

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6514105号
(P6514105)

(45) 発行日 令和1年5月15日(2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月19日(2019.4.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q 1/6844 (2018.01)

C 12 Q 1/6844 Z N A Z

C 12 Q 1/6886 (2018.01)

C 12 Q 1/6886 Z

C 12 Q 1/68 (2018.01)

C 12 Q 1/68

請求項の数 24 (全 82 頁)

(21) 出願番号	特願2015-527512 (P2015-527512)
(86) (22) 出願日	平成25年8月12日 (2013.8.12)
(65) 公表番号	特表2015-533079 (P2015-533079A)
(43) 公表日	平成27年11月19日 (2015.11.19)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/054517
(87) 國際公開番号	W02014/028378
(87) 國際公開日	平成26年2月20日 (2014.2.20)
審査請求日	平成28年8月8日 (2016.8.8)
(31) 優先権主張番号	61/682,707
(32) 優先日	平成24年8月13日 (2012.8.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/784,754
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94607-5200, オークランド, フランクリン ストリート 1111, 12番 フロア
(74) 代理人	100149294 弁理士 内田 直人
(72) 発明者	アバーテ, アダム アール. アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94114, サンフランシスコ, カストロ ストリート 297, アパートメント エー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生物学的成分を検出するための方法およびシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的ポリヌクレオチドの増幅方法であって、

(a) 試料由来のポリヌクレオチド含有成分を液滴に溶解して、溶解物液滴に溶解物を形成することであって、このとき前記ポリヌクレオチド含有成分を溶解することが、ポリヌクレオチド含有成分を、プロテアーゼ活性を有する酵素を含む溶解剤と接触させることを含み、前記溶解物が標的ポリヌクレオチドを含み、前記溶解物液滴が不混和な分散媒中にあること、

(b) 溶解物とプロテアーゼ活性を有する酵素とをラインから離した状態でインキュベートして、溶解物中の阻害性タンパク質を消化して溶解物中の阻害性タンパク質から標的ポリヌクレオチドを放出させること、

(c) 前記溶解物に、核酸増幅反応を実行するための試薬を添加して、増幅液滴に増幅混合物を形成することであって、このとき前記溶解物に核酸増幅反応を実行するための試薬を添加することが、前記溶解物を含む液滴と増幅試薬を含む液滴との融合を含まず、前記増幅液滴が不混和な分散媒中にあること、および

(d) 前記増幅液滴内で標的ポリヌクレオチドを増幅することを含み、

前記方法が、前記増幅液滴中で標的ポリヌクレオチドを増幅する前に、前記溶解物液滴または前記増幅液滴から、試薬を選択的に取り除くことを含まない、方法。

【請求項 2】

10

20

さらに、前記核酸増幅反応を実行するための試薬を添加する前に、プロテアーゼ活性を有する酵素を不活性化することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

さらに、前記溶解物に核酸増幅反応を実行するための試薬を添加する前に、プロテアーゼ活性を有する酵素を不活性化することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

溶解物とプロテアーゼ活性を有する酵素とを少なくとも 5 分間インキュベートすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

溶解物とプロテアーゼ活性を有する酵素とを少なくとも 20 分間インキュベートすることを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 6】

溶解物とプロテアーゼ活性を有する酵素とを少なくとも 37 の温度でインキュベートすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

溶解物とプロテアーゼ活性を有する酵素とを 37 ~ 60 の温度でインキュベートすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

酵素がプロテアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

酵素がプロテイナーゼ K である、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 10】

標的ポリヌクレオチドが RNA を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記核酸増幅反応を実行するための試薬を添加する前に前記溶解物を希釈することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

さらに、前記増幅液滴の増幅産物の存在を検出することであって、前記増幅産物の存在を検出することが、増幅産物の配列を決定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記溶解物が、単一細胞の溶解物を含む、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 14】

さらに、前記増幅液滴の増幅産物の存在を検出することであって、前記増幅することが、捕捉配列を含むプライマーの伸長を含み、前記増幅産物の存在を検出することが、増幅産物内の捕捉配列を検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 (a)、(b)、(c) および (d) のそれぞれの工程がマイクロ流体的制御の下で実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

標的ポリヌクレオチドの合成方法であって、

(a) 試料由来のポリヌクレオチド含有成分を液滴に溶解して、溶解物液滴に溶解物を形成することであって、このとき前記ポリヌクレオチド含有成分を溶解することが、ポリヌクレオチド含有成分を、プロテアーゼ活性を有する酵素を含む溶解剤と接触させることを含み、前記溶解物が鑄型ポリヌクレオチドを含み、前記溶解物液滴が不混和な分散媒中にあること、

(b) 溶解物とプロテアーゼ活性を有する酵素とをラインから離した状態でインキュベートして、溶解物中の阻害性タンパク質を消化して溶解物中の阻害性タンパク質から標的ポリヌクレオチドを放出させること、

(c) 前記溶解物液滴に、核酸合成試薬を添加して、不混和な分散媒に核酸合成液滴を形成すること、および

40

50

(d) 前記核酸合成液滴内で標的ポリヌクレオチドを合成することを含み、

前記プロテアーゼ活性を有する酵素が、前記核酸合成試薬を添加する前に不活性化される、方法。

【請求項 17】

鑄型ポリヌクレオチドが RNA を含み、前記核酸合成液滴内で標的ポリヌクレオチドを合成することが、RNA の逆転写を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記核酸合成液滴内で標的ポリヌクレオチドを合成することが、增幅を含む、請求項 16 に記載の方法。 10

【請求項 19】

前記溶解物が、単一細胞の溶解物を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

さらに、前記溶解物液滴に核酸合成試薬を添加する前に、酵素を不活性化することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

酵素がプロテアーゼである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

酵素がプロテイナーゼ K である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

さらに、前記核酸合成液滴の核酸合成産物の存在を検出することであって、前記核酸合成産物の存在を検出することが、核酸合成産物の配列を決定することを含む、請求項 16 に記載の方法。 20

【請求項 24】

前記核酸合成液滴が、0.001 ~ 1000 ピコリットルの体積である、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国仮特許出願第 61/682,707 号(2012 年 8 月 13 日出願)および米国仮特許出願第 61/784,754 号(2013 年 3 月 14 日出願)に対する優先権を主張し、それら出願は、その全体において、および全ての目的に対し、本明細書に参照により援用される。 30

【背景技術】

【0002】

対象から採取された生物学的試料は、しばしば多くの異なる成分を含有している。たとえば、対象の血液試料は、浮遊 DNA および浮遊 RNA、循環細胞、ならびに多くの他の成分を含有している可能性がある。生物学的試料中のそのような成分の数および多様性は多くの場合、たとえば癌等の対象における疾患の診断またはモニタリングを可能にする、試料内の目的の特定成分の正確な同定および / または定量を困難に、または阻害する。 40

【0003】

たとえば、循環腫瘍細胞 (CTC) は、対象の血流中に入り込んだ腫瘍から脱離した細胞である。いったん血中にいると、これらの細胞は対象の身体中を循環し、そこから他の組織へと侵入し、新たな腫瘍を形成することができる。ゆえに、CTC は、癌を有する対象の主要な死亡原因である、転移に関与している。CTC を計数しようと試みられているが、CTC は非常に検出し難いという事実により失敗に終わっている: CTC は非常に稀な存在であり、健常細胞との区別が非常に難しい。CTC 検出の最近のアプローチ法は、CTC の細胞表面上の特異的バイオマーカーを標的とする抗体を用いるイムノアッセイに依っている。しかしながら、そのような方法には感度および / または特異度の限界があり、それにより、多くの健常細胞が癌性細胞であると誤って特定され、多くの癌細胞が分析 50

において見過ごされてしまっている。

【発明の概要】

【0004】

生物学的試料から成分を検出するための方法が提示される。ある態様において、当該方法を用いて、生物学的試料（たとえば、腫瘍細胞（たとえば、循環腫瘍細胞、すなわちCTC等））中の特定の成分を検出および／または定量してもよい。本発明方法の実施における使用のためのシステムおよびデバイスもまた提示される。

【0005】

本発明の方法には、生物学的試料中の細胞（たとえば、腫瘍細胞）を検出するための方法が含まれる。マイクロ流体学を用いて、通常、直径 $0.1 \sim 1000 \mu\text{m}$ の範囲にある溶液の小さな球体であり、細胞、ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび他の成分の内包化に用いられる、微小液滴中へと生物学的試料を内包してもよい。各微小液滴中に内包化された成分を、本明細書に詳細に記述されるように分析してもよい。

10

【0006】

本方法の態様には、対象の血液試料から得た細胞を微小液滴中に内包化することが含まれ、ここで、少なくとも1つの細胞が、微小液滴中に存在し；細胞を溶解することが含まれ；ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試薬、検出成分および複数のPCRプライマーを微小液滴中へと導入し、PCR增幅が可能となる条件下で微小液滴をインキュベートし、PCR增幅産物を產生することが含まれ、ここで、複数のPCRプライマーには、1以上のオリゴヌクレオチド（たとえば、癌遺伝子）にハイブリダイズする1以上のプライマーが含まれ；および、検出成分の検出により、PCR增幅産物の存在または非存在を検出することが含まれ、ここで、検出成分の検出は、PCR增幅産物の存在を示唆する。ある態様において、細胞を溶解するステップには、溶解剤を微小液滴中に導入すること、および、細胞溶解に有効な状態の下で微小液滴をインキュベートすることが含まれる。当該方法には、PCR産物が検出された微小液滴の数に少なくとも部分的に基づいて、対象の血液試料中に存在する循環腫瘍細胞（CTC）の数を測定することが含まれても良い。他の態様において、当該方法には、PCR産物が検出された微小液滴の数に少なくとも部分的に基づいて、対象から採取された固形組織試料中に存在する腫瘍細胞の数を測定することが含まれても良い。

20

【0007】

30

他の態様において、細胞検出のための方法には、微小液滴の大部分がゼロ、または1つの細胞を含有する状態の下で、複数の微小液滴中に複数の細胞を内包化することが含まれ、ここで、複数の細胞は、対象の血液試料から得られたものであり；1つの細胞を含有する微小液滴に関して、複数の微小液滴を富化することが含まれ；細胞を溶解することが含まれ；ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試薬、検出成分および複数のPCRプライマーを複数の微小液滴中へと導入し、PCR增幅が可能となる条件下で複数の微小液滴をインキュベートし、PCR增幅産物を產生することが含まれ、ここで、複数のPCRプライマーには、1以上のオリゴヌクレオチド（たとえば、癌遺伝子）に各々ハイブリダイズする1以上のプライマーが含まれ；および、検出成分の検出により、PCR增幅産物の存在または非存在を検出することが含まれ、ここで、検出成分の検出は、PCR增幅産物の存在を示唆し；および、PCR增幅産物が検出された微小液滴の数に少なくとも部分的に基づいて、対象の血液試料中に存在する細胞の数を決定することが含まれ；ここで、1以上のステップは、マイクロ流体的制御の下で実行される。ある態様において、細胞は腫瘍細胞であり、複数のPCRプライマーには、1以上の癌遺伝子に各々ハイブリダイズする1以上のプライマーが含まれる。細胞を溶解するステップには、微小液滴に溶解剤を導入すること、および、細胞溶解に効果のある状態で微小液滴をインキュベートすることが含まれても良い。

40

【0008】

本発明の方法にはまた、腫瘍細胞を含む、細胞の遺伝子型決定のための方法が含まれる。ある態様において、細胞の遺伝子型決定のための方法には、対象由来の生物学的試料か

50

ら得た細胞を、微小液滴中に内包することが含まれ、ここで、1つの細胞が、微小液滴中に存在し；溶解剤を微小液滴中に導入すること、および細胞溶解に効果的な条件下で微小液滴をインキュベートすることが含まれ；ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）試薬、および複数のP C Rプライマーを微小液滴中へと導入し、P C R增幅が可能となる状態下で微小液滴をインキュベートし、P C R增幅産物を產生することが含まれ；および、微小液滴中に複数のプローブを導入することが含まれ、ここで、当該プローブは、対象の1以上の変異にハイブリダイズし、異なる波長の蛍光を発するものであり；および、プローブの蛍光の検出により、特定のP C R增幅産物の存在または非存在を検出することが含まれ、ここで、蛍光の検出は、P C R增幅産物の存在を示唆するものであり；ここで、1以上のステップが、マイクロ流体的な制御の下で実行される。複数のプローブには、1以上のT a q Man（登録商標）プローブが含まれても良い。10

【0009】

本発明の方法にはまた、癌を検出するための方法が含まれており、当該方法には、微小液滴中に、対象由来の生物学的試料から得たオリゴヌクレオチドを内包化することが含まれ、ここで、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが当該微小液滴中に存在し；ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）試薬、検出成分、および複数のP C Rプライマーを微小液滴中へと導入し、P C R增幅が可能となる状態下で微小液滴をインキュベートし、P C R增幅産物を產生することが含まれ、ここで、当該複数のP C Rプライマーには、1以上の癌遺伝子に対してそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーが含まれてあり；および、検出成分の検出により、P C R增幅産物の存在または非存在を検出することが含まれ、ここで、検出成分の検出は、P C R增幅産物の存在を示唆するものである。対象における癌の検出は、1以上の癌遺伝子に対するP C R增幅産物の存在に基づいたものであっても良い。20

【0010】

他の態様において、本開示の方法には、微小液滴中に、対象由来の生物学的試料から得たオリゴヌクレオチドを内包化することが含まれ、ここで、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが当該微小液滴中に存在し；ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）試薬、検出成分、および複数のP C Rプライマーを微小液滴中へと導入し、P C R增幅が可能となる状態下で微小液滴をインキュベートし、P C R增幅産物を產生することが含まれ；および、検出成分の検出により、P C R增幅産物の存在または非存在を検出することが含まれ、ここで、検出成分の検出は、P C R增幅産物の存在を示唆するものであり；ここで、1以上のステップが、マイクロ流体的制御の下で実行されている。30

【0011】

本発明方法の実施において、改変をいくつか行っても良い。たとえば、さまざまな異なるP C Rベースのアッセイを行っても良い（たとえば、定量P C R（q P C R））。そのようなアッセイに用いられるプライマーの数および性質は、実施されるアッセイのタイプ、生物学的試料の性質、および／または他の因子に少なくとも部分的に基づいて、変化しても良い。ある態様において、微小液滴に添加され得るプライマーの数は、1～100かそれ以上であってもよく、および／または、約1～100かそれ以上の異なる遺伝子（たとえば、癌遺伝子）を検出するためのプライマーを含んでも良い。そのようなプライマーに加え、または、そのようなプライマーの代わりに、1以上のプローブ（たとえば、T a q Man（登録商標）プローブ）を、主題方法の実施に用いても良い。40

【0012】

微小液滴それ自身が異なっていてもよい（サイズ、組成、内容物等）。微小液滴は通常、約0.001～1000ピコリットルかそれ以上の内部体積を有しうる。さらに、微小液滴は、界面活性剤および／または粒子により安定化されていても、されていなくてもよい。

【0013】

試薬を微小液滴に添加する方法は、非常に多岐にわたりうる。1つのステップで試薬を添加してもよく、または、複数のステップ（たとえば、2以上のステップ、4以上のステ50

ップ、または10以上のステップ)で添加してもよい。ある態様において、液滴合体(droplet coalescence)、ピコ注入、複数の液滴融合等を含む技術を用いて、試薬が添加されても良い(本明細書において、より詳細に記述されている)。ある実施形態においては、注入流体それ自身が電極として作用する方法により、試薬が添加される。注入流体は、そのように使用することが可能な、1以上の溶解電解剤を含有してもよい。注入流体それ自身が電極として作用する場合、液滴に試薬を添加する目的のために、マイクロ流体チップ中に、金属電極を含む必要は、必ずしもない。ある実施形態において、注入流体は、電極として作用しないが、1以上の液体電極が金属電極の代わりに用いられる。

【0014】

10

様々な異なる検出成分を用いて、PCR産物の存在または非存在を検出する様々な方法を行っても良い。対象の検出成分としては、限定されないが、蛍光物質およびその誘導体;ローダミンおよびその誘導体;シアニンおよびその誘導体;クマリンおよびその誘導体;カスケードブルー(Cascade Blue)およびその誘導体;ルシファーイエロー(Lucifer Yellow)およびその誘導体;BODIPYおよびその誘導体、等が挙げられる。例示的な蛍光色素分子としては、インドカルボシアニン(indocarbocyanine)(C3)、インドジカルボシアニン(indodicarbocyanine)(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Texas Red、Pacific Blue、Oregon Green 488、Alexa Fluor-355、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、JOE、Lissamine、ローダミングリーン、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、カルボキシ-フルオレセイン(FAM)、フィコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン(dRhodamine)、カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)、カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、Picogreen、RiboGreenが挙げられる。検出成分は、ビーズ(たとえば、磁気ビーズまたは蛍光ビーズ(たとえば、Luminexビーズ等))等を含んでも良い。ある態様において、検出には、サーマルサイクルの間、固定された位置に微小液滴を保持して、繰り返し画像撮影されることを含んでも良い。そのような繰り返しの画像撮影には、Megadroppletアレイの使用を含んでも良い(本明細書において、より詳細に記述されている)。ある態様において、検出には、1以上の微小液滴中の1以上の細胞を固定することおよび/または透過処理することを含んでも良い。

20

【0015】

30

本明細書に開示される方法に適した対象には、哺乳類(たとえば、ヒト)が含まれる。対象は、疾患状態の臨床所見を示すものであってもよく、または、疾患有すると診断されているものであってもよい。ある態様において、対象は、癌を有すると診断されているもの、癌の臨床所見を示しているもの、または、たとえば家族歴、環境露出、遺伝子変異(複数含む)、生活習慣(たとえば、食事および/または喫煙)、1以上の他の疾患状態の存在等の、1以上の因子から、癌を発症するリスクがあると決定されているものであってもよい。

40

【0016】

マイクロ流体システムおよびデバイスがまた、本開示により提示される。ある態様において、マイクロ流体デバイスには、分析される細胞を微小液滴中に内包化するための細胞ローディング領域;細胞ローディング領域と流体連通にある第一のチャンバー(当該第一のチャンバーは、第一の試薬を微小液滴に添加するための手段および、発熱体を有する);第一のチャンバーと流体連通にある第二のチャンバー(当該第二のチャンバーは、第二の試薬を微小的滴中に添加するための手段、および発熱体を有する)、ここで、発熱体

50

は、微小液滴を 1 以上の温度で加熱してもよく；および、第一または第二のチャンバーからの反応産物の存在または非存在を検出する、第二のチャンバーと流体連通にある検出領域が含まれる。

【0017】

本発明は、添付する図面と併せて読むと、以下の詳細な説明から最良の理解が得られる。以下の図は、図面に記載されている。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図 1】図 1 は、本開示のマイクロ流体システムの簡易的な図である。示されたシステムでは、マイクロ流体システムは、生体試料の成分を検出および / または遺伝子決定するために使用されてもよい。この特定のシステムでは腫瘍細胞の検出に適用する場合、封入装置（左）を使用して、有核（n u c l e a t e d）血球を個々の液滴に封入する。液滴に細胞溶解緩衝液を注入し、37 でインキュベートすると細胞溶解が促進される。これらに、特有の発癌性変異を標的とするプライマーを含有する P C R 混合物を注入する（中央）。液滴は、65 および 95 に維持された領域一帯を蛇行する流路を通過する。液滴が領域中を移動する時、その温度は P C R に必要な温度を循環する。この P C R 反応の間、液滴が変異体を含む腫瘍細胞のゲノム（この検出のためにプライマーが設計される）を含有する場合、增幅が開始されて蛍光出力が生成され、液滴が蛍光性になる。その後、液滴はフローサイトメトリを使用して光学走査され、液滴選別を使用して選別し、それらを回収する（右）。液滴は保管されるか、または塩基配列決定に関するようなさらなる分析（例えば、次世代のシーケンサ用の入力として使用されるか、または塩基配列決定機関に提供される）に使用されてもよい。

10

【図 2】図 2 パネル A ~ E は、蛍光測定を使用して、微小液滴に包埋された単細胞を表している。左端から酵母細胞（黒色斑点）を入れて、封入し、ドロップとなる（低倍率（4 倍率の対物レンズ；パネル A）および高倍率（10 倍率の対物レンズ；パネル B）で示す）。ドロップをインキュベートし、酵母にその産生物を分泌させ（パネル C）；これが蛍光化合物をドロップ中に生成し、その結果、有效地に生産するもの（p r o d u c e r）を含むドロップが迅速に蛍光性となる（パネル D）。その後、ドロップを選別して、最も有效的な酵母を、マイクロ流体選別装置（s o r t e r）を使用して抽出する（パネル E）。スケールバーは、80 mm を示す。

20

【図 3】図 3 は、ヒト B R A F 遺伝子の一部からの単位複製配列に相補的なフルオロフォア F A M で標識された T a q M a n（登録商標）P C R プローブを使用した、B R A F のデジタル検出を表す。蛍光性ドロップは、精製ヒトゲノム D N A からの B R A F 遺伝子の増幅を示し、一方で、非蛍光性ドロップは、本遺伝子が欠けていることを示す。

【図 4】図 4 パネル A ~ B は、C T C を検出する二元系（b i n a r y）P C R 反応を表す。パネル A：フォワードおよびリバースプライマーは、腫瘍形成性の配列を標的化するドロップに封入されている。腫瘍形成性の配列が存在する場合、P C R 反応は、二本鎖 P C R 産物を生成し（パネル A、上）、これに対し、腫瘍形成性の配列が存在しない場合、P C R 産物は生成されない（パネル A、下）。挿入染色（i n t e r c a l a t i n g s t a i n）（例えば、S y b r G r e e n）もまた、ドロップ中に存在してもよい。パネル B：二本鎖産物を生成する場合、染料はそれらに挿入して蛍光性を示し、ドロップを蛍光性に変え（パネル B、上）；一方で、二本鎖産物を生成しない場合、染料は非蛍光性のままで薄暗いドロップを生成する（パネル B、下）。

