

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6419209号
(P6419209)

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(51) Int.Cl.		F I	
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
G O 1 N	37/00	(2006.01)	G O 1 N 37/00 I O 1
G O 1 N	35/08	(2006.01)	G O 1 N 35/08 A

請求項の数 16 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2016-555918 (P2016-555918)	(73) 特許権者	516157913 ジェネウェーブ
(86) (22) 出願日	平成26年11月27日(2014.11.27)		フランス国, エフ-75011 パリ, ルー・デ・シャローヌ, 172, バット ベー2, イムブル・レ・ドリアン
(65) 公表番号	特表2017-502687 (P2017-502687A)	(74) 代理人	100107766 弁理士 伊東 忠重
(43) 公表日	平成29年1月26日(2017.1.26)	(74) 代理人	100070150 弁理士 伊東 忠彦
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/075868	(74) 代理人	100091214 弁理士 大貫 進介
(87) 国際公開番号	W02015/078998	(72) 発明者	マルシー, ヤン フランス国, エフ-13008 マルセイユ, アベニュー・デュ・パルク ボレリー 4 ビス
(87) 国際公開日	平成27年6月4日(2015.6.4)		
審査請求日	平成29年11月24日(2017.11.24)		
(31) 優先権主張番号	13306643.1		
(32) 優先日	平成25年11月29日(2013.11.29)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子診断用のマイクロ流体カートリッジ、このようなマイクロ流体カートリッジを用いるドッキングステーション、及び生物学的サンプルを分析するためのプロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル(S)の少なくとも1つの核酸を検出するためのマイクロ流体カートリッジ(1)であって:

・少なくともサンプル調製領域(T1、T2、T3、T4、T5)、核酸増幅領域(AMP1、AMP2)、核酸分析領域(T9、T10、HYB1、HYB2)、廃棄物領域(WST)、から選択される複数の機能領域に分けられた複数の機能容積部、及び

・マイクロチャネル(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C11a、C12a、C15a、C15b、C16a、C16b)の流体ネットワークを備え:

・少なくとも3つの機能領域が、1つ以上のハブ接続マイクロチャネル(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12)によって流体の1つの中心分配ハブ(CH)に流体接続され、前記ハブ接続マイクロチャネルのそれぞれが、ハブ端部及び領域端部を有し、前記中心分配ハブ(CH)が、流体を、前記中心分配ハブ(CH)を通過させることによって前記少なくとも3つの機能領域の第1の機能領域から第2の機能領域にポンピング及び注入することができ、前記第2の機能領域が、前記第1の機能領域と同一又は異なり、且つ

・それぞれハブ接続マイクロチャネルに配置された少なくとも3つの弁(V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7、V8、V9、V10)が、単一外部カム駆動アクチュエータ(1100)によって機械的に作動されるよう構成されるように前記マイクロ流体カー

トリッジ(1)に配置されている、マイクロ流体カートリッジ(1)。

【請求項2】

前記少なくとも3つの弁(V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7、V8、V9、V10)が、前記マイクロ流体カートリッジ(1)に円形に配置されている、請求項1に記載のマイクロ流体カートリッジ(1)。

【請求項3】

前記少なくとも3つの弁が、前記マイクロ流体カートリッジに線形に配置されている、請求項1に記載のマイクロ流体カートリッジ。

【請求項4】

各ハブ接続マイクロチャンネル(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12)が、前記ハブ接続マイクロチャンネル(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12)の前記領域端部に配置された1つの弁(V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7、V8、V9、V10、V11、V12)を備える、請求項1～3のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ(1)。

10

【請求項5】

前記複数の機能領域の2つの機能領域(AMP1、AMP2、T9、T10、HYB1、HYB2、WST)が、1つ以上の領域接続マイクロチャンネル(C13、C14)によって互いに直接流体接続され、前記領域接続マイクロチャンネル(C13、C14)のそれぞれが、弁(V13、V14)を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ(1)。

20

【請求項6】

・カートリッジプレート(10)であって：

・第1の面(101)及び第2の面(102)、前記第1の面(101)又は前記第2の面(102)と面一の複数の溝(G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7、G8、G9、G10、G11、G11a、G12、G12a、G13a、G14a、G15、G15a、G15b、G16、G16a、G16b)、及び前記第1の面(101)と前記第2の面(102)とを接続する複数の貫通孔(H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H0c、H1c、H2c、H3c、H4c、H5c、H9c、H10c、H7a、H7b、H11a、H12a、H15A、H15b、H15c、H15d、H16a、H16b、H16c、H16d)を有する基板(100)、及び

30

・前記カートリッジプレート(10)の前記基板(100)の第1の面(101)に結合された第1のフィルム(11)であって、前記第1の面(101)と面一の前記溝(G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7、G8、G9、G10、G11、G12)が、前記第1のフィルム(11)によって密封されて前記ハブ接続マイクロチャンネル(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12)を形成し、前記第1のフィルム(11)が、外部アクチュエータ(1100)によって変形されるように構成された変形膜である、第1のフィルム(11)を有する、カートリッジプレート(10)、

40

・前記基板(100)の前記第2の面(102)で前記カートリッジプレート(10)に接触するカートリッジ本体(20)であって：

・前記基板(100)の前記第2の面(102)から延びた側壁(21)、及び

・前記カートリッジ本体(20)の複数の機能容積部(CT、T1、T2、T3、T4、T5、AMP、DET、WST)を画定する複数の内壁(W0、W1、W2、W3、W4、W5、W6、W7、W8、W9、W10)を有する、カートリッジ本体(20)、及び

・前記異なる機能容積部(CT、T1、T2、T3、T4、T5、AMP、DET、WST)を閉じるように構成されたカートリッジカバー(30)を備える、請求項1～5のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ(1)。

50

【請求項 7】

前記機能容積部（CT、T1、T2、T3、T4、T5、AMP、DET、WST）からの液体の流出は防止するが空気は通過させるように構成された、前記カートリッジ本体（20）と前記カートリッジカバー（30）との間の半透膜を備える、請求項6に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）。

【請求項 8】

前記カートリッジプレート（10）が、その基板（100）の第2の面（102）に結合された第2のフィルム（12）を備え、前記第2の面（102）と面一の前記複数の溝（G11a、G12a、G13a、G14a、G15a、G15b、G16a、G16b）が、前記第2のフィルム（12）によって密封されて領域接続マイクロチャネル（C13、C14）を形成する、請求項6又は7に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）。

10

【請求項 9】

前記カートリッジプレート（10）が、前記基板（100）に形成された、前記第1の面（101）から延びた少なくとも1つの凹型空洞部（R1a、R2a、R1b、R2b）を備え、

前記基板（100）の前記第1の面（101）に結合されたマイクロアレイスライド（110）が、前記少なくとも1つの凹型空洞部（R1b、R2b）を閉じて核酸分析用の少なくとも1つの検出チャンバ（HYB1、HYB2）を形成する、請求項6～8のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）。

【請求項 10】

前記カートリッジ本体（20）の前記機能容積部（CT、T1、T2、T3、T4、T5）が、管、サンプル（T1）、試薬製品（T3、T4、T5）、又は精製カラム（T2）を受容するように構成された容器である、請求項6～9のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）。

20

【請求項 11】

流体分配の前記中心分配ハブ（CH）が、ハブ本体（CT）及びプランジャシール（61）を備え、前記プランジャシール（61）が、前記ハブ本体（CT）に対して入出して、流体を、前記ハブ接続マイクロチャネル（C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12）を介して前記マイクロ流体カートリッジ（1）の前記機能領域（T1、T2、T3、T4、T5、AMP1、AMP2、T9、T10、HYB1、HYB2、WST）に対して送出又は注入するように構成されている、請求項6～10のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）。

30

【請求項 12】

流体分配の前記中心分配ハブ（CH）が、前記プランジャシール（61）が取り付けられたプランジャ（62）を有するシリンジ（60）を備える、請求項11に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）。

【請求項 13】

請求項1～12のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）を受容するように構成されたドッキングステーション（1000）であって、

ハブ接続マイクロチャネル（C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12）の少なくとも3つの弁（V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7、V8、V9、V10）を機械的に作動させるように構成されたカム駆動アクチュエータ（1100）を備える、ドッキングステーション（1000）。

40

【請求項 14】

請求項1～12のいずれか1項に記載のマイクロ流体カートリッジ（1）を受容するように構成されたドッキングステーション（1000）であって：

- ・前記マイクロ流体カートリッジ（1）のマイクロアレイスライド（110）の光励起のための手段、及び
- ・前記マイクロ流体カートリッジ（1）によって分析される前記サンプル中の前記核酸を表す光シグナルの光検出のための手段、並びに

50

・前記マイクロ流体カートリッジ(1)の他の弁(V11、V12、V13、V14)を作動させるように構成された作動手段を備える、ドッキングステーション(1000)。

【請求項15】

前記カム駆動アクチュエータ(1100)が回転運動アクチュエータである、請求項13に記載のドッキングステーション(1000)。

【請求項16】

前記中心分配ハブ(CH)のシリンジ(60)を前記ハブ本体(CT)に対して入出させて、流体を、前記ハブ接続マイクロチャネル(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12)を介して前記マイクロ流体カートリッジ(1)の前記機能領域に対して送出又は注入するように構成されたスライド手段を備える、請求項15に記載のドッキングステーション(1000)。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子診断又は生物学的診断を行うために使用されるマイクロ流体デバイスの分野に関する。

【0002】

本発明は、より詳細には、生物学的サンプル中に含まれる少なくとも1つの核酸を分析するためのマイクロ流体カートリッジに関する。

20

【0003】

本発明はまた、このようなnマイクロ流体カートリッジを使用及び操作するように設計されたドッキングステーションにも関する。

【0004】

最後に、本発明は、このようなマイクロ流体カートリッジを実施する生物学的サンプルの分析方法に関する。

【背景技術】

【0005】

生物学的サンプル中に含まれる少なくとも1つの核酸又は1つのヌクレオチド配列の研究及び分析用に設計されたマイクロ流体デバイスは：生物学的サンプルから核酸を抽出するために前記サンプルを調製するため；例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」としても知られる)のような標準的な増幅技術を用いて抽出された核酸から少なくとも1つの標的核酸を増幅するため；及び、例えば、ハイブリダイゼーションのような既知の分子認識機構を用いて標的核酸を、例えば、光学的に検出し、且つ分析するために、様々な手段を備える。

30

【0006】

従って、サンプルの少なくとも1つの核酸の分析を行うために、前記サンプルを、マイクロ流体カートリッジの異なる機能領域に連続的に移送する必要がある、各機能領域は、サンプルに対する特定の処理専用である。

【0007】

40

国際公開第2009/049268号パンフレット及び米国特許出願公開第2012/115738号明細書に、例えば、複数の機能領域：核酸の抽出のためのサンプル調製領域、様々な核酸の増幅領域、並びに増幅された核酸の表面分析及び検出の領域を備えるマイクロ流体デバイスが記載されている。前記検出領域は、バイオチップである可能性が高い。

【0008】

これらの文献では、マイクロ流体カートリッジは、様々な適用例に適合するようにモジュラー式であり、且つ容易で迅速な再構成を可能にする非常に複雑な構造を特徴とする。特に、共有弁構造を備える多数のポンプが、流体をある機能領域から別の機能領域に移送するためにマイクロ流体カートリッジの各機能領域内で実施される。

50

【0009】

従って、国際公開第2009/049268号パンフレット及び米国特許出願公開第2012/115738号明細書のカートリッジは大きな容量を提供し、流体の移送は、限定された数のアクチュエータでは単純に行うことができない。

【0010】

特にヒトにおける分子診断に関連したこれらのデバイスは、各使用後にカートリッジを廃棄しなければならない、その広範な使用は、この技術に固有の複雑さ及び高コストによって限定される。さらに、これらのデバイス、例えば、米国特許出願公開第2012/0034705号明細書に記載のデバイスは、多くの場合、様々な分析段階を達成するために多様な多数の要素からなり、極めて脆弱であり、取り扱いが困難である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従って、マイクロ流体カートリッジは、大量生産が可能で、低価格であり、最も好ましくは使い捨てであることが望ましい。しかしながら、このようなマイクロ流体デバイスは、分子分析の複雑なステップを統合しているため、従来のマイクロ流体デバイスの様々な作業を適切に調整することが困難であり得る。従って、マイクロ流体カートリッジは、操作が単純であり、多数又は実質的に全ての流体処理ステップが、マイクロ流体カートリッジで直接自動化されることも望ましい。

