(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2010-523115
(P2010-523115A)
(43)公表日　平成22年7月15日(2010.7.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B024
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A	4B029
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	F	4B063

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 62 頁）

(21)出願番号　特願2010-502152 (P2010-502152)
(86)(22)出願日　平成20年4月4日 (2008.4.4)
(85)翻訳文提出日　平成21年12月2日 (2009.12.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/004462
(87)国際公開番号　WO2008/124104
(87)国際公開日　平成20年10月16日 (2008.10.16)
(31)優先権主張番号　60/921,802
(32)優先日　平成19年4月4日 (2007.4.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/964,502
(32)優先日　平成19年8月13日 (2007.8.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/028,073
(32)優先日　平成20年2月12日 (2008.2.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　507382050
ネットワーク・バイオシステムズ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８０１，ウォバーン，ギル・ストリート　１，スイート　ビー
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100106231
弁理士　矢野　正樹
(74)代理人　100156122
弁理士　佐藤　剛

最終頁に続く

(54)【発明の名称】集積化された核酸分析

(57)【要約】
本開示は核酸分析を行う完全に集積化されたマイクロ流体システムを提供する。これらのプロセスはサンプル収集、核酸抽出および精製、増幅、配列決定、ならびに分離および検出を含む。また、本開示は光学検出システムおよび生体分子の分離および検出の方法を提供する。具体的に、本発明のさまざまな態様は、１つまたは複数のマイクロ流体チャンバーまたはチャネル内で、複数の生体分子、典型的に蛍光染料標識した核酸の同時分離および検出を可能にする。核酸は少なくとも６染料で標識することができ、各々独自のピーク発光波長を有する。本システムおよび方法は、遺伝子指紋によるヒトの識別などのＤＮＡフラグメントサイズ決定用途、および臨床診断などのＤＮＡ配列決定用途に特に有用である。

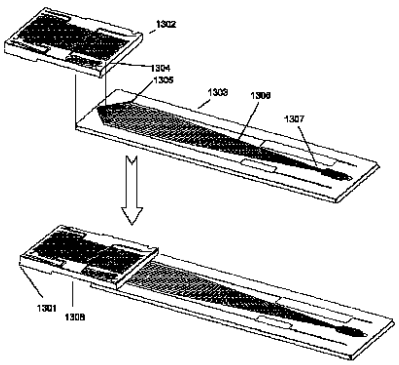

FIGURE 13

【特許請求の範囲】
【請求項１】
光学検出器であって、
基板上の１または複数の検出位置を照射するために配置された１つ以上の光源；
基板上の検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１の光学エレメント；および
第１光学エレメントからの光を受容するために配置された光検出器であって、前記光検出器が、第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、かつ、分離された光の一部を検出エレメントに提供するように配置された波長分散エレメントを含む光検出器を備え、ここに、
検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が、１つ以上の生体分子を標識した少なくとも６つの染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク発光波長を有する、光学検出器。
【請求項２】
前記生体分子が核酸である請求項１に記載の光学検出器。
【請求項３】
前記核酸がＤＮＡである請求項２に記載の光学検出器。
【請求項４】
前記光検出器が少なくとも８つの異なる染料からの蛍光を検出し、各染料が少なくとも２つの四染料含有サブセットのメンバーであって、前記サブセットが基板上の単一検出位置で少なくとも２つのＤＮＡ配列を識別可能であり、ここに、染料の数が４の倍数であり、検出されるＤＮＡ配列の数がその倍数に等しくて、異なる染料の各々が１つのサブセットだけに存在する、請求項３に記載の光学検出器。
【請求項５】
前記生体分子がタンパク質である請求項１に記載の光学検出器。
【請求項６】
少なくとも１つの光源がレーザーである請求項１に記載の光学検出器。
【請求項７】
各検出エレメントが紫外線光、可視光、赤外光、またはその組み合わせを検出可能である請求項１に記載の光学検出器。
【請求項８】
複数の検出位置の間で光源を逐次的に走査するミラーをさらに備える請求項１に記載の光学検出器。
【請求項９】
２次元光学検出器エレメントをさらに備え、前記エレメントが光学スペクトルを検出するために少なくとも２つの列を有し、第１列が第１の独立レーンの光学スペクトルを検出し、第２列が第２の独立レーンの光学スペクトルを検出する請求項１に記載の光学検出器。
【請求項１０】
各検出エレメントが単一アノード光倍増管であり、
前記波長分散エレメントが第１光学エレメントからの光の一部を前記検出エレメントの各々に提供するように配置された１つまたは複数の二色性ミラーを含み、各二色性ミラーが独立に定めた光の波長を反射する請求項１に記載の光学検出器。
【請求項１１】
バンドパスフィルターをさらに備え、各々独立に定めた光の波長が少なくとも１つの検出位置に存在する蛍光染料の蛍光放射最大値に本質的に対応する請求項１０に記載の光学検出器。
【請求項１２】
前記波長分散エレメントが、プリズム、回折格子、透過格子、スペクトルまたはホログ

ラフ回折格子である請求項１０に記載の光学検出器。
【請求項１３】
生体分子の分離と検出のためのシステムであって、
基板上の１つまたは複数のチャネル中の複数の生体分子を同時に分離するためのコンポーネントであって、ここに、各チャネルが検出位置を含むコンポーネント；
基板上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光源；
検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および
第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、前記光検出器は、前記光検出器が第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、分離された光の一部を検出エレメントに提供するように配置された波長分散エレメントを備え、ここに、
前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上の生体分子を標識する少なくとも６染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク発光波長を有する光検出器を備える、システム。
【請求項１４】
前記生体分子が核酸である請求項１３に記載のシステム。
【請求項１５】
前記核酸がＤＮＡである請求項１４に記載のシステム。
【請求項１６】
前記光検出器が少なくとも８つの異なる染料からの蛍光を検出し、各染料が少なくとも２つの四染料含有サブセットのメンバーであって、前記サブセットが基板上の単一検出位置で少なくとも２つのＤＮＡ配列を識別可能であり、ここに、染料の数が４の倍数であり、検出されるＤＮＡ配列の数がその倍数に等しくて、異なる染料の各々が１つのサブセットだけに存在する、請求項１５に記載のシステム。
【請求項１７】
前記生体分子がタンパク質である請求項１３に記載のシステム。
【請求項１８】
前記生体分子が独立に蛍光染料を含み、各独自の光学スペクトルが独自の蛍光最大値を含む請求項１３に記載のシステム。
【請求項１９】
前記コンポーネントが電気泳動デバイスである請求項１３に記載のシステム。
【請求項２０】
前記光源がレーザーである請求項１３に記載のシステム。
【請求項２１】
各検出エレメントが紫外線光、可視光、赤外光、またはその組み合わせを検出可能である請求項１３に記載のシステム。
【請求項２２】
複数の検出位置の間で光源を逐次的に走査するミラーをさらに備える請求項１３に記載の光学検出器。
【請求項２３】
各検出エレメントが単一アノード光倍増管であり、
前記波長分散エレメントが第１光学エレメントからの光の一部を前記検出エレメントの各々に提供するように配置された１つまたは複数の二色性ミラーを含み、各二色性ミラーが独立に定めた光の波長を反射する請求項１３に記載のシステム。
【請求項２４】
バンドパスフィルターをさらに備え、各々独立に定めた光の波長が少なくとも１つの検出位置に存在する蛍光染料の蛍光放射最大値に本質的に対応する請求項２３に記載のシステム。

【請求項２５】
線形多重アノード光倍増管が前記検出エレメントを備える請求項２３に記載のシステム。
【請求項２６】
前記波長分散エレメントが、プリズム、回折格子、透過格子、スペクトルまたはホログラフ回折格子である請求項２３に記載のシステム。
【請求項２７】
複数の生体分子を分離し検出する方法であって、
基板上の１つまたは複数のマイクロ流体チャネル中に１つまたは複数の分析サンプルを提供し、各マイクロ流体チャネルが検出位置を含み、ここに、各分析サンプルが独立に複数の生体分子を含み、各々が独立に少なくとも６染料の１つで標識され、各染料が独自のピーク波長を有すること；
各マイクロ流体チャネル中の複数の標識された生体分子を同時に分離すること；および
各マイクロ流体チャネル中の複数の分離された標的分析物を、
（ｉ）各検出位置を光源で照射し；
（ｉｉ）核検出位置から放射された光を収集し；
（ｉｉｉ）収集された光を光検出器に導き；
（ｉｖ）収集された光を光波長によって分離し；ついで、
（ｖ）１つ以上の生体分子を標識した少なくとも６染料からの蛍光を同時に検出し、各染料が独自のピーク波長を有することによって、検出すること、
を含む方法。
【請求項２８】
前記分離することが前記複数のマイクロ流体チャネルに電位を印加することによって行われる請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
各検出位置が逐次的に照射される請求項２７に記載の方法。
【請求項３０】
各検出位置が同時に照射される請求項２７に記載の方法。
【請求項３１】
前記染料が、各々独立に約４５０ｎｍ～約１５００ｎｍの範囲の波長で蛍光最大値を有する請求項２７に記載の方法。
【請求項３２】
前記標的分析物が核酸フラグメントを含む請求項２７に記載の方法。
【請求項３３】
前記核酸フラグメントが、１つ以上の核酸増幅反応の産物であり、蛍光染料がプライマーに付着されている請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記核酸フラグメントが１つ以上のＳａｎｇｅｒ配列決定反応の産物であり、蛍光染料がジデオキシヌクレオチド・ターミネーターに付着されている請求項３２に記載の方法。
【請求項３５】
各検出エレメントが蛍光染料の１つを検出するように適合される請求項２７に記載の方法。
【請求項３６】
集積化されたバイオチップシステムであって、
（ａ）１つまたは複数のマイクロ流体システムを含むバイオチップであって、各マイクロ流体システムが分離チャンバーにマイクロ流体的に連絡する第１反応チャンバーを含み、ここに、
第１反応チャンバーが、
（ｉ）核酸抽出、

（ｉｉ）核酸精製、
（ｉｉｉ）予備核酸増幅清浄化、
（ｉｖ）核酸増幅、
（ｖ）後核酸増幅清浄化、
（ｖｉ）予備核酸配列決定清浄化、
（ｖｉｉ）核酸配列、
（ｖｉｉｉ）後核酸配列決定清浄化、
（ｉｘ）逆転写、
（ｘ）予備逆転写清浄化、
（ｘｉ）後逆転写清浄化、
（ｘｉｉ）核酸ライゲーション、
（ｘｉｉｉ）核酸ハイブリダイゼーション、または
（ｘｉｖ）定量化
に適合され、
前記分離チャンバーが検出位置を含むバイオチップ；および
（ｂ）分離および検出システムであって、
（ｉ）前記分離チャンバー中の複数の標的分析物を同時に分離するための分離エレメント；
（ｉｉ）前記バイオチップ上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光源；
（ｉｉｉ）前記検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および
（ｉｖ）前記第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、ここに、前記光検出器が、前記第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、前記分離された光の一部を少なくとも６つの検出エレメントに提供する波長分散エレメントを含み、ここに、
前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上の生体分子を標識する少なくとも６染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク波長を有する光検出器、
を備えるバイオチップシステム。
【請求項３７】
集積化されたバイオチップシステムであって、
（ａ）１つまたは複数のマイクロ流体システムを含むバイオチップであって、各マイクロ流体システムが分離チャンバーにマイクロ流体的に連絡する第１反応チャンバーを含み、ここに、
第１反応チャンバーが、
（ｉ）核酸抽出、
（ｉｉ）核酸精製、
（ｉｉｉ）予備核酸増幅清浄化、
（ｉｖ）核酸増幅、
（ｖ）後核酸増幅清浄化、
（ｖｉ）予備核酸配列決定清浄化、
（ｖｉｉ）核酸配列、
（ｖｉｉｉ）後核酸配列決定清浄化、
（ｉｘ）逆転写、
（ｘ）予備逆転写清浄化、
（ｘｉ）後逆転写清浄化、
（ｘｉｉ）核酸ライゲーション、
（ｘｉｉｉ）核酸ハイブリダイゼーション、または

（ｘｉｖ）定量化
に適合され、
前記分離チャンバーが検出位置を含むバイオチップ；および
（ｂ）分離および検出システムであって、
（ｉ）前記分離チャンバー中のＤＮＡを含む複数の生体分子を同時に分離するための分離エレメント；
（ｉｉ）前記バイオチップ上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光源；
（ｉｉｉ）前記検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および
（ｉｖ）前記第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、ここに、前記光検出器が、前記第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、前記分離された光の一部を少なくとも６つの検出エレメントに提供する波長分散エレメントを含み、ここに、
前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上のＤＮＡ配列を標識する少なくとも８染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク波長を有し、各染料が少なくとも２つの四染料含有サブセットのメンバーであって、前記サブセットが基板上の単一検出位置で少なくとも２つのＤＮＡ配列を識別可能であり、ここに、染料の数が４の倍数であり、検出されるＤＮＡ配列の数がその倍数に等しくて、異なる染料の各々が１つのサブセットだけに存在する、光検出器、
を備えるバイオチップシステム。
【請求項３８】
前記第１反応チャンバーが核酸抽出に適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項３９】
前記第１反応チャンバーが核酸精製に適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項４０】
前記第１反応チャンバーが核酸増幅に適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項４１】
前記第１反応チャンバーが清浄化に適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項４２】
前記第１反応チャンバーが核酸配列に適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項４３】
前記第１反応チャンバーが逆転写に適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項４４】
前記第１反応チャンバーが核酸ライゲーションに適合するようにされた請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項４５】
前記第１反応チャンバーが核酸ハイブリダイゼーションに適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【請求項４６】
前記第１反応チャンバーが定量化に適合された請求項３６に記載の集積化されたバイオチップシステム。
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
間連出願の相互参照文献
本出願は、３５Ｕ．Ｓ．Ｃ第１１９号（ｅ）項に基づき、２００７年４月４日出願の米国特許仮出願第６０／９２１，８０２号、２００７年８月１３日出願の米国特許仮出願第６０／９６４，５０２号、２００８年２月１２日出願の米国特許仮出願第６１／０２８，０７３号の出願日付の優先権を請求するものであり、これらはいずれもその全体を参照して本出願に援用される。また、本出願は、２つの米国特許出願；一つは「“Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids”（標的核酸の迅速多重増幅の方法）」(Attorney Docket No. 08-318-US)と題され；もうひとつは「“Plastic Microfluidic separation and detection platforms”（プラスチックマイクロ流体分離および検出プラットフォーム）」(Attorney Docket No. 07-865-US)と題される同日出願の２つの米国出願もそれらの全体を参照して援用する。
【０００２】
本発明は、マイクロ流体の分野における核酸分析に関する。
【背景技術】
【０００３】
所与のヒト、動物、植物、または病原体ゲノムのサブセットの迅速同定（核酸の配列決定またはフラグメントサイズ決定による）として定義される、完全に集積化された（すなわち、サンプル入力から結果の出力まで）標的核酸分析のための機器および技術の開発は未解決である。標的核酸配列は最終ユーザーに実時間の臨床、法医学、または他の判断を可能にする。例えば、多くの一般的なヒトの病気は、完全なヒトのゲノムを形成するために必要なものよりも少ない１０００個未満のＤＮＡ配列塩基対に基づいて診断することができる。同様に、短鎖縦列反復配列分析(short tandem repeat analysis)によって形成される２０個未満の特定のＤＮＡフラグメントサイズの正確な測定は所与の個体を識別するのに十分である。用途に応じて、病院の研究室、医者の事務所、ベッドの脇、または法医学または環境用途の場合の現場を含んで、標的核酸分析は様々な設定で実施することができる。
【０００４】
ＤＮＡ配列決定およびフラグメントサイズ決定システムにはいくつかの未解決の改善要求がある。第１に、使用が容易であり高度に訓練された作業者を必要としないＤＮＡ配列決定およびフラグメントサイズ決定機器が必要とされている。第２に、すべての手動プロセスを省くシステムの要求がある。結果として、最小の作業者訓練で済み、例えば、危険物着衣を着た初動対応者が遭遇するような困難な環境を強いられた個人もシステムを容易に操作することができる。
【０００５】
第３に、完全で正確な信頼性の高いデータの必要性を断念しない極めて迅速な分析が必要とされる。ヒトの識別用途にとって、結果までの適切な時間は、従来の技術を用いる数日から数週間よりも十分短い４５分以下である。適切な処置法を決定するための感染病原体配列決定などの臨床用途にとって、患者が救急室に到着した後、抗菌性および抗ウィルス性薬物療法での処置を短時間に開始することのできる９０分以下が回答までの妥当な時間である。用途にかかわらず、実時間での実行可能なデータを形成する必要がある。また、回答までの短い時間は同時にサンプル処理量を増加させる。
【０００６】
第４に、小型化が必要とされる。多くのＤＮＡ分析システムは研究所全体および関連支援を必要とする。例えば、高い処理量のゲノム配列ＦＬＸ（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ　Ｃｏｒｐ，　Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）ＤＮＡ配列決定システムは設置にベンチ台を必要とするだけであるが、必要なライブラリー構築を行うために大きな研究室を必要とする。小型化は研究所および処置場所での使用ならびに現場操作の両方にとって重要である。また、サンプルあたりのコスト低減にとっても重要である。

【０００７】
第５に、耐久性が必要とされる。多くの用途、特に法医学、軍事、および国家防衛用途において、ＤＮＡ分析機器は現場で操作可能でなければならない。したがって、機器は兵士の肩に背負われ、または警察車両で運ばれ、またはヘリコプターから戦闘場所に投下されて運搬できなければならない。同様に、機器は温度、湿度、および空気中の粒子（例えば砂）を含む過酷な環境下に耐えて機能しなければならない。
【０００８】
第６に、複数のサンプル種を受け入れ、並列して高度に複雑な分析を行うことのできるシステムが必要とされる。多くの用途にとって、単一サンプル種の単一反応からのＤＮＡ分析能力は有意義なＤＮＡ分析を行うためには許容できない。
【０００９】
複数の研究室の操作をバイオチップ上に濃縮することを探究しているマイクロ流体（マイクロトータル分析システム（μＴＡＳ）またはチップ上ラボ技術とも言われる。Ｍａｎｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｎｓ．Ａｃｔｕａｔｏｒｓ　Ｂ　１９９０，１，２４４－２４８参照）の開発者は、これらの必要性のいくつかを認識したが、今日まで、これらの必要性に対処するためのマイクロ流体核酸分析を可能にする、必要かつ望ましい全ての生物化学および物理的プロセスを行う集積化されたバイオチップおよび機器を設計することはできなかった。その結果、今日、着目された核酸分析は社会的に広く使用されるに至っていない。
【００１０】
マイクロ流体システムの開発は、マイクロスケールの分離、反応、マイクロバルブおよびポンプなどのマイクロ加工されたコンポーネントとさまざまな検出スキームを集積化して完全な機能デバイスにすることを含む（例えば、Ｐａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｂ　Ｃｈｉｐ　２００５，５，１０２４－１０３２を参照）。１９９０年初めにＭａｎｚら（上記）がチップ上のキャピラリー電気泳動を発表して以来、人々はそれの改善を探究した。いくつかのグループはＤＮＡプロセシング機能をバイオチップの分離および検出と集積化することを発表した。ガラス－ＰＤＭＳ（ポリジメチルシロキサン）のハイブリッド構造上に集積されたデバイスが報告された（Ｂｌａｚｅｊ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　２００６，１０３，７２４０－５、Ｅａｓｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ，Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ　２００６，１０３，１９２７２－７、およびＬｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．２００７，７９，１８８１－９）。Ｌｉｕは短鎖縦列反復（ＳＴＲ）サイズ決定によるヒトの識別のために複数のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、分離および四染料検出を結合した。ＢｌａｚｅｊはｐＵＣ１８単位複製配列のＤＮＡ配列のためにＳａｎｇｅｒ配列反応、Ｓａｎｇｅｒ反応清浄化、電気泳動分離および四染料検出を結合した。Ｅａｓｌｅｙは血液中の細菌性感染の存在を識別するためにＤＮＡの固相抽出、ＰＣＲ、電気泳動分離および単一色検出を結合した。Ｂｕｒｎｓ（Ｐａｌ，２００５，Ｉｄ．）によって、ＰＣＲ、電気泳動分離および単一色検出を結合した集積化シリコン－ガラスデバイスが発表された。細菌ＤＮＡの存在を識別するために、ＰＣＲ用のガラス－ＰＤＭＳ部分と気泳動分離用のポリ（メチルメタクリラート）（ＰＭＭＡ）部分、および単一色検出を結合するハイブリッドデバイスがＨｕａｎｇ（Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ　２００６，２７，３２９７－３０５）によって報告された。
【００１１】
Ｋｏｈらは細菌ＤＮＡの存在を識別するために、ＰＣＲをバイオチップ電気泳動分離および単一色検出に結合したプラスチックデバイスを報告する（Ｋｏｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．２００３，７５，４５９１－８）。ＤＮＡ抽出、ＰＣＲ増幅、バイオチップ電気泳動分離および単一色検出を結合するシリコンベースのデバイスがＡｓｏｇａｗａによって報告された（Ａｓｏｇａｗａ　Ｍ，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｏｆ　ｐｏｒｔａｂｌｅ　ａｎｄ　ｒａｐｉｄ　ｈｕｍａｎ　ＤＮＡ　ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ａｉｍｉｎｇ　ｏｎ－ｓｉｔｅ　Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，１８ｔｈ　Ｉｎｔｅｒｎａｔ

ｉｏｎａｌ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ ｏｎ Ｈｕｍａｎ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｐｏｓｔｅｒ，Ｏｃｔ，１－４，２００７，Ｈｏｌｌｙｗｏｏｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）。米国特許第７，３３２，１２６号（Ｔｏｏｋｅ ｅｔ ａｌ．）は核酸の単離とサイクル配列決定に必要なマイクロ流体操作を行うために遠心力を用いることを述べている。しかし、この手法は少量のサンプル容量（１～数μＬ程度）に基づくものである。結果として、流体サンプルは静止状態でデバイスに加えなければならないので、すなわち、遠心分離の前に（高度に並列のデバイスでは１００ｍＬまで可能）、ディスクは運転に必要な全ての流体を収容することが可能でなければならないので、このデバイスは、核酸の単離と分析のために大量のサンプルを、特に高度な並列様式で、プロセシングするには有用ではない。第２に、デバイスは細菌クローン（例えばプラスミドＤＮＡ）のサンプル調製およびサイクル配列決定に制限される。

【００１２】

ＤＮＡプロセシングをバイオチップ電気泳動分離に集積化することを試みるこれらのデバイスにはいくつかの欠点がある。第１に、検出はアッセイ毎の情報内容（多くは単一色検出を用いるが、いくつかは４色までの検出システムを有する）または処理量（単一サンプルまたは２つのサンプル能力）のいずれかによって制限される。第２に、これらのデバイスはサンプリングから回答までの完全な集積化の代表ではなく、例えば、Ｂｌａｚｅｊのデバイスはサイクル配列決定の前にテンプレートＤＮＡの外部での増幅を必要とし、他はある種の予備処理の必要なサンプルを用いる（例えば、ＥａｓｌｅｙおよびＴｏｏｋｅは添加の前にサンプルの溶解が必要である）。第３に、これらのデバイスのために行った処理選択のいくつかは回答までの時間に影響を与える。例えば、Ｂｌａｚｅｊのハイブリダイゼーションに基づく方法はサイクル配列決定の産物の清浄化に２０分以上を要する。第４に、これらのデバイスの多くは部分的または全体的にガラスまたはシリコンで作られる。これらの基板の使用および対応する製造技術は本質的にコスト高になり（Ｇａｒｄｅｎｉｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｂ－ｏｎ－ａ－Ｃｈｉｐ （ＯｏｓｔｅｒｂｒｏｅｃｋＲＥ，ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｅｒｇ Ａ，Ｅｄｓ）Ｅｌｓｅｖｉｅｒ：Ｌｏｎｄｏｎ，ｐｐ３７－６４（２００３））、それらのデバイスを再使用しなければならない用途に制限を与え、これは多くの用途（例えばヒトの識別）においてサンプルの汚染の危険を招く。最終的に、発表された技術は２つの用途、ＳＴＲ分析および配列決定によるヒトの識別には不適である。例えば、ＥａｓｌｅｙとＰａｌデバイスの両方とも解像度が低くなり、単一ベースよりも悪い。フラグメントサイズ決定用途（例えば、短鎖縦列反復プロファイルの分析によるヒトの識別）および配列の両方とも単一ベースの解像度を必要とする。