30

【図 5】図 5 は、連続二分デバイスでの並列に密集したドロップ形成の光学顕微鏡画像である。細胞を含有しない脱イオン水を左から注入する。上および下の矢印にそって流れる溶液は、2 重量 % のフッ化炭素界面活性剤を有する H F E - 7500 フルオロカーボンオイルである。一連の 2 分割後、右端に示される得られたドロップは、直径 25 μm である。

40

【図 6】図 6 は、C T C の液滴に基づく検出手順を示す概略的なマイクロ流体装置およびデータである。血球および希少な C T C は、プロティナーゼ K を含有する細胞溶解緩衝液

50

と共に微小液滴に封入される。ドロップを、55でインキュベートし、細胞を溶解して細胞タンパク質を消化する。その後、ドロップを画像化に最適なサイズに分割して、プロテイナーゼKを熱不活化する。次いで、ドロップに、PCR試薬およびTaqMan（登録商標）プローブをピコ注入（pico inject）し、その後、熱サイクル、およびMegadroppletアレイでの撮像を行なう。CTCは、CTC特異的転写物の存在に基づき同定され、多重化TaqMan（登録商標）プローブ蛍光により検出される。

【図7】図7は、プロテイナーゼK処理によるRT-PCRの細胞溶解物媒介性阻害の軽減を表す。漸増性濃度の細胞を、プロテイナーゼKと細胞溶解緩衝液、または細胞溶解緩衝液のみにより処理した。次いで、細胞を55およびその後95でインキュベートした。全細胞溶解物をRT-PCR反応物に、ドロップに関連する数種類の濃度で直接添加した。PCRでの溶解物阻害の急激な軽減が、細胞溶解緩衝液のみの溶解物ではなく、プロテイナーゼK処理された溶解物での200pLあたり1細胞の最終細胞濃度で見られた。PCR産物は、臭化工チジウム染色されたアガロースゲルで視覚化される。

【図8】図8パネル1～3は、細胞の封入／希釈、溶解、およびドロップ分割用に組み込まれたマイクロ流体システムを表す（中央画像）。パネル1：並行流モジュールは、プロテイナーゼK含有細胞溶解緩衝液および細胞懸濁液の層流に依存し、ドロップ形成前の細胞の時期尚早な溶解または混合を生じることなく細胞をドロップに封入し；層流境界は、細胞流と細胞溶解緩衝液流との間にちょうど見ることができる。パネル2：細胞を含有するドロップは、55のインキュベーション流路を20分で通過し、細胞を溶解、および阻害タンパク質を消化する。パネル3：ドロップを分割して、2倍のRT-PCR試薬の有効なピコ注入、および液滴アレイの撮像を可能にする。

【図9】図9パネルA～Cは、ピコ注入後のドロップでのTaqMan（登録商標）RT-PCRを示す。前立腺癌細胞株PC3からの全RNAの限界希釈液を含むドロップに、2倍のRT-PCR試薬およびEpCAMを標的化したTaqMan（登録商標）プローブの同量を注入した（パネルA）。ピコ注入後、ドロップに熱サイクルを行い、蛍光を撮像した（パネルB）。蛍光性ドロップ数は、ポアソン分布の予測と一致していることが認められ、ドロップ中の単一の転写物分子を検出するのに適切な感度であることを実証した。パネルC：結果をさらに確証するためパネルBからのドロップを化学的に破壊し、その内容物をアガロースゲルで電気泳動して、RT-PCR酵素なしで注入された陰性対照ドロップ（-）およびRTおよびTaqの両方を添加した実験ドロップ（+）のPCR産物の存在を観察した。ピコ注入せずにチューブで実施された対照反応とピコ注入された反応の両方が、同様の強度のバンドを形成し、反応効率が同等であることを実証した。白星は、ピコ注入ドロップを示す。

【図10】図10は、MCF7乳癌細胞を封入した液滴からのEpCAM転写物の検出を示す。図8パネル1～3に示す装置を使用して、MCF7細胞をドロップに封入し、溶解し、そしてドロップを分割した。次いで、溶解物含有ドロップにRT-PCR試薬およびTaqMan（登録商標）プローブをピコ注入した。次いで、ドロップに熱サイクルを行い、蛍光を撮像した。明視野かつ蛍光性の流路が融合して示される。

【図11】図11は、TaqMan（登録商標）プローブにより多重化するデジタル液滴RT-PCRを表す。Raji細胞（B-リンパ球）およびPC3前立腺癌細胞の両方から得られた全RNAの限界希釈液（limiting dilution）を、RT-PCR試薬ならびにCD45（青）、CD44（赤）およびEpCAM（緑）に特異的なTaqMan（登録商標）プローブと共に、ドロップに封入した。橙色のドロップは、多重反応により検出されたCD44およびEpCAM転写物の両方が存在することを示す。プローブ多重化の他の組み合わせもまた、見られた（データは示していない）。蛍光性チャネルを、破線のボックス領域の拡大した差込図として個々に示す。

【図12】図12パネルA～Cは、細胞の多重化qPCR解析を個々に実施する装置の概略図を示す。装置は、熱システムの上に設置する、PDMS流路にくぼみを付けた約1000万のトラップのアレイからなる（パネルA）。マイクロ流体チャネルの高さは、ドロップ径より低く、これにより、ドロップが扁平なパンケーキ形状をとる。使われていない

10

20

30

40

50

くぼみをドロップが流れる場合には、ドロップはより低い、エネルギー的により好ましい曲率半径となり、それによって、ドロップ全体がトラップ内へと引き込まれる力が生まれる（パネルB）。密充填のようにドロップを流すことにより、パネルCに示すように、アレイ上の全トラップが満たされていることを確実にする。装置全体に熱サイクルを行い、マイクロアレイスキャナを使用してサイクル間で撮像した。

【図13】図13は、図12パネルA～Cに示した種類の、多重化PCR検定用のMegadroppletアレイを表す。ドロップはピペットで分取し、クリアガラス／エポキシ容器に密閉し、微細加工したウェルアレイを使用して所定位置に固定する（上）。チップ全体を金属ブロックに留めて銅ブロック下のペルチェ加熱器を使用して熱サイクルを行なう。温度計、放熱板、送風機（上）、およびデジタル制御装置を使用して、温度を制御および循環させる（下）。增幅は、装置の上部を構成する透明板を介してアレイを撮像することにより、リアルタイムで監視される。10

【図14】図14パネルA～Bは、ドロップでのPCR増幅産物の検出に使用される、蛍光による単色フローサイトメーター（one-color flow cytometer）の使用を表す。パネルA：対物レンズの後部に向けた488nmレーザーからなり、また液滴が流れるマイクロ流体流路に焦点を当てる検出器の概略図である。レーザーは、ドロップ内の蛍光色素を励起し、および放射光のいずれもが、対物レンズにより捕捉され、ダイロイックミラーおよび520±5nmバンドパスフィルタに通された後に光電子増倍管（PMT）に撮像される。パネルB：ドロップは、PMTの出力電圧で示される、時間関数としての強度のピークとして現れ、これは検出された蛍光性ドロップの時間関数としての発光強度と比例している。20

【図15】図15パネルA～Cは、装置の配置の概略図を示す。パネルA：ドロップ、スペーサーオイル、および1MのNaClを、PDMS装置に、注射器ポンプを介して導入する。ピコ注入流体を、大気圧制御ポンプを使用して導入する。高電圧増幅器からの電極を、ピコ注入流体に沈めたワイヤおよび1MのNaCl「ファラデーモータ」を有する注射器の金属針に接続する。パネルB：液滴スペーサおよびピコ注入部位の拡大図。パネルC：注入開口部での液体の膨らみを示すピコ注入部位のさらなる拡大図。

【図16】図16パネルA～Bは、ピコ注入部位の明視野顕微鏡画像を示す。電場（パネルA）が存在しない場合、界面活性剤が注入流体との合体を阻害し、明確な境界線が液滴／注入流体接触面で見られる。電場を印加すると、境界線が見えなくなり、液滴が通過する際に試薬を注入する（パネルB）。30

【図17】図17パネルA～Cは、100mM（パネルA）、50mM（パネルB）、および25mM（パネルC）の注入流体についての注入後のドロップサイズの体積分率（Vf）の増加を示す。電場は強いほど、より容易に油／水接触面を破壊し、通過液滴のより大きい長さ、およびより大きい注入量まで注入を可能にする。溶解した電解質のモル濃度が高いほど、所定の電圧についての注入部位でより強い電場を発生し、また、注入量を増加させる。誤差棒は、各時点で採取した1200超のドロップについて、いずれの方向にしても1標準偏差を表す。

【図18】図18は、印加電圧および注入流体での溶解したNaClのモル濃度の関数としての注入量を示すヒートマップである。矢印／チェックマークは、データ点を示す。注入量は、0～36pLの範囲で、約2.6pL5（4%Vf）の解像度で、印加信号を100Vずつ増やして、調整され得る。注入される最も多い量は、100mM流体で3000Vであった。これより高く電場を上昇させると、エレクトロウェッティングが可能となり、ドロップがピコ注入器で自発的に形成され、注入効力および一貫性に悪い影響を与える。40

【図19】図19は、臭化エチジウム染色された2%アガロースゲルを示す。MCF7ヒト細胞株から単離された全RNAをドロップに封入し、これに逆転写酵素（RT）およびTaqDNAポリメラーゼを含む（+）、または含まない50（-）RT-PCR反応混合物をピコ注入した。非乳化の対照反応を、並行して実施した。酵素を受けた反応のみが、予測される100bpの単位複製配列を生成した。陽性対照の反応およびピコ注入され50

た反応の両方がP C R産物を生成し、これにより、ピコ注入時に発生した電場が、D N A、逆転写酵素、およびT a qと5 5生物学的に適合することが実証された。

【図20】図20パネルA～Bは、複数の液滴合体(m u l t i p l e d r o p p e t c o a l e s c e n c e)による試薬の添加を示す。パネルA：複数の液滴合体により試薬を添加するためのマイクロ流体装置の概略図。添加する試薬を、下方から、油と共に、ごく小型のドロップ生成器に導入した。これにより、結果として高い頻度で一連のごく小型のドロップを生成する。試薬を添加するドロップを左から注入し、油により間隔を空け、次いで、その流れは、流路が微小なドロップ生成器の流体出口と交差する場所で組み合わさる。試薬ドロップは、標的ドロップより非常に小型であるので、高い頻度で導入され、その結果、これらのドロップの多く(数10以上)が、1標的ドロップごとに注入される。試薬ドロップは小型であるため、大型のほうのドロップより早く流れ、大型の後方に集まり、その結果、電極流路に到達するまでに、接触し、そして電場により合体し得る。パネルB：そのようなマイクロ流体装置での合体領域の拡大写真。ドロップは左から右に流れる。一連の微小液滴は、微小液滴を添加する液滴の後ろに形成される。微小液滴およびその液滴が合体領域を通過するとすぐに、電極により微小液体がその液滴中に融合する(m e r g e)。右にある、結果として生じる最終生成物(r e s u l t i n g o u t p u t)は、微小液滴に存在した試薬(複数含む)を含有する液滴である。10

【図21】図21は、微小液滴を精製し得るマイクロ流体装置の概略図を示す。すなわち、ドロップ中の流体の大多数が、ドロップに封入され得る細胞またはビーズのような個別のいかなる試薬も取り除くことなく、精製された溶液に置き換えられる。最初、微小液滴に溶液を注入して、微小液滴内のいずれの不純物も希釈する。次いで、希釈された微小液滴を、電極を使用して電場が印加されるマイクロ流体流路を通過させる。電場により発生する誘電泳動力の存在により、細胞または他の別個の試薬が電場を通過する際に、それらは、流れで移動する(d i s p l a c e)。次いで、ドロップを分割し、その結果、全ての物体が最後には1つの微小液滴になる。したがって、汚染物質は取り除かれ得るが液滴内に封入され得る個別の試薬(ビーズまたは細胞等)の存在および/または濃度が、結果的に得られる微小液滴中で維持されているという点で、最初の微小液滴は洗浄化されている。20

【図22】図22パネルA～Bは、選別を示す。液滴は、右から入り、左に流れ、電極のそばを通過する。したがって、ドロップは、特定性質の存在(パネルA；液滴が上部流体出口に流れ込む)または不在(パネルB；液滴は下部流体出口に流れ込む)で選別される。30

【図23】図23は、合体過程の概略図を示し、親水性流路で再注入された単一乳剤(E 1)からの二重乳剤(E 2)の形成を開始する(左上)。これらは、疎水性接合部で三重乳剤(E 3)に変えられ(左下)、その後に電場を使用して合体し、反転したE 2(E 2'、右下)になる。

【図24】図24パネルA～Dは、(a)二重乳剤(E 2)形成、(b)三重乳剤(E 3)形成、(c)E 3合体、および(d)最終的な反転したE 2(E 2')生成物の顕微鏡画像を示す。スケールバーを全ての画像に適用する。

【図25】図25パネルA～Bは、E 3が合体してE 2'になることを示す2つの高速度カメラ時系列を示す。内部E 1のオイルシェルは擬色した青色である。40

【図26】図26パネルA～Cは、実施例5の試験で使用したマイクロ流体装置およびデジタルR T - P C Rワークフローを示す。(A) R N AおよびR T - P C R試薬を含有するドロップは、マイクロ流体T字形接合部およびキャリアオイルにより生成される。ドロップ形成の明視野の顕微鏡画像を下に示し、中央画像は単純反応混合物からのドロップの1群の生成を示し、また、下部画像は、2種類の混合物からの2群の生成を示す。(B)形成後、ドロップに、逆転写酵素を、電場により始動されるピコ注入流路を使用し、ピコ注入器に直接対向する電極流路により印加してピコ注入する。(C)ピコ注入ドロップをチューブに回収し、熱サイクルを行い、蛍光顕微鏡により撮像する。

【図27】図27パネルA～Cは、逆転写酵素のピコ注入後のマイクロ流体ドロップでの50

デジタルRT - PCR TaqMan (登録商標) 分析を示す。(A) PCR細胞の全RNAを含有する対照のRT - PCR反応物を、T字形接合部ドロップ生成器で乳化し、熱サイクルを行い、撮像した。FAM(緑)蛍光は、EpcAM転写物のTaqMan (登録商標) の検出を示し、また、Cyt5(赤)は、CD44転写物の検出を示す。同一のドロップの明視野画像(BF)を、右端の画像パネルに示す。(B)逆転写酵素を欠いたRT - PCR反応物をT字形接合部ドロップ生成器で乳化し、続いて、逆転写酵素をピコ注入した。ピコ注入流体は、左の概略図では、濃灰色で描かれている。明視野の画像により、ドロップがピコ注入後におよそ倍の大きさになったことが実証される。(C)逆転写酵素を省いてピコ注入を実施したRT - PCR反応物は、EpcAMおよびCD44についてTaqMan (登録商標) 信号を示さず、これにより、TaqMan (登録商標) 分析に特異性があることが実証される。赤色矢印は、図での乳剤の流れる方向を示す。スケールバー = 100 μm。

【図28】図28パネルA ~ Bは、対照ドロップと逆転写酵素をピコ注入したドロップとのデジタルRT - PCR検出率の比較を示す。(A)対照試料(左)およびピコ注入試料(右)についてのFAMおよびCyt5ドロップ輝度の散布図。ドロップをTaqMan (登録商標) 信号について陽性または陰性に標識化するために使用されるゲーティングの閾値を線で画定し、散布図を象限、(-、-)、(-、+)、(+、-)、(+、+)に分割する。(B)棒グラフは、対照群についてのCD44およびEpcAM TaqMan (登録商標) 分析の正規化計数値(normalized count)に対するピコ注入による平均のTaqMan (登録商標) 陽性ドロップ数を示す。データは、4つの独立した実験の反復の平均を表す。

【図29】図29パネルA ~ Bは、ピコ注入が個別のドロップ群の解析を可能にすることを示す。(A)非ピコ注入ドロップ。混合したPCR細胞の全RNAおよびRaji細胞の全RNAを含有する対照のRT - PCR反応物をT字形接合部ドロップ生成器で乳化し、熱サイクルを実施し、撮像した。融合したFAMおよびHEXの蛍光画像を、EpcAM転写物のTaqMan (登録商標) 検出を示すFAM(緑)蛍光、およびPTPRC転写物の存在を示すHEX(赤)で示す。黄色のドロップは、多重化TaqMan (登録商標) 検定の存在を示し、この際、EpcAMおよびPTPRC転写物は、同一のドロップに共封入されていた。明視野の画像(BF)を、右のパネルに示す。(B)ピコ注入ドロップ。二重のT字形接合部ドロップ生成器は、迅速にピコ注入されたドロップの2群を同時に生成した。1ドロップ生成器は、Raji細胞RNAのみを含有するドロップを、他方の発生器は、PCR細胞のRNAのみを含有するドロップを生成した。両方のドロップ型は、最初は逆転写酵素がないが、逆転写酵素はドロップ生成器のちょうど下流でピコ注入により添加される。圧倒的大多数のドロップが、多重化を呈さず、これにより、ピコ注入の際の物質の移動が非常に稀であることが実証される。図での赤色矢印は、乳剤の流れる方向を示す。スケールバー = 100 μm。

【図30】図30パネルA ~ Bは、二重(dual)転写物検出解析を示し、これにより、ピコ注入中の相互汚染が最小であることが実証される。(A)共封入された対照試料についてのFAMの散布図およびHEXドロップ輝度(intensity)(左)、および二重の(dual)群のピコ注入試料(右)。この解析を使用して、多数のTaqMan (登録商標) の多重化ドロップが、共封入対照で同定され、これらは二重群のピコ注入されたドロップで事実上不在であった(ゲーティング散布図の右上の象限)。(B)共封入対照および二重群のピコ注入についての、総輝度計数値(bright count)に対する異なる照度数のドロップ群の棒グラフ。データは、3種類の実験の反復の平均を示している。

【図31】図31パネルA ~ Bは、RNAドロップの二重群(dual population)をラインから離して保管し、また、その後にピコ注入され得ることを示す。(A)乳剤を、ドロップの2群(1群はRaji細胞から回収されたRNAを含み、他方の群はPCR細胞からのRNAを含む)からなるようにした。ドロップを注射器に回収し、チップとは別のところでインキュベートし、次いで、ピコ注入するピコマイクロ流体装置に

再注入した。次いで、ドロップを回収し、熱サイクルを実施し撮像した。これらのドロップは、多少はより高分子分散であり、それらが形成された同一の装置上のピコ注入ドロップより高い多重化率（1%）を呈し、これはインキュベーションおよび再注入中のドロップのいくつかが融合したことによる可能性が最も高い。試薬を添加するためにインキュベーション後に乳剤を再注入する能力は、多数の液滴に基づく分子生物学分析に重要である場合がある。（B）ピコ注入乳剤の明視野の画像。スケールバー = 100 μm。

【図32】図32は、本明細書に記載の単細胞RT-PCRマイクロ流体装置の実施形態を示す。

【図33】図33は、液滴形成接合部の下流のマイクロ流体装置の流路での切り込み構造を含む効果を示す。切り込みを備えていないT字形接合部ドロップ生成器を左に示す。流量比を増加させると、ドロップ生成器はドロップの形成を中断し、代わりに長い噴流を形成する。これは、噴流が流路壁を濡らし、接着し、ドロップの形成を妨げることによる。右では、同様のT字形接合部が、切り込み（ridge）構造で示される。切り込みは、好適な様相、例えば、疎水性油相、を流路壁近くに捕らえ、水相が濡らしづらくする。これは、装置が、最終的にR = 0.9で濡らす前に、非常に高い流量比でドロップを形成することを可能にする。これは、切り込みを設けることで、ドロップ生成器が、切り込みを省いた場合よりも非常に比較的広範囲にわたり機能できることを示す。流路幅は30 μmであり、切り込みのピークは、約5～10 μmである。実験に対応する画像の上部および下部セットは、異なるマイクロ流体装置で行う実験に対応する。

【図34】図34は、本明細書で説明される液体電極の実施形態についての一般的な製作スキームを示すフローチャートである。

【図35】図35は、電極流路に塩水（時間的経過は、左から右に進む；パネルA～C）を充填している際の、異なる時間で撮像した一連の3画像である。塩水は、流路の流体入口に導入され、加圧されて、これにより流路をゆっくりと充填する。元々、流路に存在する空気は、PDMsに押し込まれ、終了時には液体で完全に充填される。

【図36】図36は、様々な液体電極構造について模倣した力線を示す。模倣図は、異なる3形状の等電位線を示す正電極および接地電極のものである。

【図37】図37は、液体電極を使用して大型のドロップと小型のドロップを融合する液滴融合装置の2画像である。ドロップを融合するために、電場を塩水電極を使用して印加する。電場がオフの時、融合は生じず（右）、オンの時、ドロップは融合する（左）。

【図38】図38は、单一乳剤を二重乳剤に封入するために使用される場合がある装置を示す、三次元の概略図のうち異なる2図である。これは、单一乳剤が導入される流路を含み、この流路が広がり大型の流路になり、この大型の流路中に追加の水相を添加する。これは、開口部を介して注入ドロップを集め、注入ドロップを油のドロップに封入させ、また水中油中水型二重乳剤を形成する。

【図39】図39は、二重の乳化装置を構成するために使用されてもよいPDMs厚板の2つの概略図である。左の厚板は、2つの高さを有する流路、すなわち液滴の再注入用の短い流路および圧縮部流路（図38を参照のこと）および水相用の高い流路および流体出口を備える。右の厚板は、高い流路のみを備える。装置を完成させるために、厚板を整列させ、共に密封させ、その結果、流路は対面している。プラズマ酸化を使用して装置を結合させる。

【図40】図40は、再注入された单一乳剤を二重乳剤に封入する二重乳化装置の顕微鏡画像である。再注入された单一乳剤は、上方から入って、装置の中心に示す圧縮部で封入される。次いで、乳剤は二重乳剤として出る（装置の下に向かって示される4滴が示される）。

【図41】図41は、蛍光性の二重乳剤の蛍光顕微鏡画像である。左の画像は、流体を振動させることにより形成された二重乳剤であり、振動により、大量の多分散性およびFACS選別用に適切な大きさの少量のドロップを生じる。右の画像は、はるかに多くの单分散性を有する、本明細書に開示のマイクロ流体処理で生成された二重乳剤を示す。

