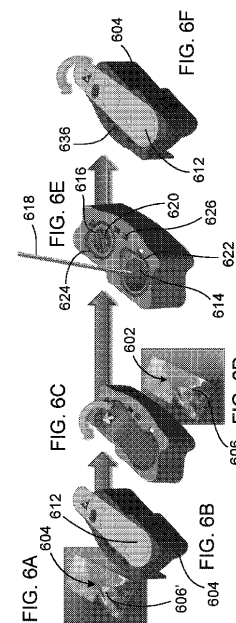
【図 5 A - 5 G】



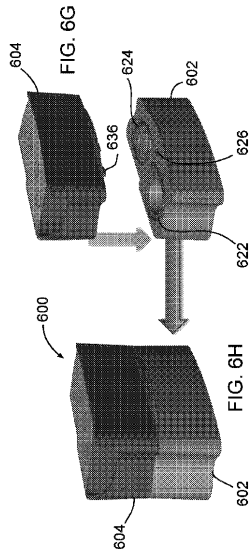
【図 4 A - 4 B】



【図 6 A - 6 F】



【図 6 G - 6 H】



【図 7】

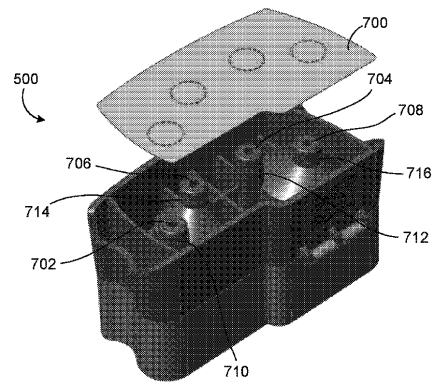


FIG. 7

【図 8 A】

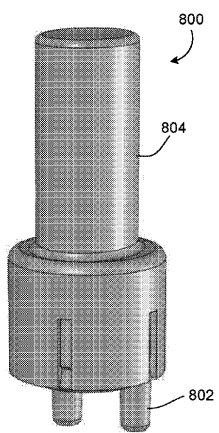


FIG. 8A

【図 8 B】

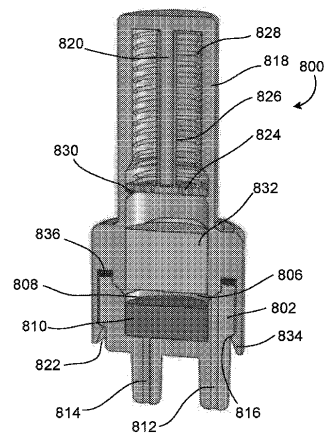


FIG. 8B

【図 9 A】

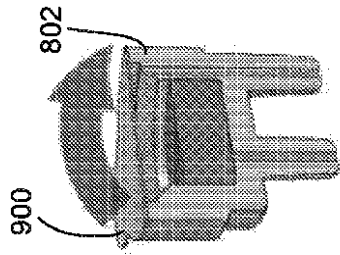


FIG. 9A

【図 9 B】

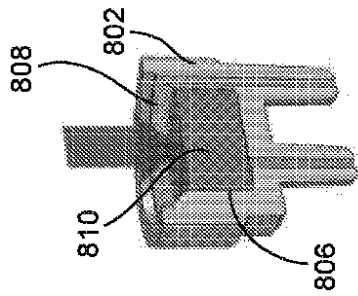


FIG. 9B

【図 9 C】

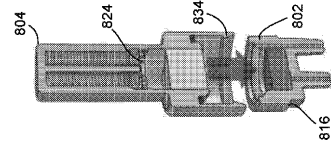


FIG. 9C

【図 9 D】