【００１３】

マイクロ流体の集積化に関する先行技術の制約に加えて、蛍光検出に関する問題も従来の研究所の仕事を超える核酸分析の広い用途を制限する。最も広く用いられる市販の配列決定キット（ＢｉｇＤｙｅ（登録商標）ｖ３．１（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＤＹＥｎａｍｉｃ（登録商標）ＥＴ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｏｒｐ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）は、２０年前の四色検出方法に基づく（例えば、米国特許第４，８５５，２２５、第５，３３２，６６６号、第５，８００，９９６号、第５，８４７，１６２号、第５，８４７，１６２号を参照）。この方法は染料で標識されたヌクレオチドの放射信号の４つの異なる色への解像に基づき、それは４つの塩基の各々を表す。これらの四色染料システムは、蛍光染料の不十分な励起、スペクトルの顕著な重なり合い、および不十分な放射信号の収集を含む、いくつかの欠点を有する。四色染料システムはそれらが配列決定された産物の所与の電気泳動（または他の）分離から得ることのできる情報量を制限するので、特に問題である。

【００１４】

フラグメントサイズおよび色（染料の波長）の両方によるＤＮＡフラグメントの分離と検出に基づく電気泳動において、高い情報量のアッセイを達成することのできるシステムが必要とされる。電気泳動によって識別することのできるＤＮＡフラグメントの最大数は分離の読み取り長さとデバイスの解像度によって決定される。検出することのできる色の

最大数は部分的に蛍光染料の入手可能性と検出システムの波長識別力によって決定される。現在のバイオチップ検出システムは典型的に単一色に制限されるが、４色までの検出が報告されている。

【００１５】

ヒトの識別用のＳＴＲ分析は、色多重化に基づくＤＮＡフラグメントサイズ決定の例であり、１６座までの同時分析を可能にする（ＡｍｐＦＩＳＴＲ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｌｅｒ ｋｉｔ：Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）およびＰｏｗｅｒＰｌｅｘ１６ ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）。単一の分離チャネルは、４つまたは５つの蛍光染料を用いて各染色体座の多くの対立する変形サイズを区別することができる。いくつかのフラグメントサイズ決定の用途は、１６個以上のフラグメントが分離され単一レーンで検出されることが必要であろう。例えば、指紋による病原体の識別（すなわち、多数の特性ＤＮＡフラグメントの分離と検出）およびヒトのゲノム全体の検査による異数体の診断は、それぞれ数ダースまたは数百の染色体座を観察することによって得ることができる。

【００１６】

単一分離チャネルで検出することのできる染色体座の数を増加させる１つの手法は、追加の染色体座のフラグメントサイズを部分的に増加させることによって、発生したフラグメントサイズの範囲を広くすることである。しかし、フラグメントのより大きな増幅は抑制剤およびＤＮＡ変性に対してより敏感であり、短いフラグメントに対して長いフラグメントの生成が少なくなるので、追加の染色体座のためにより長いフラグメントを使用するのは理想的ではない。さらに、より長いフラグメントの生成は伸張時間の増加が必要であり、したがって、総アッセイ時間の増加が必要になる。染料の色数を増加させることによって所与の分離チャネル中で同時に検出することのできる染色体座の数を増加させる必要がある。

【００１７】

単一分離チャネル中で分析することのできるＤＮＡ配列の数を増加させることによって、Ｓａｎｇｅｒ配列分離の能力を増加させること（したがって、コスト、労力、および処理空間を低減すること）が必要である。さらに、いくつかの用途において、複数のＤＮＡフラグメントは「混合配列」データを読み取ることが難しく配列され、その混合配列を正しく解釈することのできる手法を開発する必要がある。

【００１８】

Ｓａｎｇｅｒ分離チャネルの能力を増加させ混合された配列を解釈する能力を開発する１つの手法は配列決定反応に用いられる染料の色数を増加させることである。ＤＮＡ配列決定とフラグメントサイズ決定の両方において、異なる染料で標識された複数のフラグメントを同時に検出することができる。一般に、隣接染料のピーク発光波長は染料のピーク幅に比べて十分大きくなければならない。したがって、各分離チャネルの処理量は、例えば、２つの独立配列決定反応において２セットの四染料を用い、産物を結合させ、それらを単一チャネル中で分離することによって２倍にすることができる。この方法は全部で８つの染料色の使用が必要であり、第１の配列反応はジデオキシヌクレオチド・ターミネーターを標識するために加えられた四染料のセットを用い、第２反応はターミネーターを標識するために加えられたもうひとつの四染料のセットを用い、各セットの染料色は、２つの配列の解釈が重なり合わないように独立である。この同じ手法を用いて、１２染料のセットを用いて単一チャネル中の３つのＤＮＡフラグメントの配列の同時分析が可能であり、１６染料のセットは４つの配列の分析を可能にし、このようにしてＳａｎｇｅｒ分離の情報能力を劇的に増加させることができる。

【００１９】

この用途の新しい機器およびバイオチップは上述のものを含んで多くの必要性を満足する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００２０】
本発明は核酸分析を行う完全に集積化されたマイクロ流体システムを提供する。これらのプロセスはサンプル収集、ＤＮＡ抽出、および精製、増幅（高次に多重化できる）、配列決定、およびＤＮＡ産物の分離と検出を含む。
【００２１】
本発明の分離と検出のモジュールは耐久性があり、単一ベースの解像度よりも良好な能力とすることができる。それらは６つ以上の色の検出が可能であり、したがって、配列およびフラグメントサイズ決定用途から高い情報量を発生するのに有用である。
【００２２】
バイオチップ上での高度の多重化迅速ＰＣＲは本出願と同時に出願した「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＲＡＰＩＤ　ＭＵＬＴＩＰＬＥＸＥＤ　ＡＭＰＬＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＴＡＲＧＥＴ　ＮＵＣＬＥＩＣ　ＡＣＩＤＳ（標的核酸の迅速多重増幅の方法）」と題される米国特許出願、弁理士事件番号０８－３１８－ＵＳの主題であり、その全体を参照して本出願に援用されている。さらに、その全体を参照して本出願に援用している「ＰＬＡＳＴＩＣ　ＭＩＣＲＯＦＬＵＩＤＩＣ　ＳＥＰＡＲＡＴＩＯＮ　ＡＮＤ　ＤＥＴＥＣＴＩＯＮ　ＰＬＡＴＦＯＲＭＳ（プラスチックマイクロ流体分離および検出プラットフォーム）」と題される米国特許出願、弁理士事件番号第０７－８６５－ＵＳに記載の通り、ＰＣＲ産物はバイオチップ内で分離し検出することができる。
【課題を解決するための手段】
【００２３】
したがって、第１態様において、本発明は、光学検出器であって、基板上の１または複数の検出位置を照射するために配置された１つ以上の光源；基板上の検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１の光学エレメント；および第１光学エレメントからの光を受容するために配置された光検出器であって、前記光検出器が、第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、かつ、分離された光の一部を検出エレメントに提供するように配置された波長分散エレメントを含む光検出器を備え、ここに、検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が、１つ以上の生体分子を標識した少なくとも６つの染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク発光波長を有する、光学検出器を提供する。
【００２４】
第２態様において、本発明は、生体分子の分離と検出のためのシステムであって、基板上の１つまたは複数のチャネル中の複数の生体分子を同時に分離するためのコンポーネントであって、ここに、各チャネルが検出位置を含むコンポーネント；基板上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光源；検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、前記光検出器は、前記光検出器が第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、分離された光の一部を検出エレメントに提供するように配置された波長分散エレメントを備え、ここに、前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上の生体分子を標識する少なくとも６染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク発光波長を有する光検出器を備える、システムを提供する。
【００２５】
第３態様において、本発明は、複数の生体分子を分離し検出する方法であって、基板上の１つまたは複数のマイクロ流体チャネル中に１つまたは複数の分析サンプルを提供し、各マイクロ流体チャネルが検出位置を含み、ここに、各分析サンプルが独立に複数の生体分子を含み、各々が独立に少なくとも６染料の１つで標識され、各染料が独自のピーク波長を有すること；各マイクロ流体チャネル中の複数の標識された生体分子を同時に分離すること；および各マイクロ流体チャネル中の複数の分離された標的分析物を、（ｉ）各検

出位置を光源で照射し；（ｉｉ）核検出位置から放射された光を収集し；（ｉｉｉ）収集された光を光検出器に導き；（ｉｖ）収集された光を光波長によって分離し；ついで、（ｖ）１つ以上の生体分子を標識した少なくとも６染料からの蛍光を同時に検出し、各染料が独自のピーク波長を有することによって、検出すること、を含む方法を提供する。

【００２６】

第４態様において、本発明は、集積化されたバイオチップシステムであって、（ａ）１つまたは複数のマイクロ流体システムを含むバイオチップであって、各マイクロ流体システムが分離チャンバーにマイクロ流体的に連絡する第１反応チャンバーを含み、ここに、第１反応チャンバーが、（ｉ）核酸抽出、（ｉｉ）核酸精製、（ｉｉｉ）予備核酸増幅清浄化、（ｉｖ）核酸増幅、（ｖ）後核酸増幅清浄化、（ｖｉ）予備核酸配列決定清浄化、（ｖｉｉ）核酸配列、（ｖｉｉｉ）後核酸配列決定清浄化、（ｉｘ）逆転写、（ｘ）予備逆転写清浄化、（ｘｉ）後逆転写清浄化、（ｘｉｉ）核酸ライゲーション、（ｘｉｉｉ）核酸ハイブリダイゼーション、または（ｘｉｖ）定量化に適合され、前記分離チャンバーが検出位置を含むバイオチップ；および（ｂ）分離および検出システムであって、（ｉ）前記分離チャンバー中の複数の標的分析物を同時に分離するための分離エレメント；（ｉｉ）前記バイオチップ上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光源；（ｉｉｉ）前記検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および（ｉｖ）前記第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、ここに、前記光検出器が、前記第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、前記分離された光の一部を少なくとも６つの検出エレメントに提供する波長分散エレメントを含み、ここに、前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上の生体分子を標識する少なくとも６染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク波長を有する光検出器、を備えるバイオチップシステムを提供する。

【００２７】

第５態様において、本発明は、集積化されたバイオチップシステムであって、（ａ）１つまたは複数のマイクロ流体システムを含むバイオチップであって、各マイクロ流体システムが分離チャンバーにマイクロ流体的に連絡する第１反応チャンバーを含み、ここに、第１反応チャンバーが、（ｉ）核酸抽出、（ｉｉ）核酸精製、（ｉｉｉ）予備核酸増幅清浄化、（ｉｖ）核酸増幅、（ｖ）後核酸増幅清浄化、（ｖｉ）予備核酸配列決定清浄化、（ｖｉｉ）核酸配列、（ｖｉｉｉ）後核酸配列決定清浄化、（ｉｘ）逆転写、（ｘ）予備逆転写清浄化、（ｘｉ）後逆転写清浄化、（ｘｉｉ）核酸ライゲーション、（ｘｉｉｉ）核酸ハイブリダイゼーション、または（ｘｉｖ）定量化に適合され、前記分離チャンバーが検出位置を含むバイオチップ；および（ｂ）分離および検出システムであって、（ｉ）前記分離チャンバー中のＤＮＡを含む複数の生体分子を同時に分離するための分離エレメント；（ｉｉ）前記バイオチップ上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光源；（ｉｉｉ）前記検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および（ｉｖ）前記第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、ここに、前記光検出器が、前記第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、前記分離された光の一部を少なくとも６つの検出エレメントに提供する波長分散エレメントを含み、ここに、前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上のＤＮＡ配列を標識する少なくとも８染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク波長を有し、各染料が少なくとも２つの四染料含有サブセットのメンバーであって、前記サブセットが基板上の単一検出位置で少なくとも２つのＤＮＡ配列を識別可能であり、ここに、染料の数が４の倍数であり、検出されるＤＮＡ配列の数がその倍数に等しくて、異なる染料の各々が１つのサブセットだけに存在する、光検出器、を備えるバイオチップシステムを提供する。

【図面の簡単な説明】

【００２８】
【図１】４つの個別サンプル用の溶解とテンプレート増幅のための集積化されたバイオチップの一実施形態の概略図。
【図２】図１のバイオチップの第１層の一実施形態の概略図。
【図３】図１のバイオチップの第２層の一実施形態の概略図。
【図４】図１のバイオチップの第３層の一実施形態の概略図。
【図５】図１のバイオチップの第４層の一実施形態の概略図。
【図６】図１のバイオチップの組み立てと結合の一実施形態の概略図。
【図７】面内および貫通孔バルブの２バルブ式について、脱イオン水とサイクル配列決定試薬のためのバルブの逆水力学的直径の関数としての毛管バルブ動作圧力を示すグラフ。
【図８】ＰＣＲによるテンプレート増幅について、図１のバイオチップの流体ステップの一実施形態を示す概略図。
【図８ａ】サンプルとＰＣＲ試薬が本発明のバイオチップに装填された状態を示す概略図。
【図８ｂ】チャネルからサンプルチャンバー（それらは流路を示すためにサンプルチャネルに沿う異なる位置で示される）へのサンプル送達を示す概略図。
【図８ｃ】サンプルチャンバー中のサンプルを示す概略図。
【図８ｄ】試薬チャンバーへのＰＣＲ試薬の送達を示す概略図。
【図８ｅ】過剰ＰＣＲ試薬の引き抜きを示す概略図。
【図８ｆ－８ｇ】第１の毛管バルブセットによる液体の初期混合ステップおよび保持を示す概略図。
【図８ｈ－８ｊ】ＰＣＲチャンバーに送達された混合液体を示す概略図、その時点で熱サイクルが開始される。
【図９】集積化されたバイオチップの流体ステップの一実施形態を示す概略図。
【図９ａ－９ｅ】第１層中の計量チャンバーへのサイクル配列決定試薬の送達およびチャンバー近傍からの過剰の薬剤の除去を示す概略図。
【図９ｆ－９ｇ】Ｓａｎｇｅｒ反応チャンバーへのＰＣＲ産物の導入を示す概略図。
【図９ｈ－９ｊ】往復動によるＳａｎｇｅｒ剤とＰＣＲ産物の混合を示す概略図。
【図９ｌ】分析のために取り出すことのできるサイクルされた産物を示す概略図。
【図１０】図１のバイオチップ中で製造された配列決定産物のための配列決定トレース（電気泳動図）を示す概略図。
【図１１】サイクル配列決定産物の限外濾過の実施のための集積化されたバイオチップの一実施形態を示す概略図、チップ組み立て体は層３と４の間の限外濾過（ＵＦ）フィルター１１１６の追加を除いてバイオチップ１と同じである。
【図１２】配列決定産物の精製中の図１１のバイオチップの流体ステップを示す概略図。
【図１２ａ－１２ｂ】ＵＦ入力チャンバーへのＳａｎｇｅｒ産物の送達を示す概略図。
【図１２ｃ】濾過チャンバーへ送達された配列決定産物を示す概略図。
【図１２ｄ】配列決定産物のほとんど完全な濾過を示す概略図。
【図１２ｅ－１２ｇ】ＵＦ入力チャンバーへの洗浄の送達および続いて送達チャネルからの過剰の洗浄の除去を示す概略図。
【図１２ｈ】第１洗浄サイクルの開始を示す概略図、図１２ｄの濾過および後続の洗浄サイクルが続く。
【図１２ｉ－１２ｊ】溶出液体（洗浄と同じ液体）がＵＦ入力チャンバーに送達されていることを示す概略図。
【図１２ｋ－１２ｍ】出力口を閉じてＵＦ入力チャンバーを加圧し、次いで圧力を開放して往復動させる単一サイクルを示す概略図。
【図１２ｎ】他のプロセスまたは取り出しの準備のできた精製された産物を示す概略図。
【図１３】テンプレート増幅、サイクル配列決定、配列決定産物の清浄化、電気泳動による分離、およびレーザー誘起蛍光による検出を実施するための集積化されたバイオチップの一実施形態を示す概略図。

【図１４】対電極による標識された核酸フラグメントの濃縮および分離チャネル中への注入を示す概略図。
【図１５】励起および検出システムの一実施形態を示す概略図。
【図１６】励起および検出システムの一実施形態を示す概略図。
【図１７】６染料サンプルの分離および検出のために形成された電気泳動図、グラフの各トレースは３２アノードＰＭＴの３２要素の各々からの信号を表し、各トレースはデータを見やすくするために互いに偏っている。
【図１８】電気泳動図から抽出された６染料の各々の染料スペクトルを示すグラフ、背景の蛍光スペクトルも示される。
【図１９】６－ＦＡＭ、ＶＩＣ、ＮＥＤ、ＰＥＴ、およびＬＩＺ染料の染料放射スペクトルを示すグラフ。
【図２０】５－ＦＡＭ、ＪＯＥ、ＮＥＤ、およびＲＯＸ染料の染料放射スペクトルを示すグラフ。
【図２１】４染料サンプルの分離および検出のために形成された電気泳動図、グラフの各トレースは３２アノードＰＭＴの３２要素の各々からの信号を表し、各トレースはデータを見やすくするために互いに偏っている。
【図２２】配列決定トレース。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
Ｉ．集積化および集積化されたシステム
Ａ．集積化の全般的な説明
マイクロ流体の使用は単一バイオチップ上に１つ以上の機能を実行する造作の製作を可能にする。これらの２つ以上の機能をマイクロ流体的に接続してサンプルのシーケンシャルプロセスを可能にすることができる。この結合は集積化と呼ばれる。
【００３０】
可能な機能またはコンポーネントプロセスには、任意の所与の用途を達成するために集積化しなければならない範囲があるが、任意の所与の用途のために全てのプロセスを実行しなくてもよい。結果として、選択された集積化方法は多くの異なる成分プロセスを異なる順序で有効に接続するために適切でなければならない。集積化することのできるプロセスは制限なしに以下を含む。
（１）サンプル挿入
（２）異物（例えば、塵、繊維などの大きな粒子）の除去
（３）細胞の分離（すなわち、ヒト細胞（したがってヒトのゲノムＤＮＡ）の除去など、分析すべき核酸を含むもの以外の細胞の除去）
（４）対象核酸を含む細胞の濃縮
（５）細胞の溶解と核酸の抽出
（６）溶解物からの核酸の精製、可能な限りより小さな容量へ核酸の濃縮
（７）予備増幅核酸清浄化
（８）後増幅清浄化
（９）予備配列決定清浄化
（１０）配列決定
（１１）後配列決定清浄化（例えば、組み込まれない染料標識されたターミネーターおよび電気泳動を妨害するイオンを除去するため）
（１２）核酸分離
（１３）核酸検出
（１４）ＲＮＡの逆転写
（１５）予備逆転写清浄化
（１６）後逆転写清浄化
（１７）核酸ライゲーション
（１８）核酸定量化

（１９）核酸ハイブリダイゼーション
（２０）核酸増幅（例えば、ＰＣＲ、ローリングサークル増幅(rolling circle amplification)、ストランド転移増幅、多重転移増幅）
【００３１】
これらのプロセスのいくつかを結合できる多くの方法の１つはＳＴＲ分析によるヒトの識別のための集積化システムである。それらのシステムはＤＮＡ抽出、ヒトの特定のＤＮＡ定量化、ＰＣＲ反応への所定量のＤＮＡの添加、多重化されたＰＣＲ増幅、および分離と検出（選択肢として、反応成分またはプライマーを除去する清浄化ステップも組み込むことができる）を必要とする。全血、乾燥血液、頬内部表面、指紋、性的暴行、接触、または他の法医学関連サンプルのスワッビングなどの技術で１つ以上のサンプルを収集することができる（Ｓｗｅｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｆｏｒｅｎｓｉｃ　Ｓｃｉ．１９９７，４２，３２０－２を参照）。溶解物（選択的に攪拌しながら）に曝すとスワッブから管にＤＮＡが放出される。
【００３２】
Ｂ．集積化コンポーネントおよびその使用の一般的な説明
１．サンプル収集および初期処理
多くの用途にとって、以下の個々のコンポーネントが有利にはバイオチップに集積化される。サンプル挿入、異物の除去、妨害核酸の除去、および対象細胞の濃縮。一般に、バイオチップの予備処理コンポーネントはサンプルを受容し、粒子と細胞を含む外部の核酸の初期除去を行い、対象細胞を小さな容量に濃縮する。１つの手法はスワッブを受容することができ（例えば、「Ｑチップ」に類似する）、溶解溶液で充填されて溶解と抽出ステップを行うサンプル管を用いることである。スワッブは血痕、指紋、水、空気フィルター、または臨床現場（例えば、口内スワッブ、創傷スワッブ、鼻汁スワッブ）を含んで、多くの細胞含有部位に接触させることができる。バイオチップの他のコンポーネントとこれらの管のインターフェースは異物除去のためのフィルターを含むことができる。他の手法は大容量の血液または１～１００ｍＬのサンプルを保持する環境サンプル取得カートリッジを使用することである。血液の場合、白血球低減媒体は対象核酸を含有する細菌が通過する間にヒトの白血球細胞と妨害ＤＮＡを除去することができる。環境サンプルについては、大メッシュのフィルターを用いて塵や泥を除去することができるが、小メッシュのフィルター（例えば、＜２０μｍ、＜１０μｍ、＜５μｍ、＜２．５μｍ、＜１μｍ、＜０．５μｍ、＜０．２μｍ、＜０．１μｍ）を用いて細菌を捕獲し、それらを小容量に濃縮することができる。これらの予備処理コンポーネントは分離して使い捨て可能とすることができ、または製造時に集積化されたバイオチップに取り付けることができる。替わりに、バイオチップは示差溶解を行って種類によって細胞を分離することができる（例えば、膣上皮細胞からの精液または細菌からの赤血球細胞）。
【００３３】
２．溶解および抽出
さまざまな溶解および抽出の方法を用いることができる。例えば、典型的な手順は、細胞壁を破壊して核酸を放出する少量のプロテイナーゼ－Ｋなどの分解酵素とサンプルを混合した後に熱を加えることを含む。他の有用な方法は音波処理および超音波処理であり、いずれもまたは両方ともしばしばビーズを存在下で行われる。
例えば、溶解および抽出は１０６個以下の細胞を含むサンプルで行うことができる。本発明のバイオチップおよび方法には、用途に応じてより少数の出発細胞を用いることができ、１０５未満、１０４未満、１０３未満、１０２未満、１０未満、および多重複写配列が用いられる場合には１未満である。
【００３４】
３．核酸の精製
核酸生成の１つの形は入力および出力チャネルの間に精製媒体を挿入することによって達成することができる。この精製媒体はシリカファイバー系とすることができ、カオトロピック塩薬試薬を用いて生物サンプルを溶解し、ＤＮＡ（およびＲＮＡ）を露出させ、Ｄ

ＮＡ（およびＲＮＡ）を精製媒体に結合させることができる。次いで、溶解物は入力チャネルを経由して精製媒体中を輸送して、核酸に結合させる。結合した核酸はエタノール系緩衝剤で洗って汚染物を除去する。これは入力チャネルを経由して洗浄剤を精製膜に通すことによって達成することができる。次いで、結合した核酸は適切な低塩緩衝剤（例えば、Ｂｏｏｍの米国特許５，２３４，８０９号）を流すことによって膜から溶出される。この方法の変形は異なる構成の固体相の使用を含む。例えば、シリカゲルを用いて核酸を結合することができる。常磁性シリカビーズを使用することができ、その磁気的特性を用いて結合、洗浄、および溶出ステップの間、それらをチャネルまたはチャンバーの壁に対して固定する。また、非磁化シリカビーズも、密な「カラム」に充填しフリットで保持する（典型的にデバイスのプラスチック中に作られるが、それらは組み立て中に挿入することもできる）か、またはその運転のある相の間「自由」な状態で用いることができる。自由ビーズは核酸と混合することができ、次いで、デバイス中のフリットまたは堰に向かって流動させて、それらを捕捉し、それらが下流のプロセスを妨害しないようにすることができる。他の形式はゲル媒体中に分散されたシリカ粒子とシリカ粒子を含有するポリマーモノリスを有するゾルーゲルを含み、キャリアは機械的安定性を高めるために架橋される。本質的に、従来の設定において任意の機能的な核酸精製方法が本発明の集積化バイオチップに適用することができる。