【図42】図42は、振動で生成した二重乳剤対装置で生成した二重乳剤についてのドロップ

10

20

30

40

50

ップ領域のヒストグラムである。装置で生成した二重乳剤は、ピークで示されるように、はるかに多くの单分散を有する。

【図43】図43は、本開示によりマイクロ流体装置で形成された二重乳剤についてのFACS蛍光および散乱データを示す。上部プロットは、FACSのFITCチャネル(約520nm)により測定された群の輝度ヒストグラム(intensity histogram)を示す。下部プロットは、FITC信号によりゲーティングを行なった、ドロップの前方散乱および側方散乱を示す。

【図44】図44は、振動で生成した二重乳剤についてのFACS蛍光性および散乱データを示す。上部プロットは、FACSのFITCチャネル(約520nm)により測定された群の輝度ヒストグラムを示す。下部プロットは、FITC信号によりゲーティングを行なった、ドロップの前方散乱および側方散乱を示す。
10

【図45】図45は、封入染料の異なる4濃度についてFACS(FITCチャネル)で読み取った際の液滴輝度のヒストグラムである。染料は、蛍光標識BSAからなる。

【図46】図46は、FACSを実施したドロップの検出率を検定するために設計された実験結果である。ドロップの2群が作製され、1つは標識されたBSAが520nmでの蛍光性を有するものであり、もう1つはBSAが647nmでの蛍光性を有するものである。次いで、2群を所定の比率で混合し、その試料にFACSを実施した。測定した比率は、既知の比率と一致していることが見いだされ、FACS測定がこの範囲で正確であることを実証している。

【図47】図47は、DNAの異なる3濃度を含む乳剤を示す。全ドロップはDNA標的に対するTaqMan(登録商標)プローブを有するが、その標的は限定的な濃度で封入され、その結果、標的を得ているドロップのみが増幅を受ける。標的の濃度が減少すると、蛍光性ドロップの割合は低下する。比較的低いプロットは、二重乳剤で封入した後の、FACSでスクリーニング(screed)されたドロップを示す。
20

【図48】図48は、図47のDNA濃度より低いDNAの3濃度を含有する乳剤を示す。全ドロップはDNA標的に対するTaqMan(登録商標)プローブを有するが、その標的は限定的な濃度で封入され、その結果、標的を得たドロップのみが増幅を受ける。標的の濃度が減少すると、蛍光性ドロップの割合は低下する。比較的低いプロットは、二重乳剤で封入した後の、FACSでスクリーニング(screed)されたドロップを示す。
30

【図49】図49は、図47および48について、3図のうち最も低いDNA濃度の乳剤を示す。比較的低いプロットは、二重乳剤で封入した後の、FACSでスクリーニング(screed)されたドロップを示す。

【図50】図50は、二重乳化前のドロップを蛍光顕微鏡を使用して撮像することにより検出された陽性数に対する、プロットされた二重乳剤のFACS解析により検出された陽性数のプロットを示す。結果は試験を行なった20年にわたる別ものと一致している。

【図51】図51は、陽性であるドロップの割合を1og2濃度の関数として示したプロットである。DNA濃度が上昇すると、ドロップのより多くが少なくとも单一分子を含有することから、より多くのドロップが蛍光性となる。

【図52】図52は、封入したアゾスピラを用いてTaqMan(登録商標)PCR反応を実施したドロップを示す画像である。上部画像は110bp単位複製配列を生成した反応に対応し、一方で下部画像は147bp単位複製配列に対応する。
40

【図53】図53は、2種類のTaqMan(登録商標)PCR反応の単位複製配列に対応するバンド(1つは464bp単位複製配列について、1つは550bp単位複製配列について)を示すゲル写真を示す。

【図54】図54は、複数のプライマーセットを細菌含有試料に添加することによりPCR反応を多重化し得ることを実証するゲル写真を示す。

【図55】図55は、アゾスピラ単位複製配列のPCR增幅(左)およびアゾスピラを含む二重乳剤のFACS解析(右)の結果を示す。

【発明を実施するための形態】
50

【 0 0 1 9 】

生物学的試料からの成分の検出方法が開示される。ある態様において、当該方法を用いて、生物学的試料中の特定の成分（たとえば、腫瘍細胞（たとえば、循環腫瘍細胞等））を検出および／または定量してもよい。本発明方法の実施における使用のためのシステムおよびデバイスもまた提示される。

【 0 0 2 0 】

本発明方法およびデバイスは、たとえば癌の検出、母親の血流中に循環するDNAからの異数性検出、疾患進行のモニタリング、細胞のDNA含量またはRNA含量の分析、および、生物学的試料中の特定の成分の検出および／または定量が所望される、様々な他の応用等の、様々な応用において用途が見出される。

10

【 0 0 2 1 】

本発明を詳細に記述する前に、本発明は、記述される特定の実施形態に限定されず、そしてもちろん、異なり得ることを理解されたい。また、本明細書において用いられる専門用語は、特定の実施形態を記述する目的のためのみであり、限定の意図は無く、本発明の範囲は、添付の請求項によってのみ、限定されることを理解されたい。

【 0 0 2 2 】

値の範囲が提示される場合、他で明確に示されていない限り、その範囲の上限と下限の間にある、下限単位の10分の1までの、それぞれの間にある値も具体的に開示されているものとして理解されたい。任意の定められた値の間のより小さな各範囲、または、定められた範囲の間にある値と、任意の他の定められた値もしくはその定められた範囲の間にある値の間のより小さな各範囲は、本発明の範囲内に包含される。これらの小さな範囲の上限および下限は、独立して、当該範囲内に含まれ、または除外されていてもよく、および、当該より小さな範囲内にいずれかの限界もしくは両方の限界が含まれる場合、または含まれない場合の各範囲もまた、本発明の内に包含され、定められた範囲内の任意の具体的な除外される限界の対象となる。定められた範囲に、限界点のうちの1つ、または両方が含まれる場合、限界点を含有したもののいずれか、または両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

20

【 0 0 2 3 】

他で定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明分野に属する当業者により普遍的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記述されるものと類似または等しい任意の方法および物質を、本発明の実行または試験に用いることができるが、いくつかの可能性のある例示的な方法および物質を、本明細書に記述する。本明細書に言及される任意の、およびすべての公表文献は、当該公表文献が引用されている方法および／または物質を開示および記述するために、参照により本明細書に援用される。矛盾が生じる範囲では、援用された公表文献の任意の開示内容よりも、本開示内容が優先されることを理解されたい。

30

【 0 0 2 4 】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形の「一つの（a、an）」、および「当該（the）」には、他で明確に示されない限り、複数形への言及が含まれることに注意されたい。ゆえに、たとえば、「1つの微小液滴」という言及には、複数のそのような微小液滴が含まれ、「当該微小液滴」という言及には、1以上の微小液滴およびその他への言及が含まれる。

40

【 0 0 2 5 】

さらに、任意選択的であってもよい、任意の構成要素を除外するように請求項が記述されていることに注意されたい。ゆえに、この記述は、請求項の構成要素の列挙に関連して、「唯一の」、「～のみ」等の排他的な用語の使用に関する、または、「負の」限界の使用に関する、先の記載として機能することが意図されている。

【 0 0 2 6 】

本明細書において検討された公表文献は、本出願の出願日より先行する開示内容のみ、提示される。本明細書に記述されるものはいかなるものであっても、先行発明であるとい

50

う理由により、そのような公表文献に本発明が先行する権利が与えられないということを承認するとはみなされない。さらに、開示されている公表文献の日付は、個々に確認される必要性がある、実際の公表日とは異なっている可能性がある。そのような公表文献が、本開示の明白な定義または暗黙の定義と矛盾する用語を定義づけている範囲においては、本開示の定義が制御する。

【0027】

本開示を読んだ当業者には、本明細書に記述および解説される個々の実施形態のそれぞれが、本発明の範囲および主旨から解離することなく、他のいくつかの実施形態の特性から容易に分離されうる、または組み合わせられる、別個の構成要素および特性を有していることが明らかであろう。列挙される方法のすべては、論理的に可能な任意の他の順番で、または列挙される事象の順序で、実施することができる。10

【0028】

方法

上述のように、本発明の態様には、生物学的試料由来の成分検出のための方法が含まれる。本発明の態様には、細胞（たとえば、正常細胞（すなわち、腫瘍ではない細胞）、腫瘍細胞、またはCTC）の検出、定量および／または遺伝子型決定のための方法が含まれる。

【0029】

本明細書において、「生物学的試料」という文言には、個体から得られた様々なタイプの試料が包含され、診断アッセイまたはモニタリングアッセイに用いることができるものである。当該定義には、血液および、生物学的起源の他の液体試料、固体組織試料（たとえば、生検切片）、または、それらから誘導された組織培養物もしくは細胞およびそれらの子孫物が包含される。当該定義にはまた、たとえば試薬での処置、可溶化、またはある成分（たとえばポリペプチド等）の富化等の、入手後に任意の方法で取り扱われた試料が含まれる。「生物学的試料」という用語には、臨床試料が包含され、ならびに、培養物中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、細胞、血清、血漿、生物学的液体および組織試料もまた含まれる。「生物学的試料」には、細胞；生物学的液体（たとえば、血液、脳脊髄液、精液、唾液等）；胆汁；骨髓；皮膚（たとえば、皮膚生検）；および個体から得た抗体が含まれる。20

【0030】

本明細書にさらに詳細に記述されるように、様々な態様において、本発明方法を用いて、そのような生物学的試料由来の様々な成分を検出してよい。対象の成分としては、限定されないが、細胞（たとえば、循環細胞および／または循環腫瘍細胞）、ポリヌクレオチド（たとえば、DNAおよび／またはRNA）、ポリペプチド（たとえば、ペプチドおよび／またはタンパク質）、ならびに、生物学的試料中に存在する他の多くの成分が挙げられる。30

【0031】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチド単量体の直線状ポリマーを指し、それらは相互交換可能に用いられる。ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、任意の様々な構造配置を取りうる（たとえば、一本鎖、二本鎖、またはそれら両方の組み合わせ、ならびに、高次の分子内または分子間の二次／三次構造（たとえば、ヘアピン、ループ、三重らせん領域等））。通常、ポリヌクレオチドは、数個のモノマー単位（一般的に「オリゴヌクレオチド」と呼称される場合には、たとえば、5～40）から、数千のモノマー単位のサイズ範囲にある。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、たとえば、「ATGCCCTG」等の文字の配列により表される場合には（上述または下述のケース）、当該ヌクレオチドは、左から右に、5' 3' の順番となっていること、および、他で示唆されたり、文脈から明らかにされたりしない限り、「A」はデオキシアデノシンを意味し、「C」はデオキシシチジンを意味し、「G」はデオキシグアノシンを意味し、および、「T」はチミジンを意味し、「I」はデオキシイノシンを意味し、「U」はウリジンを意味することを理解されたい。4050

他で明記されない限り、専門用語および原子番号の表現は、Strachan and Read, Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss, New York, 1999) に開示されているものに従うものとする。

【0032】

本明細書において相互交換可能に用いられる「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。NH₂は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。COOHは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離カルボキシリル基を指す。標準的なポリペプチドの用語体系とするため、J. Biol. Chem., 243 (1969), 3552 - 3559を用いている。

10

【0033】

ある態様において、たとえばCTC等の腫瘍細胞、または正常細胞を含む、細胞を計数するための方法および/または遺伝子型決定を行うための方法が提示される。そのような方法の特徴は、マイクロ流体学を用いることである。

【0034】

図1は、本発明のマイクロ流体学的システムおよび方法の1つのタイプの、非限定的で単純化した例を表す。図1に示される特定応用は、生物学的試料由来の細胞（たとえば、腫瘍細胞）の検出および/または遺伝子型決定である。そのような1つの方法において、有核血球は、対象由来の生物学的試料から得ても良い。有核血球は、内包化デバイス（左）を用いて、個々のドロップ中へと内包化される。次いで、ドロップを、溶解緩衝液と共に注入し、細胞溶解を加速させる状態で（たとえば、37度）インキュベートしても良い。ドロップを特徴的な癌遺伝子変異（中央）を標的とする、1以上のプライマーを含有するPCR混合物と共に注入しても良い。PCR混合物を含有するドロップを、PCRに効果的な条件の下で液滴をインキュベートするチャネルを通して流しても良い。この図においては、65および95に維持された、様々なゾーンの上を蛇行して渡るチャネルを通してドロップを流すことにより、達成される。ドロップがゾーンを通って動くにつれ、PCRに必要な、それらの温度が循環する。もしドロップが、プライマー（複数含む）が検出するよう設計された変異を有する細胞のゲノムを含有している場合、PCR反応の間に、增幅が開始される。これらの特定のPCR産物の存在は、たとえば、ドロップの蛍光を変化させる蛍光出力により検出されてもよい（図3～4）。ゆえに、ドロップはスキヤンされ（たとえば、フローサイトメトリーを用いることにより）、蛍光ドロップの存在を検出してもよい（図14、パネルA～B）。ある態様において、ドロップはまた、たとえば、対象のドロップを回収するためのドロップ選別を用いて、選別されてもよい（右）。本開示の用語体系を用いると、上述のステップは、「マイクロ流体学的制御の下」で、行われる。すなわち、当該ステップは、1以上のマイクロ流体学的デバイス上で行われる。

20

【0035】

図2、パネルA～Eは、多くの一般原則および上述のステップを含むマイクロ流体学的システムを示す。ここでは、酵母細胞（黒い小さな点）は、一番左から入り、ドロップ中へと内包化される（下に示される。4×対物レンズ；パネルA、および、高拡大は10×対物レンズ；パネルB）。ドロップはインキュベートされ、酵母に産物を分泌させる（パネルC）；これにより、ドロップ中に蛍光成分が産生され、効率的な産生物を含有するドロップは、素早く蛍光物質となる（パネルD）。次いで、ドロップを選別して、マイクロ流体選別装置を用いて、最も効率的な酵母を抽出する（パネルE）。

30

【0036】

生物学的試料からの成分の内包化は、任意の簡便な手段により行われても良い。図5において、（1つの可能性の例ではあるが）、液滴が超並列的な様式で形成される、連続二分デバイスを示す。たとえば、細胞含有溶液を左から注入し、大きなドロップへと形成させ、それを連続二分アレイへと流し、小さなドロップへと分割する（一番右に示される、直径25mmのドロップ）。対象の内包化方法にはまた、限定されないが、Link, e

40

50

t a l . , Phys. Rev. Lett. 92, 054503 (2004) に記述される(その開示が参考により本明細書に援用される)、水力学的誘導液滴形成法が挙げられる。

【0037】

図1、4および6により明らかであるように、本発明のある方法の特徴は、細胞中に存在する、あるオリゴヌクレオチドおよび/または癌遺伝子(複数含む)の存在を検出するために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をベースにしたアッセイの使用にある。対象のPCRベースのアッセイの例としては、限定されないが、定量PCR(qPCR)、定量蛍光PCR(QF-PCR)、多重化蛍光PCR(MF-PCR)、リアルタイムPCR(RT-PCR)、単一細胞PCR、PCR-RFLP/RT-PCR-RFLP、ホットスタートPCR、ネスティドPCR、in situボロニ-(polony)PCR、in situローリングサークル増幅(rolling circle amplification)(RCA)、ブリッジPCR、ピコタイマーPCRおよびエマルションPCRが挙げられる。他の適切な増幅方法としては、ライゲース鎖反応(LCR)、転写増幅、自律配列複製、標的ポリヌクレオチド配列の選択増幅、コンセンサス配列プライム化ポリメラーゼ連鎖反応(CP-PCR)、任意プライム化ポリメラーゼ連鎖反応(AP-PCR)、縮重オリゴヌクレオチドプライム化PCR(DOP-PCR)および、核酸ベースの配列増幅(NASA)が挙げられる。
10

【0038】

PCRベースのアッセイを用いて、ある遺伝子(複数含む)(たとえば、ある癌遺伝子(複数含む))の存在を検出しても良い。図4、パネルA~Bは、癌遺伝子を検出するためのPCRベースアッセイを示す。このアッセイにおいては、対象の各癌遺伝子に特異的な1以上のプライマーを各細胞のゲノムと反応させる。これらのプライマーは、特定の癌遺伝子に対して特異的な配列を有しており、それにより、細胞のゲノムに対して相補的である場合にのみハイブリダイズされ、PCRが開始される。もし癌遺伝子が存在し、プライマーが合致する場合には、癌遺伝子の多量のコピーが生成される。癌遺伝子が存在するかどうかを測定するために、たとえば、溶液を挿入染色(Sybr Greenまたはエチジウムプロマイド等)で染色し、PCR産物を固体基質(たとえば、磁気ビーズまたは蛍光ビーズ(たとえば、Luminexビーズ)等のビーズ)へとハイブリダイズさせることにより、液滴の液体をプローブするアッセイを用いてPCR産物を検出してもよく、または、たとえばFRET等の分子間反応を介して検出することにより、PCR産物を検出してもよい。これらの色素、ビーズ等は、それぞれ、各試料の「検出成分」であり、この用語は本明細書において、PCR産物(複数含む)の存在または非存在を検出するために用いられる任意の成分を指すために一般的に、および広く用いられている。
20
30

【0039】

これらの基礎的な方法の多くのバリエーションを、以下に詳述する。

【0040】

レア細胞(たとえば、腫瘍細胞)の検出

本発明方法の態様において、生物学的試料中の細胞(たとえば、腫瘍細胞)の1以上のサブセットの存在の検出が含まれる。当該スキームを、図6に示す。腫瘍細胞検出のための本方法を用いるために、生物学的試料(たとえば、全血)を、任意の簡便な方法を用いて対象から採取してもよい。生物学的試料を、たとえば遠心分離、ろ過等の処理ステップを用いて処理し、細胞以外の成分を取り除いてもよい。
40

【0041】

次いで、生物学的試料中の各細胞を、たとえば図5および/または図8に示されるようなマイクロ流体学的デバイスを用いて液滴中へと内包化する。図5の例を用いると、細胞含有溶液を左から注入し、大きなドロップを形成させ、それを連続二分アレイへと流し、より小さな液滴へと分割させる。細胞を液滴中へと内包化する他の方法も当分野に公知である。所望の場合、細胞を1以上の抗体および/またはプローブで染色してから、ドロップへと内包化してもよい。本明細書において、「ドロップ」、「液滴」および「微小液滴」
50

」という用語は相互効果に用いられ、一般的に0.1~1000μmの直径範囲にある、水相（たとえば、水）を含有する小さな球体を指し、細胞、DNA、酵素および他の成分を内包化するために用いられる。ゆえに、当該用語は、マイクロ流体学的デバイスにより、またはマイクロ流体学的デバイス中で、またはマイクロ流体学的デバイス上で產生される液滴を指すために用いられる。

【0042】

また、細胞を含有する液滴に1以上の溶解剤を添加し、それにより細胞（複数含む）を破裂させ、ゲノムを放出させても良い。溶解剤は、細胞が微小液滴中に内包化された後に添加されてもよい。任意の簡便な溶解剤を使用してもよい（たとえば、プロテナーゼKまたはサイトトキシン等）。特定の実施形態において、細胞は、たとえばTrition X100および／またはプロテナーゼK等の合成洗剤を含有する溶解緩衝液と共にドロップ中に内包化されても良い。細胞（複数含む）を破裂させる具体的な条件は、用いる具体的な溶解剤により変化しうる。たとえば、プロテナーゼKを溶解剤として組み込む場合、微小液滴を約20分間、約37~60まで温め、細胞を溶解させ、プロテナーゼKに細胞性タンパク質を消化させてもよく、その後、それを5~10分間、約95まで加熱し、プロテナーゼKを不活化させてもよい。

【0043】

ある態様において、細胞溶解は、代わりに、溶解剤の添加を含めない技術により行われても良い。たとえば、細胞に穴を開ける、細胞をせん断する、細胞を研磨する等の効果をもたらす様々な幾何学的特徴を用いる機械的技術により溶解を行っても良い。また、他のタイプの機械的破壊（たとえば、音響的な技術）を用いても良い。さらに、熱エネルギーを用いて細胞を溶解することもできる。細胞溶解をもたらす任意の利便な手段を本明細書に記述される方法に用いても良い。

【0044】

検出される各遺伝子（たとえば癌遺伝子）に対して、プライマーを液滴中へと導入してもよい。ゆえに、ある態様において、すべての癌遺伝子に対するプライマーが、同時に液滴中に存在してもよく、それにより、多重化分析が可能となる。液滴は温度循環され、それにより癌性細胞を含有する液滴が、たとえばPCRを経ることとなる。この時間の間、ゲノム中に存在する癌遺伝子に相当するプライマーのみが増幅導入され、液滴中にこれら癌遺伝子の大量コピーを生成する。これらPCR産物の存在の検出は、様々な方法（たとえば、FRET、挿入染色での染色、ビーズへの付着を用いる等）により行われても良い。これに対する異なるオプションに関するさらなる情報は、改変技術を記述する項を参照にされたい。液滴を光学的にプローブし、PCR産物を検出してもよい（図14）。液滴を光学的にプローブすることには、最初の群中に存在する腫瘍細胞の数を計数することが含まれても良く、および／または、各腫瘍細胞中に存在する癌遺伝子を同定することを含んでも良い。

【0045】

本方法を用いて、生物学的試料が特定の対象細胞（たとえば、腫瘍細胞）を含有するか否かを測定してもよい。ある態様において、本方法は、生物学的試料中に存在する対象の細胞（たとえば、腫瘍細胞）の数を定量することを含んでも良い。生物学的試料中に存在する対象の細胞（たとえば、腫瘍細胞）の数を定量することは、PCR増幅産物が検出された微小液滴の数に少なくとも部分的に基づいていても良い。たとえば、微小液滴は、液滴の大部分がゼロまたは1つの細胞を含有すると予測される条件下で製造されてもよい。いずれの細胞も含有しない液滴は、本明細書に詳述される技術を用いて取り除かれても良い。上述のPCRステップを行った後、PCR産物を含有すると検出された微小液滴の総数を計数し、生物学的試料中の対象の細胞（たとえば、腫瘍細胞）の数を定量してもよい。ある態様において、本方法はまた、対象の細胞（たとえば、腫瘍細胞）である、生物学的試料由来の細胞の分画または割合を測定するために、微小液滴の総数を計数することを含んでも良い。