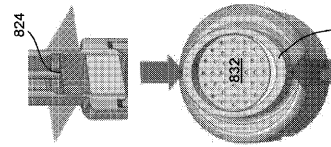


FIG. 9D

【図 9 E】

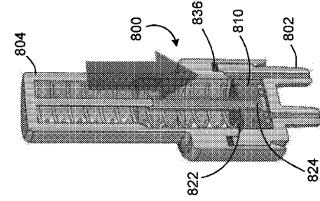


FIG. 9E

【図 10】

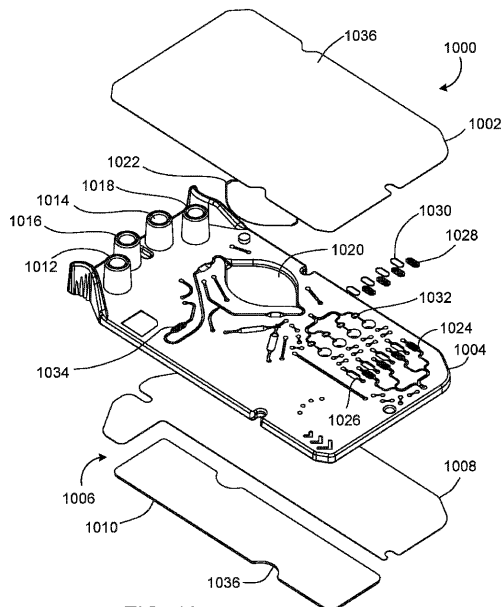


FIG. 10

【図 11】

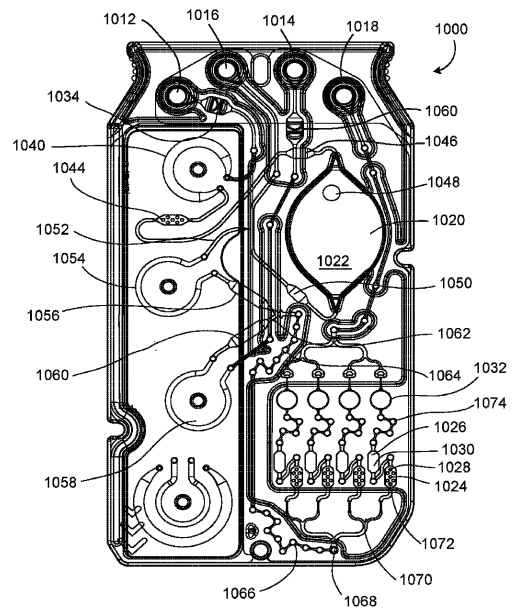


FIG. 11

【図 1 2】

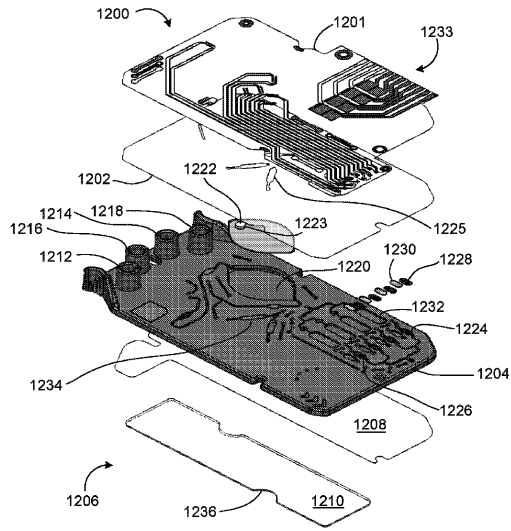


FIG. 12

【図 1 3】

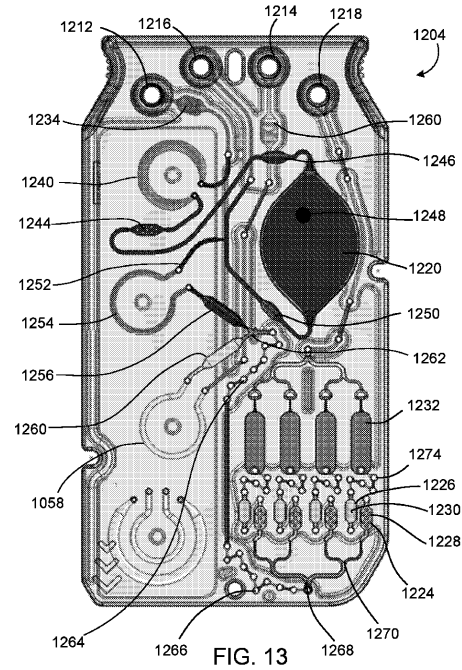


FIG. 13

【図 1 4】

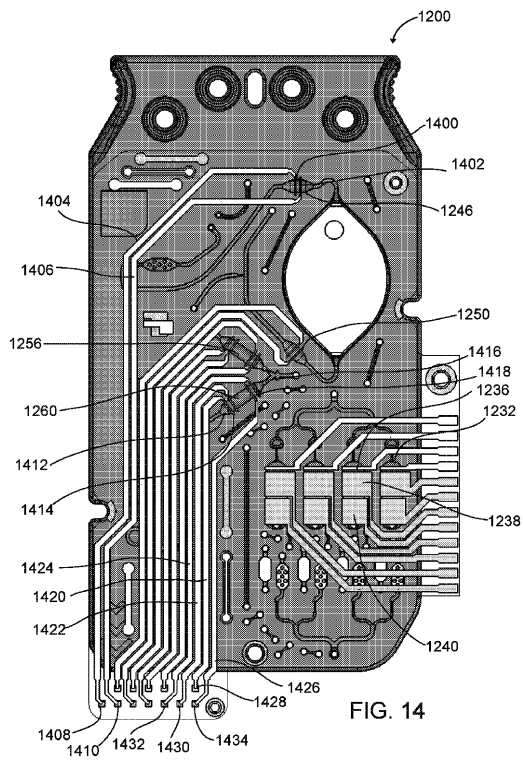


FIG. 14

【図 1 5】

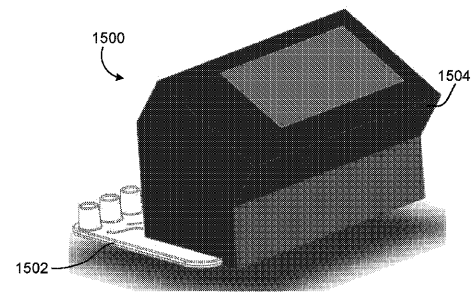


FIG. 15

【図 1 6】

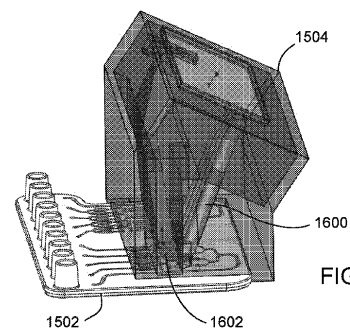