【課題を解決するための手段】

20

【0012】

このため、本発明は、一方では、マイクロ流体カートリッジ内で、その処理に必要な全ての流体だけではなく、マイクロ流体回路、マイクロチャンネル及び弁、反応チャンバ、並びにバイオチップの全てを統合することを可能にし、他方では、単純な方式、低容量で、小型外部アクチュエータによって流体を移送及び移動させるマイクロ流体カートリッジを提案する。

【0013】

より正確には、本発明は、サンプルの少なくとも1つの核酸を検出するためのマイクロ流体カートリッジを提供し、このマイクロ流体カートリッジは：

- ・機能領域、例えば、少なくともサンプル調製領域、核酸増幅領域、核酸分析領域、廃棄物領域に分けられた複数の機能容積部、及び

30

- ・マイクロチャンネルの流体ネットワークを備え：

- ・少なくとも3つの機能領域が、1つ以上のハブ接続マイクロチャンネルによって流体分配の1つの中心分配ハブに流体接続され、前記ハブ接続マイクロチャンネルのそれぞれが、ハブ端部及び領域端部を有し、前記中心分配ハブが、流体を、前記中心分配ハブを通過させることによって前記少なくとも3つの機能領域の第1の機能領域から第2の領域にポンピング及び注入することができ、前記第2の機能領域が、前記第1の機能領域と同一又は異なり、且つ

- ・それぞれハブ接続マイクロチャンネルに配置された少なくとも3つの弁が、単一外部カム駆動アクチュエータによって機械的に作動されるよう構成されるように前記マイクロ流体カートリッジに配置されている。

40

【0014】

従って、本発明によるマイクロ流体カートリッジは、流体の中心分配ハブの使用により、流体の第1の機能領域から第2の機能領域への移送が容易であるという利点を有する。これにより、流体をある機能容積部又は領域から別の領域に移動させるために、減圧及び加圧を誘導する際にマイクロ流体カートリッジの流体の移動の殆どで唯1つの単純流体変位システム（典型的には、ポンピングシステム）を使用して、マイクロ流体カートリッジの容積を減少させることが可能である。

【0015】

マイクロ流体カートリッジは、可動要素が少なく、従って、そのコストが従来のカート

50

リッジと比較して削減される。

【0016】

さらに、中心ハブに接続されたマイクロチャネルの弁を作動させるためのシステムは、マイクロ流体カートリッジにおけるこれらの弁の配置により、米国特許出願公開第2012/0034705号明細書に開示されているシステムよりも小型で単純にすることもできる。

【0017】

一実施形態では、中心分配ハブに接続された少なくとも3つの機能領域は、サンプル調製領域及び廃棄物領域である。

【0018】

一実施形態では、少なくとも3つの機能領域は、核酸分析領域及び/又は核酸増幅領域を含む。

【0019】

別の実施形態では、少なくとも3つの機能領域は、サンプル調製領域、核酸分析領域、及び廃棄物領域を含む。

【0020】

別の実施形態では、少なくとも3つの機能領域は、マイクロ流体カートリッジの全ての機能領域を含む。

【0021】

一実施形態では、マイクロ流体カートリッジは、線形アクチュエータによって作動される、カム駆動アクチュエータから独立した少なくとも2つの弁をさらに備える。

【0022】

本発明によるマイクロ流体カートリッジは、典型的には、診断又は微生物学研究室で行われる、サンプルの収集から結果の読み取りまでのサンプルの完全な核酸分析を行うことができる「ラボオンチップ」と見なすことができる。

【0023】

配列が目的の遺伝子に特異的な核酸又は分子マーカーのサンプル中での存在の検出は、本出願における分子診断として解釈されたい。

【0024】

マイクロ流体カートリッジは通常、従来はいくつかの研究室の装置を用いて行われる複雑な分析を行う、数平方センチメートルのいくつかの特殊な機能領域及び容積部を統合している。これらの作業を自動化でき、しかも試薬消費量が少ないことが利点である。

【0025】

加えて、本発明によるマイクロ流体カートリッジの他の利点及び非限定的な特性を以下に説明する。前記特性は、単独又は組み合わせることができる本発明の様々な実施形態に一致する。

【0026】

少なくとも3つの弁が、単一外部カム駆動アクチュエータによって同時に作動されるよう構成されるようにマイクロ流体カートリッジに空間的に配置されている。本発明の特定の実施形態では、前記少なくとも3つの弁は、マイクロ流体カートリッジに線形又は円形に配置されている。

【0027】

典型的には、前記少なくとも3つの弁は、サンプル調製領域、核酸分析領域、及び廃棄物領域を中心ハブに接続するハブ接続マイクロチャネルの弁である。

【0028】

優先的に、前記弁は、前記ハブ接続マイクロチャネルの領域端部に近接して、又はこの端部に配置され、前記領域端部は、対応する機能領域に向けられたハブ接続マイクロチャネルの2つの端部の一方である。反対側では、ハブ端部は、流体の中心分配ハブに向けられたハブ接続マイクロチャネルの2つの端部の一方である。

【0029】

10

20

30

40

50

本発明の一実施形態では、各ハブマイクロチャンネルは、その領域端部に近接して、又はその領域端部に配置された1つの弁を備える。前記弁は、優先的に、上述のように外部カム駆動アクチュエータによって同時に作動されるようにするために空間的に配置される。

【0030】

複数の機能領域の少なくとも2つの機能領域は、1つ以上の領域接続マイクロチャンネルによって互いに直接流体接続することもでき、前記領域接続マイクロチャンネルのそれぞれは、少なくとも、カム駆動アクチュエータとは独立の線形アクチュエータによって優先的に作動される弁を有する。

【0031】

例えば、前記2つの機能領域は、核酸増幅領域及び核酸分析領域である。

10

【0032】

別の例では、前記2つの機能領域は、核酸分析領域及び廃棄物領域である。

【0033】

典型的には、本発明によるマイクロ流体カートリッジは、使い捨てであり、且つ：

・カートリッジプレートであって：

・第1の面及び第2の面、前記第1の面又は前記第2の面と面一の複数の溝、及び前記第1の面と前記第2の面とを接続する複数の貫通孔を有する基板、及び

・カートリッジプレートの前記基板の第1の面に結合された第1のフィルムであって、第1の面と面一の前記溝が、前記第1のフィルムによって密封されてハブ接続マイクロチャンネルを形成し、前記第1のフィルムが、外部アクチュエータによって変形されるように構成された第1の変形膜である、第1のフィルムを有する、カートリッジプレート、

20

・前記基板の第2の面でカートリッジプレートに接触するカートリッジ本体であって：

・前記基板の第2の面から延びた側壁、及び

・前記カートリッジ本体の複数の機能容積部を画定する複数の内壁を有する、カートリッジ本体、及び

・異なる機能容積部を閉じるように構成されたカートリッジカバーを有する、カートリッジプレートを備える。

【0034】

一実施形態では、カートリッジプレートは、その基板の第2の面に結合された第2のフィルムを備え、第2の面と面一の複数の溝が、前記第2のフィルムによって密封されて領域接続マイクロチャンネルが形成されている。

30

【0035】

典型的には、カートリッジプレートは、基板に形成された、第1の面から延びた少なくとも1つの凹型空洞部を備える。

【0036】

典型的には、同様に、基板の第1の面に結合された第1のフィルムは、前記少なくとも1つの凹型空洞部を閉じて核酸増幅用の少なくとも1つの反応チャンバを形成する。

【0037】

好ましい一実施形態では、基板の第1の面に結合されたマイクロアレイスライド（又はバイオチップ）は、前記少なくとも1つの凹型空洞部を閉じて核酸分析用の少なくとも1つの検出チャンバを形成する。

40

【0038】

好ましい一実施形態では、マイクロ流体カートリッジは、機能容積部からの液体の流出は防止するが空気は通過させるように構成された、カートリッジ本体とカートリッジカバーとの間の半透膜を備える。

【0039】

典型的には、カートリッジ本体の機能容積部は、いくつかの機能領域（例えば、少なくともサンプル調製領域、核酸増幅領域、核酸分析領域、及び廃棄物領域）を含む。前記機能容積部は、管、流体、例えば、サンプル、試薬製品、又は精製カラムを受容するように構成された容器である。

50

【0040】

一実施形態では、流体分配の中心ハブは、ハブ本体及びプランジャシールを備え、このプランジャシールは、ハブ本体に対して入出して、流体を、ハブ接続マイクロチャンネルを介して前記マイクロ流体カートリッジの機能領域に対して送出又は注入するように構成されている。

【0041】

別の実施形態では、流体分配の中心ハブは、プランジャシールが取り付けられたプランジャを有するシリンジも備える。

【0042】

マイクロ流体カートリッジは、少なくとも次の機能：熱制御、流体の流れの制御、弁の作動、及び光検出を果たすように設計された機器内で、ドッキングステーションに挿入されるように構成されている。

【0043】

本発明はまた、上述のようなマイクロ流体カートリッジを使用及び操作するためのドッキングステーションも提案する。

【0044】

従って、本発明は、本発明によるマイクロ流体カートリッジを受容するように構成されたドッキングステーションを提供し、このドッキングステーションは：

- ・ハブ接続マイクロチャンネルの少なくとも3つの弁を同時に作動させるように構成されたカム駆動アクチュエータ、
- ・前記カートリッジのマイクロアレイスライドの光励起のための手段、及び
- ・カートリッジによって分析されるサンプル中の前記核酸を表す光シグナルの光検出のための手段を備える。

【0045】

一実施形態では、ドッキングステーションは、前記マイクロ流体カートリッジの線形/独立に作動される弁を作動させるように構成された作動手段も備える。

【0046】

特定の一実施形態では、カム駆動アクチュエータは、回転運動アクチュエータである。

【0047】

別の特定の実施形態では、カム駆動アクチュエータは、線形運動アクチュエータである。

【0048】

優先的に、ドッキングステーションのカム駆動アクチュエータは、中心ハブに接続されたマイクロチャンネルの弁のうち、最大でも前記弁の1つしか開けないように設計されている。

【0049】

好ましい一実施形態では、本発明によるドッキングステーションは、中心ハブのシリンジをハブ本体に対して入出させて、流体を、ハブ接続マイクロチャンネルを介して前記マイクロ流体カートリッジの機能領域に対して送出又は注入するように構成されたスライド手段を備える。

【0050】

また、本発明の目的は、少なくともサンプルの核酸を分析するために、本発明によるこのようなドッキングステーション及びマイクロ流体カートリッジを備える、生物学的サンプルを分析するための装置を提供することにある。

【0051】

さらに、本発明によるマイクロ流体カートリッジは、特に、生物学的サンプルを分析するためのプロセスに使用されるように構成されている。

【0052】

従って、本発明の別の目的は、生物学的サンプルを分析するためのプロセスを提案することであり、このプロセスは：

10

20

30

40

50

- (a) 前記生物学的サンプルを、本発明によるマイクロ流体カートリッジのサンプル調製領域の少なくとも1つの機能容積部に供給するステップ、
- (b) 前記生物学的サンプルを、マイクロチャネルの流体の流れを制御する少なくとも1つの弁を作動させることによって前記サンプル調製領域の別の機能容積部に存在する少なくとも1つの試薬及び/又は1つの精製カラムに接触させるステップ、
- (c) ステップ b から得られた産物を回収して、単離されたDNAサンプルを得るステップ、
- (d) 単離されたDNAサンプルを、核酸増幅領域の少なくとも1つの機能容積部に移送するステップ、
- (e) 前記単離されたDNAサンプルを、少なくとも増幅用試薬に接触させて、増幅領域の機能容積部の弁を閉じるステップ、
- (f) DNAの増幅を行うステップ、
- (g) ステップ (f) で得られた増幅されたDNAを回収し、この増幅されたDNAを、マイクロチャネルの流体の流れを制御する少なくとも1つの弁を作動させることによってハイブリダイゼーション領域の別の機能容積部に移送するステップ、
- (h) ハイブリダイゼーションチャンバ内で、前記増幅されたDNAを、前記DNAにハイブリダイズし得る少なくとも1つの化合物に接触させるステップ、及び
- (i) マイクロアレイ画像を得て、この画像を自動的に分析するステップを含む。