【0046】

10

20

30

40

50

P C R

上述のように、本発明方法の実施において、P C Rベースのアッセイを用いて細胞中に存在する対象のある遺伝子（たとえば、癌遺伝子）の存在を検出してもよい。そのようなP C Rベースのアッセイの条件は、幾通りも変化しうる。

【0047】

たとえば、微小液滴に添加されうるP C Rプライマーの数も変化しうる。「プライマー」という用語は、2以上のプライマーを指しても良く、および、天然、精製された制限酵素消化物、または合成製造物であろうとなからうと、核酸鎖に対して相補的であるプライマー伸長産物の合成が触媒される条件下に置かれた場合に、相補鎖に沿った合成の開始地点として作用することができるオリゴヌクレオチドを指しても良い。そのような条件には、適切な緩衝液中（「緩衝液」には補因子である、またはp H、イオン強度等に影響を与える置換基が含まれる）に溶解した4つの異なるデオキシリボヌクレオチドトリホスフェート、および、重合誘導剤（たとえば、D N Aポリメラーゼまたは逆転写酵素）の存在、ならびに、適切な温度が含まれる。プライマーは、増幅の最大効率を得るために、一本鎖が好みしい。

10

【0048】

本明細書において用いられる核酸配列の相補体とは、1つの配列の5'末端が、他の配列の3'末端と対になるように核酸配列と並べられた場合に、「逆平行の関連性」になるオリゴヌクレオチドを指す。相補性は完璧である必要はなく；安定な二本鎖は、不適合な塩基対または合致していない塩基を含有してもよい。核酸技術に関する分野の当業者であれば、たとえば、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチド中のシトシンおよびグアニンの濃度パーセント、イオン強度、および不適合塩基対の発生率等を含む、変数の数を考慮することで経験的に二本鎖の安定性を測定することができる。

20

【0049】

微小液滴に添加されうるP C Rプライマーの数は、約1～約500かそれ以上の範囲（たとえば、約2～100プライマー、約2～10プライマー、約10～20プライマー、約20～30プライマー、約30～40プライマー、約40～50プライマー、約50～60プライマー、約60～70プライマー、約70～80プライマー、約80～90プライマー、約90～100プライマー、約100～150プライマー、約150～200プライマー、約200～250プライマー、約250～300プライマー、約300～350プライマー、約350～400プライマー、約400～450プライマー、約450～500プライマー、または約500プライマーかそれ以上）であってもよい。

30

【0050】

これらのプライマーは、1以上の対象の遺伝子（たとえば、癌遺伝子）に対するプライマーを含有してもよい。添加される対象遺伝子に対するプライマーの数は、約1～500（たとえば、約1～10プライマー、約10～20プライマー、約20～30プライマー、約30～40プライマー、約40～50プライマー、約50～60プライマー、約60～70プライマー、約70～80プライマー、約80～90プライマー、約90～100プライマー、約100～150プライマー、約150～200プライマー、約200～250プライマー、約250～300プライマー、約300～350プライマー、約350～400プライマー、約400～450プライマー、約450～500プライマー、または約500プライマーまたはそれ以上）であってもよい。対象の遺伝子および癌遺伝子としては、限定されないが、BAX、BCL2L1、CASP8、CDK4、ELK1、ETS1、HGF、JAK2、JUNB、JUND、KIT、KITLG、MCL1、MET、MOS、MYB、NFKBIA、EGFR、Myc、EpCAM、NRAS、PIK3CA、PML、PRKCA、RAF1、RARα、REL、ROS1、RUNX1、SRC、STAT3、CD45、サイトケラチン、CEA、CD133、HER2、CD44、CD49f、CD146、MUC1/2、およびZHX2が挙げられる。

40

【0051】

そのようなプライマーおよび／または試薬は、1つのステップ、または2以上のステッ

50

プで微小液滴に添加されてもよい。たとえば、プライマーは、2以上のステップ、3以上のステップ、4以上のステップ、または5以上のステップで添加されてもよい。プライマーが1つのステップまたは2以上のステップで添加されるかどうかに関わらず、溶解剤添加の後、溶解剤添加の前、または溶解剤添加と付随して、それらを添加してもよい。溶解剤添加の前後に添加される場合には、PCRプライマーは、溶解剤添加と別のステップで添加されてもよい。

【0052】

プライマーを微小液滴に添加した時点で、PCRが可能となるような条件下で微小液滴をインキュベートしてもよい。微小液滴は、プライマー（複数含む）を添加するために用いられたものと同じマイクロ流体学的デバイス上でインキュベートされてもよく、または、別のデバイス上でインキュベートされてもよい。ある実施形態において、PCR增幅が可能となる条件下での微小液滴のインキュベーションは、細胞の内包化および細胞の溶解に用いられたものと同じマイクロ流体学的デバイス上で行われる。微小液滴のインキュベートは、様々な形態をとってもよい。ある態様において、PCR混合物を含有するドロップは、PCRに対して効果的な条件下で液滴をインキュベートするチャネルを通って流れても良い。チャネルを通り微小液滴を流すことには、PCRに対して効果的な温度で維持された、様々な温度ゾーンの上を蛇行して渡るチャネルを含んでも良い。そのようなチャネルは、たとえば、2以上の温度ゾーンを循環してもよく、ここで、少なくとも1つのゾーンは、約65℃に維持されており、および少なくとも1つのゾーンは、約95℃に維持されている。ドロップがそのようなゾーンを通過するにつれ、PCRに必要な温度が循環する。所望のPCR增幅を得るためのゾーンの正確な数、および、各ゾーンのそれぞれの温度は、当業者により容易に決定されうる。

10

20

【0053】

他の実施形態において、微小液滴のインキュベートには、図12のパネルA～C、および図13に示される一般型のデバイスの使用が含まれても良く；この一般型のデバイスは、本明細書において、「Megadroppletアレイ」と呼称される場合もある。そのようなデバイスにおいて、チャネルのくぼみを付けられた数百、数千、または数百万のトラップのアレイ（たとえば、PDMSチャネル）を、熱システムの上に置く（図12、パネルA）。チャネルは、ガスが漏れ出ることを防ぐために加圧されても良い。マイクロ流体チャネルの高さは、ドロップ径より低く、これにより、ドロップが扁平なパンケーキ形状をとる。使われていないくぼみをドロップが流れる場合には、ドロップはより低い、エネルギー的により好ましい曲率半径となり、それによって、ドロップ全体がトラップ内へと引き込まれる力が生まれる（図12、パネルB）。ドロップを密集させて流すことにより、アレイ上のすべてのトラップが確実に使われことになる（図12、パネルC）。ヒーターを用いてデバイス全体を熱循環させてもよい。

30

【0054】

ある態様において、ヒーターには、ペルチェプレート、放熱板、および制御コンピューターが含まれる。ペルチェプレートにより、適用電流を制御することによる、室温を上回る、または下回る、チップの加熱または冷却が可能となる。再現性のある温度制御を確実にするために、コンピューターは、統合温度プローブを用いてアレイの温度をモニターしてもよく、および、必要に応じて加熱または冷却するために適用電流を調節してもよい。金属（たとえば、銅）プレートによって、均一な熱の適用、および、冷却サイクル中の余剰熱の放出が可能となり、それによって、およそ1分以内に約95℃から約60℃まで冷却することが可能となる。

40

【0055】

また、本発明の方法では、微小液滴に1以上のプローブを導入してもよい。核酸に関し、本明細書において、「プローブ」という用語は、標的領域中の配列とプローブ中の少なくとも1つの配列との相補性により、標的核酸中の配列と二本鎖構造を形成する標識オリゴヌクレオチドを指す。プローブは、好ましくは、ポリメラーゼ連鎖反応をプライムするために用いられる配列（複数含む）に対して相補的な配列を含有しない。添加されるプロ

50

ープの数は、約 1 ~ 5 0 0 (たとえば、約 1 ~ 1 0 プローブ、約 1 0 ~ 2 0 プローブ、約 2 0 ~ 3 0 プローブ、約 3 0 ~ 4 0 プローブ、約 4 0 ~ 5 0 プローブ、約 5 0 ~ 6 0 プローブ、約 6 0 ~ 7 0 プローブ、約 7 0 ~ 8 0 プローブ、約 8 0 ~ 9 0 プローブ、約 9 0 ~ 1 0 0 プローブ、約 1 0 0 ~ 1 5 0 プローブ、約 1 5 0 ~ 2 0 0 プローブ、約 2 0 0 ~ 2 5 0 プローブ、約 2 5 0 ~ 3 0 0 プローブ、約 3 0 0 ~ 3 5 0 プローブ、約 3 5 0 ~ 4 0 0 プローブ、約 4 0 0 ~ 4 5 0 プローブ、約 4 5 0 ~ 5 0 0 プローブ、または約 5 0 0 プローブまたはそれ以上) であっても良い。プローブ(複数含む)は、1 以上のプライマー(複数含む)の添加の前、添加に引き続き、または添加の後に、微小液滴中に導入されても良い。対象のプローブとしては、限定されないが、TaqMan(登録商標)プローブ(たとえば、Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase". PNAS, 88 (16): 7276 - 7280、に記述される)が挙げられる。

【0056】

ある実施形態において、RT - PCRをベースにしたアッセイを用いて、細胞中に存在する、ある対象の転写物(たとえば癌遺伝子(複数含む))の存在を検出してもよい。そのような実施形態において、本明細書に記述されるPCRの実施に用いられる試薬に加え、cDNA合成に必要な逆転写酵素および任意の他の試薬が微小液滴中に添加される(まとめて、「RT - PCR試薬」と呼称される)。RT - PCR試薬は、本明細書に記述される任意の方法を用いて微小液滴に添加される。RT - PCR試薬が微小液滴に添加された時点で、微小液滴は、逆転写が可能な条件下でインキュベートされてもよく、次いで、本明細書に記述されるPCRが可能となる条件下でインキュベートされてもよい。微小液滴は、RT - PCR試薬の添加に用いられたものと同じマイクロ流体デバイス上でインキュベートされてもよく、または、別のデバイス上でインキュベートされてもよい。ある実施形態において、RT - PCRが可能となる条件下での微小液滴のインキュベートは、細胞の内包化および細胞の溶解に用いられたものと同じマイクロ流体デバイス上で行われる。

【0057】

ある実施形態において、RT - PCRまたはPCRのために微小液滴に添加される試薬にはさらに、リアルタイムRT - PCR産物またはPCR産物を検出することができる蛍光DNAプローブが含まれる。用いることができる任意の適切な蛍光DNAプローブとしては、限定されないが、SYBRグリーン、TaqMan(登録商標)、Molecular Beacons、およびScorpiionプローブが挙げられる。ある実施形態において、微小液滴に添加される試薬に、2以上のDNAプローブ(たとえば、2つの蛍光DNAプローブ、3つの蛍光DNAプローブ、または4つの蛍光DNAプローブ)が含まれる。複数の蛍光DNAプローブを用いることによって、1回の反応で、RT - PCRまたはPCR産物の同時測定が可能となる。

【0058】

ダブルPCR

レア転写物を増幅するために、本明細書に記述される第一ステップのRT - PCRまたはPCR反応を行った微小液滴に、第二ステップのPCR反応をさらに行っても良い。一部の実施形態において、第一ステップのRT - PCRまたはPCR反応を経た微小液滴の一部が、微小液滴から抽出され、追加のPCR試薬(限定されないが、酵素(たとえば、DNAポリメラーゼ)、DNAプローブ(たとえば、蛍光DNAプローブ)、およびプライマーを含む)を含有する液滴と融合される。ある実施形態において、追加のPCR試薬を含有する液滴は、第一ステップのRT - PCRまたはPCR反応を経た微小液滴よりも大きい。このことは、たとえば、第二ステップのPCRに対して阻害性のある細胞成分の希釈が可能となる等の理由で、有益である。第二ステップのPCR反応は、第一ステップ

10

20

30

40

50

反応を行うために用いられたものと同じマイクロ流体デバイス上で行っても良く、または、異なるマイクロ流体デバイス上で行っても良い。

【0059】

一部の実施形態において、第二ステップのPCR反応に用いられたプライマーは、第一ステップのRT-PCRまたはPCR反応に用いられたプライマーと同じである。他の実施形態において、第二ステップのPCR反応に用いられたプライマーは、第一ステップの反応に用いられたプライマーとは異なる。

【0060】

多重化

本発明のある実施形態において、複数のバイオマーカーを選択し、特定の細胞を分析してもよい。検出されるバイオマーカーとしては、限定されないが、1以上のタンパク質、転写物および／もしくは細胞ゲノム中の遺伝的特徴、またはそれらの組み合わせを含んでも良い。標準的な蛍光ベースの検出法では、同時に調べることができるバイオマーカーの数は、各微小液滴内で個々に可視化することができる蛍光色素の数に限定される。ある実施形態においては、特定の微小液滴内で個々に検出されうるバイオマーカーの数は、増加させることができる。たとえば、微小液滴の異なる部分に対して、色素を分離させることにより、これを行うことができる。特定の実施形態において、色素およびプローブ（たとえば、核酸プローブまたは抗体プローブ）と結合したビーズ（たとえば、LUMINEX（登録商標）ビーズ）を、微小液滴中に内包化させ、分析されるバイオマーカーの数を増加させてもよい。他の実施形態において、蛍光の偏光を用いて、1つの細胞に対して、より多くの数の異なるバイオマーカーに対するシグナルを検出してもよい。たとえば、蛍光色素を様々なプローブに付着させ、微小液滴を異なる偏光条件下で可視化してもよい。同様に、同じ色の色素を用いて、1つの細胞に対し、異なるプローブ標的に対するシグナルを得ても良い。固定された細胞および／または透過処理された細胞（以下に詳述される）の使用により、多重化レベルを増加させることもできる。たとえば、標識PCR産物および／または標識RT-PCR産物を微小液滴内に遊離させながら、標識抗体を用いて、細胞成分に局在するタンパク質標的を標的化してもよい。これにより、同じ色の色素を、抗体、および、RT-PCRにより產生された增幅物に対して用いることができるようになる。

【0061】

微小液滴のタイプ

本発明の実施において、微小液滴の組成および性質は変化しうる。たとえば、ある態様において、界面活性剤を用いて微小液滴を安定化させても良い。ゆえに、微小液滴は、界面活性剤安定化乳剤を含んでも良い。ドロップ中で行われる所望の反応が可能な、任意の簡単な界面活性剤を用いても良い。他の態様において、微小液滴は、界面活性剤または粒子により安定化されていない。

【0062】

使用される界面活性剤は、たとえば、乳剤に用いられる油相および水相（または、他の適切な不混和相（たとえば、任意の適切な疎水相および親水相等））等の因子の数に依存する。たとえば、フッ化炭素油中の水性液滴を用いる場合、界面活性剤は、親水性ブロック（PEG-PPO）および疎水性フッ化ブロック（Krytox FSH）を有しても良い。しかしながら、もし油が炭化水素油に切り替わった場合、たとえば、界面活性剤ABILEM90のような疎水性炭化水素ブロックを有するように、界面活性剤が代わりに選択される。界面活性剤の選択において、界面活性剤の選択において考慮されうる所望の特性としては、以下のうちの1つ以上が挙げられる：（1）界面活性剤が、低い粘度を有していること；（2）界面活性剤が、デバイスを構築するために用いた試薬と不混和であり、デバイスを膨張させないこと；（3）生体適合性；（4）アッセイ試薬が界面活性剤中に溶解しない；（5）ガスが出入りすることができるという点において、界面活性剤が、好みのガス溶解度を示すこと；（6）界面活性剤が、PCRに用いられる温度（たとえば、95℃）よりも高い沸点を有すること；（7）乳剤の安定性；（8）界面活性剤

10

20

30

40

50

が所望サイズのドロップを安定化させること；(9)界面活性剤が、担体相において可溶性であり、液滴相においては可溶性ではないこと；(10)界面活性剤は、ごくわずかな蛍光特性しか有さないこと；および、(11)界面活性剤が、広範な温度範囲にわたり、担体相における可溶性を維持すること。

【0063】

イオン性界面活性剤等の他の界面活性剤もまた予期される。35を超える温度での液滴の安定性を増加させるポリマーを含む、他の添加剤を、ドロップを安定化させるために油中に含むこともできる。

【0064】

微小液滴への試薬添加

10

本方法の実施において、1以上のステップ(たとえば、約2、約3、約4または約5かそれ以上のステップ)において、多くの試薬を微小液滴に添加する必要がありうる。微小液滴に試薬を添加する手段は、多くの方法において変化してもよい。対象の方法としては、限定されないが、Ahn, et al., Appl. Phys. Lett. 88, 264105 (2006); Priest, et al., Appl. Phys. Lett. 89, 134101 (2006); Abate, et al., PNAS, November 9, 2010 vol. 107 no. 45 19163-19166; および、Song, et al., Anal. Chem., 2006, 78 (14), pp 4839-4849に記述されているものが挙げられる(参照によりこれら開示は本明細書に援用される)。

20

【0065】

たとえば、微小液滴と、試薬(複数含む)を含有する第二の微小液滴とを混合することを含む方法により、微小液滴に試薬が添加されてもよい。第二の微小液滴に含有される試薬(複数含む)は、任意の簡便な手段(具体的には、本明細書に開示されるものを含む)により添加されてもよい。この液滴を、第一の微小液滴と混合させ、第一の微小液滴と第二の微小液滴の両方の内容物を含有する微小液滴を生成してもよい。

【0066】

または代わりに、1以上の試薬を、たとえば液滴合体もしくはピコ注入等の技術を用いて添加しても良い。液滴合体において、標的ドロップ(すなわち、微小液滴)は、当該微小液滴に添加される試薬(複数含む)を含有する微小液滴と並行して流されても良い。2つの微小液滴は、互いに接触するが、他の微小液滴とは接触しないように流されても良い。次いで、これらのドロップは、電極、または電場を適用するための他の手段を通過させてもよく、ここで、互いに合体するように、電場により微小液滴を不安定化されてもよい。

30

【0067】

または代わりに、ピコ注入を用いて試薬を添加しても良い。この方法の場合、標的ドロップ(すなわち、微小液滴)は、添加される試薬(複数含む)を含有するチャネルを通り過ぎて流されても良く、ここで、試薬(複数含む)は、加圧されている。しかしながら、電場が無い場合でも、界面活性剤の存在により、微小液滴は注入されることなく、流れ過ぎる(界面活性剤による微小液滴の被覆により、液体(複数)が侵入してくることを防ぐため)。しかしながら、注入器を通り過ぎる際に電場を微小液滴に適用する場合、試薬(複数含む)を含有する液体が、微小液滴に注入される。微小液滴に添加される試薬の量は、いくつかの異なるパラメーターにより制御されてもよい(たとえば、電場のオンオフを切り替えることにより、注入圧力を調節、および、ドロップ流の速度を調節することによる等)。

40

【0068】

他の態様において、代わりに、2つの液滴を共に合体させることに依らない方法、または液体をドロップに注入することに依らない方法により、微小液滴に1以上の試薬を添加しても良い。非常に小さいドロップの流れへと試薬を乳化させ、標的とする微小液滴と共にこれらの小さなドロップを合体させるステップを含む方法により、むしろ、1以上の試

50

薬を微小液滴に添加してもよい（図20、パネルA～B）。そのような方法を、本明細書において、「マルチプルドロップ合体を介した試薬添加」と呼称する。これらの方法には、標的ドロップと比較して小さなサイズのドロップを添加することにより、小さなドロップは標的ドロップよりも速く流れ、それらの後ろに集まるという利点がある。次いで、たとえば、電場を適用することにより、その集まりを合体させることができる。また代わりに、異なる液体の小さなドロップのいくつかの共流を用いることによる、微小液滴への複数の試薬の添加にこの方法を用いても良い。小さなドロップと標的ドロップの効果的な合体を可能とするためには、小さなドロップを、標的ドロップを含有するチャネルよりも小さくすることが重要であり、また、標的ドロップを注入するチャネルと、電場を適用する電極の間の距離を十分に長くとり、小さなドロップが標的ドロップに「追いつく」ための時間を与えることが重要である。もしこのチャネルが小さすぎる場合、小さなドロップの一部だけが標的ドロップと合体し、所望するよりも少ない試薬しか添加されないこととなる。このことはある程度まで電場の大きさを増加させることにより補うことができるが、それにより、ドロップが融合するためにさらに遠く離れる傾向となってしまう。図20パネルA～Bに示される、同じマイクロ流体デバイス上で小さなドロップを作製することに加え、その代わりに、他のマイクロ流体ドロップメーカーを用いて、またはホモジナイゼーションを介して、ラインから離れてドロップを作製し、次いで、標的ドロップを含有するデバイスへと注入してもよい。

【0069】

ゆえに、ある態様においては、液滴の流れの中へと試薬を乳化させることを含む方法により、試薬は微小液滴に添加され、ここで、液滴は、微小液滴のサイズよりも小さく；液滴は微小液滴と共に流され；および、液滴は微小液滴と合体する。液滴の流れに含有される液滴の直径は、微小液滴の直径の約75%からそれよりも小さい範囲で変化してもよく、たとえば、流れる液滴の直径は、微小液滴の直径の約75%かそれよりも小さく、微小液滴の直径の約50%かそれよりも小さく、微小液滴の直径の約25%かそれよりも小さく、微小液滴の直径の約15%かそれよりも小さく、微小液滴の直径の約10%かそれよりも小さく、微小液滴の直径の約5%かそれよりも小さく、または、微小液滴の直径の約2%かそれよりも小さい。ある態様において、複数の流れる液滴（たとえば、2以上の液滴、3以上、4以上、または5以上の液滴）が、微小液滴と合体されてもよい。そのような合体は、任意の簡便な手段（限定されないが、電場の適用によるもの等であり、ここで、電場は、流れる液滴と微小液滴の合体に効果的なものである）により行われても良い。