【００３５】

４．核酸増幅

ＰＣＲおよび逆転写ＰＣＲなどのさまざまな核酸増幅方法を用いることができ、これは少なくとも２つの温度、またはより典型的には３つの温度間の熱サイクルが必要であった。ストランド転移増幅などの等温方法を用いることができ、多重転移増幅は全てのゲノム増幅に用いることができる。「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＲＡＰＩＤ　ＭＵＬＴＩＰＬＥＸＥＤ　ＡＭＰＬＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＴＡＲＧＥＴ　ＮＵＣＬＥＩＣ　ＡＣＩＤＳ（標的核酸の迅速多重増幅の方法）」と題される米国特許、弁理士事件番号第０８－３１８－ＵＳ（上述）の教示は、その全体を参照して本出願に援用されている。

【００３６】

５．核酸定量化

マイクロ流体形式における定量化の１つの手法はリアルタイムＰＣＲに基づく。この定量化方法において、反応チャンバーは入力および出力のチャネルの間に作られる。反応チャンバーは熱循環器および光学励起に結合され、検出システムは反応チャンバーに結合されて反応溶液からの蛍光の測定を可能にする。サンプル中のＤＮＡの量は反応チャンバーからのサイクル毎の蛍光の強度に相関がある。例えば、Ｈｅｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１９９６，６，９８６－９９４を参照されたい。他の定量化方法はいずれも増幅の前または後にピコＧｒｅｅｎ、ＳＹＢＲまたは臭化エチジウムなどの挿入染料の使用を含み、これは次いで蛍光または吸収のいずれかを用いて検出することができる。

【００３７】

６．二次精製

ＳＴＲ分析では、多重増幅され、かつ、標識されたＰＣＲ産物を分析に直接用いることができる。しかし、電気泳動分離性能は、分離その他の後続のステップを妨害するＰＣＲに必要なイオンを除去する産物の精製によって大きく改善することができる。同様に、サイクル配列決定または他の核酸操作に続く精製は有用である。まとめれば、核酸の初期抽出または精製に続く任意の精製ステップは二次精製と考えることができる。限外濾過を含んでさまざまな方法を用いることができ、これは小さなイオン／プライマー／組み込まれなかった染料標識がフィルターを通して動かされ、フィルター上に望ましい産物が残り、次いでこれは溶出されて分離または後続のモジュールに直接適用できる。限外濾過媒体はポリエーテルスルホンおよび再生セルロース「織布」フィルター、ならびに、極めて薄い（１～１０μｍ）膜に高度に均一なサイズの孔が形成された溝エッチ膜を含む。後者は、表面下のある深さに産物を捕捉するのではなく、フィルターの孔サイズよりも大きなサイ

ズの産物を集める利点を有する。また、増幅された核酸は上で概説した同じ方法を用いて精製することもできる（すなわち、古典的なシリカ上の固相精製）。さらに他の方法は、可変孔サイズ特性、すなわち、熱、ｐＨなどの環境変数に対応して孔サイズを変化させる特性を有する架橋ポリマーであるヒドロゲルを含む。１つの状態において、孔は細かく、ＰＣＲ産物は通過できない。孔が広がると、孔を通して流体力学または電気泳動的な産物の流動が可能になる。他の方法は、表面（ビーズの表面など）に固定されたランダムＤＮＡへの産物の非特異的ハイブリダイゼーション、または固体表面上で産物への配列標識が補足される特異的ハイブリダイゼーションのいずれかのハイブリダイゼーションを用いることである。この手法において、対象産物はハイブリダイゼーションによって固定され、望ましくない材料は洗浄によって除去され、後続の加熱が二本鎖ＤＮＡ分子を溶かし、精製された産物を放出する。

【００３８】

７．サイクル配列決定反応

古典的なサイクル配列決定はＰＣＲなどの熱サイクルが必要である。好ましい方法は、各伸張産物が伸張反応の最終塩基に相当する単一の蛍光標識を有するように染料標識を付けたターミネーターを用いるものである。

【００３９】

８．注入、分離、および検出

電気泳動チャネルへの標識された核酸フラグメントの注入、分離、および検出はさまざまな方法で行うことができ、これは本出願と同時出願になる、「ＰＬＡＳＴＩＣ ＭＩＣＲＯＦＬＵＩＤＩＣ ＳＥＰＡＲＡＴＩＯＮ ＡＮＤ ＤＥＴＥＣＴＩＯＮ ＰＬＡＴＦＯＲＭＳ（プラスチックマイクロ流体分離および検出プラットフォーム）」と題される米国特許出願、弁理士事件番号第０７－８６５－ＵＳに記載されており、これはその全体を参照して本出願に援用されている。第１に、本出願に議論されている交差注入器を用いてサンプルの一部を注入することができる。代替の実施形態において、動電学的な注入（「ＥＫＩ」）を用いることができる。いずれの場合も、電極近くの産物を静電気的に濃縮することによって、装填チャネルの開放終端近傍（交差注入の場合）または分離チャネル（ＥＫＩの場合）の配列決定産物のさらなる濃縮を行うことができる。チップの電気泳動部分の２つの電極サンプルウェルは図１４に示される。両方の電極は浸透層でコーティングされ、それは、ＤＮＡが電極の金属に接触するのを防止するが、イオンと水はサンプルウェルと電極の間に接近することを許容する。それらの浸透層は架橋ポリアクリルアミドから形成することができる（米国特許出願公開ＵＳ２００３－１４６１４５－Ａ１を参照されたい）。チャネル開口部から最も遠い電極は分離電極であるが、チャネル開口部に最も近い電極は対電極である。対電極の分離電極に対して正に印加することによってＤＮＡは対電極に引っ張られ、分離チャネルの開放部近くで濃縮される。対電極を電源から切り離し、分離電極と分離チャネルの遠い端部のアノードを用いて注入することによって、濃縮された産物が動電学的に注入される。

【００４０】

Ｃ．集積化方法

また、バイオチップは機能モジュールを集積化するいくつかの異なる手段を含む。これらの手段は、バイオチップ上の点から点へ液体を輸送すること、流量依存のプロセスについては流量の制御（例えば、いくつかの洗浄ステップ、粒子分離、および溶出）、バイオチップ上で流体の運動を時間と空間でゲート制御すること（例えば、ある形態のバルブを用いることによって）、および流体の混合を含む。

【００４１】

流体輸送および流体流れの制御のために様々な方法を用いることができる。１つの方法は能動的な転移ポンピングであり、流体または介在ガスまたは流体に接触するプランジャーが、運動中のプランジャーによって転移された容積に基づいて流体を正確な距離動かす。それらの方法の一例はシリンジポンプである。他の方法は空気力学的にまたは磁気的に、または他の方法で起動される集積化された弾性膜の使用である。これらの膜は所定の空

間中の流体を含むバルブとして、および／または流体の早期混合または送達を防止するために単一で使用することができる。しかし、直列に用いるとき、これらの膜は蠕動ポンプに類似のポンプを形成することができる。先端側の膜は運動流体を受け取る（およびデバイスのチャネル中の転移された空気を排気する）ように開放しているので、同期させた逐次的な膜の起動によってその流れ側から流体を「押し出す」ことができる。これらの膜を起動する好ましい方法は空気力学的起動である。それらのデバイスにおいて、バイオチップは流体層から構成され、少なくともその１つは膜を有し、その一方の側はデバイスの流体チャネルおよびチャンバー内部に露出される。膜の他の側は圧力源に配管された空気力学的マニホールド層に露出する。膜は圧力または真空の印加によって解放または閉じられる。通常開放または通常閉鎖のバルブを用いることができ、圧力または真空の下で状態を変化させる。ガスが分析下の流体に接触しないので、起動のために任意のガスを使用できることに留意されたい。

【００４２】

流体を駆動し流量を制御するさらに他の方法は、流体の先端、流路、または両方のメニスカスの圧力を変化させることによって真空または圧力を流体自体に直接加えることである。適切な圧力（典型的に０．０５～３ｐｓｉｇの範囲）が加えられる。また、流量は流体と水力学的直径の圧力差の４乗に比例し、チャネルの長さまたは液体栓と粘度に反比例するので、流体チャネルを適切なサイズにすることによって、流量を制御することもできる。

【００４３】

流体ゲート制御はさまざまな能動バルブを使用して達成することができる。前者は圧電バルブまたはソレノイドバルブを含むことができ、チップに直接組み込み、または主要チップ本体のポートがバルブに連絡して流体をバルブに導き、次いでチップに戻すようにバイオチップに加えることができる。これらの種類のバルブの１つの欠点は多くの用途についてそれらの製造が困難になり、使い捨て集積化デバイスに組み込むのが高価なことである。好ましい手法は、上述のようにバルブとして膜を使用することである。例えば、１０ｐｓｉｇで起動される膜はＰＣＲを行う流体を都合よく含むことができる。

【００４４】

いくつかの用途において、受動バルブであるキャピラリーマイクロバルブが好ましい。本質的に、マイクロバルブは流路中の狭窄である。マイクロバルブにおいて、流体に加えられた圧力がバースト圧力と呼ばれる臨界バルブ以下であるとき、表面エネルギーおよび／または鋭い縁などの幾何形状を用いて流れに抵抗することができ、これは一般に関係、

【００４５】

【数１】

$$P_{バルブ} \alpha (\gamma / dH) * \sin(\theta c)$$

【００４６】

で与えられ、式中、γは液体の表面張力であり、ｄＨはバルブの水力的直径（４＊（断面積）／断面周で定義される）であり、θｃは液体のバルブ表面との接触角である。

【００４７】

いくつかの用途について受動バルブを好ましくする特性は、極めて小さなデッド容積（典型的にピコリットルの範囲である）、および物理的な小ささ（各々はバルブに行き来するチャネルよりもわずかに大きいだけである）を含む。物理的な小ささはバイオチップの所与の表面上で高いバルブ密度を可能にする。さらに、いくつかのキャピラリーバルブは製造が非常に簡単であり、本質的にプラスチックシート中の小さな孔からなり、表面処理はあってもなくても良い。キャピラリーバルブの賢明な使用は必要な膜バルブの数を低減することができ、全体的に製造が単純化され、堅牢なシステムを作る。

【００４８】

本発明のデバイスに実施されるキャピラリーバルブには２つの種類がある。すなわち、１つの層の中に「溝」を作って、この層を造作のない蓋（典型的にデバイスの他の層）に

接合することにより、バルブの小さなチャネルと鋭い角が形成される面内バルブ、および、小さな（典型的に２５０μｍ以下）孔がデバイスの２つの流体保持層の間の中間層に作られるスルーホールバルブである。両方とも、フルオロポリマーによる処理を用いてバルブに接触する流体の接触角を増加させることができる。

【００４９】

図７はこれらのバルブの対象液体、すなわち、脱イオン水およびサイクル配列決定試薬のためのフルオロポリマー処理の場合のバルブサイズの関数としてバルブ性能を示す。両方とも、バルブ寸法に対するバルブ操作圧力に、予想される依存性（圧力～１／直径）が観察される。スルーホールバルブは面内バルブよりも大きな利点を有する。第１に、それらは製造が容易であり、プラスチックシート中の小さなスルーホールは、バルブ層が作られた後に、ポストの周りの成型、打ち抜き、金型切断、ドリル穴あけ、またはレーザードリル穴あけのいずれかによって容易に作ることができる。面内バルブはかなり精密な加工を必要とし、非常に細かなバルブ（高いバルブ作動圧力を有する）は必要な成型または型押し工具を作るためにリソグラフ技術を用いる必要がある。第２に、スルーホールバルブは「全ての側」をフルオロポリマーでより完全にコーティングすることができる。孔に表面張力の低いフルオロポリマー溶液を添加することによって、毛細管作用による孔内壁の完全なコーティングがもたらされる。面内バルブの全ての側をコーティングするには、バルブ並びにバルブを封止する嵌合層の領域の両方にフルオロポリマーを添加する必要がある。結果として、典型的な面内バルブはバルブの「屋根」上がコーティングされないで形成される。

【００５０】

機械加工された試作品において、スルーホールバルブは実施が容易であり、図７に示すように、より大きなバルブ作動圧力を有する。

混合はさまざまな方法で達成することができる。第１に、所与の流量で拡散時間が、

【００５１】

【数２】

$$t_D = (\text{幅})^2 / (2 * \text{拡散定数})$$

【００５２】

を満足するように、通常小さな横方向寸法と十分な長さの単一チャネルに２つの流体を共注入することによって、拡散を用いて流体を混合することができる。都合の悪いことに、拡散または混合時間はチャネル幅の二乗で増加するので、この種の混合は典型的に急速に大容量を混合するには不十分である。混合は、流体の流れが分割され再結合される積層（ＣａｍｐｂｅｌｌおよびＧｒｚｙｂｏｗｓｋｉ Ｐｈｉｌ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄ．Ａ ２００４，３６２，１０６９－１０８６）、または流れチャネル内に無秩序の移流を形成する微小構造の使用（Ｓｔｒｏｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．２００２．７４，５３０６－４３１２）など、さまざまな方法で高めることができる。能動ポンプを使用するシステムにおいて、混合はデバイス上の２つの点の間に流体を循環させることによって達成することができる。最終的に、後者はキャピラリーバルブを用いるシステムにおいても達成することができる。２つのチャネルまたはチャンバーの間に配設されたキャピラリーバルブは流体流れの旋回軸として働き、流体がキャピラリーを通して１つのチャネルから他へ流れる際に、流体のポンピングに十分低い圧力が用いられる場合、流路のメニスカスが捕捉される。逆向きの圧力は流体を第１チャネル中に戻し、それは再びキャピラリーで動かなくなる。複数のサイクルを用いて成分を十分混合することができる。

【００５３】

マイクロ流体形式における分離および検出の手法は、本出願と同日出願の「ＰＬＡＳＴＩＣ ＭＩＣＲＯＦＬＵＩＤＩＣ ＳＥＰＡＲＡＴＩＯＮ ＡＮＤ ＤＥＴＥＣＴＩＯＮ ＰＬＡＴＦＯＲＭＳ（プラスチックマイクロ流体分離および検出プラットフォーム）」と題される米国特許出願、弁理士事件番号第０７－８６５－ＵＳに記載され、これはその

全体を参照して本出願に援用されている（例えば、その中のパラグラフ６８～７９、９４～９８を参照されたい）。

【００５４】

図１３の上部は２つのコンポーネントから製造中に接合されて集積化されたバイオチップ（１３０１）の構造を示す。第１に、溶解、増幅、および図１のバイオチップの配列決定造作を図１１のバイオチップの配列決定産物精製造作と組み合わせる１６サンプルのバイオチップ（１３０２）であり、第２に、１６レーンのプラスチック分離バイオチップ（１３０３）である。また、精製された配列決定産物は分離の前に動電的に注入することもできる。

【００５５】

Ｄ．製造方法

本発明のデバイスは主としてプラスチックから構成することができる。有用なプラスチックの種類は、制限なしに、環状オレフィンポリマー（ＣＯＰ）、環状オレフィンコポリマー（ＣＯＣ）、（その両方とも優れた光学品質、低い吸湿性、および分子量が十分であるとき高い動作温度を有する）、ポリ（メチルメタクリラート）（ＰＭＭＡ）（機械加工が容易であり、優れた光学特性を得ることができる）、ポリカーボナート（ＰＣ）（成型性が高く、衝撃抵抗が良好であり動作温度が高い）を含む。材料および製造方法のさらに多くの情報は、「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＲＡＰＩＤ　ＭＵＬＴＩＰＬＥＸＥＤ　ＡＭＰＬＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＴＡＲＧＥＴ　ＮＵＣＬＥＩＣ　ＡＣＩＤＳ（標的核酸の迅速多重増幅の方法）」と題される米国特許出願（弁理士事件番号第０８－３１８－ＵＳ）（上記）に含まれ、これは参照して本出願に援用されている。

【００５６】

さまざまな方法を用いてバイオチップの個々の部品を製造し、それらを最終デバイスに組み立てることができる。バイオチップは挿入コンポーネントを含むことの可能な１つ以上の種類のプラスチックから構成することができるので、対象の方法は、個々の部品の製造および部品と組み立て体の後続の後処理が付随する。

【００５７】

プラスチックコンポーネントは射出成型、熱型押し、および機械加工を含んで、いくつかの方法で作ることができる。射出成型部品は大きな造作（流体貯蔵器など）と微細造作（キャピラリーバルブなどの両方から構成される。いくつかの場合において、異なるサイズの造作の射出成型の手法は変化し得るので、微細造作を１組の部品に作り、大きな造作を他の組に作るのが望ましい。大きな貯蔵器（１方の側に数ｍｍ（約１～５０ｍｍ）および数ｍｍの深さ（約１～１０ｍｍ）、および数百μＬを収容できる）については、機械加工された射出成型工具、または工具のネガ型に機械加工されたグラファイト電極を用いて鋼または他の金属に焼成することによって作られた工具を使用する従来の成型を用いることができる。

【００５８】

微細造作については、工具作成および成型プロセスは変化することができる。工具は典型的に対象基板上にリソグラフプロセス（例えば、ガラスの異方性エッチング、または深い反応性イオンエッチング、またはシリコン上の他のプロセス）を用いて作られる。次いで、基板はニッケルで電気メッキ（通常接着を向上するクロム層を堆積した後）し、例えば酸中のエッチングによって基板を除去することができる。このニッケル「娘」プレートは射出成型工具である。成型プロセスは上述とはいくらか異なることができる。細い浅い造作については、プラスチックが空洞に注入された後金型が物理的にわずかに圧縮される圧縮射出成型が標準的な射出成型よりも忠実度、精度、および再現性において優れることが判明している。

【００５９】

熱型押しについては、上述の大きな造作と微細造作に関する類似の論点は保たれ、工具は上述のようにして作ることができる。熱型押しにおいて、ペレットの形のプラスチック樹脂または成型または型押しによって予備成形された材料の打ち抜き材を工具表面または

平坦な基板に貼ることができる。次いで、プラスチックをそのガラス転移温度以上に昇温させ、材料が流動して工具の空洞を充填するように、第２工具に正確に制御された温度と圧力を加える。真空中の型押しは空気が工具とプラスチックの間に捕捉される問題を回避することができる。

【００６０】

また、部品を作るのに機械加工を用いることもできる。高速コンピュータ制御（ＣＮＣ）機械を用いて、成型された、または押し出された、または溶媒鋳造されたプラスチックから１日に多くの個別部品を作ることができる。フライス盤、作業パラメーター、および切断工具の適切な選択によって高い表面品質を達成することができる（５０ｎｍの表面粗さはＣＯＣの高速フライスで達成可能である（Ｂｕｎｄｇａａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ＩＭｅｃｈＥ Ｐａｒｔ Ｃ：Ｊ．Ｍｅｃｈ．Ｅｎｇ．Ｓｃｉ．２００６，２２０，１６２５－１６３２）。また、フライスを用いて、成型または型押しで達成するのが困難な幾何形状を作り、容易に造作のサイズを単一部品中に混合することができる（例えば、大きな貯蔵器および微細キャピラリーバルブを同じ基板中に機械加工することができる）。成型または型押しよりもフライスが優れる他の利点は、作成した部品を成型工具から取り出すために成型剥離剤を必要としないことである。

【００６１】

個々の部品の後処理は光学検査（自動化することができる）、バリや飛び出したプラスチックなどの欠陥を除去する洗浄作業、および表面処理を含む。機械加工されたプラスチックに光学品質表面が必要ならば、プラスチック用溶媒の蒸気による研磨を用いることができる。例えば、ＰＭＭＡについてはジクロロメタンを用いることができ、ＣＯＣおよびＣＯＰについてはシクロヘキサンまたはトルエンを用いることができる。

【００６２】

組み立ての前に、表面処理を加えることができる。表面処理は、濡れ性を促進または低減すること（すなわち、部品の親水性／疎水性を変化させる）、マイクロ流体内のバブルの形成を抑制すること、キャピラリーバルブのバルブ動作圧力を増加すること、および／または表面へのタンパク質の吸着を抑制することができる。濡れ性を低減するコーティングは、分子がデバイスの表面に吸着されまたは結合されるとき流体に露出されるフルオロポリマーおよび／またはフッ素部を有する分子を含む。コーティングは吸着または堆積させることができ、またはそれらは表面に共有結合することができる。それらのコーティングを作るのに用いることのできる方法は、浸漬コーティング、組み立てられたデバイスのチャネルを通してコーティング剤を通過させること、インク、化学的気相堆積、およびインクジェット堆積を含む。コーティング分子と表面の間の共有結合は、活性化された表面を作る酸素または他のプラズマまたはＵＶオゾンでの処理によって形成することができ、続いて、表面に表面処理分子の堆積または共堆積が続く（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ ２００５，２６，１８００－１８０６、およびＣｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｎｓｏｒｓ ａｎｄ Ａｃｔｕａｔｏｒｓ Ｂ ２００４，９９，１８６－１９６を参照されたい）。

【００６３】

コンポーネント部品の最終デバイスへの組み立ては様々な方法で行うことができる。フィルターなどの挿入デバイスは金型切断し、次いで取り出し－配置機械で配置することができる。

【００６４】

均一な厚さの２層以上の同じ材料層の接合には熱拡散接合を用いることができる。一般に、部品を積み重ね、温度が部品を含む材料のガラス転移温度近傍まで上昇することのできる熱プレス中に積み重ねを置き、部品間のインターフェースで融合させる。この方法の利点は、接合が「全体的」である、すなわち、熱と圧力が層全体に均一に加えられるので、層の内部構造に拘わらず、概略同じ寸法の任意の２つの層を接合できることである。

【００６５】

また、熱拡散を用いて、特別に作られた接合受台を用いることによって、その接合また

は対向面が平面ではないものなど、より複雑な部品を接合することができる。それらの受台は接合すべき層の外側表面に整合する。

【００６６】

他の接合の変形は溶媒援用熱接合を含み、これはメタノールなどの溶媒が部分的にプラスチック表面を溶解し、低い接合温度で接合強度を高める。さらに他の変形は低分子量材料のスピンコーティングを用いることである。例えば、接合すべき少なくとも１層に同じ化学構造であるが基板コンポーネントよりも低分子量のポリマーをスピンコーティングし、コンポーネントを組み立て、拡散接合によって接合された積み重ねを得ることができる。熱拡散接合の間に、低分子量成分はコンポーネントよりも低い温度でそのガラス転移温度を通過し、基板プラスチック中に拡散することができる。

【００６７】

接着剤およびエポキシは、異なる材料を接合するのに用いることができ、異なる方法で作られたコンポーネントを接合するとき、使用が有望である。接着剤フィルムは金型切断しコンポーネント上に配置することができる。また、液体接着剤もスピンコーティングによって塗布することができる。構造部品上への接着剤のインク塗布（ナノコンタクト印刷など）を成功裏に用いて、接着剤を特別の領域へ「導く」必要なしに、接着剤を構造体表面に貼付することができる。

【００６８】

一例において、本発明のバイオチップは図６に示すように組み立てることができる。層１および２は含まれる造作によって整列することができ（例えば、ピンとソケット）、別々に、含まれる造作によって層３と４を同様に整列することができる。層１と層２の積み重ねは逆にすることができ、層３と層４の積み重ねに加え、次いで積み重ね全体を接合することができる。

【００６９】

Ｅ．実施例

実施例１

核酸抽出および核酸増幅用集積バイオチップ

ＰＣＲによる核酸抽出および核酸増幅用集積バイオチップを図１に示す。この４サンプル装置は、試薬の分配および計量、試薬とサンプルの混合、チップの熱サイクル部へのサンプルの送達、熱サイクリング、の機能を集積化する。同バイオチップは以下の実施例２で使用され、サイクル配列決定を実行するための追加の構造を有する。