10

【0053】

ここで、添付の図面を参照して本発明の一実施形態を詳細に説明する。

20

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】本発明の好ましい一実施形態のマイクロ流体カートリッジの斜視図である。

【図2】カートリッジプレート、カートリッジ本体、及びカートリッジカバーを示す、図1のマイクロ流体カートリッジの組立分解図である。

【図3】図1のマイクロ流体カートリッジで分析するための生物学的サンプル用の調製管の略図である。

【図4】流体をポンピング及び注入するために図1のマイクロ流体カートリッジに使用することができるシリンジの組立分解略図である。

【図5】図1のマイクロ流体カートリッジに挿入される「増幅ミックス」管の略図である

30

【図6】図2のカートリッジ本体の詳細図である。

【図7】図2のカートリッジプレートの詳細図である。

【図8】図7のカートリッジプレートの底面図である。

【図8A】断面A - Aに沿った図8の断面図である。

【図8B】断面B - Bに沿った図8の断面図である。

【図9】図8にIで示されている領域の詳細図である。

【図9A】断面A - Aに沿った図9の断面図である。

【図10】図8にIで示されている領域の詳細図である。

【図10A】断面B - Bに沿った図10の断面図である。

40

【図11】図7のカートリッジプレートの平面図である。

【図12】好ましい一実施形態のドッキングステーション（機械部品のみ）への図1のマイクロ流体カートリッジの取り付けの略図である。

【図13】マイクロ流体カートリッジの弁を作動させるためにボールを使用する回転運動カム駆動アクチュエータの略図である。

【図14】図13のカム駆動アクチュエータのボールの代わりに保持を可能にする穿孔アクチュエータプレートの略図である。

【図15】図13のカム駆動アクチュエータの機構で機能する移動止めを有する円形プレートの略図である。

【図16】カートリッジプレートの別の例の詳細図である。

50

【発明を実施するための形態】**【0055】**

図1及び図2にそれぞれ、マイクロ流体カートリッジ1がここでは使い捨てカートリッジである、本発明の好ましい一実施形態によるマイクロ流体カートリッジ1の組立図及び組立分解図が示されている。これは、マイクロ流体カートリッジ1が、使い捨て用であり、生物学的廃棄物受け取り用の容器内に配置されるようになっていることを意味している。

【0056】

図1及び図2に示されているように、マイクロ流体カートリッジ1は、3つの主要要素、即ち：カートリッジプレート10、カートリッジ本体20、及びカートリッジカバー30を備える。

10

【0057】

マイクロ流体カートリッジ1はまた、サンプルSを含むサンプル管40、少なくとも増幅ミックス管50、及びシリンジ60を備える。

【0058】

マイクロ流体カートリッジ1のこれらの異なる要素を以下に詳述する。

【0059】

マイクロ流体カートリッジ1のカートリッジプレート10は、第1に、基板100、例えば、図7に詳細に示されている基板を備えている。

【0060】

20

この基板100は、実質的に薄いブレードの形状を有し、第1の面101及び第2の面102を有する。第2の面102は、カートリッジが組み立てられるとカートリッジ本体20を向く面である(図1及び図2を参照)。

【0061】

カートリッジプレート10は、有利なことに、熱可塑性ポリマー材料、例えば、環状オレフィンコポリマー(COC)又は環状オレフィンポリマー(COP)の射出成形によって形成することができる。カートリッジプレート10は、ここでは、好ましくはポリプロピレン(PP)から形成される。COC及びCOPは、生体適合性に優れた環状オレフィンベースとする非晶質の透明な材料である。これらの材料は、膜及び/又は接着パッチとの密封接続の形成を可能にする。これらの材料は、特に、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリメチル-メタクリレート(PMMA)、ポリジメチル-シロキサン(PDMS)、ポリ塩化ビニル(PVC)を含む群から選択され得る。

30

【0062】

好ましくは、カートリッジプレート10の基板100の寸法は、縦及び横が、概ね、50~150mmの長さ、優先的に85~125mmの長さ、及び25~75mmの幅、優先的に40~60mmの幅である。基板100の厚さは、優先的に約1~5mm、優先的に1~2mmである。

【0063】

一般に、マイクロ流体カートリッジ1は、様々な流体が循環するマイクロチャネルの流体ネットワークを備え、各マイクロチャネルは、対応するマイクロチャネル内でのこのような流体の循環を制御するための少なくとも1つの弁を備える。

40

【0064】

ここで、図1及び図2に示されているマイクロ流体カートリッジ1の特定の実施形態について、カートリッジプレート10及びその基板100の様々な図を示す図7~図11を参照してこれらのマイクロチャネル及び関連する弁がどこにどのように形成されるかを説明する。

【0065】

従って、特に図7及び図8に示されているように、カートリッジプレート10は、第1に、複数の貫通孔を備え、これらの貫通孔は、ここでは合計34で示され、参照符号は次の通りである：

50

- ・ H 1 ~ H 1 4、
- ・ H 0 c ~ H 5 c 及び H 9 c、H 1 0 c、並びに
- ・ H 7 a、H 7 b、H 1 1 a、H 1 2 a、H 1 5 a ~ H 1 5 d、H 1 6 a ~ H 1 6 d。

【 0 0 6 6 】

これらの全ての貫通孔は、第 1 の面 1 0 1 と第 2 の面 1 0 2 との間で基板 1 0 0 を貫通し、好ましくは、これらの 2 つの面 1 0 1、1 0 2 に対して垂直である（例えば、貫通孔 H 4、H 4 C については図 9 A を、貫通孔 H 8、H 1 6 a については図 1 0 A を参照）。

【 0 0 6 7 】

第 1 及び第 2 の面 1 0 1、1 0 2 のそれぞれで開口しているこれらの貫通孔は、要素をいずれかの面から互いに流体接続する。これは、流体が、これらの貫通孔において他と同様に一方向に循環できることを意味する。

【 0 0 6 8 】

適切な理解のために、3 つの異なるタイプの貫通孔（図 7 ~ 図 1 0 A を参照）間の相違を以下に説明する：

- ・ 凹部を備えた貫通孔：これらは、H 1 ~ H 1 4 の参照符号が付された貫通孔であり（図 8、図 9、及び図 9 A を参照）、これらを通る流れは弁によって起こされる
- ・ 中心貫通孔：これらは、H 0 c ~ H 5 c、H 9 c ~ H 1 0 c の参照符号が付された貫通孔であり、及び
- ・ H 7 a、H 7 b、H 1 1 a、H 1 2 a、H 1 5 a ~ H 1 5 d、H 1 6 a ~ H 1 6 d の参照符号が付された、残りの貫通孔に対応する単純貫通孔。

【 0 0 6 9 】

図 7 及び図 8 における H 1 ~ H 1 4 の参照符号が付された、凹部を備えた貫通孔はそれぞれ、基板 1 0 0 の第 1 の面 1 0 1 を向いたそれらの端部に、基板 1 0 0 の第 1 の面 1 0 1 の表面に形成された円柱状の凹部を有し、この凹部はそれぞれ、図 7 及び図 8 に R 1 ~ R 1 4 の参照符号で示されている。これは、例えば、基板 1 0 0 の部分断面図である図 9 A 及び図 1 0 A に例示され、貫通孔 H 4（図 9 A）及び H 8（図 1 0 A）はそれぞれ、凹部 R 4 及び R 8 を備えて示されている。

【 0 0 7 0 】

凹部 R 1 ~ R 1 4 は：

- ・ 1 mm ~ 1 0 mm、優先的に 2 mm ~ 8 mm、好ましくは約 4 mm の直径、及び
- ・ 0 . 0 2 mm ~ 0 . 4 mm、優先的に 0 . 0 5 mm ~ 0 . 1 5 mm、好ましくは約 0 . 1 mm の深さを有する。

【 0 0 7 1 】

H 0 c、H 1 c、H 2 c、H 3 c、H 4 c、H 5 c、H 9 c、及び H 1 0 c の参照符号が付された中心貫通孔（例えば、図 8 を参照）は、互いに近接して円形に配置されている。このような構成の利益は、以降で分かるであろう。

【 0 0 7 2 】

加えて、カートリッジプレート 1 0 は、図 8 ~ 図 1 0 A において G 1 ~ G 1 6 の参照符号が付された第 1 の複数の 1 6 の溝を備える。これらの第 1 の溝 G 1 ~ G 1 6 は、基板 1 0 0 の第 1 の面 1 0 1 と面一となるようにこの第 1 の面 1 0 1 の近傍に形成される。これは、例えば、溝 G 4（図 9 A）及び G 8、G 1 6 が示されている図 9 A 及び図 1 0 A で確認することができる。

【 0 0 7 3 】

有利なことに、これらの溝 G 1 ~ G 1 6 は、基板 1 0 0 の第 1 の面 1 0 1 に平行であり、一般に 0 . 0 1 mm ~ 0 . 5 mm、優先的に 0 . 2 mm ~ 0 . 4 mm、好ましくは約 0 . 3 mm の深さを有する。

【 0 0 7 4 】

これらの溝 G 1 ~ G 1 6 の幅は、ここでは約 0 . 5 mm に等しい。

【 0 0 7 5 】

図 1 に示されているマイクロ流体カートリッジ 1 の特定の実施形態では、これらの第 1

10

20

30

40

50

の溝 G 1 ~ G 1 6 は :

- ・ 中心貫通孔 H 0 c、H 1 c、H 2 c、H 3 c、H 4 c、H 5 c、H 9 c、H 1 0 c と凹部 R 1 ~ R 1 0 との間に延在するか : これは、溝 G 1 ~ G 1 0 の場合である (例えば、中心孔 H 4 c と凹部 R 4 を備えた貫通孔 G 4 との間の溝 G 4 については図 9 A を参照) ;
- ・ 又は中心貫通孔 H 0 c と単純貫通孔 H 1 1 a、H 1 2 a との間に延在するか ; これは溝 G 1 1 及び G 1 2 の場合である ;
- ・ 又は 2 つの単純貫通孔間に延在する : これは、貫通孔 H 1 5 a と H 1 5 c との間に延在する溝 G 1 5、及び貫通孔 H 1 6 a と H 1 6 c との間に延在する溝 1 6 の場合である。これらの特定の溝 G 1 5、G 1 6 では、それぞれが、途中で単純貫通孔 H 1 5 b、H 1 6 b を備えていることも分かる。

10

【 0 0 7 6 】

溝 G 6、G 7、G 8、G 1 1、及び G 1 2 は、これらの溝 G 6、G 7、G 8、G 1 1、及び G 1 2 のそれぞれを中心孔 H 0 c に接続する共通部分を共有し、このようにして分岐構造が形成される。

【 0 0 7 7 】

図 7 及び図 1 1 に示されているように、カートリッジプレート 1 0 は、最後に、第 2 の複数の 8 つの溝 G 1 1 a、G 1 2 a、G 1 3 a、G 1 4 a、G 1 5 a、G 1 5 b、G 1 6 a、G 1 6 b を備える。これらの第 2 の溝 G 1 1 a、G 1 2 a、G 1 3 a、G 1 4 a、G 1 5 a、G 1 5 b、G 1 6 a、G 1 6 b は、基板 1 0 0 の第 2 の面 1 0 2 と面一となるようにこの第 2 の面 1 0 2 の近傍に形成される。これは、例えば、溝 G 1 6 a が示されている

20

【 0 0 7 8 】

第 1 の溝 G 1 ~ G 1 6 に関しては、これらの第 2 の溝 G 1 1 a、G 1 2 a、G 1 3 a、G 1 4 a、G 1 5 a、G 1 5 b、G 1 6 a、G 1 6 b が、有利なことに、基板 1 0 0 の第 2 の面 1 0 2 に平行である。これらの溝は、第 1 の溝 G 1 ~ G 1 6 と同じ寸法特性を有する。