【0070】

上述の方法のバリエーションとして、液体は、噴流であっても良い。すなわち、液体を乳化して流れる液滴へと添加することよりもむしろ、この液体の長い噴流を形成し、標的微小液滴と並行して流しても良い。次いで、これらの2つの液体を、たとえば電場を適用することにより合体させててもよい。結果、Rayleighプラトー不安定性により、融合する前に標的微小液滴とほぼ同じサイズの微小液滴へと自然に崩壊する、微小液滴が存在する突出部を伴うジェットが生じる。多くの変異体も予期される。たとえば、1以上の剤（たとえば、ゲル化剤および／または界面活性剤）を噴流に添加して、より簡単に噴出するようにしててもよい。さらにまた、連続的な流れの粘度を調節し、噴出できるようにしてもよい（たとえば、U t a d a , e t a l . , P h y s . R e v . L e t t . 9 9 , 0 9 4 5 0 2 (2 0 0 7) に記述されている（その開示が参照により本明細書に援用される））。

【0071】

他の態様において、電極として注入流体それ自身を用いる方法（溶液中の溶解電解質を有効利用することによる）を用いて、1以上の剤を添加しても良い（図15～19）。一般的なこの方法は、本明細書の実施例3にさらに詳述する。

【0072】

他の態様において、試薬が添加されているドロップ（すなわち「標的ドロップ」）を、添加される試薬（「標的試薬」）を含有するドロップの内側に内包化することにより、よ

10

20

30

40

50

り早期に形成されたドロップ（たとえば微小液滴）へと試薬が添加される。ある実施形態において、適切な疎水性相（たとえば、油）の殻の中に標的ドロップを第一内包し、二重乳剤を形成することにより、そのような方法が行われる。次いで、二重乳剤は、標的試薬を含有するドロップにより内包化され、三重乳剤を形成する。標的試薬を含有するドロップと標的ドロップを混合し、次いで、二重乳剤を、適切な方法（限定されないが、電場の適用、液滴の接触面を不安定化させる化学物質の添加、三重乳剤を圧縮部および他のマイクロ流体学的配置に流す、機械的攪拌もしくは超音波の適用、温度上昇もしくは下降、または、磁場により引き抜かれた際に二重乳剤の接触面を破裂させることができる磁性粒子をドロップ内に内包化すること、を含む）を用いて押し開かせる。三重乳剤の作製方法および、標的ドロップと標的試薬の混合方法は、本明細書の実施例4に記述される。

10

【0073】

PCR産物の検出

本発明方法の実施において、PCR産物が検出される方法は変化しうる。たとえば、目的が単純に、群の中に存在する特定の細胞型（たとえば、腫瘍細胞）の数のカウントである場合、特徴のある遺伝子（たとえば、癌遺伝子）が存在し、PCR産物が生成された場合に、ドロップが蛍光を発するように、各微小液滴にSYBR Greenまたは任意の他の色素および／または挿入染色が各微小液滴に添加される、シンプルな二元アッセイを用いることにより目的が達成される。蛍光の変化は、蛍光の偏光によるものでありうる。検出成分には、挿入染色（たとえば、SYBR Green）の使用が含まれても良い。

【0074】

20

当分野公知の蛍光色素の使用を含む、様々な異なる検出成分を、本発明方法の実施に用いても良い。蛍光色素は、通常、ファミリー（フルオレセインおよびその誘導体；ローダミンおよびその誘導体；シアニンおよびその誘導体；クマリンおよびその誘導体；Cascade Blueおよびその誘導体；Lucifer Yellowおよびその誘導体；BODIPYおよびその誘導体等）に分類される。例示的な蛍光色素分子としては、インドカルボシアニン（indocarbocyanine）（C3）、インドジカルボシアニン（indodicarbocyanine）（C5）、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Texas Red、Pacific Blue、Oregon Green 488、Alexa fluor-355、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、JOE、Lissamine、ローダミングリーン、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、カルボキシ-フルオレセイン（FAM）、フィコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン（dRhodamine）、カルボキシテトラメチルローダミン（TAMRA）、カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、Picogreen、Ribo Green等が挙げられる。蛍光色素分子およびその使用に関する記述は、特に、R.Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th ed. (2002), Molecular Probes, Eugene, Oreg.; M.Schena, Microarray Analysis (2003), John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.; Synthetic Medicinal Chemistry 2003/2004 Catalog, Berry and Associates, Ann Arbor, Mich.; G.Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996); および、Glen Research 2002 Catalog, Sterling, VAに見出される。

30

【0075】

図14、パネルA～Bにおいて、たとえばドロップを含有する腫瘍細胞を検出するため

40

50

に用いることができる、単一色フローサイトメーターの使用について示す。パネルAには、検出器(対物レンズの背後へと向けられ、微小液滴が流れるマイクロ流体チャネルへと焦点が合わされた488nmのレーザーからなる)の概略図を示す。レーザーは、ドロップ内の蛍光色素を励起させ、ダイクロイックミラーおよび520±5nmのバンドパスフィルターを通してフィルタリングされた後、任意の発光が対物レンズにより捕捉され、PMT上で画像化される。パネルBにおいて、ドロップは、PMTのアウトプット電圧量として示される、時間関数としての強度におけるピークとして現れ、検出された蛍光ドロップに対する時間関数としての発光強度に比例する。

【0076】

図3および図4、パネルA～Bはさらに、そのような概念を解説する。たとえば、図3は、アレイ化された微小液滴における、*TaqMan*(登録商標)PCRアッセイを用いたBRAFのデジタル検出を示す非限定的な例である。蛍光ドロップは、ヒトゲノムDNAからのBRAF遺伝子の増幅を示し、一方、非蛍光ドロップは、当該遺伝子の欠損を示す。図4、パネルA～Bにおいて、このスキームを統合している。図4、パネルAにおいて、癌遺伝子配列を標的とする、微小液滴中に内包されたフォワードプライマーおよびリバースプライマーを示す概略図を示す。もし癌遺伝子配列が存在する場合、PCR反応により二本鎖PCR産物が産生され(パネルA、上)、一方、もし存在しない場合、何も産生されない(パネルA、下)。*Sybr Green*または他の任意のタイプの挿入染色もまた、ドロップ中に存在する。結果は、図4、パネルBの画像により示され、もし二本鎖産物が産生されている場合、色素はそれらに侵入し、蛍光を発し、ドロップから蛍光が発せられる(図4、パネルB、上)；一方、二本鎖産物が産生されない場合、色素は蛍光を発せず、薄暗いドロップが産生される(図4、パネルB、下)。

【0077】

他の態様において、もし目的が存在する癌遺伝子のさらなる特性解析である場合、追加の検証が必要となる。たとえば、本明細書に詳述される多重化アッセイの場合(実施例2)、どの遺伝子(複数含む)がドロップ内で増幅されたかを表す、光学的なアウトプットを有することにより、達成されてもよい。別の方法としては、たとえば、挿入染色と二元アウトプットを用いて、シンプルにどの液滴が任意の癌遺伝子を有しているのかを測定する。次いで、これらドロップがどの癌遺伝子を含有しているのかを測定するために、さらに詳細に分析できるよう、これらを選別して、回収してもよい。そのようなドロップ中に存在する癌遺伝子を測定するために、マイクロ流体学的技術または非マイクロ流体学的技術を用いても良い。非マイクロ流体学的技術を用いて、癌遺伝子を含有すると特定された液滴を、ウェルプレート上のウェルへと置き(そこで、より大きな体積へと希釈される)、多重化PCR反応の間に生成されたすべてのPCR産物を放出させてもよい。次いで、このウェル由来の試料を他のウェルに移し、各ウェルに、癌遺伝子のうちの1つに対するプライマーを添加する。次いで、これらウェルを温度循環させ、PCRを開始し、その時点で挿入染色を添加して、合致癌遺伝子とプライマーのあるウェルを発光させる。

【0078】

ゆえに、本発明の実施において、成分は、たとえば、蛍光における変化に基づいて検出されても良い。ある態様において、蛍光における変化は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)によるものである。この方法においては、5'プライマーがクエンチャー色素を有し、3'プライマーが蛍光色素を有する、特別なプライマーセットを用いる。これらの色素は、プライマー上のどこにでも(いずれか末端、または真ん中)配置してよい。プライマーは相補的であるため、溶液中では二本鎖として存在し、互いに非常に近接しているため、蛍光色素の発光はクエンチャー色素によりクエンチされており、溶液は暗い色に見える。PCRの後、これらプライマーは長いPCR産物の中に組み込まれ、ゆえに、互いに遠く離れることとなる。このことにより、蛍光色素は光を発し、溶液は蛍光を発するようになる。従って、特定の癌遺伝子が存在しているかどうかを検出するためには、蛍光色素の波長で液滴の強度を測定すればよい。異なる癌遺伝子が存在するかどうかを検出するためには、異なるプライマーに対し異なる色の色素を用いて行う。これにより、細胞中に存

10

20

30

40

50

在する癌遺伝子のプライマーに対応する、すべての波長で液滴は蛍光を発するようになる。

【0079】

選別

本発明方法の実施において、1以上の選別ステップを行っても良い。対象の選別方法としては、限定されないが、膜バルブ(membrane valves)、分岐チャネル、表面音響波、および/または、誘電泳動(dielectrophoresis)の使用を含む方法が挙げられる。対象の選別方法としては、さらに、図2および22、パネルA～Bに記述されているもの、および、Agresti, et al., PNAS vol. 107, no. 9, 4004-4009(その開示が参考により本明細書に援用される)に記述されているものが挙げられる。群は選別により富化されてもよく、所望の特性を有しているもの、有していないものが混在している群は、所望の特性を有していないものを取り除くことにより富化され、所望の特性を有する富化群が得られる。

【0080】

本明細書に記述される任意のステップの前後に選別を実行してもよい。さらに、2以上の選別ステップを微小液滴群に行っても良い(たとえば、約2以上の選別ステップ、約3以上の選別ステップ、約4以上の選別ステップ、または、約5以上の選別ステップ等)。複数の選別ステップを行う場合、当該ステップは、1以上の点において、実質的に同一、または異なっていても良い(たとえば、異なる特性に基づいた選別、異なる技術を用いた選別等)。

【0081】

さらに、液滴は、任意の選別ステップの前、または後で、精製されても良い。図21において、微小液滴が精製されうるマイクロ流体学的デバイスの概略図を示す。すなわち、たとえば細胞またはビーズ等の、ドロップ中に内包化されうる個別の試薬のいずれも取り除かれる事無く、ドロップ中のほとんどの液体が、精製された溶液と置換される。最初に微小液滴に溶液が共に注入され、その中にある任意の不純物が希釈される。次いで、希釈された微小液滴は、電場が電極を用いて適用されているマイクロ流体学的チャネルを通じて流される。電場により生じた誘電泳動力により、細胞または他の個々の試薬が電場を通過するにつれ、それらは流れの中で動かされる。次いで、ドロップは分割され、最後には、すべての物体は1つの微小液滴となる。従って、最初の微小液滴が精製されると、その中で、たとえばビーズまたは細胞等の個々の試薬は存在しつつ、および/または、濃縮されつつ、混入物が除去され、液滴内に内包化されたものは、得られた微小液滴中に維持されている。

【0082】

微小液滴は、1以上の特性にもとづいて選別されても良い。対象の特性としては、限定されないが、サイズ、粘度、質量、浮力、表面張力、電気伝導率、電荷、磁性、および/または、1以上の成分の存在もしくは非存在等が挙げられる。ある態様において、選別は、微小液滴中の細胞の存在または非存在に少なくとも部分的に基づいても良い。ある態様において、選別は、PCR増幅産物の存在または非存在の検出に少なくとも部分的に基づいても良い。

【0083】

微小液滴選別を、たとえば、細胞が存在しない微小液滴の除去のために用いても良い。内包化により、1以上の微小液滴がもたらされるが、ほとんどの微小液滴には、細胞が存在しない。そのような空のドロップがシステム中に残っていると、他の任意のドロップと同じように処理されてしまい、時間と試薬の無駄となる。最も良い効率とスピードで行うために、これらの空のドロップを、液滴選別で取り除いてもよい。たとえば、実施例1に記述されるように、液滴メーカーを、ドリッピング・ジェッティングトランジション(dripping-to-jetting transition)に近接して操作し、細胞が無い場合には、8μmの液滴が形成されるようにし；対照的に、細胞が存在する場合には、流れの中で生成された乱れにより、ジェットの崩壊が誘導され、直径25μmの

10

20

30

40

50

ドロップが形成される。ゆえに、デバイスは、2つに分かれた群（空の8 μm のドロップと、1つの細胞を含有する25 μm のドロップ）を生成し、次いで、それらを、サイズにより選別してもよい（たとえば、水力学的ソーターを用いて、大きく、1つの細胞を含有するドロップのみを回収する）。

【0084】

対象の受動ソーターとしては、水力学的ソーターが挙げられる（小さなドロップと大きなドロップは異なる部分でマイクロ流体学的チャネルを通ることに基づき、サイズに従い異なるチャネルへと微小液滴を選別する）。また、対象として、バルクソーターが挙げられ、そのシンプルな例は、重力場において、異なる質量のドロップを含有するチューブである。チューブを遠心、攪拌および／または振とうすることによって、より浮揚性のある、軽いドロップが、自然と容器の上へと移動する。磁性を有するドロップも同様のプロセスで選別することができる（ただし、容器に磁場を適用することを除く（磁性を有するドロップが、その磁性の大きさに従い自然にその磁場へと移動する））。また、本発明方法において用いられている受動ソーターは、その流れ特性に基づき、同時に多くのドロップを選別する、比較的大きなチャネルを含んでも良い。

10

【0085】

また、ピコ注入を用いて、ドロップの電気的特性を変化させることもできる。たとえば、これを用いて、イオンを添加することによりドロップの伝導性を変化させ、次いで、それを用いて、選別する（たとえば誘導泳動を用いる）。あるいは、ピコ注入を用いてドロップを荷電しても良い。ドロップ内へ荷電されている液体を注入することにより、これが行われ、注入の後、ドロップは荷電される。これにより、一部が荷電され、その他の部分は荷電されていないドロップの集団が産生され、次いで、電場領域を通して流すことにより荷電されたドロップを抽出され、そしてその荷電量に基づき、屈曲させる。添加された注入量に対して異なる電荷量を注入するために、ピコ注入を調節して異なる量の液体を注入することにより、または、電圧量を調節することにより、ドロップの最終電荷量が調製され、異なる電荷を有するドロップが産生される。次いで、電場領域中の異なる量により、これらは屈曲され、異なる容器へと選別される。

20

【0086】

適切な対象

本発明方法は、様々な異なる対象から採取された生物学的試料に適用してもよい。多くの実施形態において、対象は、「哺乳類」または「哺乳動物」であり、ここで、これらの用語は、哺乳類の綱にある生物（肉食動物目（たとえば、イヌおよびネコ）、齧歯目（たとえば、マウス、モルモットおよびラット）、および、靈長目（たとえば、ヒト、チンパンジーおよびサル）を含む）を記述するために広く用いられている。多くの実施形態において、対象は、ヒトである。本発明方法は、両方の性別のヒト対象、および、発達の任意の段階にあるヒト対象（すなわち、新生児、幼児、小児、青年、成人）に適用しても良く、ある実施形態においては、ヒト対象は、小児、青年、または成人である。本発明はヒト対象に適用してもよいが、本発明方法はまた、他の動物対象（すなわち、ヒトではない対象。たとえば、限定されないが、鳥類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、家畜およびウマ等）にも実施でき得ることを理解されたい。ゆえに、本発明方法による評価の必要のある任意の対象が、適切な対象であることを理解されたい。

30

【0087】

さらに、適切な対象としては、たとえば癌等の疾患有すると診断されている、または診断されていない者が含まれる。適切な対象としては、1以上の癌の臨床所見を示している、または示していない者が含まれる。ある態様において、対象は、たとえば、家族歴、化学物質および／または環境的曝露、遺伝子変異（複数含む。たとえば、B R C A 1および／またはB R C A 2変異）、ホルモン、感染体、放射線曝露、ライフスタイル（たとえば、食事および／または喫煙）、1以上の他の疾患状態の存在等の、1以上の因子により、癌を発症するリスクがありうる者であっても良い。

40

【0088】

50

上記に詳述されるように、様々な異なるタイプの生物学的試料が、そのような対象から得られても良い。ある実施形態において、全血が対象から抽出される。所望の場合、本発明方法実施の前に、全血は処理されても良い（たとえば、遠心分離、分画、精製等）。対象から抽出される全血試料の量は、100 mL以下（たとえば、約100 mL以下、約50 mL以下、約30 mL以下、約15 mL以下、約10 mL以下、約5 mL以下、または約1 mL以下）であっても良い。

【0089】

本明細書に開示される本発明方法およびデバイスは、固定細胞または生細胞の両方に対して適合性を有する。ある実施形態において、本発明方法およびデバイスは、生細胞で行われる。他の実施形態において、本発明方法およびデバイスは、固定細胞で行われる。細胞性試料を固定することにより、試料を洗浄して、下流分析に干渉する可能性のある小分子および脂質を抜き取ることができる。さらに、細胞を固定し、透過処理を行うことにより、表面タンパク質に対する抗体および細胞内タンパク質に対する抗体で細胞を染色することができる。本明細書に記述されるRT-PCR法と組み合わせて、そのような染色を行うことにより、高レベルの多重化処理を行うことができる（抗体は細胞試料に局在し、一方でRT-PCR産物は微小液滴内に遊離しているため）。そのような配置を行うことにより、抗体および、RT-PCRにより生成された増殖物に対して、同色の色素を用いることができる。任意の適切な方法（限定されないが、ホルムアルデヒド、メタノールおよび／またはアセトンを用いた固定を含む）を用いて細胞を固定することができる。

【0090】

微小液滴中に内包された固定細胞に対して行われるRT-PCRは、最初に微小液滴を希釈し、そして、希釈された微小液滴の試料に対しRT-PCRを行うことにより実行することができる。そのような細胞性試料の希釈により、RT-PCRを妨げる任意の細胞性成分を制限することができる。他の実施形態においては、RT-PCR試薬は、全く希釈されていない試料での、「ワンポット」反応で固定された細胞を含有する微小液滴に直接添加される。ある実施形態において、固定細胞は、プロテアーゼおよび洗剤を用いてRT-PCRの前に可溶化される。

【0091】

細胞の遺伝子型決定

上述のように、本発明の態様にはまた、生物学的試料由来の成分を遺伝子型決定する方法が含まれる。「遺伝子型決定」とは、特定の細胞中の2以上のオリゴヌクレオチド（たとえば、癌遺伝子）を検出することを意味する。本発明方法の態様には、細胞（たとえば、腫瘍細胞（CTCを含む））を遺伝子型決定する方法が含まれる。

【0092】

そのようなある態様において、本発明方法には、対象の血液試料から得た細胞を微小液滴中に内包化することが含まれ、ここで、1つの細胞が、当該微小液滴中に含まれ；溶解剤を微小液滴へと導入すること、および細胞溶解に効果的な条件下で微小液滴をインキュベートすることが含まれ；ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試薬および複数のPCRプライマーを微小液滴へと導入すること、ならびに、PCR增幅ができる条件下で微小液滴をインキュベートして、PCR增幅産物を產生することが含まれ、ここで、当該複数のPCRプライマーには、1以上の癌遺伝子にそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーが含まれ；微小液滴に複数のプローブを導入することが含まれ、ここで、当該プローブは、対象の1以上の変異にハイブリダイズし、および、異なる波長で蛍光を発し；ならびに、プローブの蛍光検出により、特定のPCR增幅産物の存在または非存在を検出することが含まれ、ここで、蛍光の検出は、当該PCR增幅産物の存在を示唆するものであり；ここで、1以上のステップが、マイクロ流体学的な制御のもとで行われる。

【0093】

他の態様において、本発明方法には、対象の血液試料から得た細胞を微小液滴中に内包化することが含まれてもよく、ここで、1つの細胞が、当該微小液滴中に含まれ；溶解剤を微小液滴へと導入すること、および細胞溶解に有効な条件下で微小液滴をインキュベー

10

20

30

40

50

トすることが含まれてもよく；ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）試薬および複数のP C Rプライマーを微小液滴へと導入すること、ならびに、P C R增幅ができる条件下で微小液滴をインキュベートして、P C R增幅産物を產生することが含まれてもよく、ここで、当該複数のP C Rプライマーには、1以上の癌遺伝子にそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーが含まれ；微小液滴に複数のプローブを導入することが含まれてもよく、当該プライマーは、標識を含有するフォワードプライマー、および、捕捉配列を含有するリバースプライマーを含有し；蛍光ビーズを微小液滴に導入することが含まれてもよく、ここで、当該ビーズには、捕捉配列に対して相補的なスクレオチド配列が含まれ；ならびに、ビーズの蛍光およびプライマーの蛍光の検出により、P C R增幅産物の存在または非存在を検出し、ここで、蛍光の検出は、当該P C R增幅産物の存在を示唆するものであり；ここで、1以上のステップが、マイクロ流体学的な制御のもとで行われる。

【0094】

細胞遺伝子型決定法の実施において、本明細書に記述される一般ステップに対する任意の変更（たとえば、添加されるプライマーの数、試薬が添加される様式、適切な対象等）が行われても良い。

【0095】

癌の検出

本発明による方法にはまた、癌を検出するための方法が含まれる。そのような方法には、対象由来の生物学的試料から得たオリゴスクレオチドを微小液滴中に内包することが含まれても良く、ここで、少なくとも1つのオリゴスクレオチドが当該微小液滴中に存在してあり；ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）試薬および複数のP C Rプライマーを微小液滴へと導入すること、ならびに、P C R增幅ができる条件下で微小液滴をインキュベートして、P C R增幅産物を產生することが含まれてもよく、ここで、当該複数のP C Rプライマーには、1以上の癌遺伝子にそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーが含まれてもよく；および、検出成分の検出によりP C R增幅産物の存在または非存在を検出することが含まれもよく、ここで、当該検出成分の検出は、P C R增幅産物の存在を示唆する。