【００７０】

バイオチップは、図２～５に示すように熱可塑性物質の４層で構成した。４層は加工したＰＭＭＡであり、それぞれ０．７６ｍｍ、１．９ｍｍ、０．３８ｍｍ、０．７６ｍｍの厚さを有し、バイオチップの横寸法は１２４ｍｍ×６０ｍｍとした。一般的に、３層以上のバイオチップでは、複数の検定間で分割される不定数の共通の試薬を使用することができる。２つの流体層と少なくとも貫通孔を含む１つの層では、外側の層の流体路がお互いを乗り越えることができる（複数のサンプル間で１つのみの試薬を使用するような、３層構造を必要としない特別な場合が存在すると認識される）。４層の選択は、限外濾過（実施例３）や完全集積化（実施例４）などの他の機能用のチップの構造との適合性のために行った。

【００７１】

バイオチップのチャネルの１２７μｍ×１２７μｍ～４００μｍ×４００μｍの範囲であり、リザーバの断面寸法は４００μｍ×４００μｍ～１．９×１．６ｍｍである。チャネルとリザーバはいずれも０．５ｍｍ～数十ｍｍ程度の短い距離を延在する。バイオチップ内で使用されるキャピラリーバルブは、「面内」バルブの場合は１２７μｍ×１２７μｍの寸法で、貫通孔キャピラリーバルブの場合は直径１００μｍとした。

【００７２】

４加工層の特定のチャネル、リザーバ、およびキャピラリーバルブを、疎水性／疎油性物質、ＰＦＣ　５０２Ａ（Ｃｙｔｏｎｉｘ，Ｂｅｌｔｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ）で処理した。

表面処理は、湿ったＱチップで被覆した後、室温で空気乾燥した。乾燥したフルオロポリマー層は、光学顕微鏡で判定したところ厚さ１０μｍ未満だった。表面処理は、液体が急速にチャネルまたはチャンバーの壁を濡らす際に生じうる、液体内、特にサイクル配列決定試薬などの低表面張力液体内での気泡の生成を防止し、（および、空気が移動できる前に気泡を「孤立させ」）、キャピラリーバルブが液体流に抵抗するキャピラリー破壊圧力を増大させるという２つの目的に供する。処理されずに残った領域は、ＰＣＲおよびサイクル配列決定用の熱サイクリングチャンバである。

【００７３】

表面処理後、層を図６に示すように接合した。接合は、多量の成分がプラスチックのガラス転移温度（T_g）近傍の温度まで圧力下で加熱される熱拡散接合を用いて行った。４５ｌｂｓの力を１５分間、１１．５平方インチのバイオチップ全体に印加し、うち７．５分は気温から１３０℃までの傾斜から成る熱接合プロファイルで、後の７．５分は１３０℃を維持してから急速に室温まで冷却した。

【００７４】

本発明のバイオチップ内で流体を動かすために空気式機器を開発した。２個の小さな蠕動ポンプが圧力と真空を提供する。約０．０５～３ｐｓｉｇの範囲の３つのレギュレータ間で正圧を分割した。真空は約（－０．１）～（－３）ｐｓｉｇの出力真空を有するレギュレータに移した。４つ目の高圧を別のレギュレータへのN^2のシリンダからまたは高容量ポンプから取り出した。正圧と負圧を一連の８つの圧力選択モジュールに印加した。各モジュールには、５入力の中からバイオチップに送られる出力圧力を選択することのできるソレノイドバルブを備えた。出力圧力ラインは、少なくとも１つの空気圧インタフェースを終端とした。このインタフェースは、チップの入力側のチップポート（図面の最上部に沿うポート）上に配置されるＯリングでチップに固定した。

【００７５】

バイオチップポートの真上には、圧力選択モジュールからの出力圧力ラインを受け入れる追加のソレノイドバルブ（すなわち、ゲートバルブ、１インタフェースにつき８個）を設けた。チップに近接するこれらのバルブは、圧力ラインとチップ間に低デッドボリュームインタフェース（約１３μＬ）を提供する。低デッドボリュームインタフェースは、圧力が別の液体を動かすように印加される際、バイオチップ上の特定の液体の意図しない移動を防止する（液体の栓と閉鎖したバルブの間の小さなガス体積が、たとえば、圧力が印加されるときのガスの圧縮によって栓が移動しうる最大量を決定する）。すべての圧力選択バルブとゲートバルブとを、スクリプトベースのＬａｂ　ＶｉｅｗＴＭプログラムを用いてコンピュータの制御下で動作させた。このシステムの重要な特徴は、短い圧力サイクル時間が可能なことである。３０ｍｓｅｃ程度の短い圧力パルスしか必要としない流体制御イベントを実行することができる、および／または、圧力をある値から別の値に（すなわち、あるレギュレータから別のレギュレータに）、迅速に（すなわち、わずか１０～２０ｍｓｅｃのタイムラグで）切替え可能な複雑な圧力プロファイルを利用することができる。

【００７６】

サンプルは、ｐＧＥＭシーケンシングプラスミドインサートで転換された約１０６細胞／ｍＬのＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５（ｐＵＣ１８シーケンシングターゲット）の細菌懸濁液から成る。ＰＣＲ試薬は、０．１μＭの濃度のｄＮＴＰｓ　ＫＯＤ　Ｔａｑ　ポリメラーゼ（Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）から成る。

【００７７】

細菌懸濁液１．２３μＬのサンプルを４つのポート１０４それぞれに追加し、各ポートは層１および２にそれぞれ貫通孔２０２および３３６を有する。その後、サンプルは層２のサンプルチャネル３０３に配置した。次に、１０μＬのＰＣＲ試薬を層１および２に貫通孔２１７および３０６を備えるポート１０５に追加した。その後、ＰＣＲ試薬を層２のチャンバー３０７に配置した（図８ａを参照）。ＰＣＲ試薬のために移動した空気の排気用ポートは、１０９および貫通孔２０３と３０５を備えるポート１０７である。

【００７８】
動作中、サンプルおよび下流工程（試薬の計量や流体の混合など）により移動した空気は、貫通孔２２７を備えるチップの出力端上のポート１０８を通じて排気した。ＰＣＲ反応の最終体積は所望に増大または減少させることができる。
【００７９】
バイオチップを上述の空気マニホールド内に配置した。ステップ間の遅延なく、以下の自動圧力プロファイルを実行した。特段他に指摘のない限り、チップの入力側に沿ったポートに対応する空気圧インタフェースバルブは、全ステップの間中閉じている。
【００８０】
１５秒間ポート１０４に０．１２ｐｓｉｇの圧力を印加して、チャネル３０３を下って貫通孔３０４までサンプルを動かした。サンプルは貫通孔３０４を通過し、層２の反対側の層１のサンプルチャンバー２０４に現れ、第１の混合ジャンクション２０５まで動かされた。第１の混合ジャンクションでは、サンプルはキャピラリーバルブ２１０によって保持された（図８ｂ～ｃを参照）。
【００８１】
１０秒間ポート１０５に０．１２ｐｓｉｇの圧力を印加して、ＰＣＲ試薬を貫通孔３２０を貫通して動かした。ＰＣＲ試薬は分配チャネル２０８の層２の反対側に現れ、サンプル量と等しい試薬量を確定する計量チャンバー２０９まで移動し、混合ジャンクション２０５でキャピラリーバルブ２１１によって保持された（図８ｄを参照）。
【００８２】
ポート１０７（貫通孔２０３および３０５を備える）に０．１２ｐｓｉｇの圧力を印加しポート１０５を３秒間大気に開放し、チャネル２０８を空にした（図８ｅを参照）。
【００８３】
０．０３秒間ポート１０７および１０５に０．８ｐｓｉｇの圧力を印加すると同時に、０．０３秒間、０．７ｐｓｉｇの圧力をポート１０４に印加して、キャピラリーバルブ２１０および２１１を越えて液体を決壊させることによってサンプルとＰＣＲ試薬との混合を開始させた（図８ｆを参照）。
【００８４】
１０秒間ポート１０４および１０７に０．１２ｐｓｉｇの圧力を印加して、サンプルおよびＰＣＲ試薬を混合チャネル２１４に注入し、キャピラリーバルブ２１０および２１１で保持させた。混合バルブ２１２を通って狭窄部２１３までの通過により、追加の水圧抵抗が生成されて、先の高圧パルスによって与えられていた高速が減速した。
【００８５】
０．０３秒間ポート１０４および１０７に０．７ｐｓｉｇの圧力を印加して、キャピラリーバルブ２１０および２１１から液体を分離した（図８ｇを参照）。
【００８６】
３秒間ポート１０４および１０７に０．１２ｐｓｉｇの圧力を印加して、混合チャネル２１４を通過してキャピラリーバルブ２１９まで液体を注入し、そこで保持させた（図８ｈを参照）。
【００８７】
０．１秒間ポート１０４および１０７に０．７ｐｓｉｇの圧力を印加して、サンプルとＰＣＲ試薬の混合物を貫通孔３１５および４０２と層２および３とを通過させ、ＰＣＲチャンバー５０２内まで動かした（図８ｉを参照）。
【００８８】
３秒間ポート１０４および１０７に０．１２ｐｓｉｇの圧力を印加して、サンプルとＰＣＲ試薬の混合物を完全にチャンバー５０２に注入した。その後、サンプルとＰＣＲ試薬の混合物の先端は貫通孔４０３および３１６を通過して、層１に現れ、キャピラリーバルブ２２０で保持された（図８ｊを参照）。
【００８９】
その後、「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＲＡＰＩＤ　ＭＵＬＴＩＰＬＥＸＥＤ　ＡＭＰＬ

ＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＴＡＲＧＥＴ　ＮＵＣＬＥＩＣ　ＡＣＩＤＳ（標的核酸の迅速多重増幅の方法）」と題され、本文書とともに出願された米国特許出願、弁理士事件番号０８－３１８－ＵＳおよび、「ＤＥＶＩＣＥＳ　ＡＮＤ　ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＴＨＥ　ＰＥＲＦＯＲＭＡＮＣＥ　ＯＦ　ＭＩＮＩＡＴＵＲＩＺＥＤ　ＩＮ　ＶＩＴＲＯ　ＡＳＳＡＹＳ（小型化管内検定の実行装置および方法）」と題され、２００８年２月６日に出願された国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ０８／５３２３４号、弁理士事件番号０７－０８４－ＷＯに記載されるガスブラダー圧縮機構を用いて、バイオチップを３０ｐｓｉｇN_2まで加圧し、ペルチエを介したＰＣＲ増幅のために熱サイクルした。上記両文書とも引用により本文書に全文を組み込む。

【００９０】

サンプル、試薬量、およびＰＣＲチャンバーの寸法は、液体がバルブ２１９とバルブ２２０間の領域を満たすように選択した。その結果、小さな断面積（通常、１２７μｍ×１２７μｍ）の液体／蒸気インタフェースが、層４の熱サイクルされた底面から約３ｍｍの位置に配置された。熱サイクリング間の圧力の印加により、サンプル内の溶存酸素によるガス放出を抑制した。液体／蒸気インタフェースの小さな断面積と、ペルチエ表面からの距離とはいずれも、蒸発を抑制した。

【００９１】

サイクリング中のバイオチップの最上部で観測された温度は６０℃を超えず、その結果、液体／蒸気インタフェースでの蒸気圧は、仮にインタフェースがＰＣＲチャンバー内にあった場合の蒸気圧よりも相当低かった。２μＬのサンプルの場合、そのうち１．４μＬがチャンバー５０２内にあり、残りが貫通孔およびキャピラリーバルブ内にあり、観測される蒸発は４０サイクルのＰＣＲ全体で０．２μＬ未満だった。未サイクルの流体量、この場合０．６μＬは、より小さな貫通孔の直径を選択することにより低減することができる。

【００９２】

ＰＣＲは、以下の温度プロファイルを用いて実行した。

・３分間、９８℃での細菌の熱溶解

・以下を４０サイクル

５秒間９８℃での変性

１５秒間６５℃でのアニーリング

４秒間７２℃で伸張

２分間７２℃での最終伸張

【００９３】

ＰＣＲ産物を、チャンバー５０２を～５μＬの脱イオン水で洗浄することによって洗浄し、スラブゲル電気泳動によって分析した。ＰＣＲは、以後の配列決定反応に必要とされるよりもずっと多くの、１反応につき最大４０ｎｇを産出した。この適用では、単に細菌を溶解することによって、細菌核酸を生成した。核酸は必要に応じて精製することができ、この精製工程は、増幅、配列決定、およびその他の反応の効率を向上させることができる。

【００９４】

実施例２

サイクル配列決定試薬の分配、ＰＣＲ産物との混合、およびサイクル配列決定用集積バイオチップ

実施例１に記載のバイオチップを使用した。実施例１に概説したプロトコルを用いて管内で生成したＰＣＲ産物を、上述したようにサンプルとバイオチップのＰＣＲ試薬ポートの両方に追加した。５０μＬのサイクル配列決定試薬（ＢｉｇＤｙｅＴＭ３．１／ＢＤＸ６４、ＭＣＬａｂ、Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）を、（貫通孔２１５および３０８を備える）ポート１０６とチャンバー３０９とに追加した。２つの空気式インタフェース（１つはチップの入力端用、もう１つは出力端用）の設置後、ＰＣＲ産物を実施例１で説明したようにＰＣＲチャンバーまで処理したが、ＰＣＲ熱サイクリングステップは除いた。チ

ップ内の流体の配置を図９ａに示す。
【００９５】
空気圧システムソフトウェアを使用して、以下の圧力プロファイルを実行した。チップポートに対応するすべてのソレノイドバルブは、特段の指摘のない限り、閉じている。
（１）ポート１０６に０．１ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０９を１０秒間大気に開放して、サイクル配列決定試薬をチャネル３１０に注入した（図９ｂを参照）。
（２）０．２秒間ポート１０６および１０８に０．７ｐｓｉｇの圧力を（貫通孔２１６および３１４を備える）印加して、チャネル３０４から貫通孔３１１、さらに層２の本体を通って層１のサイクル配列決定試薬計量チャンバー２１８まで配列決定試薬を動かした（図９ｃを参照）。
（３）ポート１０６に０．１ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０９を大気に開放して、サイクル配列決定試薬をキャピラリーバルブ２２１まで動かし、そこで保持させた（図９ｄを参照）。
（４）ポート１０８に０．１ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０６を１秒間大気に開放して、過剰なサイクル配列決定試薬を後方へチャンバー１０１まで戻させ、チャネル３１０を空にした（図９ｅを参照）。
（５）０．１秒間ポート１０４および１０７に０．７ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０９を大気に開放して、ＰＣＲ産物を、キャピラリーバルブ２２０を通り貫通孔３１７まで、そして層２の本体と層３の貫通孔４０４を通過させ、層４のサイクル配列決定チャンバー５０３内へと動かした（図９ｆを参照）。
（６）ポート１０９に０．１ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０４および１０７を５秒間大気に開放して、ＰＣＲサンプルを貫通孔に戻るように動かした。毛管管作用により貫通孔の入口で液体を保持して、閉じ込められた気泡がＰＣＲ産物とチャンバー５０３との間に現れるのを防止した（図９ｇを参照）。
（７）０．２秒間ポート１０８に０．７ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０９を大気に開放して、サイクル配列決定試薬をチャンバー５０３内に動かすと同時に、ポート１０４および１０７に０．１ｐｓｉｇを印加して、ＰＣＲ産物を配列決定試薬と接触させた（図９ｈを参照）。
（８）１０秒間ポート１０４、１０７、および１０８に０．１ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０９を大気に開放して、ＰＣＲ産物およびサンガー試薬をチャンバー内に動かした。ＰＣＲ産物の後方メニスカスと配列決定試薬の後方メニスカスは、キャピラリーバルブ２２０および２２１で留められた（図９ｉを参照）。
（９）０．１秒間０．２５ｐｓｉｇの５真空パルスをポート１０８に印加して、ポート１０９を大気に開放して、両液体を部分的に後方へ試薬計量チャンバー２１８内へと引き戻した（図９ｊを参照）。
（１０）ポート１０４、１０７、および１０８に０．１ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１０９を１０秒間大気に開放して、混合物を戻しチャンバー５０３に注入して、後方メニスカスをステップ８と同様キャピラリーバルブで保持した（図９ｋを参照）。
【００９６】
ステップ９～１０は、配列決定試薬とＰＣＲ産物の混合を実行するためにあと２回繰り返した。
【００９７】
その後、バイオチップを３０ｐｓｉｇ　N_2 に加圧し、以下の温度プロファイルで熱サイクルを行った。
・１分間９５℃で最初の変性
以下を３０サイクル
５秒間９５℃での変性
１０秒間５０℃でのアニーリング
１分間６０℃での伸張
【００９８】

サンプル（図９１を参照）を回収し、エタノール沈澱により精製し、後述するように（パートＩＩ、実施例５）Ｇｅｎｅｂｅｎｃｈ™機器上で電気泳動分離およびレーザー励起蛍光検出によって分析した。Ｐｈｒｅｄ品質分析は、１サンプルにつき４０８＋／－５７　ＱＶ２０塩基を産出する。

【００９９】

実施例３

４サンプルバイオチップでの限外濾過

配列決定産物精製実行用の４サンプルバイオチップは、実施例１に記載され、図１１に示されるように４層で構成した。構成内の追加要素は、適切なサイズにカットされ、熱接合前に層３と４の間に配置される限外濾過（ＵＦ）フィルター１１１６である。ＵＦフィルター周りで良好な接合を形成するには、層３の使用を必要とした。フィルターまで、およびフィルターからつながる全チャネルは層２の底部にあるため、層３および４は途切れのないフィルター外周を形成する（層２と４とを直接接合すると、たとえば、チャネルがフィルターを横断する場所でフィルターの接合が不良となる）。本実施例では、分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）３０ｋＤの再生セルロース（ＲＣ）フィルターを使用した（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ，Ｇｏｅｔｔｉｎｇｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）。別の材料ポリエーテルスルホン（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｅａｓｔ　Ｈｉｌｌｓ，ＮＹ）を有する、その他各種ＭＷＣＯ（１０ｋＤ、５０ｋＤ、および１００ｋＤ）を検討した。

【０１００】

（１）ｐＵＣ１８テンプレートおよびＫＯＤ酵素を用いて管反応で生成されたサイクル配列決定産物の４つの１０μＬサンプルを、第１層のポート１１０４から、第２層のチャネル１１０５を通って第２層のチャンバー１１０６に追加した。２００μＬの脱イオン水を、ポート１１２０（第１層の貫通孔）と第２層のリザーバ１１２１に追加した。その後、バイオチップを２つの空気圧インタフェースに設置した。

【０１０１】

以下の圧力プロファイルを空気圧システムソフトウェアを用いて実行した。バイオチップポートに対応するすべてのソレノイドバルブは、特に断りのない限り閉じている。

（２）ポート１１０４に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を５秒間大気に開放して、配列決定産物を層１のキャピラリーバルブ１１０８まで動かし、そこで保持させた。

（３）ポート１１０４に０．６ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を０．１秒間大気に開放して、層１のキャピラリーバルブ１１０８を通ってサンプルを決壊させ、層２の貫通孔１１１１を通過し層２のＵＦ入力チャンバー１１１２まで送達させた。

（４）ポート１１０４に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を１０～３０秒間（実験によって異なる時間を用いた）大気に開放して、配列決定産物をチャンバー１１１２に送達した。配列決定産物は、層２のキャピラリーバルブ１１１３によって保持された（図１２ａおよび１２ｂを参照）。

（５）ポート１１２４に０．８ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９および１１０４を０．５秒間大気に開放して、バルブ１１３を介して濾過チャンバー１１１５まで配列決定産物を動かした。また、これにより、保持された液体の入力キャピラリーバルブ１１０８を清掃した。

（６）ポート１１２４に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を１０～３０秒間大気に開放して、配列決定産物のチャンバー１１１５への送達を完了した。配列決定産物はバルブ１１１３で保持された（図１２ｃを参照）。

（７）７．５ｐｓｉｇの圧力を、限外濾過のためにチップの全ポートにゆっくりと印加した。限外濾過中、配列決定産物メニスカスは１１１３で留められたままで、液体がフィルター１１１６を通過して推進されるにつれ、液体の先端が「後退」する。１０μＬの配列決定産物は、濾過のために１２０秒までを要した。濾過後、圧力を解放した（図１２ｃおよび１２ｄを参照）。

（８）ポート１１２０に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１２４を３秒間大

気に開放して、水を（層４の）チャネル１１２２まで動かし、部分的にチャンバー１１２３をあふれさせた（図１２ｅを参照）。
（９）ポート１１２０および１１２４に０．８ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を大気に開放して、水をチャネル１１２２内の貫通孔キャピラリーバルブ１１１０を介してチャンバー１１１２内へと動かした。
（１０）ポート１１２０に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を１０～３０秒間大気に開放して、液体のチャンバー１１１２への送達を完了させ、そこで液体はバルブ１１１３によって保持された。（図１２ｆを参照）。
（１１）ポート１１２４に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１２０を解放し、チャンバー１１２３およびチャネル１１２２内の水をチャンバー１１２１に戻るように動かした（図１２ｇを参照）。
（１２）ポート１１２４に０．８ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９および１１０４を０．５秒間大気に開放して、水をバルブ１１３を通過して濾過チャンバー１１１５まで動かした。また、これにより、保持された液体の入力キャピラリーバルブ１１０８を清掃した。
（１３）ポート１１２４に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を１０～３０秒間大気に開放して、水のチャンバー１１１５への送達を完了した。配列決定産物はバルブ１１１３で保持された（図１２ｈを参照）。
【０１０２】
上記ステップ６と同様、水はＵＦフィルターを通じて動かされ、第１の洗浄を完了し、ステップ８～１３をあと１回繰り返した。
【０１０３】
ステップ８～１２を繰り返して、溶出のために使用される最終量の水でチャンバー１１１５を部分的に満たした（図１２ｋを参照）。
【０１０４】
ポート１１０４に１．６ｐｓｉｇの真空を印加して、他の全ポートを１秒間閉鎖して、チャンバー１１１５からチャンバー１１１２へと水を引き込んだ（液体のメニスカスとポート１１１９に対応するソレノイドバルブとの間のデッドスペースと等しい大きさの真空を生成することによって、最大の移動が指示される）（図１２ｌを参照）。
【０１０５】
ポート１１０４を１秒間大気に開放して、液体とポート１１１９に対応するバルブとの間に生成される部分的真空により、液体をチャンバー１１１５内に戻すことができる（図１２ｍを参照）。
【０１０６】
１６～１７を５０回繰り返して、５０の溶出サイクルを生成した。
１０秒間ポート１１２４に０．０９ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を大気に開放して、後方メニスカスが１１１３で留められるように液体を動かした。
【０１０７】
０．０５秒間ポート１１２４に０．７ｐｓｉｇの圧力を印加して、ポート１１１９を大気に開放して溶出液を分離した（図１２ｎを参照）。
サンプルを回収し、上述したようにＧｅｎｅｂｅｎｃｈＴＭ上で直接処理して、最大４７９のＱＶ２０塩基を産出した。
【０１０８】
実施例４
核酸抽出、テンプレート増幅、サイクル配列決定、配列決定産物の精製、および精製産物の電気泳動分離および検出用完全集積バイオチップ
図１３は、図１のバイオチップの溶解および抽出、テンプレート増幅、およびサイクル配列決定機能と、図１１のチップの限外濾過と、電気泳動分離および検出と、を組み合わせた１６サンプルバイオチップ１３０１の実施形態を示す。限外濾過による工程はサブコンポーネント１３０２によって実行され、実施例１、２、および３に記載されるように遂