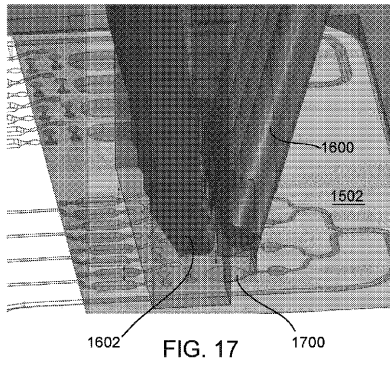
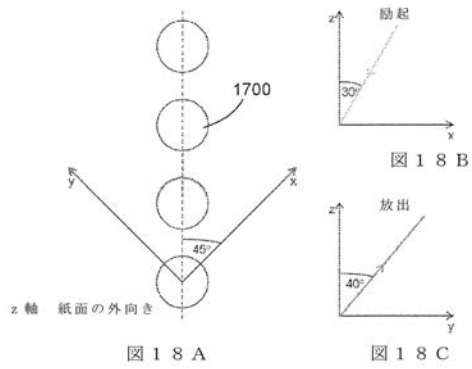


FIG. 16

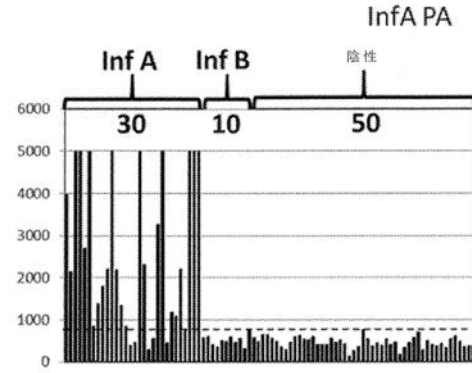
【図 17】



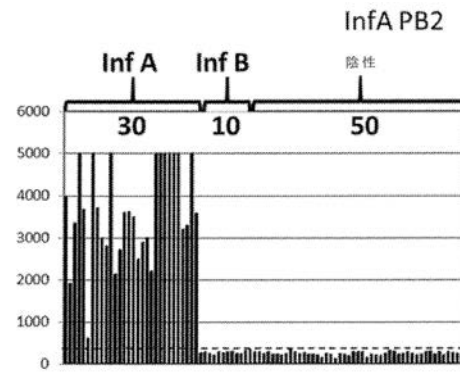
【図 18】



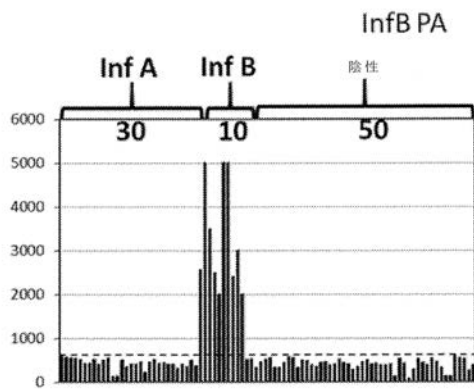
【図 19 A】



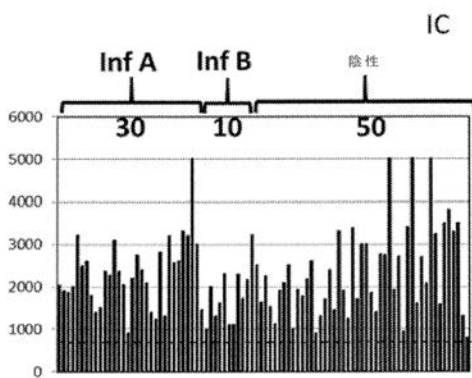
【図 19 B】



【図 19 C】



【図 19 D】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/20782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - C12Q 1/68; C12P 19/34; C12N 9/16 (2017.01)
 CPC - C12Q 1/6884, 1/6816, 2521/531, 2600/118