【0096】

1以上の癌遺伝子に対応する1以上のP C R增幅産物の検出は、対象が癌を有していることの指標であってもよい。微小液滴に添加される具体的な癌遺伝子は変更されてもよい。ある態様において、癌遺伝子（複数含む）は、癌の特定の型（たとえば、乳癌、結腸癌等）に特異的であってもよい。

【0097】

さらに、本発明方法の実施において、成分が検出される生物学的試料は変化してもよく、および、検出を試みる癌の特定の型に少なくとも部分的に依存するものであってもよい。たとえば、対象が乳癌等を有しているかどうかを測定することが望ましい場合には、乳房組織が、ある例においては生物学的試料として用いられても良い。

【0098】

癌検出方法の実施において、本明細書に記述される一般ステップに対する任意の変更（たとえば、添加されるプライマーの数、試薬が添加される様式、適切な対象等）が行われても良い。

【0099】

デバイス

上述のように、本発明の実施において、マイクロ流体学的なデバイスが用いられる。本発明のマイクロ流体学的デバイスは様々な方法で特徴付けられても良い。ある実施形態において、たとえば、マイクロ流体学的デバイスは、少なくとも1つの「マイクロ」チャネルを有している。そのようなチャネルは、少なくとも1つの、ミリメーターまたはそれより小さい桁の切断面寸法を有していてもよい（たとえば、約1ミリメーター以下）。言うまでもなく、ある応用に対しては、この寸法は調整されてもよい；一部の実施形態においては少なくとも1つの切断面寸法は、約500マイクロメーター以下である。一部の実施

10

20

30

40

50

形態においては、応用が可能ならば、切断面寸法は約100マイクロメーター以下（約10マイクロメーター以下～一部では約1マイクロメーター以下）である。切断面寸法は、通常は中心線の流れの検出に対して垂直であるが、流れが屈曲している、または、流れの方向を変えるような他の特性がある場合には、作動中の切断面寸法は、流れに対して厳密に垂直である必要はない。また、一部の実施形態においては、マイクロチャネルは2以上の切断面寸法（たとえば、楕円形の切断面の主軸および複軸、または、長方形の切断面の高さおよび幅等）を有する可能性があることを理解されたい。これらの寸法のいずれかを、本明細書に提示されるサイズに対して比較してもよい。本発明に用いられるマイクロチャネルは、きわめて不均衡な2つの寸法（たとえば、約100～200マイクロメーターの高さと、センチメーターまたはそれ以上の桁にある幅を有する長方形の切断面等）を有していても良いことに注意されたい。もちろん、あるデバイスでは、2以上の軸が非常に類似、または同じサイズであるチャネルが用いられても良い（たとえば、正方形または円形の切断面を有するチャネル）。 10

【0100】

一部の実施形態において、本発明のマイクロ流体学的デバイスは、マイクロ加工技術を用いて加工されている。そのような技術は、集積回路（IC）、マイクロマシンデバイス（MEMS）、ディスプレイデバイス等を加工するために普遍的に用いられている。マイクロ流体学的デバイス中の小さな寸法パターンを製造するために用いることができるマイクロ加工技術方法の型の中には、フォトリソグラフィー（X線リソグラフィー、e-ビームリソグラフィー等）、自己整合型堆積およびエッチング技術、異方性堆積、およびエッチング処理、自己アセンブリマスク形成（たとえば、疎水性・親水性コポリマー相の形成）等がある。 20

【0101】

上述の点において、本明細書に記述される一部の原理および設計特性は、ミリメーター、またはさらにはセンチメーターの大きさのチャネル切断面におよぶチャネルを使用するデバイスならびにシステムを含む、より大きなデバイスおよびシステムに拡大させることができる。ゆえに、一部のデバイスおよびシステムを「マイクロ流体学的」と記述する場合、当該記述は、ある実施形態においては、いくらか大きなスケールのデバイスに対しても等しく適用されることが意図される。 30

【0102】

マイクロ流体学的な「デバイス」と呼称する場合、通常、それは、1以上のチャネル、容器、ステーション等が連続的な基盤（モノリシックであっても、なくてもよい）を共有する1つの実体を表すことが意図される。マイクロ流体学的な「システム」には、1以上のマイクロ流体学的デバイス、および、関連流体コネクション、電気的コネクション、制御／論理的特性等を含有してもよい。マイクロ流体学的デバイスの態様において、1以上の液体フローパス（たとえば、本明細書に記述される寸法を有するチャネル）の存在を含有されてもよい。 40

【0103】

ある実施形態において、本発明のマイクロ流体学的デバイスは、液体培地の連続的な流れをもたらす。マイクロ流体学的デバイスの中のチャネルを通って流れる液体は、多くの興味深い特性を示す。典型的には、無次元 Reynolds数が非常に低く、その結果、常に層状となる流れが生じる。さらに、このレジームにおいて、接合する2つの液体は容易に混合されず、2つの成分の混合をもたらすのは拡散のみである。

【0104】

本発明での使用に適したマイクロ流体学的デバイス構成要素の様々な特性および例を以下に記述する。

【0105】

基盤

マイクロ流体システムに用いられる基盤は、液体移送に必要な要素が備わっている支持体である。基本的な構造はモノリシック、薄板化された、または分割されたものであって 50

も良い。一般的に、基盤には、分子ライブラリおよび試薬（もし必要であれば）の導管として供される1以上のマイクロチャネルが含まれている。また、それらには、インプットポート、アウトプットポート、および／または、流れの制御を補助する機能が含まれても良い。

【0106】

ある実施形態において、基盤選択は、アプリケーションおよびデバイス設計に依存していてもよい。基盤物質は通常、様々な操作条件に適合するよう選択される。所与の物質に対するマイクロ加工処理における制限もまた、適切な基盤選択における関連検討事項である。有用な基盤物質としては、たとえば、ガラス、ポリマー類、シリコン、金属およびセラミックが挙げられる。

10

【0107】

ポリマー類は、費用効率が良く、大量生産も容易であることから、マイクロ流体デバイスの標準的な物質となっている。ポリマーは、その成形挙動により3つのカテゴリーに分類することができる：熱可塑性ポリマー、エラストマー・ポリマーおよびデュロプラスチック（d u r o p l a s t i c）ポリマーである。熱可塑性ポリマーは、ガラス遷移温度を超えて形状成形することができ、ガラス遷移温度を下回って冷却された後でもその形状を維持する。エラストマー・ポリマーは、外力を適用させることで延長させることができが、外力が無くなった時点で、元の状態に戻る。エラストマーは、熱分解温度に達する前には溶解しない。デュロプラスチックポリマーは、その熱分解温度に温度が達する前に少し柔らかくなるため、最終形態へと鋳型成形しなければならない。

20

【0108】

本発明のマイクロ加工されたデバイスにおいて用いられるポリマーとしては、ポリアミド（P A）、ポリブチレンテレフタレート（P B T）、ポリカーボネート（P C）、ポリエチレン（P E）、ポリメチルメタクリレート（P M M A）、ポリオキシメチレン（P O M）、ポリプロピレン（P P）、ポリフェニレンエーテル（P P E）、ポリスチレン（P S）およびポリスルホン（P S U）がある。ポリマーの化学的特性および物理的特性は、マイクロ流体学的デバイスにおけるその使用を制限することがある。特に、ガラスとの比較において、化学物質に対する抵抗性の低さ、劣化、機械的安定性、およびU V安定性は、ある応用に対するポリマー使用を制限する。

30

【0109】

基盤物質として用いられることがあるガラスは、ある操作条件下で、特有の利点を有する。ガラスはほとんどの液体およびガスに対して化学的に不活性であるため、プラスチックを溶かす傾向を有する、ある溶媒を用いる応用に対し特に適切である。さらに、その透明性から、ガラスは光学的検出またはU V検出に対して特に有用である。

【0110】

表面処理およびコーティング

マイクロ流体学的デバイスの機能的構造の制御（たとえば、流れの制御）に対しては、表面修飾が有用である。たとえば、チャネル壁に流体種が吸着することを防ぎ、または、生物学的成分検出用の表面に抗体を付着させるのに有利でありうる。

【0111】

ポリマーデバイスは特に疎水性の傾向があり、ゆえに、チャネルにローディングすることは困難となる可能性がある。ポリマー表面の疎水性はまた、電気浸透流（E O F）の制御を困難にする。ポリマー表面をコーティングする1つの技術は、高分子電解質の多分子層（P E M）をチャネル表面に塗布することである。P E Mには、プラス荷電の高分子電解質とマイナス荷電の高分子電解質の溶液で交互に連続してチャネルを充填し、それにより、多分子層が静電結合を形成するようになる。通常、層はチャネル表面に結合しないが、長期間保存後でさえもチャネルを完全に覆うことはできる。ポリマー表面に親水層を塗布するための他の技術としては、チャネル表面へのポリマーのU Vグラフトィングがある。第一のグラフトィング部位、ラジカルは、モノマー溶液にデバイスを同時に曝露させながら、表面をU V照射曝露させることにより表面に生成される。モノマーは反応して、ボ

40

50

リマーが形成される（反応部位で共有結合される）。

【0112】

ガラスのチャネルは一般的に、高レベルの表面電荷を有しており、それにより、タンパク質が吸着し、分離プロセスが妨げられる可能性がある。一部の場合において、ガラスのチャネルにポリジメチルシロキサン（P D M S）および／または界面活性剤コーティングを塗布することが有利である場合がある。表面吸着を抑制するために用いることができる他のポリマーとしては、ポリアクリルアミド、グリコール基、ポリシロキサン、グリセログリシドキシプロピル、ポリ（エチレングリコール）および、ヒドロキシエチル化ポリ（エチレンイミン）が挙げられる。さらに、電気浸透デバイスに関しては、デバイス内部の条件を操作することにより（たとえば、p H）、強さを調節することができる電荷を帯びたコーティングを施すことが有利である。コーティングは正荷電または負荷電のいずれであっても良いため、流れの方向もまた、コーティングに基づき選択することができる。10

【0113】

特殊化されたコーティングもまた、ある種のものをチャネル表面上に固定するために適用することができる。このプロセスは、「表面の機能化」として当業者に公知である。たとえば、ポリメチルメタクリレート（P M M A）表面を、アミン類でコートして、様々な官能基または標的の付着を促進してもよい。あるいは、P M M A表面は、酸素プラズマ処置プロセスを介して、親水性の状態となることができる。

【0114】

マイクロ流体学的な要素20

マイクロ流体システムには、多くのマイクロチャネル、バルブ、ポンプ、リアクター、ミキサーおよび他の構成要素が含有されてもよい。これらの構成要素およびその全体構造および寸法のいくつかを以下に記述する。

【0115】

様々なタイプのバルブを、本発明のマイクロ流体学的なデバイスにおける流れの制御に用いることができる。それらとしては、限定されないが、能動バルブおよびチェックバルブ（膜、フラップ、二弁膜（b i v a l v u l a r）、リーケージ等）が挙げられる。これらのバルブを通る流速は、たとえば、表面積、流れチャネルのサイズ、バルブ物質等のバルブの様々な物理学的特性に依存している。また、バルブは、関連した操作上および製造上の利点／欠点を有しており、それらは、マイクロ流体学的デバイスの設計に考慮されなければならない。30

【0116】

他のマイクロ流体学的成分と同様、マイクロポンプも製造上の制限を受ける。ポンプ設計における典型的な検討事項としては、泡の処置、詰まり、および耐久性が挙げられる。現在利用可能なマイクロポンプとしては、限定されないが、電気的等価ポンプ、一定ストロークの微小移動、蠕動式マイクロ膜、およびチェックバルブを組み込んだポンプが挙げられる。

【0117】

マクロデバイスは、たとえば試薬を混合するための振とうおよび攪拌等の乱流力（t u r b u l e n t f o r c e）に依存している。比較すると、そのような乱流力は実際上、マイクロデバイスには適さず、マイクロ流体学的デバイスにおける混合は、ほとんどの場合、拡散を介して行われる。拡散を介した混合は遅く、非効率的であるため、多くの場合、微細構造を設計して混合プロセスを強化する。これらの構造は、液体領域間の界面表面積を増加させる方法で液体を操作し、それにより、拡散をスピードアップさせる。ある実施形態において、マイクロ流体学的なミキサーが用いられる。そのようなミキサーは、本発明のマイクロ流体学的な分離デバイスから上流に備えられて（一部の場合においては、組み込まれて）も良い。40

【0118】

マイクロミキサーは、2つの大まかなカテゴリーに分類されうる：能動ミキサーおよび受動ミキサーである。能動ミキサーは、流れ領域に能動的な制御を行うことにより作動す50

る（たとえば、圧力勾配、電気量を変化させることによる）。受動ミキサーはエネルギーを供給する必要はなく、「流体力学」のみを用いて（たとえば、圧力）、一定の率で液体の流れを操作する。受動ミキサーの一例としては、プレートにより分離されたそれぞれの上に2つの流れを並べることが含まれる。分離プレートが取り除かれた時点で、流れは互いに接触する。2つの液体を並べることにより、接触面積が広がり、拡散距離が減少し、それにより、拡散プロセスが強化されることとなる。もし熱の管理が必要な場合には、混合および反応デバイスは、熱移送システムに連結されていても良い。マクロ熱交換と同様に、マイクロ熱交換も、並流、逆流、または直交流の流れスキームのいずれかを有していても良い。マイクロ流体学的なデバイスは多くの場合、約 $10\text{ }\mu\text{m}$ ～約 10 cm の間のチャネル幅と深さを有している。一般的なチャネル構造には、長いメインの分離チャネル、および3つの短い「オフショート」なサイドチャネル（緩衝液容器、試料容器、または廃液容器のいずれかで終わる）が含まれる。分離チャネルは、数センチメーターの長さであっても良く、3つのサイドチャネルは通常、わずか数ミリメーターの長さである。もちろん、マイクロ流体学的なデバイスの実際の長さ、切断面領域、形、およびプランチの設計は、たとえばスループット（流れ抵抗に依存する）、速度プロファイル、滞留時間等の他の設計検討事項と同様、アプリケーションに依存している。10

【0119】

本明細書に記述されるマイクロ流体学的なデバイスは、本明細書に記述される方法のあるステップ（限定されないが、ピコ注入、液滴合体、選択液滴融合、および液滴選別等を含む）を実施するための電場ジェネレーターを含んでも良い。ある実施形態において、電場は、金属電極を用いて生じさせてもよい。特定の実施形態において、電場は、液体電極を用いて生じさせても良い。ある実施形態において、液体電極は、伝導性の液体（たとえば、塩水または緩衝液）で満たされ、電場があることが望ましいマイクロ流体学的デバイスの中の位置に置かれた液体電極チャネルを含む。特定の実施形態において、液体電極は、電源装置または高電圧增幅器を用いて、作動される。一部の実施形態において、液体電極チャネルには、伝導性液体が液体電極チャネルに添加される注入口ポートが含まれる。そのような伝導性液体は、たとえば、液体で満たされたチューブと注入口ポートを連結し、圧力を加えることにより、液体電極チャネルに添加されても良い。特定の実施形態において、液体電極チャネルはまた、チャネルからの伝導性液体を放出するための排水口ポートを含む。特定の実施形態において、液体電極は、本明細書に記述されるマイクロ流体学的デバイスの、ピコ注入、液滴合体、選択液滴融合、および／または、液滴選別の態様において用いられる。液体電極は、たとえば、電場の適用を介して注入される物質が帯電していない場合の用途が見いだされうる。20

【0120】

本明細書に記述される液体電極はまた、本明細書に検討される特定のマイクロ流体学的デバイス応用の外にある適用性を有する。たとえば、液体電極は、金属電極が一般的に用いられている様々なデバイスにおいて利用されても良い。さらに、液体電極は、柔軟性のあるデバイス（たとえば、身体の上に装着されるよう設計されているデバイス、および／または、その操作の結果として、曲がらなければならないデバイス等）における使用に特に良く適していても良い。30

【0121】

ある実施形態において、インプットマイクロチャネル、ペアリングマイクロチャネル、および／または、ピコ注入マイクロチャネルのうちの1つ以上の接合部のすぐ下流にある、マイクロ流体学的デバイスのチャネルの1以上の壁に、1以上の切り込み（リッジ）が含まれる。マイクロチャネルの壁のそのような切り込みは、適切な相（たとえば、適切な疎水相（たとえば油））の層を捕捉するように構成されており、それにより、非混合相（たとえば、水性相）が、マイクロチャネルの壁に接触しないようにし、チャネルの壁が濡れることを防ぐ。予測できないドロップ形成がもたらされる、および／または、液体がドロップ間に移送されてしまい、汚染が生じることとなるため、そのように濡れてしまうことは望ましくない。ある実施形態において、切り込みは、より高い流速比率 R （ Q_a / Q_q 40

10

20

30

40

50

$/ Q_{sum}$) でドロップの形成をもたらす。

【0122】

ある実施形態において、マイクロ流体学的デバイスのマイクロチャネル（インプットマイクロチャネル、ペアリングマイクロチャネル、ピコ注入マイクロチャネル、および／または、これらのチャネルのうちの 1 以上の上流もしくは下流にある流れチャネル）のうちの 1 以上の幅は、100 ミクロン以下（たとえば、90 ミクロン以下、80 ミクロン以下、70 ミクロン以下、60 ミクロン以下、50 ミクロン以下、たとえば、45 ミクロン以下、40 ミクロン以下、39 ミクロン以下、38 ミクロン以下、37 ミクロン以下、36 ミクロン以下、35 ミクロン以下、34 ミクロン以下、33 ミクロン以下、32 ミクロン以下、31 ミクロン以下、30 ミクロン以下、29 ミクロン以下、28 ミクロン以下、27 ミクロン以下、26 ミクロン以下、25 ミクロン以下、20 ミクロン以下、15 ミクロン以下、または 10 ミクロン以下）である。一部の実施形態において、上述のマイクロチャネルのうちの 1 以上の幅は、約 10 ミクロン～約 15 ミクロン、約 15 ミクロン～約 20 ミクロン、約 20 ミクロン～約 25 ミクロン、約 25 ミクロン～約 30 ミクロン、約 30 ミクロン～約 35 ミクロン、約 35 ミクロン～約 40 ミクロン、約 40 ミクロン～約 45 ミクロン、または約 45 ミクロン～約 50 ミクロン、約 50 ミクロン～約 60 ミクロン、約 60 ミクロン～約 70 ミクロン、約 70 ミクロン～約 80 ミクロン、約 80 ミクロン～約 90 ミクロン、または、約 90 ミクロン～約 100 ミクロンである。
10

【0123】

ある実施形態において、1 以上の各切り込みのベースは、約 10 ミクロン～約 20 の長さであり、たとえば、約 11 ～ 約 19 ミクロンの長さ、約 12 ～ 約 18 ミクロンの長さ、約 13 ～ 約 17 ミクロンの長さ、約 14 ～ 約 16 ミクロンの長さ、または約 15 ミクロンの長さである。
20

【0124】

ある実施形態において、各 1 以上の切り込みのピークは、約 1 ～ 約 10 ミクロン、たとえば、約 1 ～ 約 9 ミクロン、約 2 ～ 約 8 ミクロン、約 3 ～ 約 7 ミクロン、約 4 ～ 約 6 ミクロン、または約 5 ミクロンの幅を有している。ある実施形態において、各 1 以上の切り込みのピークは、約 1 ミクロン～約 2 ミクロン、約 2 ミクロン～約 3 ミクロン、約 3 ミクロン～約 4 ミクロン、約 4 ミクロン～約 5 ミクロン、約 5 ミクロン～約 6 ミクロン、約 6 ミクロン～約 7 ミクロン、約 7 ミクロン～約 8 ミクロン、約 8 ミクロン～約 9 ミクロン、または約 9 ミクロン～約 10 ミクロンの幅を有している。
30

【0125】

ある実施形態において、各 1 以上の切り込みの高さは、約 5 ミクロン～約 15 ミクロン、たとえば、約 6 ミクロン～約 14 ミクロン、約 7 ミクロン～約 13 ミクロン、約 8 ミクロン～約 12 ミクロン、約 9 ミクロン～約 11 ミクロン、または約 10 ミクロンである。

【0126】

ある実施形態において、各 1 以上の切り込みのベースと各 1 以上の切り込みの高さの比率は、約 1 . 0 : 0 . 75 ～ 約 0 . 75 : 1 . 0 である。ある実施形態において、各 1 以上の切り込みのベースと各 1 以上の切り込みのピークの幅の比率は、約 1 . 0 : 0 . 5 ～ 約 1 . 0 : 0 . 1、たとえば、約 1 . 0 : 0 . 2、約 1 . 0 : 0 . 3、または約 1 . 0 : 0 . 4 である。
40

【0127】

ある実施形態において、各 1 以上の切り込みのベースと各 1 以上の切り込みの高さと、各 1 以上の切り込みの幅の比率は、約 1 : 0 . 75 : 0 . 5 である。

【0128】

ある実施形態において、本明細書に記述されるチャネルは、チャネル壁に沿った距離にわたる複数の切り込みと共に提供されている。この距離は、たとえば、約 50 ミクロン～約 500 ミクロン、たとえば、約 50 ミクロン～約 450 ミクロン、約 100 ミクロン～約 400 ミクロン、約 150 ミクロン～約 350 ミクロン、約 200 ミクロン～約 300 ミクロン、または、約 250 ミクロンであってもよい。ある実施形態において、複数の切
50

り込みは、チャネル壁に沿った距離にわたり提供されてもよく、ここで、チャネル壁に沿った距離とチャネルの幅の間の比率は、約 10 : 1 ~ 約 1 : 2、たとえば、約 10 : 1、約 9 : 1、約 8 : 1、約 7 : 1、約 6 : 1、約 5 : 1、約 4 : 1、約 3 : 1、約 2 : 1、約 1 : 1、または約 1 : 2 である。

【 0 1 2 9 】

上述の様々な 1 以上の寸法が、特定のアプリケーションに対し適したものとなるようにスケールアップまたはスケールダウンしても良いことに注記されたく、たとえば、上述の寸法のそれぞれは、必要に応じて、2、5、10 またはそれ以上の倍数でスケールアップまたはスケールダウンされてもよい。