【 0 0 7 9 】

一般に、図 8 (基板 1 0 0 の底面図) 及び図 1 1 (基板の平面図) を見ると分かるように、基板 1 0 0 の第 2 の面 1 0 2 に形成された第 2 の溝 G 1 1 a、G 1 2 a、G 1 3 a、G 1 4 a、G 1 5 a、G 1 5 b、G 1 6 a、G 1 6 b は :

30

- ・ 凹部を備える貫通孔 H 6、H 8、H 1 1、H 1 2、H 1 3、H 1 4 と対応する単純貫通孔 H 1 5 a、H 1 6 a、H 1 1 a、H 1 2 a、H 1 5 b、H 1 6 b との間に延在するか ; これは、例えば、第 2 の溝 G 1 1 a、G 1 2 a、G 1 3 a、G 1 4 a、G 1 5 a、及び G 1 6 a の場合である (例えば、図 1 0 A を参照) ;
- ・ 又は 2 つの単純貫通孔 H 1 5 c、H 1 5 d、H 1 6 c、H 1 6 d 間に延在する : これは、例えば、溝 G 1 5 b (単純貫通孔 H 1 5 c と H 1 5 d との間) 及び溝 G 1 6 b (単純貫通孔 H 1 6 c と H 1 6 d との間) の場合である。

【 0 0 8 0 】

上述の基板 1 0 0 に形成された貫通孔、凹部、及び溝は、一方でマイクロチャネルの流体ネットワークを形成し、他方でこれらのマイクロチャネルの流体制御弁を形成するよう

40

【 0 0 8 1 】

このために、このように基板の第 1 の面 1 0 1 又は第 2 の面 1 0 2 で開口した貫通孔、凹部、及び溝を閉じる必要があることを理解されたい。

【 0 0 8 2 】

従って、カートリッジプレート 1 0 は、第 1 に、マイクロ流体カートリッジ 1 が組み立てられると (図 1 を参照) カートリッジプレート 1 0 の基板 1 0 0 の第 1 の面 1 0 1 に位置する第 1 のフィルム 1 1 (図 2 を参照) を備える。

【 0 0 8 3 】

さらに、この第 1 のフィルム 1 1 の形態及び寸法は :

50

・基板 100 の外部プロフィール 103 に従い、且つ
 ・基板 100 の大きい半分に亘って延在して、第 1 の溝 G1 ~ G16、凹部 R1 ~ R14、及び中心貫通孔 H0c ~ H5c、H9c、H10c、並びに単純貫通孔 H11a、H12a、H15a ~ H15c、及び H16a ~ H16c の全てを覆うように調整される（図 8 を参照）。

【0084】

第 1 のフィルム 11 は、優先的に、カートリッジプレート 10 の剛性基板 100 と同様の材料で形成される。一般に、第 1 のフィルム 11 は、ここではポリプロピレン（PP）から形成される。

【0085】

好ましくは、第 1 のフィルム 11 は、熱溶接、例えば、レーザー溶接、結合、接着、又は化学結合法によって基板の第 1 の面 101 の表面に結合又は溶接された約 0.1 mm の厚さの熱可塑性フィルムである。この第 1 のフィルム 11 は、第 1 の面 101 を閉じて、マイクロ流体回路の厚さを提供する。

【0086】

このように基板 100 の第 1 の面 101 に配置されて固定され、第 1 のフィルム 11 は、第 1 の溝 G1 ~ G16、凹部 R1 ~ R14、並びに中心貫通孔 H0c、H1c ~ H5c、H9c、H10c、並びに単純貫通孔 H11a、H12a、H15a ~ H15c、及び H16a ~ H16c を閉じてしっかりと密封する。

【0087】

言い換えれば、第 1 のフィルム 11 は、第 1 の溝、貫通孔、及び凹部と協働して複数のマイクロ流体チャネル又はマイクロチャネル及び弁を形成する。

【0088】

従って、図 12 に示されているように、マイクロチャネル C1 ~ C12、C15、C16 は、基板 100 の第 1 の面 101 と面一の第 1 の溝 G1 ~ G12、G15、G16 をこの第 1 の面 101 に配置された第 1 のフィルム 11 によって閉じることによって形成される。

【0089】

同様の方式で、弁 V1 ~ V14 は、弁座の反対側に配置された変形可能な第 1 のフィルム 11 によって形成され、この弁座は、基板 100 の第 1 の面 101 の表面に形成された凹部 R1 ~ R14 によって形成される。

【0090】

好ましい一方式では、凹部 R1 ~ R14 の反対側に配置された変形可能な第 1 のフィルム 11 の表面は、静止状態では、ほぼ平面で、基板の第 1 の面 101 に対して平行であり、外部アクチュエータによって変形可能である（以下を参照）。この外部アクチュエータの作用を受けた、凹部 R1 ~ R14 の高さでの第 1 のフィルム 11 の変形により、弁 V1 ~ V14 の開閉が可能である。

【0091】

より正確には、各弁座、即ち、各凹部 R1 ~ R14 の反対側の第 1 のフィルム 11 の変形により、各凹部 R1 ~ R14 の直径よりも遥かに直径が小さい対応する貫通孔 H1 ~ H14 の閉塞が可能となる。これにより、特定の剛性を有する第 1 のフィルム 11 を用いるとカートリッジプレート 10 を最大限に閉塞させることができる。

【0092】

カートリッジプレート 10 はまた、マイクロ流体カートリッジ 1 が組み立てられると（図 1 を参照）カートリッジプレート 10 の基板 100 の第 2 の面 102 に位置する第 2 のフィルム 12（図 2 を参照）又はプレートも備える。

【0093】

第 2 のフィルム 12 は、ここでは、カートリッジプレート 10 の剛性基板 100 と同様の材料から形成され、その厚さは約 0.1 mm である。

【0094】

10

20

30

40

50

別法では、プレートを使用することができる。このプレートは、0.05 mm ~ 2 mm の寸法を有し得る。

【0095】

第2のフィルム12は、結合によって基板100の第2の面102に結合される。

【0096】

変形形態として、第2のフィルムは、熱溶接、接着、又は化学結合法によって第2の面に固定することができる。

【0097】

この第2のフィルム12は、第2の面102を閉じて、マイクロ流体回路の気密を可能にする。

10

【0098】

より正確には、第2の複数の溝G11a、G12a、G13a、G14a、G15a、G15b、G16a、G16bは、第2のフィルム12によって閉じられて密封される。

【0099】

従って、第1のフィルム11については、図12に示されているように、マイクロチャネルC11a、C12a、C13、C14、C15a、C15b、C16a、C16bは、基板100の第2の面102と面一の第2の溝G11a、G12a、G13a、G14a、G15a、G15b、G16a、G16bを第2の面102に配置されたこの第2のフィルム12によって閉じることによって形成される。

【0100】

20

第2のフィルム12は、マイクロ流体カートリッジ1の組み立て中にカートリッジ本体20を通る第2のフィルム12の通過を可能にするために矩形開口12A（図2を参照）を有する。

【0101】

カートリッジプレート10の基板100にこのように取り付けられた第1のフィルム11及び第2のフィルム12は、マイクロチャネルC1~C15、C11a~C16a、C15b、C16bの流体ネットワークを形成する（図12を参照）。

【0102】

カートリッジプレート10に形成されたマイクロチャネル及び弁をどのように使用して、サンプルの分析のために必要な流体を輸送及び移送するかを以降に示す。

30

【0103】

図8及び図11に示されているように、カートリッジプレート10は、基板100に互いに離間して形成された少なくとも2つの凹型空洞部R1a、R2aも備える。これらの2つの凹型空洞部R1a、R2aは、第1の面101に形成され、この第1の面101から基板100の内側に向かって延びている（図8Aを参照）。

【0104】

2つの凹型空洞部R1a、R2aは、核酸増幅用の2つの反応チャンバを形成するように基板100の第1の面101に配置された第1のフィルム11によってしっかりと密封され、これらの反応チャンバは、以降増幅チャンバと呼ばれ、参照符号AMP1及びAMP2が付されている（図12を参照）。

40

【0105】

これらの2つの増幅チャンバAMP1、AMP2に対して入出する流体の循環がそれぞれ、弁V11、V13及び弁V12、V14によって制御される。

【0106】

増幅チャンバ間の流体の循環を制御する弁（典型的には、V13及びV14）は、カム駆動アクチュエータとは独立の線形アクチュエータによって作動される。優先的に、増幅チャンバに向かう流体の循環を制御する弁（典型的には、V11及びV12）は、カム駆動アクチュエータとは独立の線形アクチュエータによって作動される。

【0107】

図8及び図11に示されている同じ方式で、カートリッジプレート10は、基板100

50

に形成された2つの他の凹型空洞部 R 1 b、R 2 bを備える。

【0108】

これらの2つの凹型空洞部 R 1 b、R 2 bは、実質的に平行六面体の形状であり、第1の面101に形成され、この第1の面101から基板100の内側に向かって延びている。図8Bに示されているように、2つの凹型空洞部 R 1 b、R 2 bはそれぞれ、段階状の斜めの側面105、106を備える。

【0109】

これらの2つの凹型空洞部 R 1 b、R 2 bは、核酸分析用の2つの反応チャンバを形成するように基板100の第1の面101に結合されたバイオチップ110（図2を参照）によってしっかりと密封され、これらの反応チャンバは、以降ハイブリダイゼーションチャンバと呼ばれ、参照符号HYB1及びHYB2が付されている（図12を参照）。 10

【0110】

これらの2つの分析チャンバHYB1、HYB2に対して入出する流体の循環はそれぞれ、貫通孔H7a、H15d（ハイブリダイゼーションチャンバHYB1用）及び貫通孔H7b、H16d（ハイブリダイゼーションチャンバHYB2用）を介して行われる。

【0111】

一実施形態では、カートリッジは、各増幅チャンバの上流の中心HUBと各増幅チャンバとの間に配置された計量チャンバを備えることができる。例えば、前記計量チャンバは、弁V11及びV12（図12を参照）又はVV8及びVV14（図16を参照）を介して前記増幅チャンバに接続される。典型的には、前記計量チャンバはまた、例えば、マイクロチャンネルC11及びC12を介して中心HUBに接続される。あるいは、又はこれに加えて、前記計量チャンバはまた、マイクロチャンネルを介してハブ接続マイクロチャンネルの弁に直接接続することもできる。前記計量チャンバは、増幅チャンバに注入されるべき適切な流体レベルを測定するのに有用である。 20

【0112】

ハイブリダイゼーションチャンバは、サンプル中の特定の標的分子の存在を検出するための親和性バイオセンサを備える。親和性バイオセンサは、連結反応により標的分子と相互作用する。本発明によるカートリッジは、生物学的サンプル中のいくつかの分子ハイブリダイゼーションマーカーの存在を並行で検出することを可能にすることを目的とする。多重検出を行う上での、表面における複数の候補のうちの増幅産物又はアンプリコンの収集は、当業者に公知の技術である。検出の好ましい方式はバイオチップである。バイオチップシステムは、現在、複合サンプル中の特定の物質の検出及び測定のために広く使用されている。このようなバイオチップでは、サンプル中の標的DNAの同定及び定量は、標的配列と前記配列用に特別に用意されたプローブとの結合レベルを測定することによって行われる。DNAバイオチップ技術では、それぞれ既定の配列を有する一連のプローブ核酸が、各プローブが所定の位置を占有するように支持固体又は基板に固定される。 30

【0113】

本出願で例示される実施形態によると、バイオチップ110は、例えば、ガラス、シリコン、又はプラスチックプレートである概ね平面の固体基板111を本質的に備え、この固体基板111の表面に、配列が標的核酸に特異的なプローブ分子が固定されている。例として、本発明のカートリッジに良く適したバイオチップのサイズは、約24mm×24mm×0.1mmである。 40