行することができる。１３０２の底面の移動点１３０４は、分離サブコンポーネント１３０３上の入力ウェル１３０５と並んでいる。

【０１０９】

注入は、対向電極を用いて予備濃縮ステップで動電学的に実行される。図１４に示す入力ウェル１３０５は、液体受入ウェル１４０１、主分離電極１４０２、および対向電極１４０３から成る。分離チャネル１３０６は、ウェルリザーバ１４０１の底部に開放している。分離電極は通常、白金または金で被覆されており、好ましくは、１４０１の内面の１、３、または４を実質上覆う平坦金被覆電極である。対向電極は、架橋化ポリアクリルアミドの薄層（～１０μｍ）で被覆された薄い金、鋼鉄、または白金のワイヤ（通常、直径０．２５ｍｍ）である。これは、電極上にヒドロゲル保護層を形成する。パネルｄでは、精製された配列決定産物（１４０１内の黒丸）はウェルに移送されている。１４０２と１４０３の間に正電位を印加すると、負に帯電した配列決定産物が、パネルｃ～ｄのように１４０３の方に引かれる。１４０３上のヒドロゲル層は、配列決定産物が金属電極に接触するのを阻止し、配列決定産物の電気化学的ダメージを防止する。その後、対向電極１４０３は、１４０２に対して浮上させられる。次に、正電位が、分離チャネル１３０６の遠位端で主分離電極１４０２と陽極（図示せず）との間に印加される。これにより、産物が注入されて（パネルｅ）、分離および検出のために電気泳動で１３０６まで下る（パネルｆ）。図１４に示すように、このスキームは、チャネル１３０６の端部近傍での配列決定産物の濃度を、限外濾過から導出される濃度に比べて相当高めることができる。用途によってはこのような濃度が望ましいが、すべての場合に必要なわけではない。このような場合、対向電極１４０３のない図１４のウェルを、ＥＫＩを実行するのに直接使用することができる。もしくは、荷重ウェル中の単独の電極が、クロスＴまたはダブルＴインジェクタであってもよい（たとえば、「ＰＬＡＳＴＩＣ　ＭＩＣＲＯＦＬＵＩＤＩＣ　ＳＥＰＡＲＡＴＩＯＮ　ＡＮＤ　ＤＥＴＥＣＴＩＯＮ　ＰＬＡＴＦＯＲＭＳ（プラスチックマイクロ流体分離および検出プラットフォーム）」と題され、本文書とともに提出された米国特許出願、弁理士事件番号０７－８６５－ＵＳを参照）。

【０１１０】

分離は分離チャネル１３０６で行い、検出は検出領域１３０７内のレーザー励起蛍光を介して行う。このバイオチップでは、たとえば、ペルチエブロック（図示せず）に１３０１の下面と結合してＰＣＲおよびサイクル配列決定用の熱サイクリングを提供させるための凹部１３０８が設けられる。機器内の空気圧インタフェース（図示せず）はチップの端部に固定され、マイクロ流体制御を提供する。

【０１１１】

ＩＩ．分離および検出システム

Ａ．分離および検出コンポーネントおよびその使用の詳細な説明

１．分離機器

ＤＮＡ分離は、米国特許出願公開第ＵＳ２００６－０２６０９４１－Ａ１号に記載されるようなバイオチップおよび機器上で実行される。分離チップは、ガラスであっても（米国出願公開第ＵＳ２００６－０２６０９４１－Ａ１号を参照）、プラスチックであってもよく（「ＰＬＡＳＴＩＣ　ＭＩＣＲＯＦＬＵＩＤＩＣ　ＳＥＰＡＲＡＴＩＯＮ　ＡＮＤ　ＤＥＴＥＣＴＩＯＮ　ＰＬＡＴＦＯＲＭＳ（プラスチックマイクロ流体分離および検出プラットフォーム）」と題され、本文書と同時に出願された米国特許出願、弁理士事件番号０７－８６５－ＵＳ）、どちらも引用により全文を本文書に組み込む。

【０１１２】

２．励起および検出機器

この機器は、サンプルと相互作用し、サンプルを識別する励起および検出サブシステムを備える。サンプルは通常、色素（たとえば、蛍光色素）で標識される１つまたはそれ以上の生体分子（ＤＮＡ、ＲＮＡ、およびタンパク質を含むがそれらに限定されない）を含む。励起サブシステムは、励起源とレンズ、ピンホール、ミラー、および対物レンズなどの光学素子を有する励起ビーム路とを備えて、励起／検出ウィンドウ内の励起源を条件づ

け、焦点を結ばせる。サンプルの光励起は、４００～６５０ｎｍの可視領域の発光波長で、一連のレーザー種によって達成することができる。個体レーザーは、約４６０ｎｍ、４８８ｎｍ、および５３２ｎｍの発光波長を提供することができる。これらのレーザーは、Ｃｏｈｅｒｅｎｔ社製（Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ）のＣｏｍｐａｓｓ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、およびＶｅｒｄｉを含む。ガスレーザは、約４８８ｎｍ、５１４ｎｍ、５４３ｎｍ、５９５ｎｍ、および６３２ｎｍの可視波長での発光を有するアルゴンイオンおよびヘリウムネオンを含む。可視領域での発光波長を有するその他のレーザーは、ＣｒｙｓｔａＬａｓｅｒ社（Ｒｅｎｏ，ＮＶ）から入手可能である。１実施形態では、４８８ｎｍ個体レーザーＳａｐｐｈｉｒｅ　４８８－２００（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ，Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ）を利用することができる。別の実施形態では、可視範囲を越える波長の光源を、可視範囲を越える吸収および／または発光スペクトルを有する色素（たとえば、赤外線または紫外線発光色素）を励起するために使用することができる。もしくは、発光ダイオードやランプを含む色素励起に適した発光波長を有する非レーザー光源の使用によって、光励起を実現することができる。

【０１１３】

検出サブシステムは、１つまたはそれ以上の光学検知器、（波長分離を実行する）波長分散装置、および励起／検出ウィンドウに存在する蛍光色素標識化ＤＮＡフラグメントから発せられた蛍光を回収するための、レンズ、ピンホール、ミラー、および対物レンズなどを含むがそれらに限定されない１つまたは一連の光学素子を備える。蛍光は、単独の色素または色素の組み合わせから発することができる。信号を判別して発光色素からの貢献を判断するため、蛍光の波長分離を利用することができる。二色性ミラーおよびバンドバスフィルター素子（Ｃｈｒｏｍａ，Ｒｏｃｋｉｎｇｈａｍ，ＶＴ；およびＯｍｅｇａ　Ｏｐｔｉｃａｌ，Ｂｒａｔｔｌｅｂｏｒｏ，ＶＴなどの多数のベンダーから入手可能）の使用によって実行可能である。この構成では、発せられた蛍光が一連の二色性ミラーを通過し、そこで波長の１部がミラーによって反射されて光路を下り続け、波長の他の部分がミラーを通過する。それぞれが二色性ミラーの端部に配置される別個の一連の光検知器が、特定範囲の波長における光を検知する。バンドバスフィルターは、検出前に波長範囲をさらに狭めるために、二色性ミラーと光検知器の間に配置することができる。波長分離された信号を検出するのに利用可能な光学検知器は、フォトダイオード、アバランシェフォトダイオード、光電子倍増管モジュール、およびＣＣＤカメラなどである。これらの光学検知器は、Ｈａｍａｍａｔｓｕ（Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ，ＮＪ）などの供給業者から入手可能である。

【０１１４】

１実施形態では、波長成分を二色性ミラーおよびバンドバスフィルターを使用して分離し、これらの波長成分を光電子増倍管（ＰＭＴ）検知器（Ｈ７７３２－１０、Ｈａｍａｍａｔｓｕ）で検出する。二色性ミラーおよびバンドバスコンポーネントは、各ＰＭＴの入射光が蛍光色素の発光波長に対応する狭い波長から成るように選択することができる。バンドバスは通常、１～５０ｎｍの波長範囲のバンドバスで蛍光発光のピークを中心とするように選択される。このシステムは８色の検知を可能とし、８つのＰＭＴとそれに対応する、発せられた蛍光を別々の８色に分割するおよびバンドバスフィルターのセットとを備えて設計することができる。追加の二色性ミラー、バンドバスフィルター、およびＰＭＴを適用することによって９つ以上の色素を検出することもできる。図１５は、個々のバンドバスフィルターと二色性フィルターの実装用のビーム路を示す。この集積化バージョンの波長識別および検出構造は、Ｈａｍａｍａｔｓｕ，Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ，ＮＪのＨ９７９７Ｒである。

【０１１５】

蛍光信号から成る色素を判別するもう１つの方法は、プリズム、回析格子、透過格子（ＴｈｏｒＬａｂｓ，Ｎｅｗｔｏｎ，ＮＪ；Ｎｅｗｐｏｒｔ，Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡなどの多数のベンダーから入手可能）やスペクトル写真（Ｈｏｒｉｂａ　Ｊｏｂｉｎ－Ｙｖｏｎ，Ｅｄｉｓｏｎ，ＮＪなどの多数のベンダーから入手可能）などの波長分散素子およびシス

テムの使用である。この動作モードでは、蛍光の波長成分が物理空間全体に分散される。この物理空間に沿って配置された検知器素子が光を検知し、検知器素子の物理的位置と波長との相関関係を取る。この機能に適した検知器はアレイベースであり、多要素フォトダイオード、ＣＣＤカメラ、裏面薄型ＣＣＤカメラ、多陽極ＰＭＴを含む。当業者であれば、波長分散素子と光学検知器素子との組み合わせを適用して、同システム内で使用される色素から波長を判別デイルシステムを得ることができるであろう。

【０１１６】

別の実施形態では、波長成分と励起された蛍光とを分離するために、二色性およびバンドバスフィルターの代わりにスペクトル写真を使用する。スペクトル写真設計の詳細は、Ｊｏｈｎ Ｊａｍｅｓ，Ｓｐｅｃｔｒｏｇｒａｐｈ Ｄｅｓｉｇｎ Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ．Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ：Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，２００７で入手可能である。スペクトル範囲５０５～６７０ｎｍの凹面ホログラフィック回折格子でのスペクトル写真Ｐ／Ｎ ＭＦ－３４（Ｐ／Ｎ ５３２．００．５７０）（ＨＯＲＩＢＡ Ｊｏｂｉｎ Ｙｖｏｎ Ｉｎｃ，Ｅｄｉｓｏｎ，ＮＪ）がこの適用で使用される。検出は線形３２要素ＰＭＴ検知器アレイ（Ｈ７２６０－２０，Ｈａｍａｍａｔｓｕ，Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ、ＮＪ）によって実行可能である。回収された蛍光はピンホール上で撮像され、反射され、分散され、凹面ホログラフィック回折格子によってスペクトル写真の出力ポートに搭載される線形ＰＭＴ検知器上に撮像される。ＰＭＴベースの検知器の使用は、低暗ノイズ、高感度、高動的範囲、および迅速な反応というＰＭＴ検知器の特徴を利用している。励起された蛍光の検出にスペクトル写真と多要素ＰＭＴ検知器とを使用することによって、機器の検出システム（二色性、バンドバス、および検知器）を物理的に再構成する必要なく、システム内およびレーン内で適用可能な色素の数および色素の発光波長の自由度を高めることができる。この構成から収拾されるデータは、各レーンの各走査に関する、可視波長範囲全体にわたる波長依存スペクトルである。走査ごとに全スペクトルを生成することで、色素発光波長とサンプル内に存在しうる色素の数との両方に関して、色素の自由度が高まる。また、分光器と線形多要素ＰＭＴ検知器の使用により、アレイ内のＰＭＴ素子全部が並行して読み出されるため、読出速度が極めて速くなる。図１６は、多要素ＰＭＴとスペクトル写真実装用のビーム路を示す。

【０１１７】

機器は、複数のレーンを同時に検出し、複数の波長を同時に検出するための動作観測モードを採用することができる。１構成では、励起ビームが、すべてのレーンに同時にぶつけられる。ここからの蛍光は、ＣＣＤカメラまたはアレイなどの２次元検知器によって収集される。この収集の観測モードでは、波長分散素子が使用される。一方の次元の検知器は物理的な波長分離を表し、他方の次元の検知器は空間的またはレーン対レーンの分離を表す。

【０１１８】

複数のサンプルの同時励起および検出のため、バイオチップの各レーンを撮像するため、励起と検出の両方のビーム路を導く走査ミラーシステム（６２）（Ｐ／Ｎ ６２４０ＨＡ，６７１２４－Ｈ－０および６Ｍ２４２０Ｘ４０Ｓ１００Ｓ１，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ ＭＡ）を使用する。この動作モードでは、走査ミラーがビーム路を導いて、最初のレーンから最後のレーンまでレーンからレーンへと順次走査し、最初のレーンから最後のレーンまでの工程をサイド繰り返す。レーンの位置を特定するのに、米国特許出願公報第２００６－０２６０９４１－Ａｌ号に記載されるようなレーン発見アルゴリズムを使用する。

【０１１９】

多レーンおよび多色素同時検出のための光学検出システムの実施形態を図１６に示す。蛍光励起および検出システム４０は、記録、および最終的には分析のために色素から励起された蛍光を収集し、１つまたはそれ以上の光検知器に伝送しつつ、各マイクロチャネルの１部を通ってエネルギー源（たとえばレーザ光）を走査することによって、（たとえば、１セットのＳＴＲ遺伝子座の増幅後のＤＮＡフラグメントを含む）ＤＮＡサンプルの電

気泳動によって分離される成分を励起する。

【０１２０】

１実施形態では、蛍光励起および検出アセンブリ４０は、レーザー６０、スキャナ６２、１つまたはそれ以上の光検知器６４、各種ミラー６８、スペクトル写真、およびレーザー６０から放出され、開口部４２を通ってテストモジュール５５および光検知器６４まで戻るレーザー光を伝導するレンズ７２を含む。スキャナ６２は、テストモジュール５５に対する様々な走査位置へと入射するレーザー光を移動させる。具体的には、スキャナ６２は、テストモジュール５５内の各マイクロチャネルの該当部分までレーザー光を移動させて、それぞれの分離成分を検出する。多要素ＰＭＴ６４は、テストモジュール５５からデータ（たとえば、異なる波長のＤＮＡフラグメントの蛍光信号）を収集し、ポート７５に装着されたケーブルを介して保護カバー５０外に配置されるデータ獲得および記憶システムにデータを電子的に提供する。１実施形態では、データ獲得および記憶システムは、Ｏｐｔｉｏｎ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｃｏｍｐｕｔｅｒｓ（１３ ａｕｄｒｅｕｉｌ－Ｄｏｒｉｏｎ，Ｑｕｅｂｅｃ，Ｃａｎａｄａ）社製の小型コンピュータを含むことができる。

【０１２１】

別の実施形態（「観測モード」）では、励起源が全検出箇所に同時に入射され、全検出箇所からの蛍光が同時に収集される。同時スペクトル分散（検出された蛍光の波長スペクトル）および空間分散（検出箇所）は２次元検知器アレイで実行可能である。この構造では、一方の次元のアレイ検知器（列）でスペクトル成分が撮像および検出され、他方の次元のアレイ検知器で空間成分が撮像および検出されるように、２次元検知器アレイを配置する。

【０１２２】

好適な機器は、「観測」モードではなく動作の走査モードを利用する。走査モードでは、スキャナが識別されているレーンと一致している間であって、次のチャネルに入射される前に、各チャネルの信号を収集し、積算し、読み出す必要がある。高速読出の検知器は、最適な光の収集と積算を可能とし、信号対ノイズ性能を高める。理想的には、検知器の読出時間は、スキャナがチャネルと一致している総計時間よりも相当短くあるべきである。多要素ＰＭＴは０．７ｍｓ未満での読出しが可能であり、読出時間は個々のチャネルの検出のための集積化時間よりもずっと短い。

【０１２３】

ピンホールに入射する蛍光は、波長成分に応じて格子により分散し、線形多陽極ＰＭＴ検知器アレイ上に集束させることができる。検知器は３２の電流出力を提供し、１つの出力が、入射する光子の数に対応するアレイ素子のそれぞれに関する。複数のサンプル（またはレーン）検出中、レーザーが選択されたレーンを励起する位置にあるとき、積分回路はＰＭＴ出力電流を積算して、積算されたＰＭＴ電流に比例する出力電圧を生成する。同時に、シングルエンド型出力電圧は、アナログ機器（Ｎｏｒｗｏｏｄ、ＭＡ）差動ドライバＩＣ（Ｐ／Ｎ ＳＳＭ２１４２）を用いて差動モードに変換される。（走査速度とレーン数によって確定される）積分時間の最後に、データ獲得システムが差動信号を読み取り、データをバッファに保存する。データの保存後、データ獲得システムはスキャナを移動させて、次の選択されたレーンにレーザー光をシフトすると同時に、積分回路をリセットする。

【０１２４】

各単要素ＰＭＴモジュールは自身の積分回路を有する。８色検出システムの場合、８つのＰＭＴモジュールと８つの積分回路とがある。対応する数のＰＭＴモジュールと積分回路とを用いて、追加の色を加えることもできる。

【０１２５】

各ＰＭＴ要素（Ｈ７７２６０－２０，Ｈａｍａｍａｔｓｕ，Ｊａｐａｎ）が単独のＰＭＴ管（Ｈ７７３２－１０，Ｈａｍａｍａｔｓｕ，Ｊａｐａｎ）と同様の、またはより迅速な信号反応を有し、読出しが並列に行われるため、この検知器は非常に迅速な動作が可能

である。分光器と連結されて、この分光器および多陽極検知器システムは、０．１ｍｓ未満の読出時間で可視スペクトル（４５０ｎｍ～６５０ｎｍ）全体にわたり全スペクトル走査を提供することができる。

【０１２６】

速いリフレッシュ速度を提供できることで、この分光器／検知器システムを、１回の作業内で順次複数のレーンの検出を実行する走査モードに適用することができる。ＰＭＴベースの検知器の使用は、低ノイズ、高感度、広い動作範囲、高速反応を提供する。凹面ホログラフィック回折格子（Ｈｏｒｉｂａ　Ｊｏｂｉｎ－Ｙｖｏｎ）および多陽極ＰＭＴ検知器を備える１４０ｍｍ分光器はＨ７２６０－２０検知器（日本国浜松）である。この用途に、その他の分光器構成と多陽極ＰＭＴ検知器を使用することもできる。

【０１２７】

電気泳動図からのヌクレオチド塩基の判定は、データを訂正し、フィルタリングし、分析する信号処理アルゴリズムを用いて実行する。このプロセスは、呼出可能信号を突き止めることと、信号ベースラインを訂正することと、ノイズをろ波することと、色クロストークを除去することと、信号ピークを特定することと、関連塩基を判定することとから成る。呼出可能信号を突き止めることは、信号の最初と最後から余分なデータを除去することで実行し、閾値を採用することで達成する。次に、信号がすべての検出された色に対して共通のベースラインを有するように、信号から背景を除去する。最後に、低域通過フィルターを適用して、信号から高周波ノイズを除去する。

【０１２８】

検出した色の曖昧性を除去するため、加重マトリックスを算出し、ヌクレオチド色素スペクトルの色空間を増幅する信号に適用した。この色分離マトリックスの計算は、Ｌｉｅｔ　ａｌ．Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ　１９９９、２０、１４３３～１４４２の方法を用いて達成した。この適応において、「ｍ×ｎ」色分離マトリックスは、検定で利用する「ｍ」個の色素と「ｎ」個の検知器素子とを相互に関連付けることで計算する。検知器空間（ＰＭＴ要素）から色素空間への信号の変換は、以下のようなマトリックス操作によって実行する。Ｄ＝ＣＳＭ×ＰＭＴ、ただし、Ｄはｍ個の色素のそれぞれの色素空間における信号、ＣＳＭは色分離マトリックス、ＰＭＴは検知器のｎ個の素子のそれぞれからの信号を有するマトリックスである。

【０１２９】

次に、色分離信号のピークを、ゼロ交差フィルターと周波数分析の組み合わせを用いて特定する。最後に、フラグメントのサイジング用途の場合、訂正されたトレースは対立遺伝子を呼び出されて、各フラグメントを特定し、サイジングスタンダードに基づくフラグメントサイズを指定する。ＤＮＡ配列決定用途の場合、訂正されたトレースは塩基を呼び出されて、４つのヌクレオチドのうちの１つとトレース内の各ピークとを関連付ける。塩基呼出の詳細な説明は、Ｅｗｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９８，８，１７５～１８５、およびＥｗｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、１９９８、８、１８６～１９４でなされており、その開示は引用により本文書に全文を組み込む。

【０１３０】

３．色素標識

オリゴヌクレオチドと変性オリゴヌクレオチドに付着する色素標識は、合成する、あるいは商業的に入手する（たとえばＯｐｅｒｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ、Ａｌａｂａｍａ）ことができる。蛍光励起用途に多数の色素（５０超）が入手可能である。これらの色素は、フルオレセイン、ローダミンＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ、Ｂｉｏｄｉｐｙ、Ｃｏｕｍａｒｉｎ、およびＣｙａｎｉｎｅ色素族からの色素を含む。さらに、失活剤も、背景蛍光を最小限にするため、オリゴ配列の標識化に利用可能である。４１０ｎｍ（カスケードブルー）～７７５ｎｍ（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７５０）の発光最大値を有する色素が入手可能であり、使用することができる。５００ｎｍ～７００ｎｍの色素は、可視スペクトル内にあり、従来の光電子増倍管を用いて検出できるとい

う利点を有する。入手可能な色素の範囲が広いことで、検出範囲全体に広がる発光波長を有する色素セットを選択できる。多数の色素を区別できる検出システムは、フローサイトメトリー用途として報告されている（Ｐｅｒｆｅｔｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４．４、６４８～５５およびＲｏｂｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ ｏｆ ＳＰＩＥ ２００５，５６９２，３５９～３６５を参照）。

【０１３１】

蛍光色素は、ピーク発光波長から青にシフトした通常２０～５０ｎｍのピーク励起波長を有する。その結果、広範囲の発光波長全体にわたる色素の使用は、発光波長範囲全体で効率的な色素の励起を達成する励起波長を伴う複数の励起源の使用を必要とする。もしくは、単独の発光波長を有する単独のレーザーが当該の色素全部を励起するために使用できるように、エネルギー転移色素を利用することができる。これは、色素標識にエネルギー転移成分を付属することによって達成される。通常、この成分は、光源（たとえばレーザ）の励起波長に匹敵する吸収波長を有する別の蛍光色素である。エミッタに近接してこの吸収体を配置することで、吸収されたエネルギーを吸収体からエミッタに転移させて、長波長色素のより効率的な励起を可能とする（Ｊｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １９９５，９２，４３４７～５１）。

色素標識化されたジデオキシヌクレオチドが、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ（Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）から入手可能である。

【０１３２】

Ｂ．実施例

実施例５．核酸の６色分離および検出

以下の実施例は、６つの蛍光色素で標識された核酸フラグメントの分離および検出を示し、分光器／多要素励起／検出システムの色解像度機能を実証する。ＤＮＡフラグメントを、多重化ＰＣＲ増幅反応において蛍光色素標識化プライマーを適用することによって、６－ＦＡＭ、ＶＩＣ、ＮＥＤ、ＰＥＴ色素で標識化した。この反応では、１ｎｇのヒトゲノムＤＮＡ（９９４７Ａ）を、メーカーの推奨した条件に従い（ＡｍｐＦＩＳＴＲ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｌｅｒ，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、２５μＬの反応で増幅した。２．７μＬのＰＣＲ産物を除去し、０．３μＬのＧＳ５００－ＬＩＺサイジングスタンダード（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）および０．３μＬのＨＤ４００－ＲＯＸサイジングスタンダードと混合した。ＨｉＤｉ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を計１３μＬに追加し、そのサンプルを分離バイオチップのサンプルウェルに挿入して、電気泳動に付した。

【０１３３】

Ｇｅｎｅｂｅｎｃｈを使用するＤＮＡの電気泳動分離は、一連の４つの動作：予備電気泳動、装填、注入、および分離から成る。これらの動作は、５０℃の一定温度に加熱されるマイクロ流体バイオチップ上で実行される。バイオチップは、分離および検出並列のための１６チャネルシステムを含み、それぞれがインジェクタチャネルおよび分離チャネルから成る。分析用ＤＮＡを、分離チャネルに沿ってふるい分けマトリックスを通じてＤＮＡの電気泳動移動により分離する。バイオチップの分離長は１６０～１８０ｍｍである。

【０１３４】

第１のステップは、６分間、チャネル長に沿って１６０Ｖ／ｃｍの電界を印加することによって達成される予備電気泳動である。分離バッファ（ＴＴＥｌＸ）を、陽極、陰極、および廃棄ウェルにピペットで移す。分析用サンプルをサンプルウェルにピペットで移し、１８秒間、サンプルウェルから廃棄ウェルに１７５Ｖを印加し、その後、サンプルと廃棄ウェル全体に１７５Ｖ、７２秒間陰極に３９０Ｖを印加して、サンプルを分離チャネルに装填する。サンプルの注入は、５０Ｖ／ｃｍおよび４０Ｖ／ｃｍをサンプルと廃棄ウェルにそれぞれ印加する間、分離チャネル長に沿って１６０Ｖ／ｃｍの電界を印加することによって達成する。光学システムがＤＮＡの分離バンドを検出する３０分間、注入電圧パラメーターで分離を継続する。データ収集速度は５Ｈｚであり、ＰＭＴゲインは～８００Ｖに設定される。