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)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2012/0244534 A1 (Ching et al.) 27 September 2012 (27.09.2012). Especially para [0009], [0011], [0012], [0018], [0039], [0065], [0079], [0088], pg 17 table II, claim 27.	1, 2, 12-22, 24, 26 ----- 3-11, 23, 25, 27
Y	US 2011/0053153 A1 (Piepenburg et al.) 03 March 2011 (03.03.2011). Especially para [0011], [0015], [0018], [0054], sheet 4 fig 4.	3-11
Y	US 2009/0111089 A1 (Lindstrom et al.) 30 April 2009 (30.04.2009). Especially para [0121], [0144], [0148]	23, 25, 27
Y	Hocak et al. Nucleobase modification as redox DNA labelling for electrochemical detection. Chem Soc Rev December 2011 Vol 40 No 12 Pages 5802-5814. Especially Pg 5809 col 2 par 3; pg 5810 scheme 6a, pg 5811 col 2 para 2-3	7-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* 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

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2017

Date of mailing of the international search report

08 SEP 2017

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4900
 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/20782

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.:
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:

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:
-----Go to Extra Sheet for continuation-----

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 additional fees, this Authority did not invite payment of 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.:
Claims 1-27

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/US 17/20782

-----continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)-----

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-27, drawn to a method of nucleic acid amplification in a microfluidic device.

Group II: Claims 28-65, drawn to a card or a microfluidic device having two or more reaction chambers configured for nucleic acid amplification.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a method comprising amplifying a target polynucleotide in a first and a second round of amplification, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a card or a device configured to have reaction chambers, detection modules, pumps, inlet and outlet ports, not required by Group I.

Common Technical Feature:

Groups I and II share the special technical feature of (i) carrying out a first nucleic acid amplification on a sample fluid to form a first amplification product; and (ii) carrying out a second nucleic amplification on the first amplification product to form second amplification products, in a microfluidic device.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is anticipated by US 2012/0244534 A1 to Ching et al. (hereinafter "Ching").

Ching teaches (i) carrying out a first nucleic acid amplification on a sample fluid to form a first amplification product; and (ii) carrying out a second nucleic amplification on the first amplification product to form second amplification products, in a microfluidic device (para [0009]; "the invention provides a method of detecting the presence or absence of one or more target polynucleotides in a sample having the following steps: (a) amplifying in a fluidly closed reaction system one or more target polynucleotides from a sample using first-stage amplification reagents in a first reaction mixture to form one or more first amplicons, the first-stage amplification reagents including initial primers for each target polynucleotide; (b) isolating a sample of the first reaction mixture in the fluidly closed reaction system; and (c) amplifying in the fluidly closed reaction system the one or more first amplicons in the sample using second-stage amplification reagents in a second reaction mixture to form one or more second amplicons, the second-stage amplification reagents including at least one secondary primer for each of the one or more first amplicons, such that each second primer is nested in such first amplicon relative to an initial primer of such first amplicon"; claim 27: microfluidic device)

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72)発明者 ホワイテ, ムレー ジョン
イギリス国, デボンサイド ティリコールトリー エフケー 13 6 エイチアール, 32 アレク
サンドラ ストリート

(72)発明者 アルメス, ナイアル エー.
イギリス国, ヘリオンズ バンプステッド サフォーク シービー 9 7 エーダブリュー, セージ
ス エンド ロード, ヘリオンズ ファーム

(72)発明者 バイペンブルグ, オラフ
イギリス国, サフロン ウォールデン エセックス シービー 10 2 エーディー, 15 ハイフ
ィールズ

(72)発明者 グリーンウッツ, キャサリン ジーン
イギリス国, ソーブリッジウォース ハートフォードシャー シーエム 21 0 ディーイー, 16
クロフターズ

(72)発明者 ネットウィック, オリバー
イギリス国, ケンブリッジ シービー 1 3 エービー, 59 グレート イースタン ストリート

Fターム(参考) 2G058 DA07

4B029 AA07 BB20 FA11 FA12 FA15 GB02

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR07 QR08 QR14 QR32 QR35 QR48 QS26

QS34 QX02