【0114】

マイクロ流体カートリッジ1のカートリッジ本体20を、図1、図2、及び図6を参照して以下に説明する。

【0115】

好ましくは、カートリッジ本体20は、カートリッジプレート10とは別個に形成される。この場合、カートリッジ本体20は、熱可塑性ポリマー材料、例えば、ポリプロピレン（PP）の射出成形によって有利に立体的に形成される。

【0116】

一変更形態では、カートリッジ本体は、特にポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリメチル-メタクリレート（PMMA）、ポリジメチル-シロキサン（PDMS）、ポリ塩化ビニル（PVC）を含む群から選択される環状オレフィンコポリマー（COC）又は環状オレフィンポリマー（COP）から形成することができる。

【0117】

一部の実施形態では、カートリッジ本体は、例えば、ステレオリソグラフィ又は焼結によって立体的に形成される。

【0118】

別の有利な変更形態によると、カートリッジ本体とカートリッジプレートは、一緒に形成して単一体とすることができる。この場合、前記単一体は、例えば、カートリッジプレート10及びカートリッジ本体20に使用される材料と同じ種類の材料を用いる射出成形によって形成される。

10

【0119】

マイクロ流体カートリッジ1が組み立てられると（図1を参照）、このカートリッジ本体20は、その第1の縁22の高さで、基板100の第2の面102にあるカートリッジプレート10に接触する。

【0120】

図6に示されているように、カートリッジ本体20は、基板100に対して垂直に、この基板100の第2の面102からカートリッジ本体20の第2の縁23に延びた側壁21を備える。

20

【0121】

カートリッジ本体20はまた、複数の内壁W0、W1、W2、W3、W4、W5、W6、W7、W8、W9、W10も備え、これらの内壁はそれぞれ、複数の機能容積部CT、T1、T2、T3、T4、T5、AMP、DET、T9、T10を画定している（図6を参照）。

【0122】

カートリッジ本体20のこれらの異なる機能容積部CT、T1、T2、T3、T4、T5、AMP、DET、T9、T10は、サンプルSの分析のためにマイクロ流体カートリッジ1の使用中に、処置される又はされないサンプルS、異なる試薬製品、精製カラム、並びにサンプルSの調製、増幅、及び分析用の流体又は固体を受容する容器である。

30

【0123】

これらの異なる機能容積部の機能を以降に説明する。

【0124】

加えて、図2に示されているように、側壁21及び6つの内壁W0、W5、W6、W7、W8、W9が機能容積部WSTも画定することも分かり、機能容積部は、以降で明らかになるように、サンプルS及び異なる試薬製品から生じる廃棄物用の容積部である。

【0125】

マイクロ流体カートリッジ1が組み立てられると（図1を参照）、カートリッジ本体20が、第2の面102の高さでカートリッジプレート10に固定され、各機能容積部T1、T2、T3、T4、T5、T9、T10、CT、WST、AMP、DETが：

40

- ・機能容積部T1、T2、T3、T4、T5、T9、T10がそれぞれ、貫通孔H1、H2、H3、H4、H5、H9、H10を備え；
- ・機能容積部CTが、中心貫通孔H0c、H1c、H2c、H3c、H4c、H5c、H9c、H10cの全てを取り囲んで備え；
- ・機能容積部AMP及びDETがそれぞれ、2つの増幅チャンバAMP1、AMP2及び2つの検出チャンバHYB1、HYB2を取り囲み；
- ・機能容積部WSTが、貫通孔H7、H7a、及びH7bと連通するように、基板100の第1の面102によってカートリッジ本体20の第1の縁22の高さで閉じられる。

【0126】

従って、機能容積部T1、T2、T3、T4、T5、T9、T10がそれぞれ独立に、

50

弁V 1、V 2、V 3、V 4、V 5、V 9、V 10によって制御されるマイクロチャンネルC 1、C 2、C 3、C 4、C 5、C 9、C 10を介して機能容積部C Tと流体連通し、流体が、これらの異なる機能容積部間を他と同様に一方向に循環することができることを理解されたい(図12を参照)。

【0127】

このために、中心管とも呼ばれる機能容積部C Tは、ハブ本体を形成し、シリンジ60(図1及び図2を参照)が、このハブ本体に入る、又はこのハブ本体から出ることができる。

【0128】

より正確には、図4に示されているように、シリンジ60は、プランジャ62、及びこのプランジャ62が固定されるプランジャシール61を備える。例えば、プランジャ62は、変形可能な取り付け手段を備えるプランジャシール61内にプランジャ62を押し込むことによってプランジャシール61に取り付けることができる。

10

【0129】

プランジャ62はまた、プランジャシール61の反対側に平坦部63も備え、この平坦部63により、このプランジャ62を押し又は引いてシリンジ60をハブ本体C T内でスライドさせることが可能となる。

【0130】

シリンジ60のプランジャシール61は、2つのOリング61A、61Bを備え、且つ中心管C T内に係合するとこのシリンジ60がこの中心管C T内を密着してスライドできるように調整される外径を有する。

20

【0131】

このようにして、シリンジ60は、マイクロチャンネルC 1、C 2、C 3、C 4、C 5、C 9、C 10を介して中心管C Tに接続された異なる機能容積部T 1、T 2、T 3、T 4、T 5、T 9、T 10に流体をポンピング又は注入することができる。

【0132】

好ましい一実施形態では、プランジャシール61のみが、マイクロ流体カートリッジ1のカートリッジ本体20の一部である。この好ましい実施形態では、シリンジ60のプランジャ62は、ドッキングステーション1000の一部である。従って、マイクロ流体カートリッジ1の可動部品の数、その製造コストと同様に削減される。

30

【0133】

そして、ハブ本体C T及びシリンジ60は、流体の中心分配ハブの一部であると見なされ、これらは、以降中心ハブと呼ばれ、参照符号C Hで示される。

【0134】

図12からも分かるように、この中心ハブC Hは：
 ・マイクロチャンネルC 7を介して、弁V 7により排気物容器W S Tに対して；
 ・マイクロチャンネルC 11、C 11a、C 12、C 12aを介して、弁V 11、V 12により増幅チャンバAMP 1、AMP 2に対して；
 ・マイクロチャンネルC 6、C 8、C 15a、C 16a、C 15、C 16、C 15b、C 16bを介して、弁V 6、V 8により検出チャンバH Y B 1、H Y B 2に対して、流体を送出又は注入することもできる。

40

【0135】

マイクロ流体カートリッジの一実施形態では、廃棄物容器又は検出チャンバに結合された弁は、ハブ接続マイクロチャンネルに位置しておらず、従って、カム駆動アクチュエータとは独立の線形アクチュエータによって作動される。

【0136】

図2及び図6に示されているように、マイクロ流体カートリッジ1のカートリッジカバー30は、異なる機能容積部T 2、T 4、T 5、T 9、T 10、W S T、AMP、DETを閉じるようにカートリッジ本体20内に挿入されて、その第2の縁23に支持される。

【0137】

50

カートリッジプレート 10 及びカートリッジ本体 20 のように、カートリッジカバー 30 は、熱可塑性ポリマー材料、例えば、ポリプロピレン (P P) の射出成形によって有利に形成される。

【 0 1 3 8 】

一変形態態として、カートリッジカバーは、熱可塑性ポリマー材料、例えば、特にポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリメチル - メタクリレート (P M M A)、ポリジメチル - シロキサン (P D M S)、ポリ塩化ビニル (P V C) を含む群から選択される環状オレフィンコポリマー (C O C) 又は環状オレフィンポリマー (C O P) などの射出成形によって形成することができる。

【 0 1 3 9 】

カートリッジカバー 30 は、各機能容積部 T 2、T 4、T 5、T 9、T 10 の高さに通気孔 32 を備え、これにより、中心ハブ C H のこれらの容積部での流体の吸入及び注入が可能となる。

【 0 1 4 0 】

組み立てられた構成 (図 1) では、サンプル S の分析のためのマイクロ流体カートリッジ 1 の使用の前は、カートリッジカバー 30 は、マイクロ流体カートリッジ 1 の輸送又は保存中に機能容積部 T 2、T 4、T 5、T 9、T 10 の内容物を保護するために、通気孔 32 の全てをしっかりと覆う保護フィルム 31 を有する。この保護フィルム 31 は、例えば、プラスチック又は金属 (例えば、アルミニウム) の薄いシートから形成することができる。

【 0 1 4 1 】

一実施形態では、マイクロ流体カートリッジは、カートリッジ本体とカートリッジカバーとの間に半透膜をさらに備え得る。この半透膜は、一側に疎水性層を備え、そして他側に、カートリッジ本体の第 2 の縁にこの膜を密封するための接着層を備える。

【 0 1 4 2 】

半透膜は、G O R E T E X (商標) 生地として機能し、且つ空気は通過させるが機能容積部からの液体の漏れを防止するように構成されている。従って、この半透膜により、マイクロ流体カートリッジの様々な機能容積部の通気が可能となる。

【 0 1 4 3 】

図 1 及び図 2 に示されているように、マイクロ流体カートリッジ 1 はまた、ここでは 2 つの管 40、50 も備え、これら管 40、50 はそれぞれ、カートリッジ本体 20 の管 T 1 及び管 T 3 に押し込まれることによって、その使用中にマイクロ流体カートリッジ 1 に組み付けられる。

【 0 1 4 4 】

サンプル S を含む第 1 の管 40 は、円筒形の本体 42、この管の一侧にある本体 42 を閉じるキャップ 41、この管の反対側に位置する終端開口 43 を備える (図 3 を参照) サンプル管である。キャップ 41 は、空気は通過させるが液体を保持する半透膜を備え得る。

【 0 1 4 5 】

本出願で例示される実施形態によると、終端開口 43 は、ここでは、使い捨てインクカートリッジの技術と同様の技術に従ってプラスチックビーズ 44 によって閉じられる。

【 0 1 4 6 】

特に、サンプル管 40 を受容するようになっている容器 T 1 は、プラスチックビーズ 44 を押して、サンプル管 40 の内容物の流出を防止するブロック位置からこのプラスチックビーズ 44 を移動させるように設計された吸入ヘッドを備える。

【 0 1 4 7 】

一変形態態では、サンプルは、吸入ヘッドを備えていない管を使用することによって、又は微量ピペット若しくはシリンジを用いてサンプルを専用容器内に移すことによって容器に直接注入することができる。

【 0 1 4 8 】

10

20

30

40

50

加えて、サンプル管 40 は、サンプル S 又はこのサンプル S の副産物からの多量の大きい粒子がマイクロ流体ネットワークに進入するのを制限するように管 40 の本体 42 内に配置された充填部材 45 も備える。

【0149】

第 2 の管 50 は、増幅反応用の混合物を含む管であり、増幅ミックス管と呼ばれ、第 1 の管 40 と同様の形状を有し、且つ本体 51、カバー 52、及び同様に閉止ビーズ（不図示）を有する末端部 53 を備える。

【0150】

上記のマイクロ流体カートリッジ 1 は、部分断面図が図 13 に示されているドッキングステーション 1000 に挿入されるようになっている。

10

【0151】

図 13 に示されている実施形態では、ドッキングステーション 1000 は、回転運動カム駆動アクチュエータ 1100 を備える。

【0152】

より正確には、カム駆動アクチュエータ 1100 は、ここでは回転軸 A1 を中心とする環状円柱部 1121 であるカム 1120（図 15 を参照）を備え、このカム 1120 は、実質的に平面で互いに平行な第 1 の面 1121A 及び第 2 の面 1121B、並びに中心開口 1123 を有する。

【0153】

有利なことに、カム 1120 は、その第 1 の面 1121A に、円柱部 1121 の半径方向に沿って延在する直線カム凹部 1124 を備える。環状部 1121 の周囲に沿っていると見なされるこのカム凹部 1124 の形状は、ここでは湾曲し、カム凹部 1124 の底部に曲率半径 R_c を有する。