【０１３５】
増幅ＤＮＡを含む１６のサンプルを、同時分離および検出のために装填した。ＰＭＴの３２要素のそれぞれからの信号を時間の関数として収集し、電気泳動図を生成した。結果として生じる電気泳動図（図１７）は、１６レーンのうちの１つに関する励起／検出ウィンドウでのＤＮＡフラグメントの存在に対応するピークを示す。さらに、各ピークに関する３２要素ＰＭＴの各要素の相対信号強度は、ＤＮＡフラグメントと対応づけられる色素（２つ以上の色素が検出ウィンドウに存在する場合は複数の色素）のスペクトル内容に対応する。図１８は、検出された色素の発光スペクトルと基板の背景スペクトルとを示す。基板の背景スペクトルは、各ピークからのスペクトルから差し引く。これを実行すると、結果として、６つの異なる色素スペクトルが識別される。６色素のスペクトルを同じ図面に重畳する。このデータと実際に公開された色素スペクトルとの比較が示す通り、色素の類縁は公開データに類似する。本実施例が実証するように、該システムは、反応溶液内の６色素を検出および区別することができる。このスペクトル出力は、色訂正マトリックスを生成し、検知器空間からの信号を色素空間表示に変換するために使用する（図１９および２０）。

【０１３６】
実施例６．核酸の８色素分離および検出
本実施例では、蛍光色素で標識化核酸の８色素分離および検出を示す。８遺伝子座のフォワードプライマーおよびリバースプライマー対配列は、公開配列から選択する（Ｂｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｆｏｒｅｎｓｉｃ Ｓｃｉ ２００３、４８、１０５４～６４）。

【０１３７】
選択された遺伝子座はＣＳＦｌＰＯ、ＦＧＡ、ＴＨＯｌ、ＴＰＯＸ、ｖＷＡ、Ｄ３Ｓ１３５８、Ｄ５Ｓ８１８、およびＤ７Ｓ８２０であるが、文書に記載される遺伝子座ひいてはプライマー対のいずれも本実施例で使用することができる。プライマー対の各フォワードプライマーは、別々の蛍光色素で標識化する（Ｏｐｅｒｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ、Ａｌａｂａｍａ）。プライマーへの付着のために選択した色素は、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ色素４８８、４３０、５５５、５６８、５９４、６３３、６４７、およびＴａｍｒａである。多数の他の色素も利用可能であり、標識として使用することもできる。各遺伝子座は、各自の色素で標識化されるフラグメントを有する反応溶液を得るため、ＰＣＲ反応プロトコル（Ｂｕｔｌｅｒ、２００３、上記文献）後に個々に増幅される。ＰＣＲ反応用のテンプレートは、１ｎｇのヒトゲノムＤＮＡである（ｔｙｐｅ ９９４７Ａ ｆｒｏｍ Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）。

【０１３８】
各ＰＣＲ反応を、ＰＣＲ浄化カラムを通じて浄化することによって精製し、そこでプライマー（標識化プライマーおよび色素標識化プライマー）および酵素を除去し、ＰＣＲバッファをＤＩ溶離液に置き換えた。浄化の結果として生じる産物は、ＤＩ水内の標識化ＤＮＡフラグメントの溶液である。色素標識化産物の浄化は、ＭｉｎＥｌｕｔｅＴＭカラムを用いてＳｍｉｔｈのプロトコルに従う（Ｑｉａｇｅｎ、Ｖａｌｅｎｃｉａ、ＣＡ）。計８つの反応を実行する。８つの浄化ＰＣＲ反応は、ある割合で全部混合され、等価の信号強度のピークを生成し、８つの異なる色素で標識化されたフラグメントを含む混合物を生成する。もしくは、８遺伝子座のプライマーを全部混合して、多重増幅用のマスタプライマー混合物を形成することもできる。

【０１３９】
この溶液は、実施例１に記載の機器とプロトコルで分離および検出する。スペクトル写真の格子は、８色素の発光が検知器素子の３２画素全体に収まるように調節される。分析のために装填されるサンプルの量は、検出された信号が検出システムの動作範囲に収まるように調節すべきである。

【０１４０】
実施例７．分光器／多要素ＰＭＴシステム

以下の実施例は、具体的にはＤＮＡテンプレート、この反応では０．１ｐｍｏｌのＤＮＡテンプレートＭ１３の配列を特定する図１６の分光器／多要素ＰＭＴシステムでの標識化ＤＮＡフラグメントの分離／検出を示し、推奨される反応条件に従いＭ１３配列決定プライマーをＧＥ　Ａｍｅｒｓｈａｍ　ＢｉｇＤｙｅＴＭシーケンシングキットで増幅した。反応混合物をエタノール沈澱により浄化し、１３μＬのＤＩ水内に再懸濁させた。サンプルは、実施例５に記載の電気泳動分離条件に従い分離した。サンプル装填条件を変更し、サンプルウェルを渡って廃棄ウェルまで１０５秒間１７５Ｖを印加することによって実行した。図２１はＤＮＡ配列の電気泳動図であり、着色トレースは使用する４色素それぞれのスペクトル最大値に対応する検知器素子を表す。得られた配列は、５１９塩基がＰｈｒｅｄ品質スコア＞２０で、４３５塩基がＱＶ３０の塩基であった（図２２）。

【０１４１】

実施例８．２つの配列決定反応の産物の同時分離および検出

本実施例では、２つのＤＮＡテンプレートのサイクル配列決定からのフラグメントの分離および検出を、単独の分離チャネルで実行する。サイクル配列決定反応は、以下のように、色素標識化ターミネーター反応または色素標識化プライマー反応のいずれかにより準備することができる。

【０１４２】

色素標識化ターミネーター反応：

当該テンプレート配列に適した配列決定プライマーと、サイクル配列決定バッファ、ポリメラーゼ、オリゴヌクレオチド、ジデオキシヌクレオチド、および標識化ジデオキシヌクレオチドを含むＤＮＡ配列決定を実行する試薬とから成る各テンプレートフラグメントのサイクル配列決定反応を準備する。８つの異なる色素を標識化に使用する。第１のサイクル配列決定反応では、４つの色素標識化ジオデキシヌクレオチドの１セットを使用する。第２のサイクル配列決定反応では、（第１のサイクル配列決定反応で使用される発光波長と異なる発光波長の）４つの色素標識化ジデオキシヌクレオチドの別セットを使用する。各サイクル配列決定反応を、各反応を複数回熱サイクルするプロトコルに従い別個に実行する。各熱サイクルは、Ｓａｎｇｅｒのプロトコルに応じた温度および時間での変性、アニール、および伸張ステップを含む（Ｓａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１９７７，７４，５４６３～７を参照）。２つの反応からのサイクル配列決定産物を組み合わせて、２つのＤＮＡテンプレートのそれぞれから計８つの独自の色素で標識化ＤＮＡフラグメントから成るサンプルを形成する。

【０１４３】

色素標識化プライマー反応：

あるいは、分離および検出用のサンプルを、プライマー　標識化サイクル配列決定を用いて作製することができる。ＤＮＡテンプレート毎に４つのサイクル配列決定反応を実行する。各反応は、標識化配列決定プライマーと、サイクル配列決定バッファ、ポリメラーゼ、オリゴヌクレオチドを含むＤＮＡ配列決定を実行する試薬とから成るサイクル配列決定反応である。さらに、各反応は、ジデオキシヌクレオチド（ｄｄＡＴＰ、ｄｄＴＴＰ、ｄｄＣＴＰ、またはｄｄＧＴＰ）のうち１つと１つの標識化プライマーとを含む。プライマーと関連付けられる各色素は、発光波長が一意であり、サイクル配列決定溶液（ｄｄＡＴＰ、ｄｄＴＴＰ、ｄｄＣＴＰ、またはｄｄＧＴＰ）中のジデオキシヌクレオチドと相互に関連付けられる。各サイクル配列決定反応は、各反応を複数回熱サイクルするプロトコルに従い別個に実行する。各熱サイクルは、Ｓａｎｇｅｒのプロトコルに応じた温度および時間での変性、アニール、および伸張ステップを含む（Ｓａｎｇｅｒ，１９７７、上記文献を参照）。第２のＤＮＡテンプレートのサイクル配列決定の場合、（第１のサイクル配列決定反応で使用される４色素の発光波長とは異なる発光波長の）４色素の別のセットを適用する。８つすべての反応の産物（それぞれが異なる色素）を一緒に混合して、２つのＤＮＡテンプレートそれぞれからのＤＮＡフラグメントから成るサンプルを形成する。

【０１４４】

分離および検出用サンプル：

各配列決定反応をエタノール沈澱によって浄化する。サンプルの分離および検出は実施例８のプロトコルに従う。分離および検出の結果、２つのテンプレートＤＮＡフラグメントのそれぞれに対応する２つの異なるＤＮＡ配列が生成される。

【０１４５】

本実施例の方法は、４の倍数の色素を使用して、単独の分離チャネル内のＤＮＡ配列の複数の検出を可能とするように変更することができる（たとえば、３配列の同時検出のために１２色素、４配列の同時検出のために１６色素、５配列の同時検出のために２０色素など）。最後に、標識化されたフラグメントの分離は、電気泳動に限定する必要はない。

【０１４６】

実施例９

単独チャネルにおける５００以上の遺伝子座の分離および検出

ＤＮＡおよびＲＮＡ配列決定やフラグメントサイズ判定など、臨床診断に適用可能な核酸分析の用途がいくつかある。本実施例では、１０色の同時検出の使用により、最大５００の遺伝子座の照合を可能とする。たとえば、病原菌を特定したり、あるいは１個人のゲノム内の多数の遺伝子座を特徴づけたりするために、多数のフラグメントのサイズ分析を利用することができる。出生前または着床前遺伝子診断の場合、現在、核型分析および蛍光組織原位置ハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）によって異数性を診断する。ＦＩＳＨ研究では、１細胞につき２つの信号の存在は、所与の遺伝子座の２つのコピーが細胞内に存在することを示し、１つの信号は一染色体または部分的一染色体を示し、３つの信号は三染色体または部分的三染色体を示す。ＦＩＳＨは通常、細胞が正常な染色体対を含むか否かを査定するのに約１０のプローブを利用する。このアプローチではゲノム全体を詳細に視ることはできないが、ＦＩＳＨによって正常とみなされる細胞に、ＦＩＳＨでは検出されない重大な異常を見出す可能性がある。

【０１４７】

本発明の教示は、全染色体全体に広く分散される約５００の染色体座を査定することができる多色分離および検出を利用して、染色体構造のより詳細な分析を可能とする。本実施例では、約５００の遺伝子座に関するプライマー対配列が公開配列から選択され、各遺伝子座は、単相体ゲノムにつき１つのコピーとして存在する。さらに、５０のプライマー対１０セットを、各セットがＤＮＡフラグメントの対応セットを規定し、いずれのフラグメントも同一のサイズを持たないように選択する。セット毎に、プライマー対のフォワードプライマーは１つの蛍光色素で標識化され、２つのセットは同じ色素を共有しない。プライマーへの付着のために選択される色素は、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ色素４８８、４３０、５５５、５６８、５９４、６３３、６４７、６８０、７００、およびＴａｍｒａである。他の多数の色素も利用可能であり、標識として使用することができる。遺伝子座は、「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＲＡＰＩＤ　ＭＵＬＴＩＰＬＥＸＥＤ　ＡＭＰＬＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＴＡＲＧＥＴ　ＮＵＣＬＥＩＣ　ＡＣＩＤＳ（標的核酸の迅速多重増幅の方法）」に記載の１つまたは複数の並列ＰＣＲ反応で増幅させることができる、上記を参照。本文書に記載の方法を用いて、増幅されたプライマーを分離し検出する。単独の分離チャネルで、５００フラグメントすべてを、１０の色素のそれぞれに対して５０ずつサイズにより正確に識別することができる。

【０１４８】

遺伝子座、色素、および分離チャネルの数は、所望の適用に基づき変化させることができる。所望すれば、より少ない数の色素標識を利用する、あるいは１標識につきより少ないＤＮＡフラグメントを生成することによって、より少ない数のフラグメントを検出することができる。このようにして、所望に応じて、５００未満、４００未満、３００未満、２００未満、１００未満、７５未満、５０未満、４０未満、３０未満、または２０未満のフラグメントを検出することができる。１レーンにつき検出可能な最大数の遺伝子座は、検出可能な個々の色素（上述したように、数十が利用可能）の数を掛けた、分離システムの読出長と分解能（たとえば、２０～１５００塩基対のＤＮＡフラグメントの単一塩基対の分解能は、結果として何百ものフラグメントとなる）に基づく。したがって、何千もの

遺伝子座を単独の分離チャネルで特定することができ、追加の色素が開発されるごとにその数は増大する。

【図１】

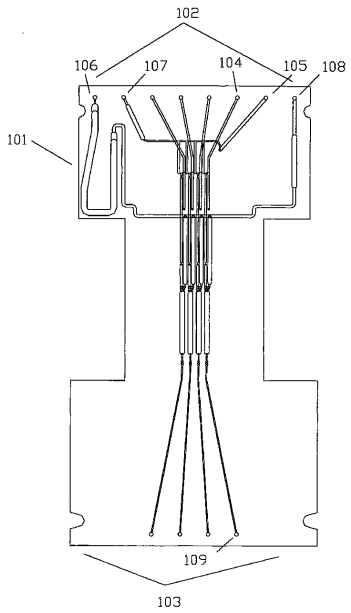

FIGURE 1

【図２】

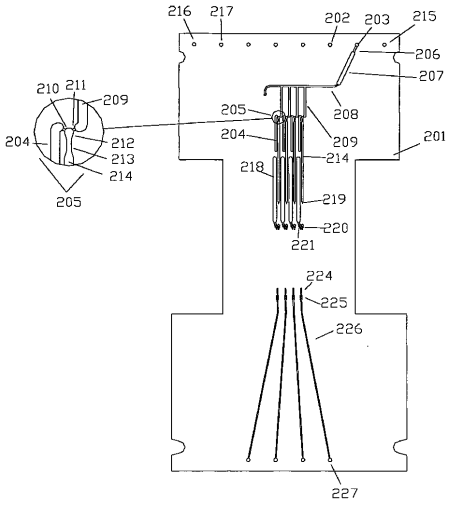

FIGURE 2

【図３】

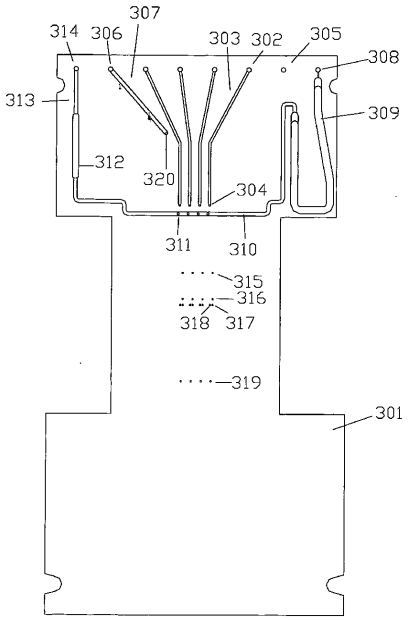

FIGURE 3

【図４】

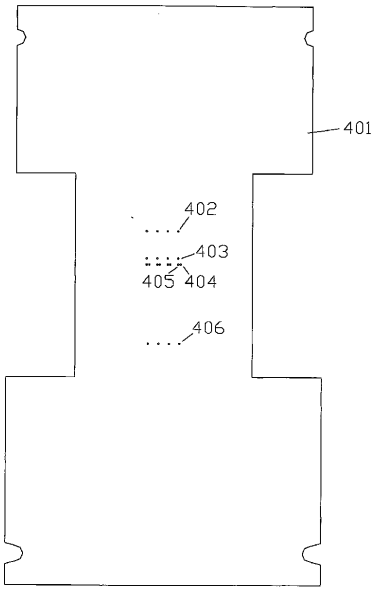

FIGURE 4

【図５】

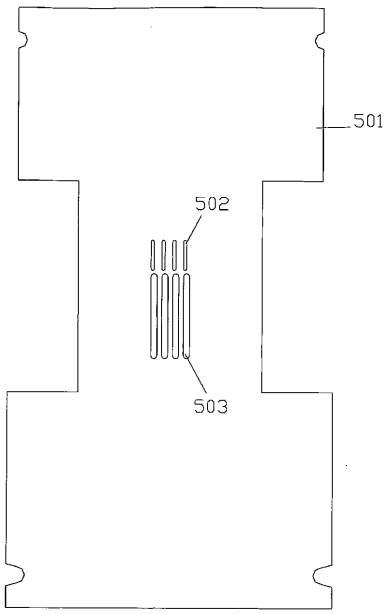

FIGURE 5

【図６】

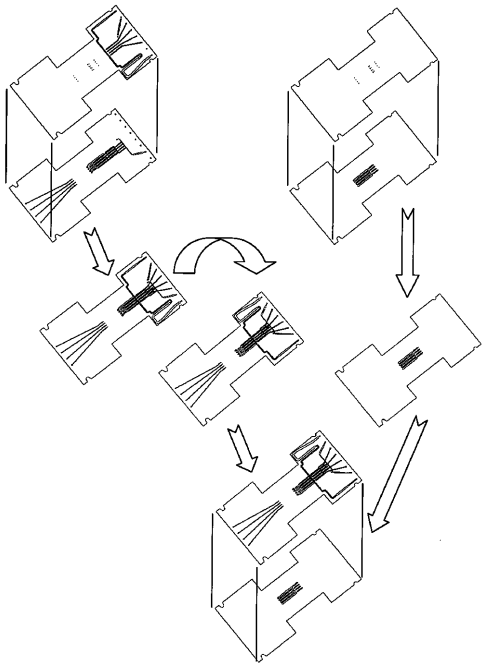

FIGURE 6

【図７】

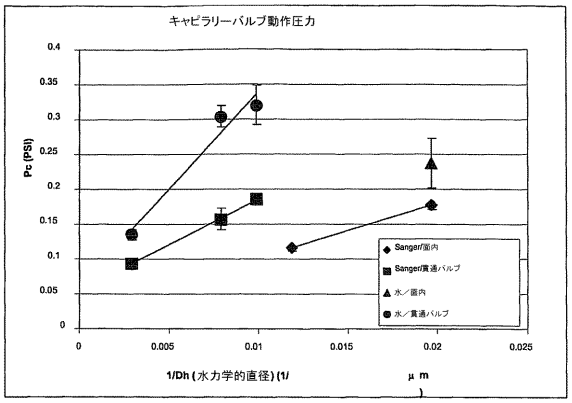

FIGURE 7

【図８－１】

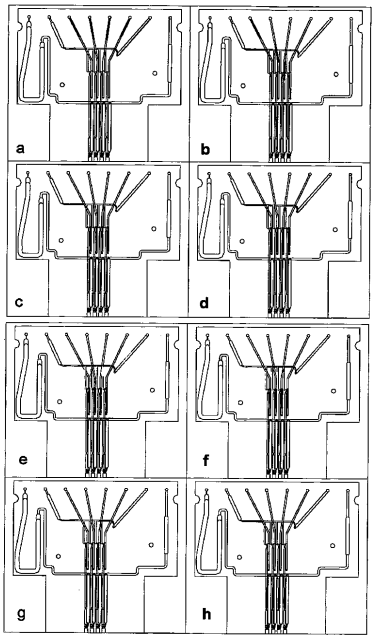

FIGURE 8

【図８－２】

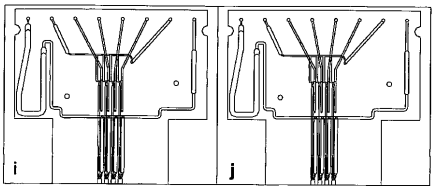

FIGURE 8 (CONT'D)

【図８Ａ】

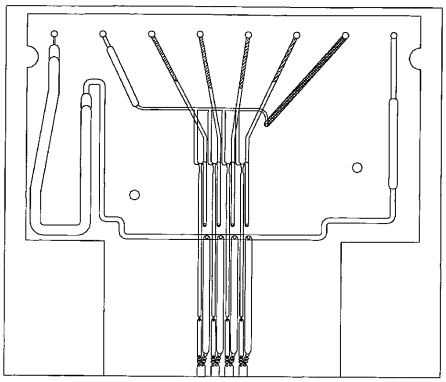

FIGURE 8A

【図８Ｂ】

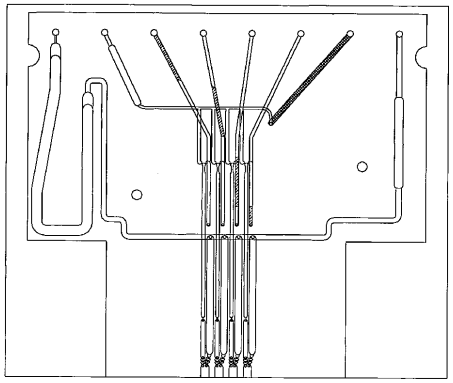

FIGURE 8B

【図８Ｃ】

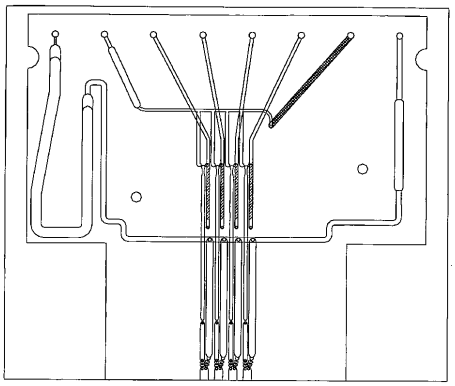

FIGURE 8C

【図８Ｄ】

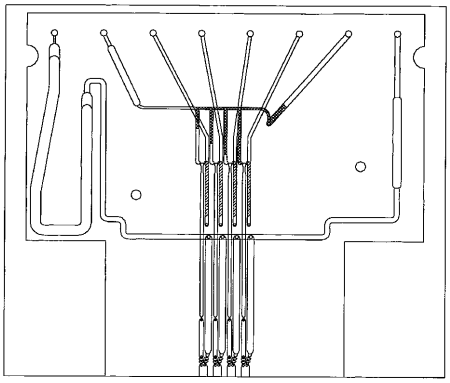

FIGURE 8D

【図８Ｅ】

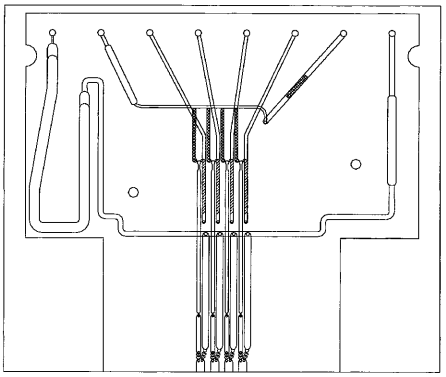

FIGURE 8E

【図８Ｆ】

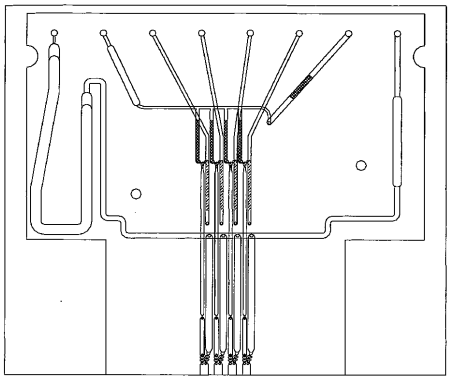

FIGURE 8F

【図８Ｇ】

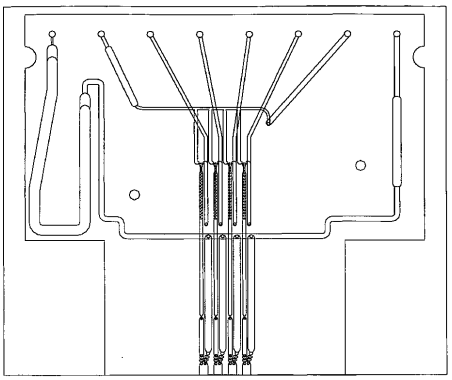

FIGURE 8G

【図８Ｈ】

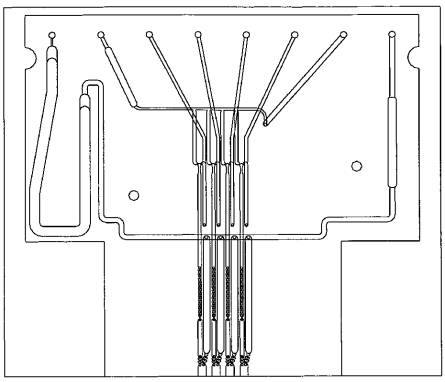

FIGURE 8H

【図８Ｉ】

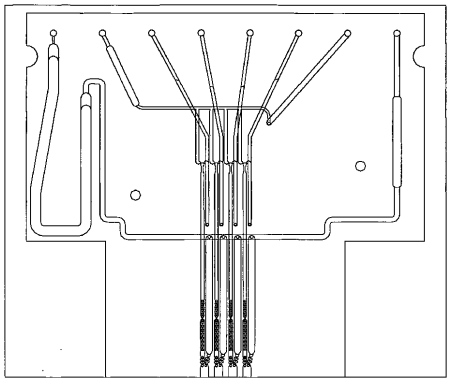

FIGURE 8I

【図８Ｊ】

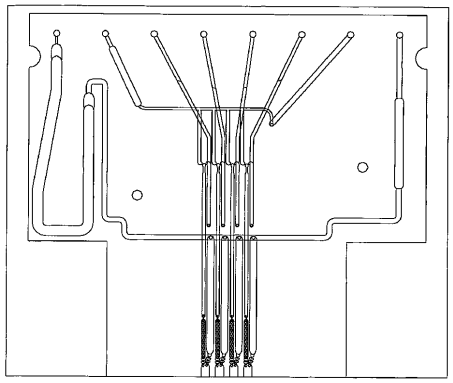

FIGURE 8J

【図９－１】

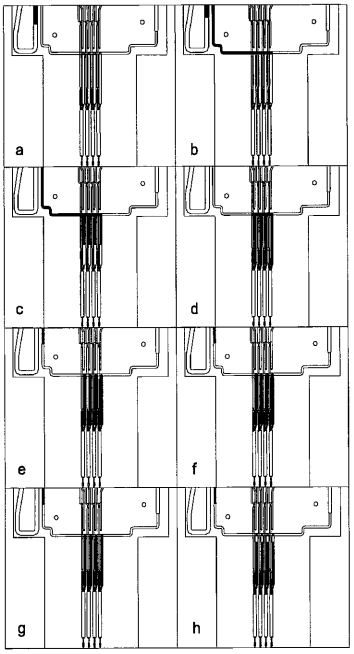

FIGURE 9

【図９－２】

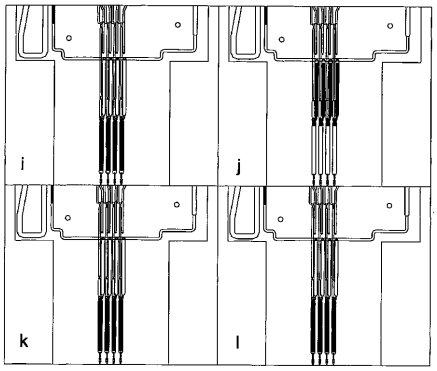

FIGURE 9 (CONT'D)