【 0 1 3 0 】

一部の実施形態において、1 以上のチャネル接合部（たとえば、ピコ注入接合部等の 1 以上の液滴形成接合部）が、「ステップダウン」構造を有する。たとえば図 26 に示しており、ここで、ピコ注入部接合部およびピコ注入部接合部の下流の流れチャネルの部分は、ピコ注入部接合部の上流の流れチャネルの部分よりも広い。このステップダウン構造により、液滴の摘み取りが促進され、ゆえに、液滴形成も促進される。ステップサイズは、形成される液滴の所望されるサイズに基づき選択されてもよく、大きなステップは大きな液滴を形成する。また、そのような構造により、原材料が、ピコ注入部から液滴へと注入した後に、ピコ注入部からポタポタと滴り落ちることを防いでもよい。一部の実施形態において、ピコ注入部接合部およびピコ注入部接合部の下流の流れチャネルの幅は、ピコ注入部接合部のすぐ上流の流れチャネルの幅よりも約 5 % ~ 約 50 % 広く、たとえば、約 5 ~ 約 10 % 広く、約 10 ~ 約 20 % 広く、約 20 ~ 約 30 % 広く、約 30 ~ 約 40 % 広く、または、約 40 ~ 約 50 % 広く。
20

【 0 1 3 1 】

加工方法

マイクロ加工プロセスは、基盤に用いられた材料のタイプ、および所望される製造量に依存して異なる。少量生産、またはプロトタイプ製造に対しては、LIGA、粉末爆破、レーザー切除、機械的加工、放電機械加工、光造形等の加工技術が挙げられる。マイクロ流体学的デバイスの大量生産のための技術には、リソグラフィックプロセスまたはマスターベースプロセスのいずれかを用いても良い。シリコン／ガラス由来の基盤を加工するためのリソグラフィックプロセスとしては、半導体デバイスの加工に普遍的に用いられているウェットエッティングおよびドライエッティングの両方が挙げられる。射出形成および熱エンボス加工は多くの場合、プラスチック基板の大量生産に用いられる。
30

【 0 1 3 2 】

ガラス、シリコンおよび他の「硬い」原材料（リソグラフィ、エッティング、蒸着）

リソグラフィー、エッティングおよび蒸着技術の組み合わせを用いてガラス、シリコンおよび他の「硬い」原材料のマイクロ管（micro canal）および微小空洞を作製してもよい。上述の技術に基づいた技術は、0.1 ~ 500 マイクロメーターのスケールでのデバイス加工に普遍的に応用されている。

【 0 1 3 3 】

現在の半導体加工プロセスに基づいたマイクロ加工技術は通常、クリーンルームで行われている。クリーンルームの質は、立方インチあたりの 4 μm 未満のサイズの粒子の数により分類されている。MEMS マイクロ加工に対する典型的なクリーンルームのクラスは、1000 ~ 10000 である。
40

【 0 1 3 4 】

ある実施形態においては、マイクロ加工にフォトリソグラフィーが用いられても良い。フォトリソグラフィーにおいて、基盤に蒸着されるフォトレジストは、光マスクを通して光源に露出される。標準的なフォトレジスト法により、10 ~ 40 μm までの構造の高さとすることができます。もしさらに高い構造が必要である場合には、たとえば SU-8、またはポリイミド等の、より厚いフォトレジストを用いることができる（1 mm までの高さとなる）。
50

【0135】

マスク上のパターンをフォトレジストで覆った基盤に移した後、次いで、基質に、ウェットプロセスまたはドライプロセスのいずれかを用いてエッチングを施す。ウェットエッチングにおいては、基盤（マスクにより防御されていない領域）は、液相中で化学処理を受ける。エッチングプロセスにおいて用いられる液体試薬は、エッチングが等方性または異方性のいずれであるかに依存する。等方性エッチングは通常、酸を使用して3次元構造（たとえば、球状空洞）をガラスまたはシリコン中に形成する。異方性エッチングは、高度に塩基性の溶媒を用いて、たとえば壁および管等の平坦な表面を形成する。シリコン上の異方性ウェットエッチングは、傾いたチャネルプロファイルを形成する。

【0136】

ドライエッチングには、ガス相またはプラズマ相のいずれか中でイオンにより基盤を処理することを含む。ドライエッチング技術を用いて、長方形のチャネル切断面および任意のチャネル経路を作製することができる。使用される様々なタイプのドライエッチングとしては、物理的、化学的、物理化学的（たとえば、RIE）、および阻害物質を伴う物理化学的なものが挙げられる。物理的エッチングは、電場により加速され、構造を「エッチング」するよう基盤表面に衝突するイオンを用いる。化学的エッチングは電場を用いて化学種を基盤表面へと移動させてもよい。次いで、化学種を基盤表面と反応させ、くぼみと揮発性種を產生する。

【0137】

ある実施形態においては、蒸着がマイクロ加工に用いられる。蒸着技術を用いて、金属、絶縁物、半導体、ポリマー、タンパク質および他の有機基盤の層を形成してもよい。ほとんどの蒸着技術は、2つの主なカテゴリーのうちの1つに分類される：物理的蒸着（PVD）および化学的蒸着（CVD）である。PVDの一つの方法において、基盤標的には、保持ガス（holding gas。たとえば蒸発により產生される）と接触する。ガス中のある種が、標的の表面に吸着し、蒸着を構成する相を形成する。マイクロエレクトロニクス加工業界において普遍的に用いられている他の方法において、蒸着される物質を含有する標的は、アルゴンイオンビームまたは他の適切なエネルギー源を用いて、スパッタされる。スパッタされた物質を、次いで、マイクロ流体学的デバイスの表面上に蒸着させる。CVDにおいては、標的と接触している種が表面と反応し、目的物に化学結合した成分を形成する。他の蒸着技術としては、スピンドルコーティング、プラズマスプレー法、プラズマ重合、浸漬被覆、铸造およびLangmuir-Blodgettフィルム蒸着が挙げられる。プラズマスプレー法において、100imまでの直径の粒子を含有する細かい粉末を担体ガス中に懸濁する。粒子を含有する混合物を、プラズマジェットを通して加速させ、加熱する。溶かされた粒子を基盤の上に散らし、凍結させ、濃いコーティングを形成させる。プラズマ重合により、有機蒸気を含有するプラズマからポリマーフィルム（たとえば、PMMA）が产生される。

【0138】

マイクロチャネル、微小空洞および他の機能がガラスまたはシリコン基板へエッチングされた時点で、エッチングされた機能は通常、シールされ、マイクロ流体学的なデバイスを確実に「防水」させる。シーリングを行う際、互いに接触させる全ての表面に接着を行っても良い。シーリングプロセスは、融合技術（たとえば、ガラス-シリコン、ガラス-ガラス、またはシリコン-シリコンの間の接合のために開発されたもの）を含んでも良い。

【0139】

陽極接合を、ガラスとシリコンの接合に用いても良い。電圧をガラスとシリコンの間に適用させ、システムの温度を上げて、表面シーリングを誘導する。電場および温度上昇により、ガラス内のナトリウムイオンがガラス-シリコンの接合部分へと移動する。ガラス-シリコン接合部分のナトリウムは、シリコン表面と非常に反応性があり、表面の間に固形の化学的結合を形成する。用いられるガラスのタイプは、理想的には、シリコンに近い熱膨張係数を有していなければならない（例えば、Pyrex Corning 774

10

20

30

40

50

0)。

【0140】

融合接合を、ガラス - ガラスまたはシリコン - シリコンシーリングに用いても良い。最初に、高い接触力を与えることにより基盤と共に力を加え、並べる。接触した時点で、原子的引力（主にファンデルワールス力）によって基盤が共に維持され、溶鉱炉の中に置いて、高温でアニールさせることができる。物質によって、用いられる温度は、約600～1100の間の範囲にある。

【0141】

ポリマー / プラスチック

本発明の実施形態に従い、マイクロマシニングプラスチック基板に多くの技術が用いられる。特に、レーザー切断、ステレオリソグラフィー、酸素プラズマエッティング、粒子ジェット切断、および微小電気 - 浸食などがある。これらの技術のうちの一部を用いて、他の物質（ガラス、シリコン、セラミック等）を同様に形作ることもできる。

10

【0142】

マイクロ流体学的デバイスの複数のコピーを製造するためには、複製技術が用いられる。そのような技術には、最初にマスターまたは金型インサート（複製されるパターンを含有する）を組み立てることが含まれる。次いで、マスターを用いて、ポリマー複製プロセスを介し、ポリマー基盤を大量生産する。

【0143】

複製プロセスにおいて、金型に含まれるマスターパターンは、ポリマー構造に複製される。ある実施形態において、ポリマーと硬化剤の混合物を、高温の下、金型に注ぎ込む。混合物を冷却した後、ポリマーは、金型のパターンを含有しており、次いで、それを金型から取り出す。あるいは、プラスチックを、金型インサートを含有する構造に注入しても良い。マイクロ注入においては、液体状態にまで加熱されたプラスチックを金型に注入する。分離および冷却の後でも、プラスチックは金型の形状を維持している。

20

【0144】

シリコンベースの有機ポリマーであるP D M S（ポリジメチルシロキサン）、を、成形過程に用いて、マイクロ流体学的デバイスを作成しても良い。その弾性特性により、P D M Sは、約5～500μmの間にあるマイクロチャネルによく適合する。P D M Sの固有特性により、マイクロ流体学的な目的に対し、特によく適合する：

30

- 1) 光学的に透明であり、流れの可視化が可能である；
- 2) 適切な量の網状化剤と混合した際、P D M Sはマイクロ流体学的な接続を「水密」に維持することを促進するエラストマーな性質を有する；
- 3) その弾力性ゆえに、膜を用いるバルブおよびポンプをP D M Sで作製することができる；
- 4) 未処置のP D M Sは疎水性であり、酸素プラズマによる表面の酸化の後、または、強塩基中への浸漬の後に、一時的に親水性となる；酸化P D M Sは、ガラス、シリコン、またはポリエチレンの表面自体が酸化プラズマに曝露されたのであれば、それらに接着する。

5) P D M Sはガスに対して浸透性である。管内に空気の泡がある場合でさえも、その空気の泡は物質から追い出されるために、液体でチャネルを満たすことが促進される。しかしながら、非極性有機溶媒に対しても浸透性である。

40

【0145】

マイクロ注入を用いて、広範位のマイクロ流体学的なデザインに用いられるプラスチック基板を製造することができる。このプロセスにおいて、液体プラスチック材料は、真空中で金型へと注入され、プラスチックのガラス転移温度よりも高い温度で圧力をかけられる。次いで、プラスチックをガラス転移温度よりも低い温度まで冷却する。金型から取り出した後、得られたプラスチックの構造は、金型パターンのネガとなる。

【0146】

さらに他の複製技術としては熱エンボス加工があり、ポリマー基盤およびマスターを、

50

ポリマーのガラス転移温度、 T_g (PMMAまたはPCについては、約100～180)を上回るまで加熱する。次いで、エンボス加工マスターを、予め調整した圧縮力で基盤にプレスする。次いで、システムを、 T_g よりも下に冷却し、次いで、金型と基盤を分離する。

【0147】

典型的には、ポリマーは、金型ツールからの分離で、最も高い物理的な力が与えられる（特に、微小構造が高いアスペクト比および垂直壁を含有している場合）。ポリマー微小構造にダメージが与えられることを避けるために、基盤および金型ツールの物質特性を考慮しても良い。これらの特性としては、以下が挙げられる：側壁の粗度、側壁の角度、エンボス加工マスターおよび基盤の間の化学的接触面、および温度計数。粗度は、分離プロセスの間、ツールと構造の間の摩擦力を生じさせるため、エンボス加工ツールが高い側壁粗度の場合、ポリマーの微小構造にダメージを与えることがある。摩擦力が、ポリマーの局所伸長強度よりも大きい場合、微小構造は破壊されることがある。ツールと基盤の間の摩擦は、垂直壁を有する微小構造において重要でありうる。マスターと基盤の間の化学的接触面もまた、考慮されても良い。エンボス加工のプロセスで、システムは高温に曝されるため、化学的結合がマスター - 基盤の接触面に形成されうる。これらの接触面の結合は、分離プロセスを阻害する可能性がある。ツールおよび基盤の熱膨張係数における差異は、追加摩擦力を生じさせうる。

【0148】

金型、エンボス加工マスター、および他のマスター（上述の複製プロセスを介してプラスチック構造を複製するために用いられるパターンを含有する）を形成するために、様々な技術を用いても良い。そのような技術の例としては、LIGA（以下に記述）、切断技術、および、他の様々な機械的マシニング技術が挙げられる。また、類似の技術を、少量のマスク、プロトタイプ、およびマイクロ流体学的な構造の作製に用いても良い。金型ツールのために用いられる物質としては、金属、金属合金、シリコンおよび他の硬い物質が挙げられる。

【0149】

レーザー切断を用いて、基板上に直接、または、マスクの使用を介して、微小構造を形成しても良い。この技術は、精密誘導のレーザーを、通常は赤外線と紫外線の間の波長で、用いる。ガラス基板および金属基盤、ならびにポリマー基盤上で、レーザー切断を行っても良い。固定されたレーザービームに対して基盤表面を動かす、または、固定された基盤に対してレーザービームを動かす、のいずれかでレーザー切断を行っても良い。様々なマイクロ壁、マイクロ管、および高アスペクト比の構造を、レーザー切断で作製することができる。

【0150】

たとえばステンレススチール等のある物質により、非常に耐久性のある金型インサートを作成し、マイクロマシニングを行って、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 範囲にまで落とした構造を形成してもよい。マイクロ加工のための様々な他のマイクロマシニング技術が存在する（μ-Electro Discharge Machining (μ-EDM)、μ-ミリング、集束イオンビームミリングを含む）。μ-EDMにより、伝導性物質中の3次元構造の加工が可能となる。μ-EDMにおいて、物質は、電極（陰極ツール）およびワークピース（陽極）の間に生成される高周波の放電により取り除かれる。ワークピースとツールの両方が、誘電性流体中に浸漬される。この技術により、比較的粗い表面が生成されるが、物質および形状の観点からは柔軟性がもたらされる。

【0151】

電気めっきを、たとえばニッケル合金からの金型ツール／マスターの作製に用いても良い。プロセスは、フォトレジストを用いて電気めっきの構造を規定するフォトリソグラフィーステップから始まる。電気めっきが行われる領域には、レジストは無い。高アスペクト比および低い粗度の必要がある構造に対しては、LIGAを用いて電気めっき構造を製造することができる。LIGAは、Lithographic (リソグラフィー)、Ga

10

20

30

40

50

l vanoformung (電気めっき)、Abformung (鋳造) のドイツの頭字語である。LIGAの1つの方法において、厚いPMMA層をシンクロトロン源からのX線に曝露する。LIGAにより作製された表面は低い粗度(約10nm RMS)を有し、得られたニッケルツールは、ほとんどのポリマーに対して適した界面化学を有している。

【0152】

ガラスデバイスおよびシリコンデバイスと同様、ポリマーマイクロ流体学的デバイスも、作動できるようになる前に密封しなければならない。マイクロ流体学的デバイスに関する接合プロセスにおける普遍的な問題としては、チャネルのプロッキングおよびチャネルの物理的パラメーターの変化が挙げられる。ラミネーションは、プラスチックのマイクロ流体学的デバイスをシールするために用いられる1つの方法である。1つのラミネーションプロセスにおいて、溶解付着層(通常5~10μm)でコートしたPETホイル(約30μm)を、加熱したローラーで、微小構造上を回転させることである。このプロセスを介し、フタのホイルが、チャネルプレート上にシールされる。いくつかの研究グループは、チャネルを閉じるために構造物を加熱し、反対側に力を加える、接触面での重合による接合を報告している。しかし、過剰な力が適用されると、微小構造を傷つける可能性がある。プラスチック-プラスチック接觸面およびプラスチック-ガラス接觸面に対する、可逆的および非可逆的な接合技術が存在する。可逆的なシーリングの1つの方法には、最初にPDMS基盤およびガラスプレート(またはPDMSの第二の部品)をメタノールで完全にリーンし、乾燥させる前に、互いの表面を接触させることが含まれる。次いで、微小構造を10分間、65°のオーブンで乾燥させる。このプロセスにクリーンルームは必要ない。不可逆的なシーリングは、最初に部品をメタノールで完全にリーンし、次いで、窒素流で別々に乾燥させることで行われる。次いで、2つの部品を空気プラズマクリーナー中に置き、約45秒間、高出力で酸化させる。次いで、基盤を互いに接触させることで、自然と不可逆的なシールが形成される。

【0153】

他の利用可能な技術としては、レーザー溶接および超音波溶接が挙げられる。レーザー溶接においては、ポリマーはレーザーにより產生された熱を介して互いに接合される。この方法はマイクロポンプの加工において用いられている。超音波溶接は、一部のアプリケーションにおいて用いられる他の接合技術である。

【0154】

本明細書に記述される核酸增幅技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。しかしながら、ある実施形態においては、PCRではない増幅技術が用いられても良い(たとえば、リアルタイム鎖置換増幅(SDA)、ローリングサイクル増幅(RCA)、および多置換増幅(MDA)等の、様々な定温核酸増幅技術)。

【0155】

PCR増幅モジュールに関して、そのようなモジュールには、少なくとも、核酸を増幅させるための基本的な構成要素(たとえば、十分な濃度の4つのヌクレオチド)、プライマー、ポリメラーゼ(たとえば、Taq)および適切な温度制御プログラム)を提供しなければならない。ポリメラーゼおよびヌクレオチド構成要素は、増幅モジュールへの外部ポートを介して、または上流源からもたらされる、緩衝溶液中で、提供されても良い。ある実施形態において、選別モジュールに提供される緩衝液流は、核酸増幅のためのすべての原材料のうちの一部を含有する。特にPCRについては、高度な反応効率を得るために、反応混合物の正確な温度制御が極めて重要である。オン-チップの熱制御の1つの方法は、電極を用いて、基底された位置でモジュールの中の液体を加熱するJoule加熱法である。液体の伝導性が、パワー制御のための、温度フィードバックとして用いられても良い。

【0156】

ある実施形態において、PCR混合物を含有するドロップは、PCRに効果的な条件下で液滴をインキュベートするチャネルを通じて流されても良い。チャネルを通じて微小液

10

20

30

40

50

滴を流すことには、P C R に有効な温度で維持された様々な温度ゾーンの上を蛇行して渡るチャネルが含まれても良い。そのようなチャネルは、たとえば、2 以上の温度ゾーンの上を循環しても良く、ここで、少なくとも 1 つのゾーンは約 65 °C に維持され、および少なくとも 1 つのゾーンは、約 95 °C に維持されている。ドロップがそのようなゾーンを通して動くにつれ、P C R に必要な、それらの温度が循環する。ゾーンの正確な数、および各ゾーンのそれぞれの温度は、所望の P C R 増幅を得るために、当業者により容易に決定されうる。

【 0 1 5 7 】

他の実施形態において、微小液滴のインキュベートには、Megadropplet アレイの使用が含まれても良い。そのようなデバイスにおいて、アレイは、チャネル天井が、直径約 25 μm の数百万の円形トラップで凹みが付けられているチャネルからなる。ドロップは、分配プレート（トラッピングチャネルの注入口を接続する大きなチャネル）を用いてトラッピングチャネルへと分配される（図 12、パネル A）。トラッピングチャネルと比較して、分配チャネルのサイズは大きいため（液滴トラッピングチャネルはたった約 15 × 100 μm であるのに対し、分配チャネルは約 100 × 500 μm の高さと幅である）、分配チャネルの流体力学的抵抗力は、トラッピングチャネルのそれよりも 1500 倍低く；このことにより、トラッピングチャネルが満たされ始める前に、分配チャネルは確実にドロップで満たされ、それにより、トラッピングチャネルへのドロップの分配さえも可能となる。チャネルの縦の高さはドロップよりも 15 μm または 10 μm 低いため、ドロップがトラッピングチャネルへと流れ込む際、ドロップはややパンケーキ状の形をとる（図 12、パネル B に示す）。ドロップがトラップに近づくと、その接触面は、より大きな、よりエネルギー的に好ましい曲率半径をとる。その表面エネルギーを最小化するために、ドロップは完全にトラップを満たし、それにより、最も低い、最もエネルギー的に好ましい、平均曲率半径を取ることが可能となる。トラップがドロップで満たされた後、トラップはわずか 1 つのドロップを入れるのに十分な大きさしかないため、他のドロップは入ることができず；追加のドロップは下流へと迂回させられ、出会う最初の空のトラップを満たす。アレイは密集した乳剤を用いて満たされているため、全てのトラップは、ドロップにより満たされる（低い流動状態の下では、これが最もエネルギー的に好ましいため）。液滴アレイが満たされた後、油を注入して、過剰なドロップを取り除き、アレイは熱循環され、画像解析される。

【 0 1 5 8 】

様々な異なる方法を用いてデバイスのトラップを満たしても良い。たとえば、浮力効果および遠心を用いて満たし、および、地球の重力場に対してデバイスをひっくり返すことによりトラップを空にしても良い（液滴の密度は、フッ化炭素担体油の 63 % であるため）。すなわち、もしドロップが油層よりも重い場合、乳剤があふれ出た際にドロップがウェルへと沈むように、ウェルがデバイスの「床」へと刻み込まれても良い。乳剤の流速は、これを最適化するために調節することができ、およびドロップサイズは、ウェルが 1 回に 1 つのドロップのみを適合させることができるよう、ウェルとおおよそ同じサイズであるように作られる。他の態様において、ドロップはまた、または代わりに、ウェルの無い大きなチャンバーの中に保存することができる。