20

【0154】

カム駆動アクチュエータ 1100 は、平面ガイドプレート 1110（図 13 及び図 14 を参照）も備え、ここでは、円形に配置されてこのガイドプレート 1110 を垂直に貫通する 10 の円柱孔 1111 が穿孔されている。これらのガイド孔 1111 は、カム駆動アクチュエータ 1100 の 10 の作動ボール 1102（1 つの作動ボール 1102 のみが示されている図 13 を参照）をガイドするようになっており、このような作動ボールは、前記ガイド孔 1111 の壁を過度に擦らずにこのガイド孔 1111 内をスライドできるように調整されたボール直径を有する。

30

【0155】

図 13 に示されているように、回転運動カム駆動アクチュエータ 1100 のガイドプレート 1110 は、作動ボール 1102 がカム 1120 の第 1 の面 1121A に支持されるようにこのカム 1120 の上に位置している。

【0156】

加えて、円柱孔 1111 の半径、従って作動ボールの直径は：

- ・作動ボール 1102 がカム 1120 の第 1 の面 1121A の平面部分に支持される場合（図 13 の場合）は、作動ボール 1102 が、その対応する円柱孔 1111 によって所定の位置に維持されてガイドプレート 1110 から上方に延出し；

40

- ・作動ボール 1102 がカム 1120 の環状部 1121 のカム凹部 1124 に支持される場合は、作動ボール 1102 が、その対応する円柱孔 1111 によってガイドされてガイドプレート 1110 から下方に延出するように、ガイドプレート 1110 の厚さに対して調整される。

【0157】

従って、カム 1120 が回転軸 A1 を中心に回転運動すると、作動ボール 1102 が、前記回転軸 A1 に平行に移動し、この作動ボール 1102 は、対応する円柱孔 1111 により、カム 1120 から離れる方向に移動してこの作動ボール 1102 が円柱孔 1111 から突き出た係合位置と、この作動ボール 1102 がカム 1120 に近づく方向に移動した係合解除位置との間でガイドされる。

50

【 0 1 5 8 】

図 1 5 に示されている好ましい実施形態では、カム 1 1 2 0 が 1 つのカム凹部 1 1 2 4 のみを備える場合、最大でも 1 つの作動ボール 1 1 0 2 しか係合解除位置にすることができず、他の作動ボール 1 1 0 2 は係合位置にある。

【 0 1 5 9 】

図 1 3 に示されているように、カムアクチュエータ 1 1 0 0 は、作動ボール 1 1 0 2 及び第 1 のガイドプレート 1 1 1 0 に類似した別のガイドプレート 1 1 3 0 の上にそれぞれ位置する一連の 1 0 のプランジャ 1 1 0 1 を備え、このガイドプレート 1 1 3 0 は、プランジャ 1 1 0 1 の移動をガイドするように同様に穿孔されている。

【 0 1 6 0 】

カム駆動アクチュエータ 1 1 0 0 では、円柱孔 1 1 1 1、作動ボール 1 1 0 2、及びプランジャ 1 1 0 1 が円形に配置されている。

【 0 1 6 1 】

本発明によるマイクロ流体カートリッジ 1 では、1 0 の弁 V 1 ~ V 1 0 が、外部のカム駆動アクチュエータ 1 1 0 0 によって機械的に一緒に作動されるように配置されている。

【 0 1 6 2 】

より正確には、中心ハブ C H に接続されたマイクロチャネル C 1 ~ C 1 0 の弁 V 1 ~ V 1 0 は、プランジャ 1 1 0 1 が弁 V 1 ~ V 1 0 のそれぞれの反対側にくるように円形に配置されている。

【 0 1 6 3 】

このように配置されると：

- ・作動ボール 1 1 0 2 が係合位置にあると（図 1 3 の場合）、作動ボール 1 1 0 2 が、対応するプランジャ 1 1 0 1 も係合位置に配置し、プランジャ 1 1 0 1 が、弁 V 1 の弁座 R 1 の反対側のカートリッジプレート 1 0 の第 1 のフィルム 1 1 に圧力を加え、これにより第 1 のフィルム 1 1 が変形して貫通孔 H 1 が密封されて弁 V 1 が閉じ、且つ

- ・逆に、作動ボール 1 1 0 2 が係合解除位置にあると、プランジャ 1 1 0 1 も係合解除位置に移動し、プランジャ 1 1 0 1 がカートリッジプレート 1 0 の第 1 のフィルム 1 1 に一切圧力を加えず、これにより第 1 のフィルム 1 1 が、弁 V 1 の弁座 R 1 の反対側に支持されて弁 V 1 が開くことを理解されたい。

【 0 1 6 4 】

従って、上記から分かるように、カム駆動アクチュエータ 1 1 0 0 は、マイクロ流体カートリッジ 1 がドッキングステーション 1 0 0 0 に挿入されて、このマイクロ流体ステーション 1 がカム駆動アクチュエータ 1 1 0 0 によって作動されると、最大でも弁 V 1 ~ V 1 0 の 1 つしか同時に開けることができないことを理解されたい。

【 0 1 6 5 】

図示されていないが、図 1 3 に示されている実施形態におけるドッキングステーション 1 0 0 0 は、中心ハブ C H のシリンジ 6 0 をハブ本体 C T に対して入出させるためのスライド手段も備える。

【 0 1 6 6 】

これらのスライド手段は、例えば、シリンジ 6 0 のプランジャ 6 2、及びこのプランジャ 6 2 を上下させるための平坦部 6 3 の下にある、シリンジ 6 0 のプランジャ 6 2 を捕捉するフォーク形レバーを備え得る。

【 0 1 6 7 】

加えて、既に分かっているように、ドッキングステーション 1 0 0 0 は：

- ・ 2 つのハイブリダイゼーションチャンバ H Y B 1、H Y B 2 に接触しているバイオチップ 1 1 0 を励起するための光励起手段、及び

- ・ マイクロ流体カートリッジ 1 によって分析されるサンプル S 中で探される少なくとも 1 つの核酸を表す、ハイブリダイゼーションチャンバ H Y B 1、H Y B 2 から放射される光シグナルを検出するための光検出手段も備える。

【 0 1 6 8 】

10

20

30

40

50

検出バイオチップ110が使用されるこの実施形態では、標的分子とプローブとの間の相互作用の検出及び定量が、光検出用のデバイスで行われる：第1の波長の光放射は、標的分子に連結された発色団を励起する。次いで、この励起光に反応して第2の波長で発色団によって放射される光が、集光デバイスによって収集される。

【0169】

また、本マイクロ流体カートリッジ1、そしてバイオチップ110の測定値が、光励起型接触イメージングに反応して発色団によって放射される光を収集するシステムに適していることが特に有利である。

【0170】

マイクロ流体カートリッジ1は、光接触イメージングを測定するための装置内に配置されるようになっており、考えることができる。このような接触イメージングデバイスは、特に国際公開第2004042376号パンフレット、同第2004068124号パンフレット、同第2007045755号パンフレット、同第2010007233号パンフレット、同第2012089987号パンフレットに記載されている。

10

【0171】

有利なことに、基板100は透明である。

【0172】

バイオチップ110の蛍光による標的核酸の検出の場合は、バイオチップ110の基板は、その表面に固定された、第1の励起波長の光を吸収して第2の波長伝送の光を放射する蛍光物質を含み得、且つ励起光の量に基づいて光放射の量の効率を高めるための手段を含むことが有利であり得る。

20

【0173】

ここで、マイクロ流体カートリッジ1の機能容積部T1内に挿入されるサンプル管40（図2を参照）内に含まれるサンプルSを分析するために操作者によって実施される方法を説明する。

【0174】

診断装置によって行われる作業手順は、次のステップを含み得る：

- ・溶解されたサンプルからのDNAの抽出及び精製
- ・限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素PCR、及び等温増幅を含む任意の増幅法を用いたDNAの増幅；
- ・最大でSNP識別レベルまでマーカを区別するための特異性の高いプローブ（例えば、Hair Loop（商標）プローブ）又は標準的な線形プローブを用いたマイクロアレイでのハイブリダイゼーション
- ・例えば、国際公開第2004042376号パンフレット、同第2004068124号パンフレット、同第2007045755号パンフレット、同第2010007233号パンフレット、同第2012089987号パンフレットに記載されている、ドッキングステーションに組み入れられた接触イメージングデバイスを優先的に可能にする蛍光組み込みリーダーを用いて蛍光標識することによるハイブリダイゼーションの検出。

30

【0175】

一実施形態では、前溶解ステップが、サンプルのカートリッジへの注入の前に行われる。

40

【0176】

溶解緩衝液及び/又は試薬を、カートリッジへの注入の前にサンプルに添加することができ、且つ/又は凍結乾燥ペレットとしてカートリッジの1つの機能容積部で保存することができる。

【0177】

サンプルは、溶液又は懸濁液であり得、特に、サンプルは、体液、例えば、便、全血、血漿、血清、尿、痰、唾液、精液、粘液、及び脳脊髄液であり得る。サンプルはまた、液体に溶解又は懸濁される固体であっても良い。

【0178】

50

本発明によって意図される核酸とは、任意の構造（一本鎖又は二本鎖DNA）のあらゆる合成又は天然の核酸のことである。

【0179】

本発明の一部の実施形態では、標的核酸は、典型的には、分析するためにウイルス核酸がサンプルで探される場合、サンプル中でRNAの形態であり得ることに留意されたい。このような実施形態では、核酸は、RT-PCRにかけることができる。

【0180】

この分析方法の主なステップは、複数の機能領域を有するマイクロ流体カートリッジ1の機能容積部で行われ、これらの機能領域は、少なくとも：

- ・分析するためにサンプルSから特定の核酸を抽出するように設計された異なる機能容積部を有するサンプル調製領域；
- ・サンプルS中に含まれる核酸の増幅を行うように構成された機能容積部を有する核酸増幅領域（様々な実施形態によると、この核酸増幅領域は1つ以上の増幅チャンバを有する）；
- ・典型的には機能容積部T9及びT10を有する核酸分析領域（様々な実施形態によると、この核酸分析領域は1つ以上の検出チャンバを有する）；及び
- ・廃棄物用に設計された機能容積部WSTを有する廃棄物領域を含む。

【0181】

上記の好ましい実施形態では、異なる機能領域は次の通りである：

- ・サンプル調製領域は、サンプル管40、増幅ミックス管50、それぞれ精製カラム、第1のDNA洗浄緩衝液、及び第2のDNA洗浄緩衝液を有する3つの機能容積部T2、T4、T5を含み；
- ・核酸増幅領域は、2つの増幅チャンバAMP1、AMP2を含み；
- ・核酸検出領域は、それぞれハイブリダイゼーション用緩衝液及びハイブリダイゼーション洗浄緩衝液を有する2つの機能容積部T9及びT10を含む。

【0182】

従って、図1及び図2を参照して上で説明されたマイクロ流体カートリッジ1の実施形態によると、サンプル調製領域及び廃棄物領域は、1つ以上のハブ接続マイクロチャネル及び1つ以上のカム駆動作動弁によって流体分配の中心ハブCHに直接流体接続される。核酸検出領域は、任意選択で、1つ以上のハブ接続マイクロチャネル（C15及びC16）によって中心ハブCHに直接流体接続することができる。

【0183】

さらに、図1及び図2を参照して説明されたマイクロ流体カートリッジ1の実施形態では、増幅領域は、中心ハブCHに直接は接続されておらず、この領域、特に各増幅チャンバとの流体接続は、線形アクチュエータによって作動される少なくとも1つの弁によって制御される。

【0184】

上で説明されたように、シリンジ60によって中心管CTに係合した中心ハブCHは、この中心ハブCHを通過させることによって流体を複数の機能領域の第1の機能領域から第2の機能領域に移送することができる。

【0185】

異なる機能領域がマイクロ流体カートリッジ1に配置される方式では、前記第2の機能領域は、前記第1の機能領域と同一又は異なり得る。

【0186】

さらに、分析方法の以下の説明から、サンプルSを分析するために複数の機能領域がどのように互いに協働するかを理解されよう。

【0187】

ステップ(a)