【図９Ａ】

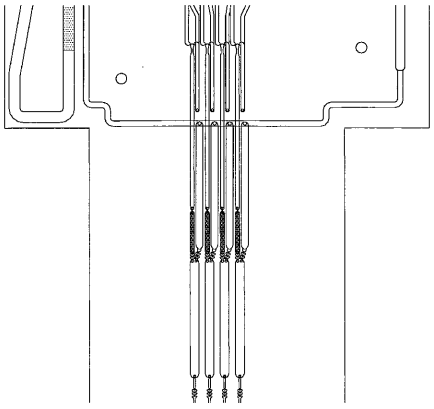

FIGURE 9A

【図９Ｂ】

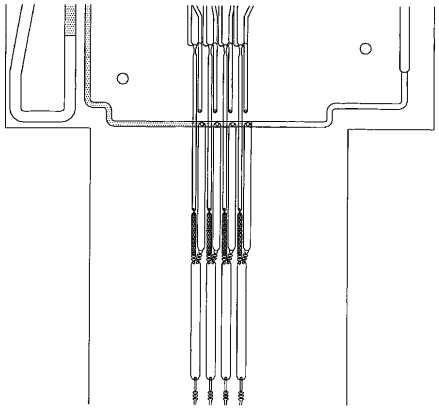

FIGURE 9B

【図９Ｃ】

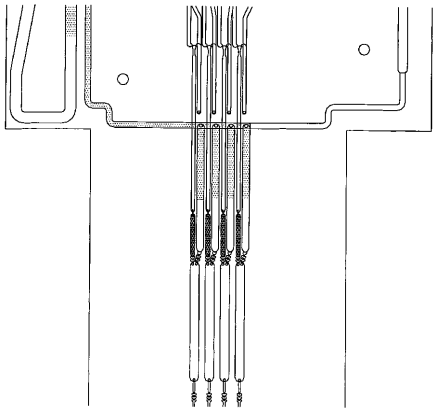

FIGURE 9C

【図９Ｄ】

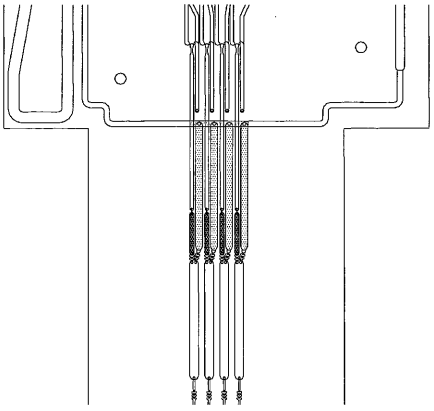

FIGURE 9D

【図９Ｅ】

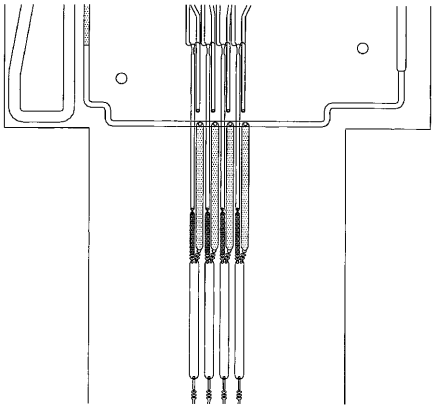

FIGURE 9E

【図９Ｆ】

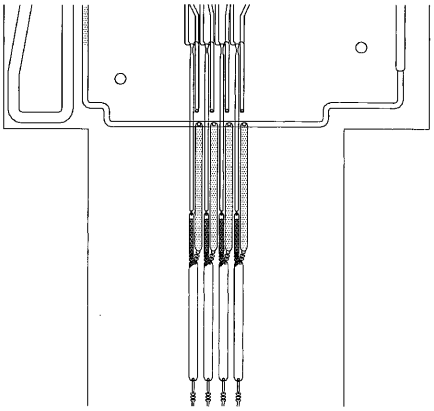

FIGURE 9F

【図９Ｇ】

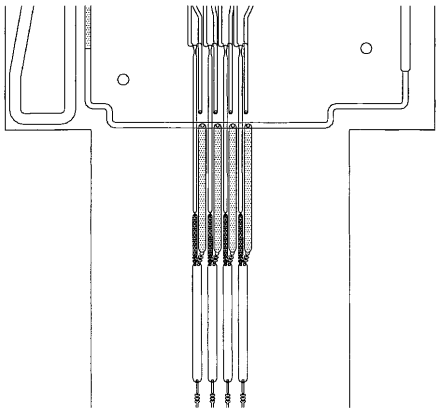

FIGURE 9G

【図９Ｈ】

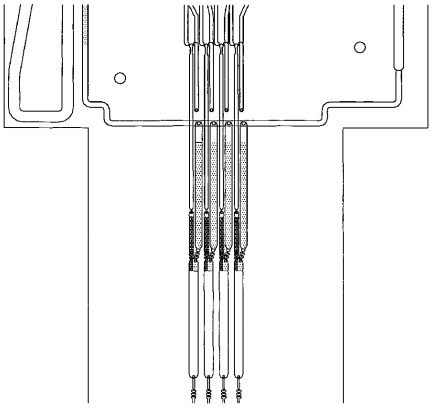

FIGURE 9H

【図９Ｉ】

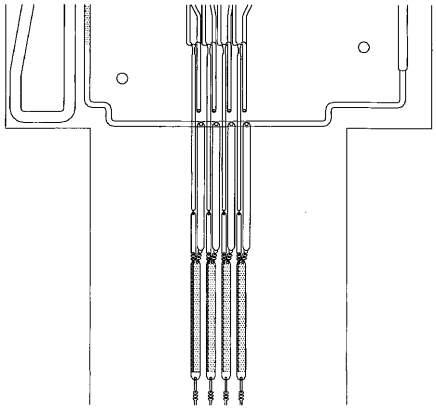

FIGURE 9I

【図９Ｊ】

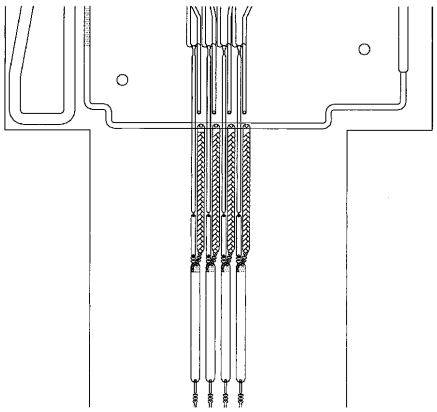

FIGURE 9J

【図９Ｋ】

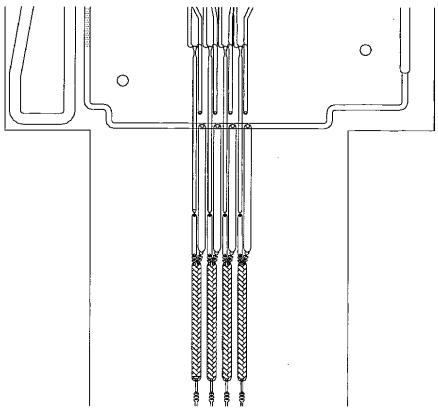

FIGURE 9K

【図１０】

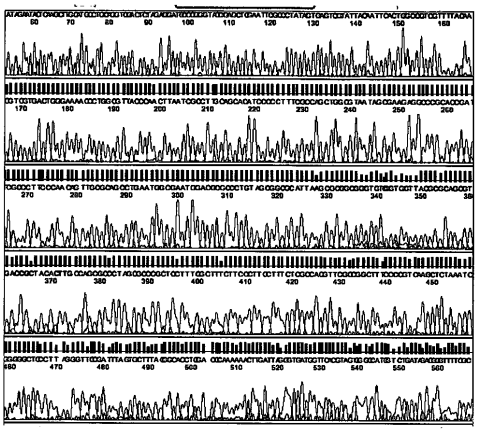

FIGURE 10

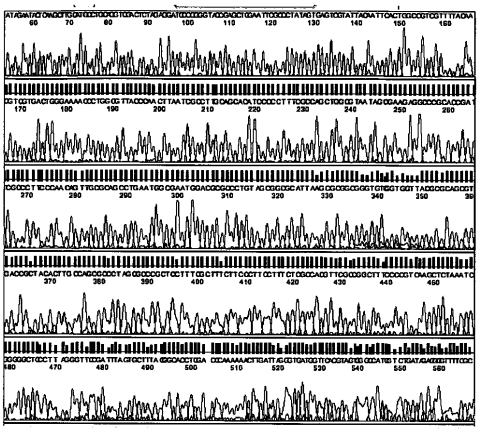

FIGURE 10

【図１１】

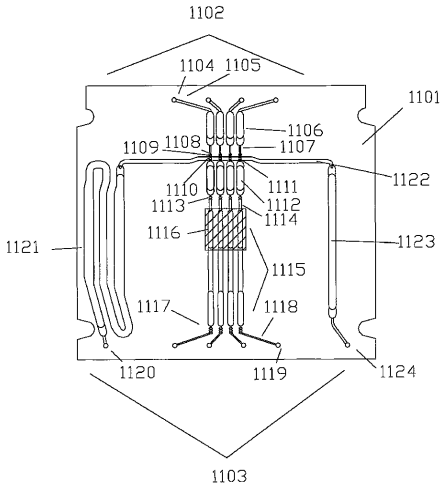

FIGURE 11

【図１２－１】

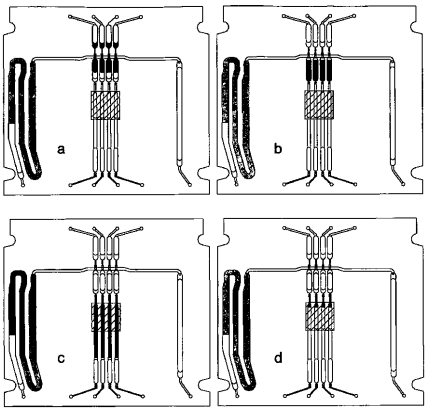

FIGURE 12

【図１２－２】

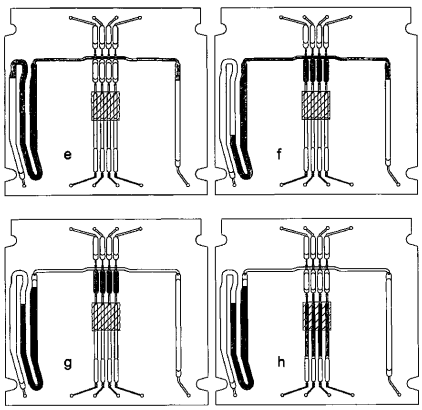

FIGURE 12 (CONT'D)

【図１２－３】

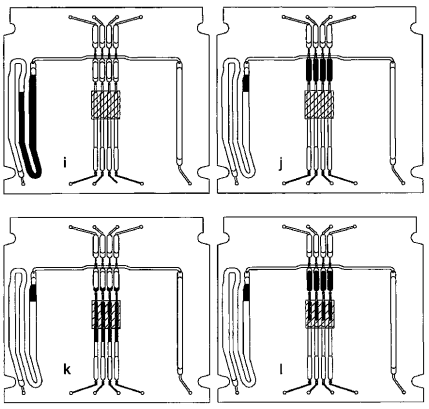

FIGURE 12 (CONT'D)

【図１２－４】

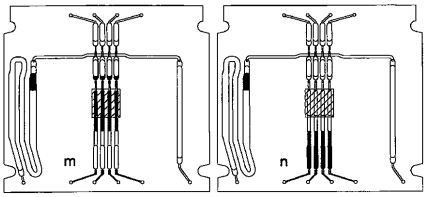

FIGURE 12 (CONT'D)