第1のステップ（ステップa）では、操作者が、マイクロ流体カートリッジ1のサンプル調製領域の少なくとも1つの機能容積部、即ち、ここではマイクロ流体カートリッジ1

10

20

30

40

50

に挿入されるサンプル管 40 に生物学的サンプル S を供給する。

【0188】

開始時に、サンプル管 40 は、溶解緩衝液を既を含み得る。殆どの細胞の破壊は、カオトロピック塩、洗浄剤、又はアルカリ変性によって行うことができる。サンプル S の溶解は、典型的には、サンプル S をサンプル管 40 に注入するときこの管 40 に既に存在する溶解緩衝液及びプロテイナーゼ K 緩衝液によって行われる。

【0189】

マイクロ流体カートリッジ 1 がドッキングステーション 1000 に挿入されたら、サンプル S を、数分間インキュベートし、化学的溶解によって細胞膜を完全に破壊する。プロテイナーゼ K 緩衝液は、タンパク質細胞成分の消化を終了させる。

10

【0190】

別の実施形態では、溶解緩衝液及び試薬（例えば、プロテイン K 緩衝液）を、凍結乾燥ペレットとしてカートリッジの機能容積部内で保存することもできる。

【0191】

別の実施形態では、サンプルが処理が困難な基質又は微生物を含む場合、サンプル調製管のマイクロ流体カートリッジへの挿入の前に次のステップが必要であろう：

- ・例えば、特定の細胞破壊緩衝液と共にバッシングビーズ（bashing bead）を用いるサンプルの溶解；
- ・最大 70 での数分間、例えば、5 分間のボルテックス及び加熱；
- ・サンプル調製管への結合緩衝液の添加、及び場合によっては、増幅阻害物質の吸収を可能にする試薬、例えば、InhibitEX Matrix も添加。

20

【0192】

ステップ（b）

サンプル S を、典型的には精製カラム T2 中に存在する試薬に接触させる。

【0193】

このために、カム駆動アクチュエータ 1100 を、ドッキングステーション 1000 によって回転させて、弁 V1 及び V2 を以下の方式で連続的に作動させる位置にする：

- ・弁 V1 を開けて弁 V2 を閉じる：溶解サンプル S をサンプル管 40 から中心管 CT にポンピングするために、シリンジ 60 のプランジャ 62 を、ドッキングステーション 1000 のフォーク形レバーによって中心管 CT から抜き出す；
- ・弁 V1 を閉じて弁 V2 を開ける：溶解サンプル S を中心管 CT から精製カラム T2 に注入するために、シリンジ 60 のプランジャ 62 を、ドッキングステーション 1000 のフォーク形レバーによって中心管 CT に差し込む。

30

【0194】

精製カラム T2 は、DNA 結合のためのシリカ様膜を含み得る。

【0195】

様々な実施形態によると、精製カラムは、例えば、DNA の結合及び濃縮のためにゲル、ビーズ、又は濾紙を含み得る。例示目的として、アガロースゲル、シリカビーズ、及び濾紙、例えば、セルロースをベースとする精製も、本発明に従って使用することができる。

40

【0196】

結合が完了したら、サンプル S を、精製カラムから再び吸引し（弁 V2 が開）、弁 V7 が開いた状態で中心ハブ CH を介して排気物領域に入れ、DNA は、精製カラム T2 によって保持される。

【0197】

ステップ（c）

このステップでは、ステップ（b）から得られる産物を、阻害物質を除去して DNA を精製するために洗浄することによって回収する。

【0198】

本出願で例示される実施形態では、精製カラム T2 の結合膜を、機能容積部 T4、T5

50

に含められた1つ以上、典型的には2つのDNA洗浄緩衝液によって連続的に洗浄する。

【0199】

このために、第1に、弁V4を、カム駆動アクチュエータ1100によって開けて(他の全ての弁は閉)、機能容積部T4に含められた第1のDNA洗浄緩衝液を中心ハブCHによって送出し、次いで弁V2を開け(従って弁V4は自動的に閉じられる)、中心ハブCHが、第1のDNA洗浄緩衝液を精製カラムT2に注入する。

【0200】

第2に、機能容積部T5に含められた第2のDNA洗浄緩衝液で同じ作業を繰り返す(弁V2が閉/弁V5が開、そして弁V2が開/弁V5が閉)。

【0201】

第3に、結合膜に結合されたDNAを、溶出緩衝液によって溶出する。増幅ミックス管T3に含められた増幅ミックス液を、溶出緩衝液として使用することができる。このために、ドッキングステーション1000のカム駆動アクチュエータ1100の回転によって弁V2を閉じて弁V3を開け、これにより中心ハブCHが増幅ミックス液を中心管CTに吸引し;次いで、弁V3を閉じて弁V2を開け、そしてシリンジ60を中心管CTに入れ、これにより中心ハブCHがPCR混合液を精製カラム20に注入する。

【0202】

ステップ(c)の最後で、単離されたDNAサンプルが得られる。

【0203】

ステップ(d)

溶出後、単離されたDNAサンプル増幅ミックスを、増幅のために2つの増幅チャンバAMP1、AMP2に移す。

【0204】

このために、単離されたDNAサンプルを、精製カラムT2(まだ弁V2が開いている)から中心管CTにポンピングする。

【0205】

次いで、全ての弁V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7、V8、V9、V10を、カム駆動アクチュエータ1100の動作によって閉じる。

【0206】

2つの標準的な線形アクチュエータによって独立に作動される、マイクロ流体カートリッジ1の弁V11、V12を開けて、単離されたDNAサンプルが、マイクロチャンネルC11、C11a、C12、C12aを介して2つの増幅チャンバAMP1、AMP2に移動できるようにする。

【0207】

一部の実施形態では、前記増幅チャンバに注入されるべき正確な量を調整するために、単離されたDNAサンプル増幅ミックスを、各増幅チャンバ(AMP1及びAMP2)に移送する前に計量チャンバに移送する。

【0208】

ステップ(e)

このステップでは、核酸増幅領域の弁V11、V12が閉じられた後に、単離されたDNAサンプルを増幅のために試薬に接触させる。

【0209】

ステップ(f)

増幅チャンバAMP1、AMP2でのDNAの増幅を、最大20マーカの非常に良好な感度及び特異性を達成する従来技術の標準的な増幅プロトコル(典型的には、限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素PCR、及び等温増幅を含む任意の増幅法)によって行う。

【0210】

各増幅チャンバAMP1、AMPにおいて、プライマーの別個のセットは、典型的には、製造プロセス中に固定される。増幅チャンバAMP1、AMP2を、典型的には、DN

10

20

30

40

50

A 鋳型の効率的な増幅に最適な濃度でポリメラーゼ、ヌクレオチド、及び反応緩衝液を含むすぐに使用できる溶液で満たしてから、これらのプライマーを再懸濁する。

【0211】

このステップの最後に、増幅されたDNAサンプルが得られる。

【0212】

ステップ (g)

このステップでは、機能容積部V10に含められたハイブリダイゼーション緩衝液を中心ハブCHを介して2つのハイブリダイゼーションチャンバ(検出チャンバと呼ぶこともできる)HYB1、HYB2に移す。

【0213】

このために、弁V10を、ドッキングステーション1000の回転運動カム駆動アクチュエータ1100によって開けて(他の全ての弁V1~V9は閉じられている)、中心管CTに移送する。

【0214】

次いで、必要に応じてハイブリダイゼーションチャンバHYB1、HYB2のハイブリダイゼーション緩衝液での事前充填に進むために、弁V6及びV8を連続的に開けることができる。

【0215】

増幅チャンバの弁を開けて、増幅液を、ハイブリダイゼーションチャンバHYB1、HYB2に押し込む。

【0216】

次いで、(典型的には、独立に作動される)弁V13、V14が開くと、増幅されたDNAサンプルが、2つの機能領域、即ち、核酸増幅領域及び核酸ハイブリダイゼーション領域を直接接続する領域接続マイクロチャンネルC13、C15B、C14、C16bを介してハイブリダイゼーションチャンバHYB1、HYB2に流れ、ハイブリダイゼーション緩衝液に接触する。

【0217】

次いで、弁V13、V14を最終的に閉じる。

【0218】

ステップ (h)

このステップでは、例えば、ハイブリダイゼーション、結合、又はプローブへの連結によって相補的な配列が、固定されたプローブに結合できるように、サンプルを親和性センサ(例えば、バイオチップ)に接触させる。非結合材料が除去されると、結合した配列の検出及び測定が可能となる。

【0219】

典型的には、このステップでは、増幅されたDNAサンプルが、数分、例えば、約30分の間に、ハイブリダイゼーションチャンバHYB1、HYB2でハイブリダイズする。ハイブリダイズしたDNAの回収を、機能容積部T9に含められたハイブリダイゼーション洗浄緩衝液を中心ハブCHを介してハイブリダイゼーションチャンバHYB1、HYB2に移すことによって行う。従って、ハイブリダイズしたDNAサンプルが得られる。

【0220】

分析方法の一変更形態では、ハイブリダイゼーションの最後のDNA溶解手順を追加することができ、検出特異性が高まるであろう。

【0221】

ステップ (i)

このステップでは、マイクロアレイ画像を得て分析する。従って、以下の段落によると、ハイブリダイゼーションチャンバを検出チャンバと呼ぶこともできることに留意されたい。

【0222】

標的核酸とプローブとの間の相互作用の検出を、光検出デバイスによって行う。局在ハ

10

20

30

40

50

イブリダイゼーションを、発色シグナルの放射によって検出する。本明細書では、「発色シグナル」は、適切な光源による励起後又は化学変換若しくは酵素変換後に直接又は間接的に放射される任意の光シグナルであることを理解されたい。従って、発色シグナルの範疇には、比色シグナル、光輝シグナル、蛍光シグナル、化学発光シグナル、又は生物発光シグナルなどが含まれる。このようなシグナルは、目的の分子によって直接放射される、又は目的の分子に付加及び/又は接合された検出可能な要素（標識）によって放射される。

【 0 2 2 3 】

従って、蛍光リーダーにより、バイオチップ表面の蛍光画像を得ることが可能となる。このために、バイオチップを、標的分子をマーキングするフルオロフォアの励起波長で光源によって照らし、適合された光学系が、フルオロフォアの放射波長でバイオチップの蛍光画像を形成する。この画像の各点の光強度は、バイオチップの対応する点に存在するフルオロフォアの量に関連し、このフルオロフォアの量自体は、ハイブリダイゼーション段階中にその場所に選択的に付着された標的分子の数に比例し、このため、サンプルの核酸含量についての情報（多くの場合、定量的）を収集することが可能となる。シグナルの検出は、優先的に、例えば、文献、米国特許第 7, 3 0 6, 7 6 6 号明細書、仏国特許第 2 9 3 2 8 8 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 2 0 1 8 9 9 号明細書、国際出願 P C T / F R 2 0 1 1 / 0 5 3 2 0 8 号明細書に記載されている小型読み出し光学系を形成する接触イメージングによって達成される。

【 0 2 2 4 】

次いで、生物学的サンプルの分析について、マイクロアレイ画像及び診断レポートの自動分析が行われる。

【 0 2 2 5 】

部品の形状、材料、組み立て方法、及び互いに対する部品の構成の変形形態を含む多数の異なる構成が、本発明の範囲内で可能である。上の記載は、本発明の 1 つの可能な実施形態を例示及び説明することを意味し、変更形態の可能な範囲を限定すると解釈すべきではない。

【 0 2 2 6 】

例えば、図 1 6 に例示されている実施形態では、マイクロ流体カートリッジは、カートリッジプレート 2 0 1 0 を備える。

【 0 2 2 7 】

マイクロ流体カートリッジのカートリッジプレート 2 0 1 0 は、ここでは、複数の 1 2 の弁 V V 1、V V 2、V V 3、V V 4、V V 5、V V 6、V V 7、V V 8、V V 9、V V 1 0、V V 1 1、V V 1 2 を備え、各弁 V V 1、V V 2、V V 3、V V 4、V V 5、V V 6、V V 7、V V 8、V V 9、V V 1 0、V V 1 1、V V 1 2 は、流体の中心分配ハブ C H に接続されたマイクロチャネル C C 1、C C 2、C C 3、C C 4、C C 5、C C 6、C C 7、C C 8、C C 9、C C 1 0、C C 1 1、C C 1 2 上に位置している。

【 0 2 2 8 】

この変更形態では、これらの 1 2 の全ての弁 V V 1、V V 2、V V 3、V V 4、V V 5、V V 6、V V 7、V V 8、V V 9、V V 1 0、V V 1 1、V V 1 2 は、外部カム駆動アクチュエータによって機械的に作動されるようにするために、カートリッジプレート 2 0 1 0 に円形 C R（図 1 6 を参照）に配置されている。

【 0 2 2 9 】

カートリッジプレート 2 0 1 0 はまた、例えば、サンプル調製領域から核酸増幅領域 A M P 1、A M P 2 及び核酸分析領域 H Y B 1、H Y B 2 に流体を移送するために、独立した線形アクチュエータによって作動させることができる 2 組の弁 V V 1 3、V V 1 4、V V 1 5、V V 1 6 も備える。

【 0 2 3 0 】

この実施形態では、典型的には、カートリッジは、中心 H U B と各増幅チャンバとの間に配置された計量チャンバを備える。前記計量チャンバは、弁 V V 8 及び弁 V V 1 4 を介

10

20

30

40

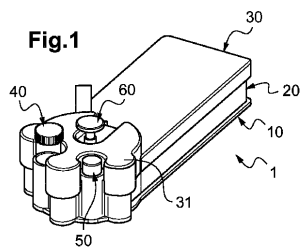
50

して前記増幅チャンバに接続することができる。典型的には、前記計量チャンバは、中心HUBにも接続される。加えて、前記計量チャンバは、マイクロチャンネルを介してハブ接続マイクロチャンネルの弁（例えば、弁VV9及び弁VV7）に直接接続することもできる。

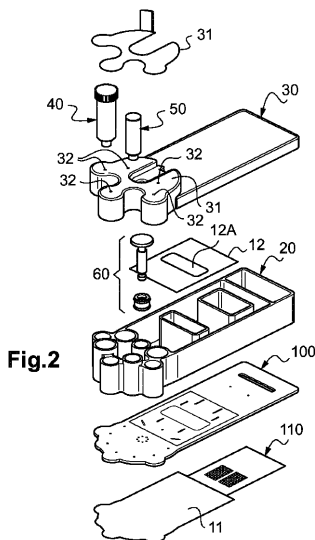
【0231】

当業者であれば、カートリッジプレート2010をマイクロ流体カートリッジの異なる機能容積部に適合させるために、マイクロ流体カートリッジの他の要素、例えば、カートリッジ本体及びカートリッジカバーを適合させることができるであろう。

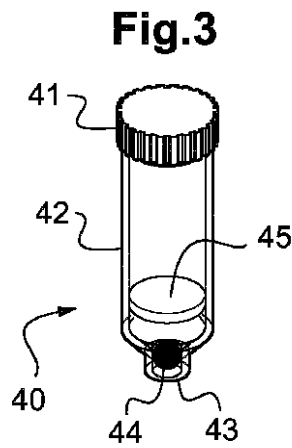
【図1】



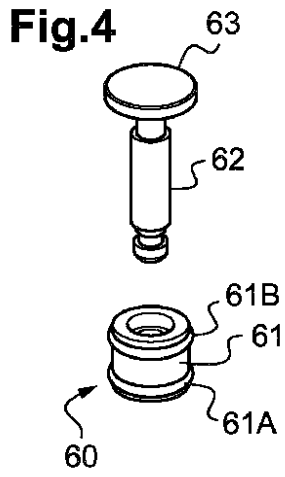
【図2】



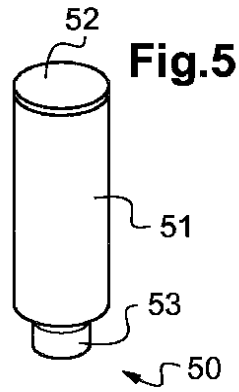
【図3】



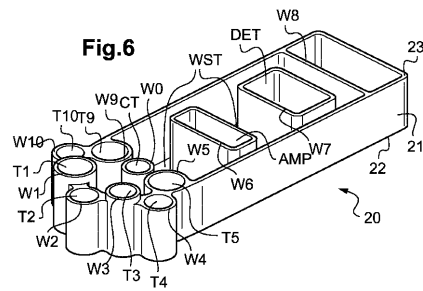
【 図 4 】



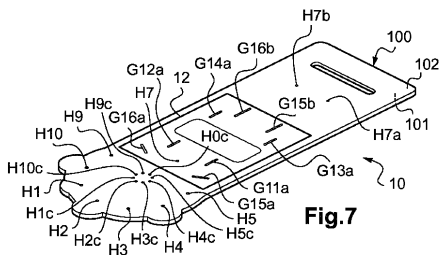
【 図 5 】



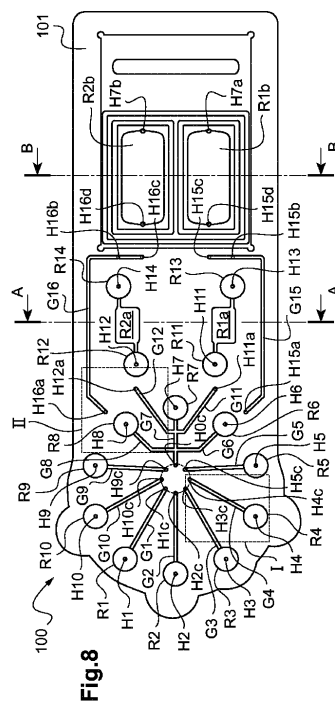
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 8 A 】

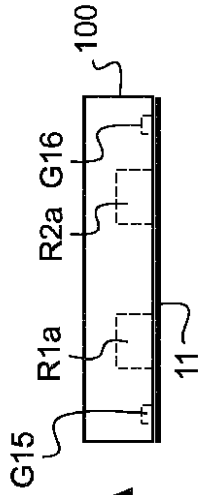


Fig.8A

【 8 B 】

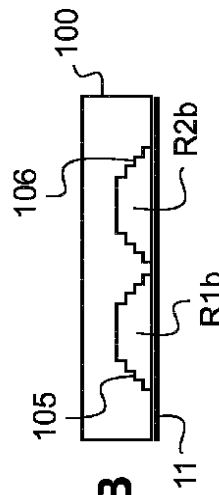
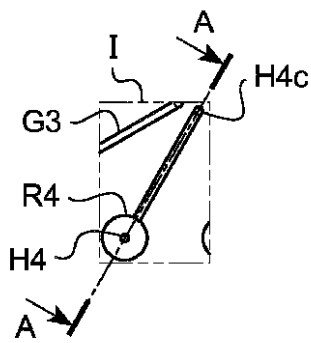


Fig.8B

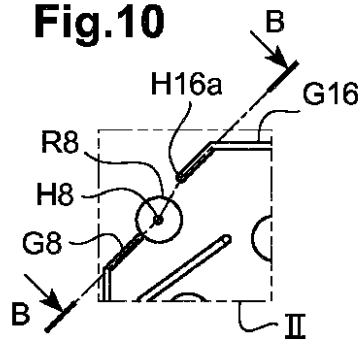
【 9 】

Fig.9



【 1 0 】

Fig.10



【 9 A 】

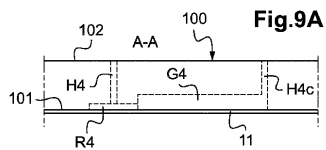
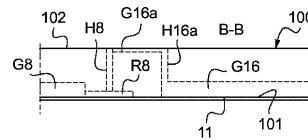


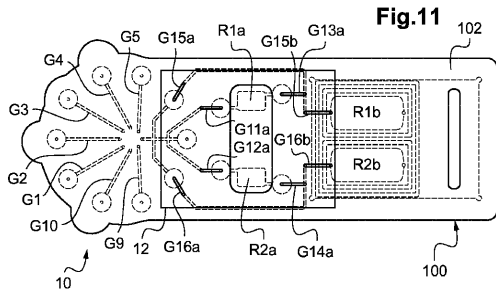
Fig.9A

【 1 0 A 】

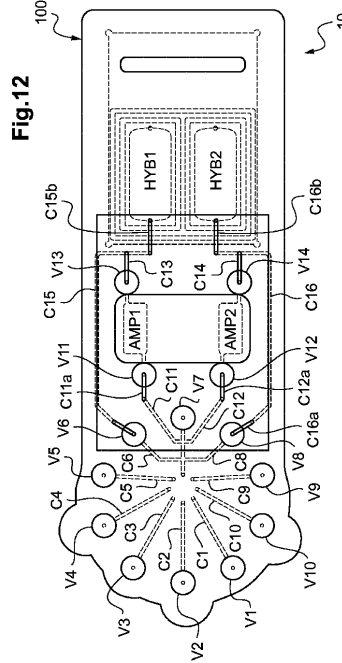
Fig.10A



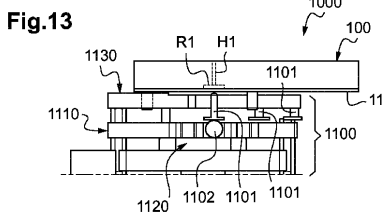
【 図 1 1 】



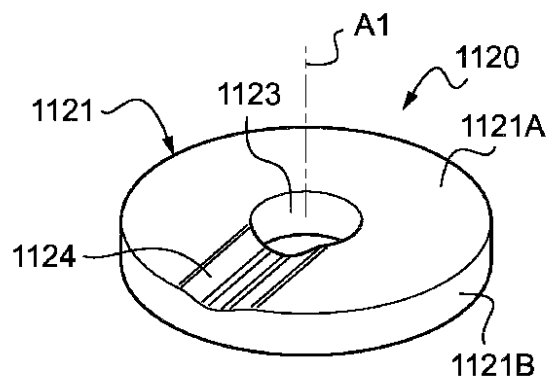
【 図 1 2 】



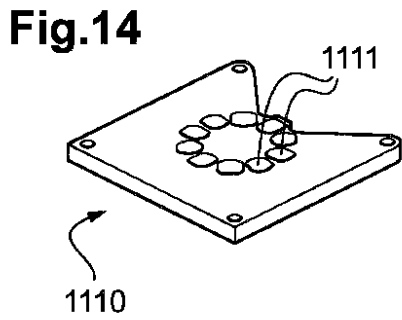
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】

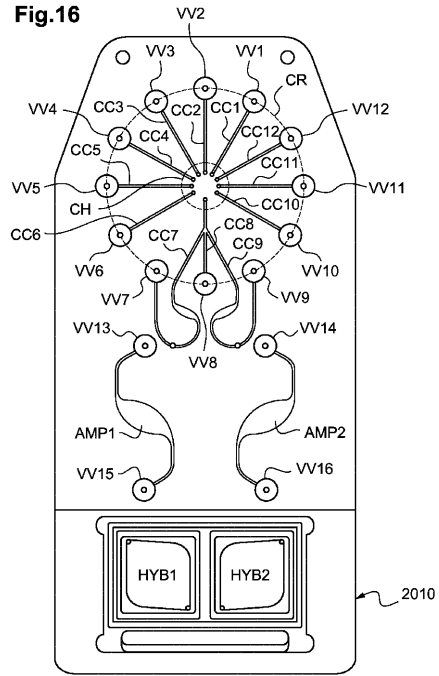


【 図 1 4 】



【 図 16 】

Fig.16



フロントページの続き

- (72)発明者 アルティエーグ, マルク
フランス国, エフ 77123 ノワジー・シュル・エコール, ルート・デ・グランド ヴァレー
49
- (72)発明者 ル マスネ, カンタン
フランス国, エフ 38000 グルノーブル, ブルヴァール マレシャル ルクレール 16
- (72)発明者 マルク, ケヴィン
フランス国, エフ 92100 ブローニュ・ビヤンクール, ルー・デュ・ドーム 52

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 米国特許第5863502(US, A)
特表2011-501665(JP, A)
特表2009-524054(JP, A)
特表2003-500674(JP, A)
特表2008-539757(JP, A)
米国特許出願公開第2013/0157349(US, A1)
特表2009-525728(JP, A)
米国特許第4522622(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-3/10
G01N 35/
G01N 37/
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)