【図１２Ａ】

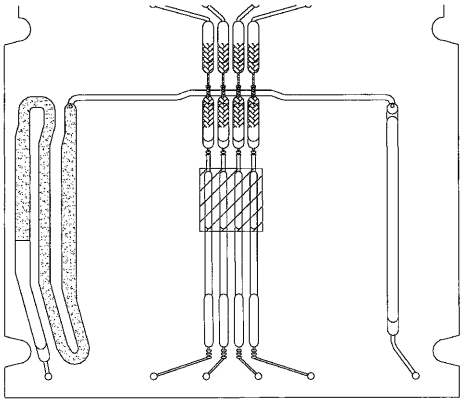

FIGURE 12A

【図１２Ｂ】

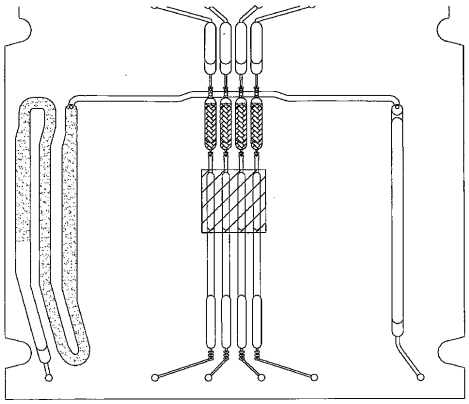

FIGURE 12B

【図１２Ｃ】

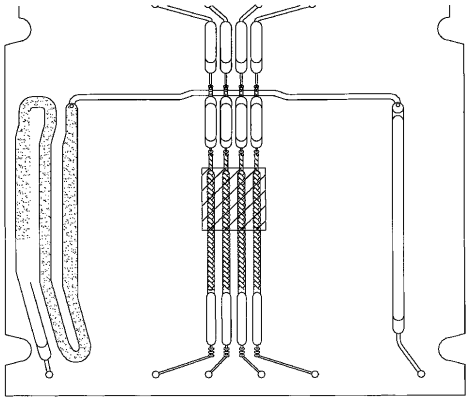

FIGURE 12C

【図１２Ｄ】

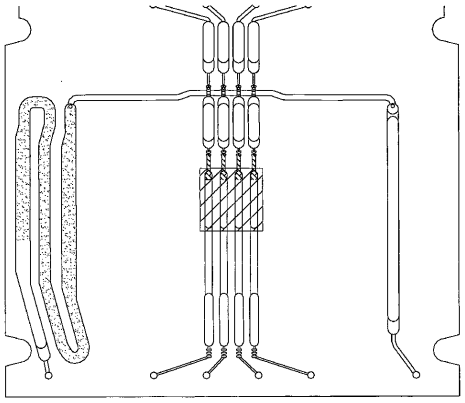

FIGURE 12D

【図１２Ｅ】

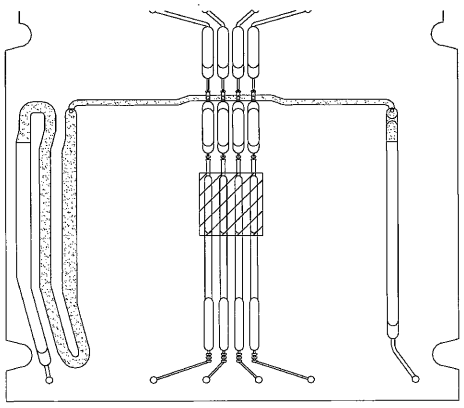

FIGURE 12E

【図１２Ｆ】

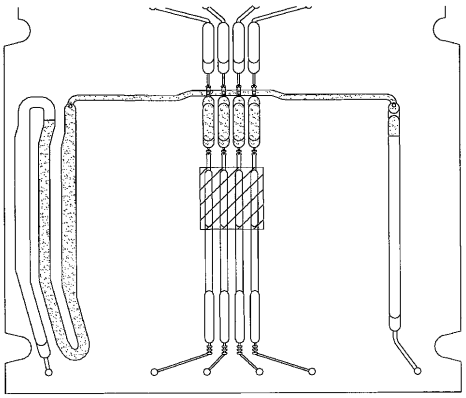

FIGURE 12F

【図１２Ｇ】

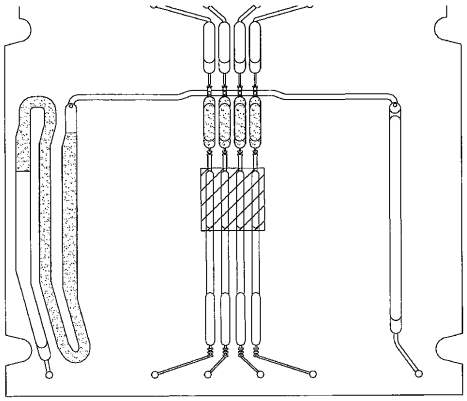

FIGURE 12G

【図１２Ｈ】

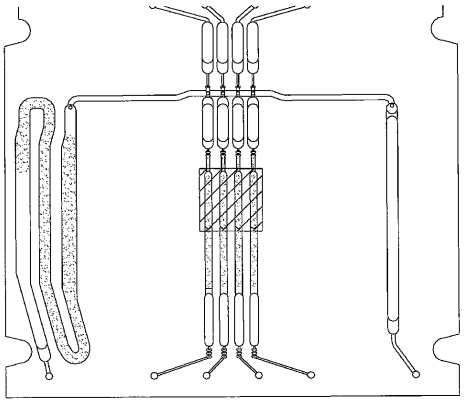

FIGURE 12H

【図１２Ｉ】

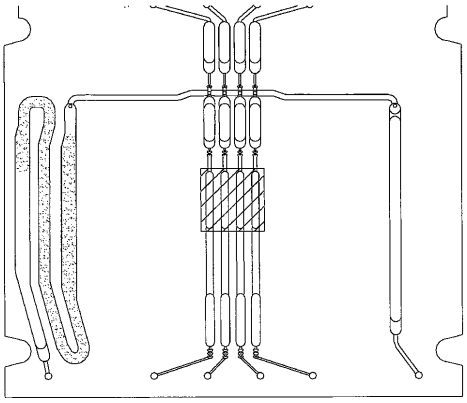

FIGURE 12I

【図１２Ｊ】

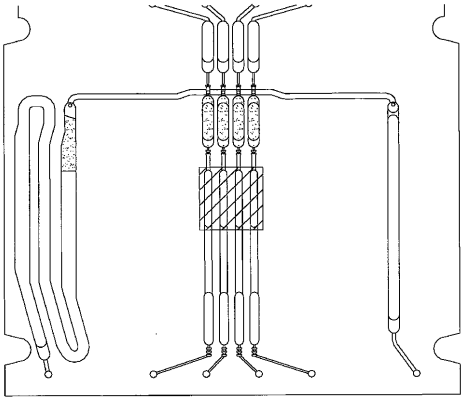

FIGURE 12J

【図１２Ｋ】

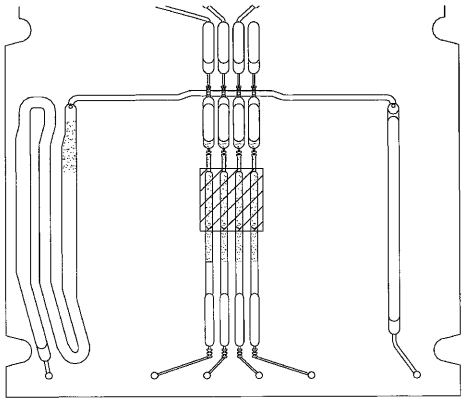

FIGURE 12K

【図１２Ｌ】

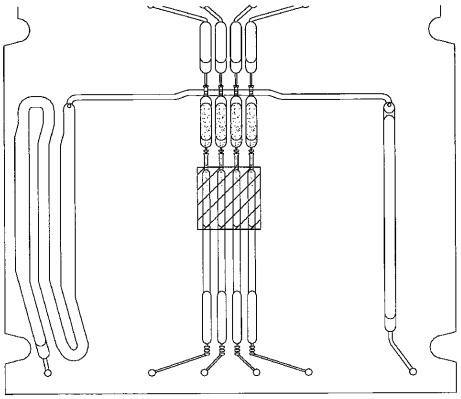

FIGURE 12L

【図１２Ｍ】

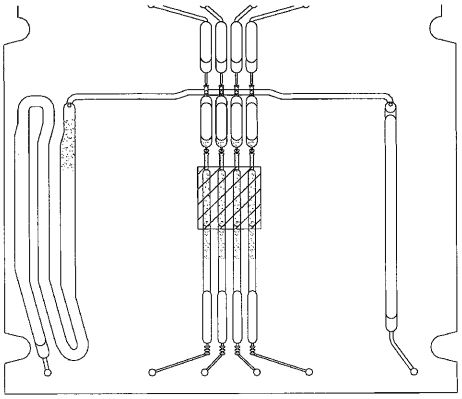

FIGURE 12M

【図１２Ｎ】

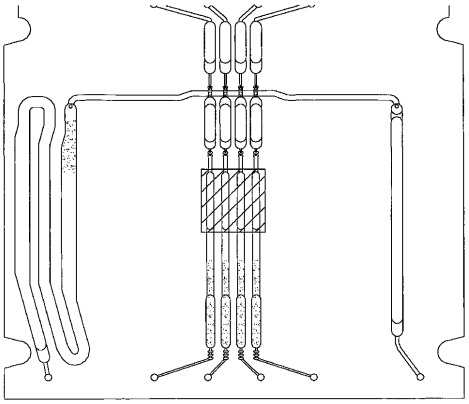

FIGURE 12N

【図１３】

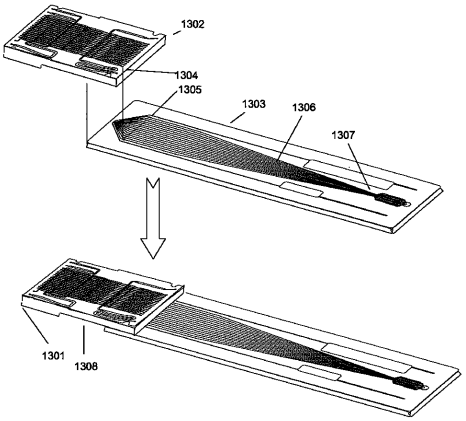

FIGURE 13

【図１４】

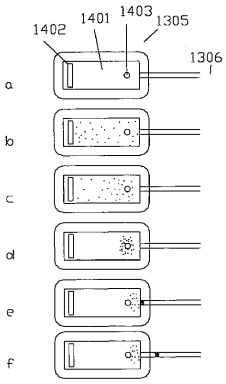

FIGURE 14

【図１５】

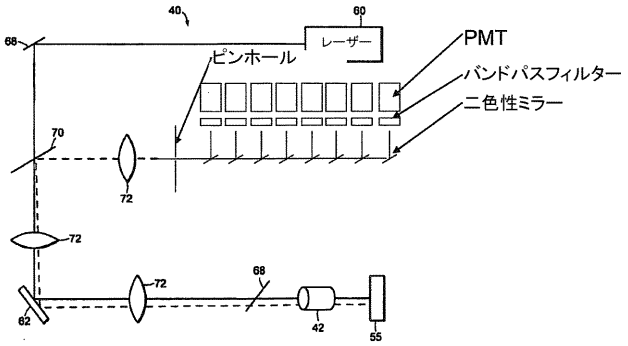

FIGURE 15

【図１６】

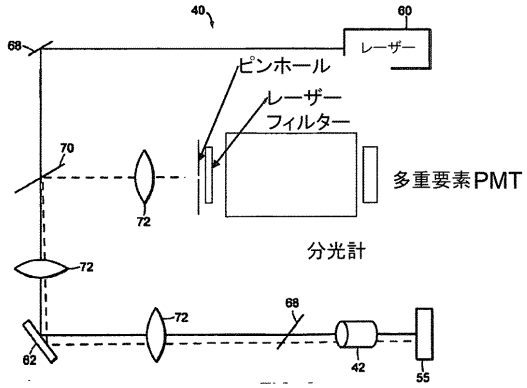

FIGURE 16

【図１７－１】

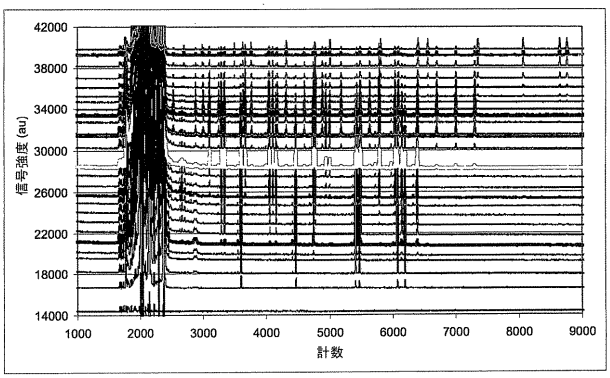

FIGURE 17

【図１７－２】

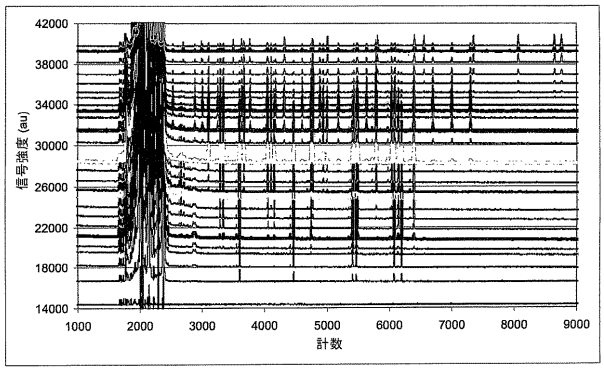

FIGURE 17

【図１８－１】

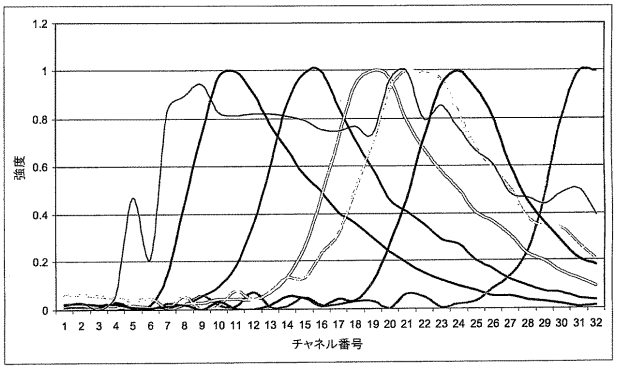

FIGURE 18

【図１８－２】

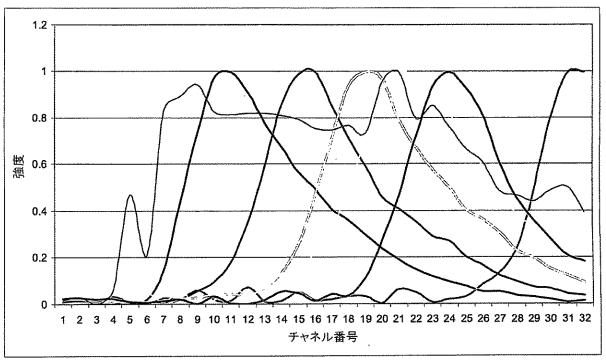

FIGURE 18

【図１９－１】

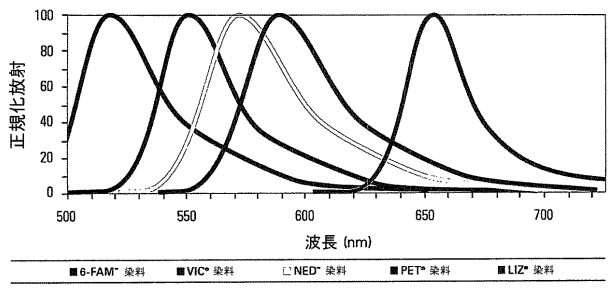

FIGURE 19

【図１９－２】

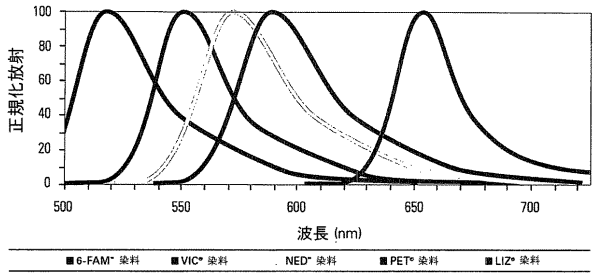

FIGURE 19

【図２０－１】

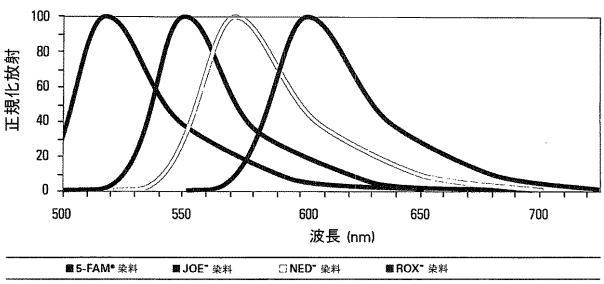

FIGURE 20

【図２０－２】

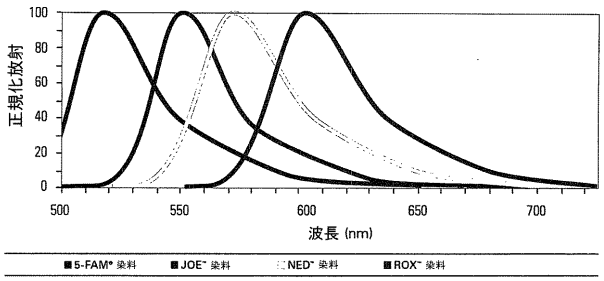

FIGURE 20

【図２１－１】

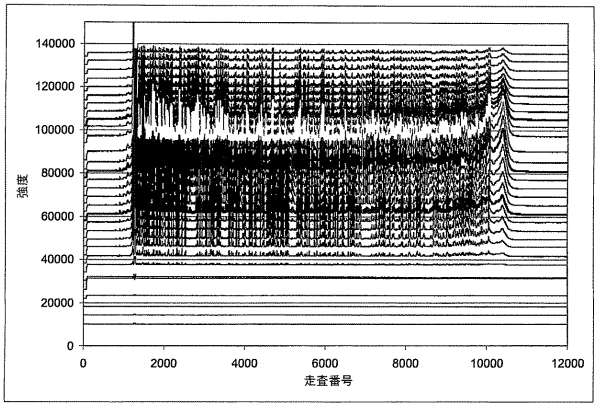

FIGURE 21

【図２１－２】

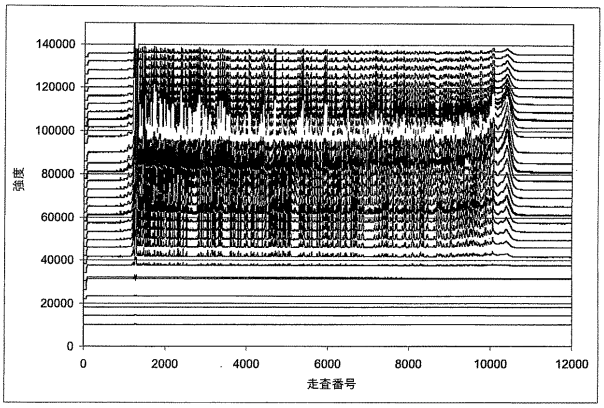

FIGURE 21

【図２２】

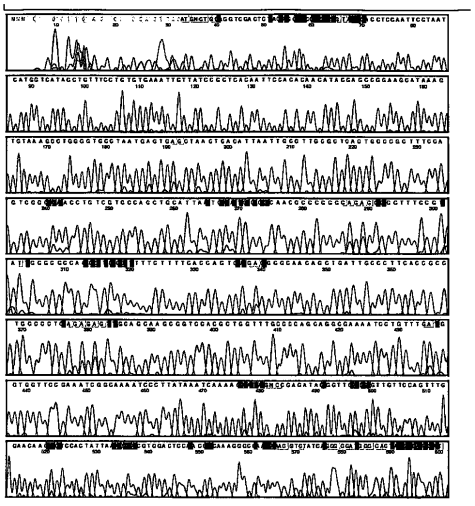

FIGURE 22

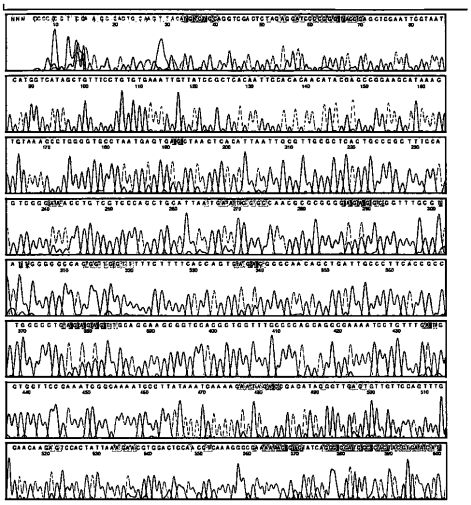

FIGURE 22

【手続補正書】
【提出日】平成22年1月19日(2010.1.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
光学検出器であって、
基板上の１または複数の検出位置を照射するために配置された１つ以上の光源；
基板上の検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１の光学エレメント；および
第１光学エレメントからの光を受容するために配置された光検出器であって、前記光検出器が、第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、かつ、分離された光の一部を検出エレメントに提供するように配置された波長分散エレメントを含む光検出器を備え、ここに、
検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が、１つ以上の生体分子を標識した少なくとも６つの染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク発光波長を有する、光学検出器。
【請求項２】
生体分子の分離と検出のためのシステムであって、
基板上の１つまたは複数のチャネル中の複数の生体分子を同時に分離するためのコンポーネントであって、ここに、各チャネルが検出位置を含むコンポーネント；
基板上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光源；
検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および
第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、前記光検出器は、前記光検出器が第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、分離された光の一部を検出エレメントに提供するように配置された波長分散エレメントを備え、ここに、
前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上の生体分子を標識する少なくとも６染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク発光波長を有する光検出器を備える、システム。
【請求項３】
前記生体分子が核酸である請求項１に記載の光学検出器または請求項２に記載のシステム。
【請求項４】
前記核酸がＤＮＡである請求項３に記載の光学検出器またはシステム。
【請求項５】
前記光検出器が少なくとも８つの異なる染料からの蛍光を検出し、各染料が少なくとも２つの四染料含有サブセットのメンバーであって、前記サブセットが基板上の単一検出位置で少なくとも２つのＤＮＡ配列を識別可能であり、ここに、染料の数が４の倍数であり、検出されるＤＮＡ配列の数がその倍数に等しくて、異なる染料の各々が１つのサブセットだけに存在する、請求項４に記載の光学検出器。
【請求項６】
前記生体分子がタンパク質である請求項１に記載の光学検出器または請求項２に記載のシステム。

【請求項７】
少なくとも１の光源がレーザーである請求項１に記載の光学検出器または請求項２に記載のシステム。
【請求項８】
各検出エレメントが紫外線光、可視光、赤外光、またはその組み合わせを検出可能である請求項１に記載の光学検出器または請求項２に記載のシステム。
【請求項９】
複数の検出位置の間で光源を逐次的に走査するミラーをさらに備える請求項１に記載の光学検出器または請求項２に記載のシステム。
【請求項１０】
２次元光学検出器エレメントをさらに備え、前記エレメントが光学スペクトルを検出するために少なくとも２つの列を有し、第１列が第１の独立レーンの光学スペクトルを検出し、第２列が第２の独立レーンの光学スペクトルを検出する請求項１に記載の光学検出器。
【請求項１１】
各検出エレメントが単一アノード光倍増管であり、
前記波長分散エレメントが第１光学エレメントからの光の一部を前記検出エレメントの各々に提供するように配置された１つまたは複数の二色性ミラーを含み、各二色性ミラーが独立に定めた光の波長を反射する請求項１に記載の光学検出器または請求項２に記載のシステム。
【請求項１２】
バンドパスフィルターをさらに備え、各々独立に定めた光の波長が少なくとも１つの検出位置に存在する蛍光染料の蛍光放射最大値に本質的に対応する請求項１１に記載の光学検出器またはシステム。
【請求項１３】
前記波長分散エレメントが、プリズム、回折格子、透過格子、スペクトルまたはホログラフ回折格子である請求項１１に記載の光学検出器またはシステム。
【請求項１４】
前記光検出器が少なくとも８つの染料からの蛍光を検出し、各染料が少なくとも２つの四染料含有サブセットのメンバーであって、前記染料セットが単一チャネルで少なくとも２つのＤＮＡ配列を識別可能であり、ここに、染料の数が４の倍数であり、検出されるＤＮＡ配列の数がその倍数に等しくて、異なる染料の各々が１つのサブセットだけに存在する、請求項４に記載のシステム。
【請求項１５】
前記生体分子が独立に蛍光染料を含み、各独自の光学スペクトルが独自の蛍光最大値を含む請求項２に記載のシステム。
【請求項１６】
前記コンポーネントが電気泳動デバイスである請求項２に記載のシステム。
【請求項１７】
線形多重アノード光倍増管が前記検出エレメントを備える請求項１１に記載のシステム。
【請求項１８】
複数の生体分子を分離し検出する方法であって、
基板上の１つまたは複数のマイクロ流体チャネル中に１つまたは複数の分析サンプルを提供し、各マイクロ流体チャネルが検出位置を含み、ここに、各分析サンプルが独立に複数の生体分子を含み、各々が独立に少なくとも６染料の１つで標識され、各染料が独自のピーク波長を有すること；
各マイクロ流体チャネル中の複数の標識された生体分子を同時に分離すること；および
各マイクロ流体チャネル中の複数の分離された標的分析物を、

（ｉ）各検出位置を光源で照射し；
（ｉｉ）核検出位置から放射された光を収集し；
（ｉｉｉ）収集された光を光検出器に導き；
（ｉｖ）収集された光を光波長によって分離し；ついで、
（ｖ）１つ以上の生体分子を標識した少なくとも６染料からの蛍光を同時に検出し、各染料が独自のピーク波長を有することによって、検出すること、
を含む方法。
【請求項１９】
前記分離することが前記複数のマイクロ流体チャネルに電位を印加することによって行われる請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
各検出位置が逐次的にまたは同時に照射される請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
前記染料が、各々独立に約４５０ｎｍ～約１５００ｎｍの範囲の波長で蛍光最大値を有する請求項１８に記載の方法。
【請求項２２】
前記標的分析物が核酸フラグメントを含み、前記核酸フラグメントが１つ以上の核酸増幅反応の産物であり、蛍光染料がプライマーに付着されているか、または、前記核酸フラグメントが１つ以上のＳａｎｇｅｒ配列決定反応の産物であり、蛍光染料がジデオキシヌクレオチド・ターミネーターに付着されているかのいずれかである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２３】
各検出エレメントが蛍光染料の１つを検出するように適合される請求項１８に記載の方法。
【請求項２４】
集積化されたバイオチップシステムであって、
（ａ）１つまたは複数のマイクロ流体システムを含むバイオチップであって、各マイクロ流体システムが分離チャンバーにマイクロ流体的に連絡する第１反応チャンバーを含み、ここに、
第１反応チャンバーが、
（ｉ）核酸抽出、
（ｉｉ）核酸精製、
（ｉｉｉ）予備核酸増幅清浄化、
（ｉｖ）核酸増幅、
（ｖ）後核酸増幅清浄化、
（ｖｉ）予備核酸配列決定清浄化、
（ｖｉｉ）核酸配列、
（ｖｉｉｉ）後核酸配列決定清浄化、
（ｉｘ）逆転写、
（ｘ）予備逆転写清浄化、
（ｘｉ）後逆転写清浄化、
（ｘｉｉ）核酸ライゲーション、
（ｘｉｉｉ）核酸ハイブリダイゼーション、または
（ｘｉｖ）定量化
に適合され、
前記分離チャンバーが検出位置を含むバイオチップ；および
（ｂ）分離および検出システムであって、
（ｉ）前記分離チャンバー中の複数の標的分析物を同時に分離するための分離エレメント；
（ｉｉ）前記バイオチップ上の検出位置を照射するように配置された１つ以上の光

源；

（ｉｉｉ）前記検出位置から放射された光を収集し導くために配置された１つまたは複数の第１光学エレメント；および

（ｉｖ）前記第１光学エレメントから導かれた光を受容するように配置された光検出器であって、ここに、前記光検出器が、前記第１光学エレメントからの光を光波長に従って分離し、前記分離された光の一部を少なくとも６つの検出エレメントに提供する波長分散エレメントを含み、ここに、

前記検出エレメントの各々が、前記検出エレメントの各々からの検出情報を同時に収集するための第１制御エレメントに連絡し、前記光検出器が１つ以上の生体分子を標識する少なくとも６染料からの蛍光を検出し、各染料が独自のピーク波長を有する光検出器、

を備えるバイオチップシステム。

【請求項２５】

前記第１反応チャンバーが、

（ｉ）核酸抽出、

（ｉｉ）核酸精製、

（ｉｉｉ）予備核酸増幅清浄化、

（ｉｖ）核酸増幅、

（ｖ）後核酸増幅清浄化、

（ｖｉ）予備核酸配列決定清浄化、

（ｖｉｉ）核酸配列、

（ｖｉｉｉ）後核酸配列決定清浄化、

（ｉｘ）逆転写、

（ｘ）予備逆転写清浄化、

（ｘｉ）後逆転写清浄化、

（ｘｉｉ）核酸ライゲーション、

（ｘｉｉｉ）核酸ハイブリダイゼーション、または

（ｘｉｖ）定量化

に適合されている、請求項２４に記載の集積化されたバイオチップシステム。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/004462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N27/447 B01L3/00 C12Q1/68 G01N21/64

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)
G01N B01L C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GERSTNER ANDREAS O H ET AL: "Near-infrared dyes for six-color immunophenotyping by laser scanning cytometry" CYTOMETRY, vol. 48, no. 3, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 115-123, XP002489569 WILEY abstract page 116, column 1, paragraph 3 - page 119, column 2, line 4 page 121, column 1, line 5 - line 9 figures 1,2 table 2 ---- -/--	1-8, 10-12

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 document 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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 July 2008	05/08/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bravin, Michel

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/004462

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MITTAG ANJA ET AL: "Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets" CYTOMETRY, vol. 65A, no. 2, June 2005 (2005-06), pages 103-115, XP002489570 WILEY abstract page 104, column 1, last paragraph - column 2, line 5 page 104, column 2, last paragraph - page 105, column 1, line 2 page 105, column 2, line 6 - line 36	1-8, 10-12
X	KAMENTSKY L A ET AL: "SLIDE-BASED LASER SCANNING CYTOMETRY" ACTA CYTOLOGICA, INTERNATIONAL ACADEMY OF CYTOLOGY, CHICAGO, IL, US, vol. 41, no. 1, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 123-143, XP002920835 ISSN: 0001-5547 abstract page 126, column 2, paragraph 2 - page 128, column 1, line 13 figure 2	1-8, 10-12
Y	US 2002/155485 A1 (KAO PIN [US]) 24 October 2002 (2002-10-24) the whole document	13-46
X Y	US 2002/146734 A1 (ORTYN WILLIAM E [US] ET AL) 10 October 2002 (2002-10-10) abstract paragraphs [0003], [0013] - [0022], [0101], [0103] figures 3,19,20	1-12 13-35
Y	WO 01/41931 A (MOTOROLA INC [US]; BRISCOE CYNTHIA G [US]; BURDON JEREMY W [US]; CHAN) 14 June 2001 (2001-06-14) abstract page 66, last paragraph - page 69, line 16 figure 1	36-46
A	WO 2006/124842 A (NETWORK BIOSYSTEMS INC [US]; TAN EUGENE [US]; LAM HEUNG CHUAN [US]; KE) 23 November 2006 (2006-11-23) abstract paragraphs [0006], [0010] figures 1A,2A-2B,3A-3B	1-46

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/004462

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002155485 A1	24-10-2002	US 6558945 B1	06-05-2003
US 2002146734 A1	10-10-2002	NONE	
WO 0141931 A	14-06-2001	AU 2082701 A	18-06-2001
		CA 2393690 A1	14-06-2001
		EP 1237655 A2	11-09-2002
		JP 2003517591 T	27-05-2003
WO 2006124842 A	23-11-2006	AU 2006247392 A1	23-11-2006
		CA 2609016 A1	23-11-2006
		EP 1886149 A2	13-02-2008
		US 2006260941 A1	23-11-2006

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

(72)発明者 ユージーン・タン
アメリカ合衆国０２４７４マサチューセッツ州アーリントン、ランターン・レイン２２番
(72)発明者 ヘウン・チュアン・ラム
アメリカ合衆国０２４６５マサチューセッツ州ニュートン、クラフツ・ストリート４７３番
(72)発明者 バレリー・レオニドビッチ・ボグダノブ
アメリカ合衆国０１８０１マサチューセッツ州ウォバーン、アパートメント２３エイ、ベッドフォード・ロード２００番
(72)発明者 グレゴリー・ジョン・ケロッグ
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセッツ州ケンブリッジ、マガジン・ストリート１３１番
(72)発明者 ジョン・エイ・ライト
アメリカ合衆国０１８２１マサチューセッツ州ビレリカ、クエーカー・レイン２２番
(72)発明者 ハンス・トーマン・ウルリッヒ
アメリカ合衆国０１７７５マサチューセッツ州ストウ、サウス・アクトン・ロード１２８番
(72)発明者 リチャード・エフ・セルデン
アメリカ合衆国０１７７３マサチューセッツ州リンカーン、ハックルベリー・ヒル２１番

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA12
4B029 AA07 BB20 CC01 FA15
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25
QS32 QX02