【 0 1 5 9 】

デバイスは、ペルチェプレート、放熱板、および制御用コンピューターからなるヒーターを用いて熱循環されてもよい（図 12、パネル A；図 13）。ペルチェプレートにより、流す電力を制御することにより、室温より上、または下に、チップを加熱および／または冷却させることができる。温度制御および温度の再現を確実にするために、組込み温度プローブを用いてコンピューターによりアレイの温度をモニターし、および、必要に応じて加熱および冷却するために流す電流を調節する。金属の（たとえば、銅の）プレートにより、熱の均一な適用および、冷却サイクル中の余剰熱の放散が可能となり、それにより、1 分以下の実行時間で、95 °C から 60 °C まで冷却することが可能となる。微小液滴を画像化するために、ある実施形態において、スキャナーベッドを組み込んでも良い。ある

10

20

30

40

50

態様においては、スキャナーベッドは、Canoscan 9000Fのスキャナーベッドである。

【0160】

標的成分から効率的に核酸を増幅するために、マイクロ流体学的システムに、試料を増幅モジュールに供する前に核酸を遊離させるための、細胞溶解モジュール、または、ウイルスタンパク質コート破碎モジュールを含んでも良い。細胞溶解モジュールは、細胞溶解を生じさせるための化学的、熱的、および／または、機械的手段に依存してもよい。細胞膜は脂質二重膜からなるため、界面活性剤を含有する溶解緩衝液により、脂質膜を可溶化することができる。典型的には、溶解緩衝液は、外部ポートから溶解チャンバーへと直接導入され、細胞が選別プロセスまたは他の上流プロセス中に、早く溶解されてしまわないようとする。細胞小器官の完全性が必要である場合には、化学的溶解法は適さない可能性がある。せん断および摩耗による細胞膜の機械的破壊は、あるアプリケーションに適している。機械的技法に依存する溶解モジュールは、モジュールに入る細胞に穴を開けること、せん断すること、摩耗させることを行う様々な幾何学的特性を有しても良い。他の機械的破壊のタイプ（たとえば、音響技術）もまた、適切な溶解物を生成しうる。さらに、熱エネルギーを用いて、たとえば細菌、酵母および胞子等の細胞を溶解することもできる。加熱により細胞膜を破壊し、細胞内物質が放出される。マイクロ流体システム中で細胞内分画を可能とするために、溶解モジュールは、動電的な技術またはエレクトロポレーションを用いても良い。エレクトロポレーションは、細胞膜に変化をもたらす外部電場を適用することにより、細胞膜に一時的、または永続的な穴を開け、膜電位を混乱させる。マイクロ流体学的なエレクトロポレーションデバイスにおいて、膜は、永続的に破壊されても良く、細胞膜上の穴は、所望の細胞内放出物質を放出させるために継続されていても良い。10

【0161】

単一細胞RT-PCRマイクロ流体学的デバイス

本明細書の他の態様において、単一細胞RT-PCRマイクロ流体学的デバイスが提示される（図32を参照として、以下に詳述される）。ある実施形態において、単一細胞RT-PCRマイクロ流体学的デバイスには、微小液滴をマイクロ流体学的デバイスへと導入するための、流れ焦点ドロップメーカーに連結されうる、インプットマイクロチャネルが含まれ、ここで、当該流れ焦点ドロップメーカーは、インプットマイクロチャネルにおいて微小液滴の間に間隔をあけ（たとえば、油等の適切な大量の疎水性層により）、ここで、各微小液滴は細胞溶解試料に含まれても良い。例示的な実施形態を図32（パネルA）に示す。30

【0162】

マイクロ流体学的デバイスはさらに、インプットマイクロチャネルとの流体連通中の対形成マイクロチャネル、および、当該対形成マイクロチャネルとの流体連通中の希釈緩衝液ドロップメーカーをさらに含んでも良い。そのような実施形態において、各微小液滴よりも大きく、各微小液滴と対を形成する希釈緩衝液のドロップを希釈緩衝液ドロップメーカーが產生する、対形成マイクロチャネルへと、インプットマイクロチャネルからの微小液滴が流れる。ある実施形態において、希釈緩衝液ドロップメーカーは、T字形接合部ドロップメーカーである。例示的な実施例を図32（パネルB）に示す。40

【0163】

マイクロ流体学的デバイスはまた、対形成マイクロチャネルとの流体連通中の融合マイクロチャネルを含んでも良く、当該融合マイクロチャネルは、それに近接して置かれた電場生成器を含んでいる。そのような実施形態において、対となった微小液滴および希釈緩衝液のドロップは、対形成マイクロチャネルから融合マイクロチャネルへと入り、電場生成器により生じた電場を通り過ぎる際に融合され、希釈された微小液滴が作製される。任意の適切な電場生成器を用いて、希釈微小液滴を作製しても良い。ある実施形態において、電場は、金属電極により生じる。他の実施形態において、電場は、本明細書に記述される液体電極により生じる。例示的な実施例を、図32（パネルC）に示す。50

【0164】

マイクロ流体学的デバイスはまた、融合マイクロチャネルとの流体連通中の一連の混合マイクロチャネルを含有してもよい。そのような混合マイクロチャネルにより、希釈微小液滴の内容物の混合が可能となる。

【0165】

マイクロ流体学的デバイスはまた、混合マイクロチャネルとの流体連通中のドロップサンプラーを含有してもよい。そのようなドロップサンプラーは、希釈された微小液滴の試料を採取することが可能である（たとえば、マイクロ流体学的デバイスにおいて行われる、次なるRT-PCR反応に用いるために）。例示的な実施例を図32（パネルD）に示す。

10

【0166】

マイクロ流体学には、ピコ注入器を備えるピコ注入マイクロチャネルを含有しても良く、ここで、当該ピコ注入マイクロチャネルは、ドロップサンプラーにより作製された希釈微小液滴の試料を受け取ることができる加圧型マイクロチャネルであっても良く、それにより、ピコ注入器が、試料中にRT-PCR試薬をピコ注入することができる。ある実施形態において、ピコ注入は、ピコ注入マイクロチャネルに適用された電場により補助される。任意の電場生成器を用いて、ピコ注入のための電場を生じさせてもよい。ある実施形態において、電場は、金属電極により生じる。他の実施形態において、電場は、本明細書に検討される液体電極により生じる。例示的な実施例を図32（パネルE）に示す。

【0167】

20

RT-PCR試薬をピコ注入された希釈微小液滴の試料を、次いで、本明細書に記述される任意の方法を用いて、RT-PCRに状態に供することができる。単一細胞RT-PCRマイクロ流体学的デバイスは、RT-PCR試薬添加の前に細胞溶解試料の希釈有利に行うことができる。そのような希釈により、細胞溶解物の成分により生じる場合があるRT-PCRの阻害が予防される。ある実施形態において、マイクロ流体学的デバイスには、細胞および溶解試薬を微小液滴中に内包化するための、インプットマイクロチャネルとの流体連通中に内包化チャンバーを含有しても良い。そのような実施形態において、インプットマイクロチャネルは、色素内包化チャンバーから微小液滴を受け取ることができる。

【0168】

30

本開示のある非限定的な態様において、以下が提示される：

1. 以下を含む、細胞を検出するための方法：

対象由来の生物学的試料から得た細胞を微小液滴中に内包化することであって、ここで、少なくとも1つの細胞が当該微小液滴中に存在するものであり；

細胞溶解に効果的な条件下で当該微小液滴をインキュベートすること；

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試薬、検出成分、および複数のPCRプライマーを当該微小液滴中へと導入すること、および、PCR增幅が可能な条件下で当該微小液滴をインキュベートして、PCR增幅産物を產生することであって、ここで、複数のPCRプライマーは、1以上のオリゴヌクレオチドに対してそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーを含有するものであり；および、

40

検出成分の検出によりPCR增幅産物の存在または非存在を検出することであって、ここで、当該検出成分の検出は、PCR增幅産物の存在を示すものであり；

ここで、1以上のステップは、マイクロ流体学的制御の下で行われる。

2. 細胞溶解に効果的な条件下で当該微小液滴をインキュベートすることは、溶解剤を当該微小液滴中に導入することを含む、1に記載の方法。

3. 当該1以上のオリゴヌクレオチドが癌遺伝子である、1または2に記載の方法。

4. 当該生物学的試料が血液であり、当該方法は、PCR增幅産物が検出された微小液滴の数に少なくとも部分的に基づいて、対象の血液試料中に存在する循環腫瘍細胞（CTC）の数を測定することを含む、1～3のいずれかに記載の方法。

5. 全てのステップが、マイクロ流体学的な制御の下で行われる、1～4のいずれかに記

50

載の方法。

6 . 全てのステップが、同じマイクロ流体学的デバイス上で行われる、5に記載の方法。

7 . 当該複数のPCRプライマーは、10以上のプライマーを含む、1~6のいずれかに記載の方法。

8 . 当該複数のPCRプライマーは、20~100のプライマーを含む、1~7のいずれかに記載の方法。

9 . 当該複数のPCRプライマーは、10以上の癌遺伝子に対するプライマーを含む、1~8のいずれかに記載の方法。

10 . PCR增幅が可能な条件下で微小液滴をインキュベートすることが、細胞の内包化および当該細胞の溶解に用いられたものと同じマイクロ流体学的デバイス上で行われる、1~9のいずれかに記載の方法。

11 . 当該PCR試薬およびPCRプライマーは、溶解剤と同時に添加される、1~10のいずれかに記載の方法。

12 . 当該PCR試薬は、2以上のステップで添加される、1~11のいずれかに記載の方法。

13 . 微小液滴にプローブを導入することをさらに含む、1~12のいずれかに記載の方法。

14 . 当該プローブは、PCR增幅が可能な条件下で微小液滴をインキュベートすることよりも前に導入される、13に記載の方法。

15 . 当該プローブは、TaqMan(登録商標)プローブである、13または14に記載の方法。

16 . 試薬を含有する第二の微小液滴と、微小液滴を融合させることにより、試薬が微小液滴に添加される、1~15のいずれかに記載の方法。

17 . 液滴合体またはピコ注入のいずれかを用いて試薬が微小液滴に添加される、1~16のいずれかに記載の方法。

18 . 1~17のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により、微小液滴に試薬が添加される、方法：

a) 液滴流へ試薬を乳化させることであって、ここで、当該液滴は、微小液滴のサイズよりも小さい；

b) 微小液滴と液滴と共に流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

19 . 液滴の直径が、微小液滴の直径より、25%またはそれよりも小さく、および、複数の液滴が微小液滴と融合される、18に記載の方法。

20 . 融合することは、電場を適用することを含む、18または19に記載の方法。

21 . 1~20のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により試薬が微小液滴に添加される、方法：

a) 試薬を噴流へと噴出させること；

b) 微小液滴に沿って噴流を流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

22 . 融合することは、電場を適用することを含む、21に記載の方法。

23 . 試薬を噴出させることは、粘度増加剤または界面活性剤を添加することを含む、21または22に記載の方法。

24 . 電極として微小液滴へと注入される液体を用いることを含む方法により、試薬が微小液滴に添加される、1~23のいずれかに記載の方法。

25 . 検出成分が、蛍光の変化に基づき検出される、1~24のいずれかに記載の方法。

26 . 蛍光における変化は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)によるものである、25に記載の方法。

27 . 蛍光における変化は、蛍光偏光によるものである、25に記載の方法。

28 . 検出成分は、挿入染色である、25または27に記載の方法。

29 . PCR增幅産物の存在または非存在の検出は、微小液滴を繰り返し画像撮影するこ

10

20

30

40

50

とを含む、1～28のいずれかに記載の方法。

30. PCR増幅が可能な条件に微小液滴が供されてPCR増幅産物が產生される間、微小液滴が繰り返し画像撮影される、29に記載の方法。

31. PCR増幅が可能な条件下で微小液滴をインキュベートすること、および、PCR増幅産物の存在または非存在を検出することが、Megadroppletアレイ上で行われる、1～30のいずれかに記載の方法。

32. 微小液滴を選別することを含む、1～31のいずれかに記載の方法。

33. 選別することは、膜バルブ、分岐チャネル、表面音響波、または誘電泳動を用いることを含む、32に記載の方法。

34. 微小液滴は、サイズ、粘度、質量、浮力、表面張力、電気伝導率、電荷、または磁性を含む特性に基づいて選別される、32または33に記載の方法。 10

35. PCR増幅産物の存在または非存在の検出に少なくとも部分的にに基づいて選別することを含む、32～34のいずれかに記載の方法。

36. 微小液滴は、PCR試薬の導入の前に選別される、32～35のいずれかに記載の方法。

37. 微小液滴は、溶解剤の導入の前に選別される、32～36のいずれかに記載の方法。
。

38. 以下をさらに含む、1～37のいずれかに記載の方法：

希釈剤を微小液滴に注入すること；

微小液滴が分割される条件の下で、電場が適用されているマイクロ流体学的チャネルを通して微小液滴を流すこと。 20

39. 対象は、哺乳類である、1～38のいずれかに記載の方法。

40. 対象は、ヒトである、1～39のいずれかに記載の方法。

41. 対象は、癌を有すると診断されている、1～40のいずれかに記載の方法。

42. 生物学的試料が、血液試料である、1～41のいずれかに記載の方法。

43. 血液試料が、全血である、42に記載の方法。

44. 血液試料を分画することを含む、42または43に記載の方法。

45. 対象の血液の30mL以下を採血することを含む、42～44のいずれか1つに記載の方法。

46. 血液試料が、15mL以下である、45に記載の方法。 30

47. 細胞を固定すること、および／または、透過処理することを含む、1～46のいずれか1つに記載の方法。

48. 複数の異なる検出成分を導入すること、および、当該複数の検出成分の検出によりPCR増幅産物の存在または非存在を検出すること、を含み、ここで、検出成分の検出は、PCR増幅産物の存在を示す、1～47のいずれか1つに記載の方法。

49. 検出可能な標識抗体と、細胞またはその成分とを接触させることを含む、1～48のいずれか1つに記載の方法。

50. 以下を含む、腫瘍細胞を検出するための方法：

大部分の微小液滴がゼロまたは1つの細胞を含有する条件下で、複数の微小液滴に複数の細胞を内包化されることであって、ここで、当該複数の細胞は、循環腫瘍細胞(CTC)を含有すると推測される対象の血液試料から得られたものであり； 40

1つの細胞を含有する微小液滴に関し、当該複数の微小液滴を富化させること；

当該複数の微小液滴に溶解剤を導入すること、および細胞溶解に効果的な条件下でインキュベートすること；

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)試薬、検出成分、および複数のPCRプライマーを、当該複数の微小液滴に導入すること、および、当該複数の微小液滴をPCR増幅が可能な条件下でインキュベートしPCR増幅産物を產生することであって、ここで、当該複数のPCRプライマーは、1以上の癌遺伝子に対してそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーを含有するものであり；

検出成分の検出により、PCR増幅産物の存在または非存在を検出することであって、

50

ここで、検出成分の検出は、PCR増幅産物の存在を示すものであり；ならびに、対象の血液試料中に存在するCTCの数を、PCR増幅産物が検出された微小液滴の数に少なくとも部分的に基づいて、測定すること；

ここで、1以上のステップが、マイクロ流体学的な制御の下で行われる。

51. マイクロ流体学的な制御のもとで、全てのステップがすべて行われる、50に記載の方法。

52. 全てのステップが、同じマイクロ流体学的デバイス上で行われる、50または51に記載の方法。

53. 複数のPCRプライマーは、10以上のプライマーを含有する、50～52のいずれかに記載の方法。10

54. 複数のPCRプライマーは、10以上の癌遺伝子に対するプライマーを含む、50～53のいずれかに記載の方法。

55. 複数のプライマーは、複数のプローブを含む、50～54のいずれかに記載の方法。

56. プローブは、TaqMan（登録商標）プローブを含有する、55に記載の方法。

57. PCR試薬は、2以上のステップで添加される、50～56のいずれかに記載の方法。

58. 微小液滴へプローブを導入することをさらに含む、50～57のいずれかに記載の方法。

59. 試薬を含有する第二の微小液滴と、微小液滴を融合させることにより、試薬が複数の微小液滴に添加される、50～58のいずれかに記載の方法。20

60. 液滴合体またはピコ注入のいずれかを用いて、複数の微小液滴に試薬が添加される、50～59のいずれかに記載の方法。

61. 50～60のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により、複数の微小液滴に試薬が添加される、方法：

a) 液滴流へ試薬を乳化させることであって、ここで、当該液滴は、微小液滴のサイズよりも小さいものであり；

b) 微小液滴と液滴を共に流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

62. 当該融合は、電場を適用することを含む、58に記載の方法。30

63. 50～62のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により、複数の微小液滴に試薬が添加される、方法：

a) 試薬を噴流へと噴出させること；

b) 微小液滴に沿って噴流を流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

64. 電極として微小液滴へと注入される液体を用いることを含む方法により、試薬が微小液滴に添加される、50～63のいずれかに記載の方法。

65. 微小液滴を選別することを含む、50～64のいずれかに記載の方法。

66. 当該複数の微小液滴は、サイズ、粘度、質量、浮力、表面張力、電気伝導率、電荷、または磁性を含む特性に基づいて選別される、65に記載の方法。40

67. 当該複数の微小液滴は、PCR試薬の導入の前に選別される、65～66のいずれかに記載の方法。

68. PCR増幅産物の存在または非存在の検出は、複数の微小液滴を繰り返し画像撮影することを含む、50～67のいずれかに記載の方法。

69. PCR増幅が可能な条件に当該複数の微小液滴が供されてPCR増幅産物が產生される間、当該複数の微小液滴が繰り返し画像撮影される、68に記載の方法。

70. PCR増幅が可能な条件下で当該複数の微小液滴をインキュベートすること、および、PCR増幅産物の存在または非存在の検出が、Megadroppletアレイ上で行われる、50～69のいずれかに記載の方法。

71. 対象は、哺乳類である、50～70のいずれかに記載の方法。50

72. 対象は、ヒトである、50～71のいずれかに記載の方法。

73. 対象は、癌を有すると診断されている、50～72のいずれかに記載の方法。

74. 以下を含む、細胞の遺伝子型を決定する方法：

対象由来の生物学的試料から得た細胞を微小液滴中に内包化することであって、ここで、1つの細胞が、微小液滴中に存在し；

当該微小液滴中に溶解剤を導入すること、および、細胞溶解に効果的な条件下で微小液滴をインキュベートすること；

ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）試薬および複数のP C Rプライマーを、微小液滴に導入すること、および、P C R增幅が可能な条件下で微小液滴をインキュベートしてP C R增幅産物を產生させることであって、ここで、当該複数のP C Rプライマーは、1以上の癌遺伝子にそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーを含有するものであり；

複数のプローブを当該微小液滴に導入することであって、ここで、当該プローブは、対象の1以上の変異に対してハイブリダイズし、および、異なる波長で蛍光を発するものであり；ならびに、

プローブの蛍光検出により特異的P C R增幅産物の存在または非存在を検出することであって、ここで、蛍光の検出は、P C R增幅産物の存在を示唆するものであり；

ここで1以上のステップが、マイクロ流体学的な制御の下で行われる。

75. 当該プローブは、TaqMan（登録商標）プローブを含有する、74に記載の方法。

76. プローブの蛍光検出により特異的P C R增幅産物の存在または非存在を検出することは、P C R增幅が可能となる条件に微小液滴が供されてP C R增幅産物が產生される間、当該微小液滴を繰り返し画像撮影することを含む、74または75に記載の方法。

77. 時間依存的な蛍光の情報を得ることを含む、76に記載の方法。

78. 試薬を含有する第二の微小液滴と、微小液滴とを融合させることにより、試薬が微小液滴に添加される、74～77のいずれかに記載の方法。

79. 液滴合体またはピコ注入のいずれかを用いて、試薬が微小液滴に添加される、74～78のいずれかに記載の方法。

80. 74～79のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により、試薬が微小液滴に添加される、方法：

a) 液滴流へ試薬を乳化させることであって、ここで、当該液滴は、微小液滴のサイズよりも小さいものであり；

b) 微小液滴と液滴を共に流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

81. 74～80のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により、試薬が微小液滴に添加される、方法：

a) 試薬を噴流へと噴出させること；

b) 微小液滴に沿って噴流を流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

82. 電極として微小液滴に注入される液体を用いることを含む方法により、試薬が微小液滴に添加される、74～81のいずれかに記載の方法。

83. 微小液滴を選別することを含む、74～82のいずれかに記載の方法。

84. 微小液滴は、サイズ、粘度、質量、浮力、表面張力、電気伝導率、電荷、または磁性を含む特性に基づいて選別される、83に記載の方法。

85. 対象は、哺乳類である、74～84のいずれかに記載の方法。

86. 対象は、ヒトである、74～85のいずれかに記載の方法。

87. 対象は、癌を有すると診断されている、74～86のいずれかに記載の方法。

88. 以下を含む、対象における癌の検出のための方法：

対象由来の生物学的試料から得たオリゴヌクレオチドを微小液滴中に内包化することであって、ここで、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが当該微小液滴中に存在しており；

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)試薬、検出成分、および複数のPCRプライマーを微小液滴へと導入すること、および、PCR增幅が可能となる条件の下で微小液滴をインキュベートしてPCR增幅産物を產生することであって、ここで、当該複数のPCRプライマーは、1以上の癌遺伝子にそれぞれハイブリダイズする1以上のプライマーを含有するものであり；

検出成分の検出によりPCR增幅産物の存在または非存在を検出することであって、ここで、検出成分の検出は、PCR增幅産物の存在を示すものであり；ならびに、

対象が、癌を有するか否かを、PCR增幅産物の存在または非存在に少なくとも部分的に基づいて診断すること；

ここで、1以上のステップが、マイクロ流体学的な制御の下で行われる。

10

89. 当該複数のPCRプライマーは、10以上のプライマーを含有する、88に記載の方法。

90. 当該複数のPCRプライマーは、10以上の癌遺伝子に対するプライマーを含有する、88～89のいずれかに記載の方法。

91. 微小液滴へとプローブを導入することをさらに含む、88～90のいずれかに記載の方法。

92. プローブは、PCR增幅が可能な条件下で微小液滴をインキュベートする前に導入される、91に記載の方法。

93. プローブは、TaqMan(登録商標)プローブである、91または92のいずれかに記載の方法。

20

94. 試薬を含有する第二の微小液滴と、微小液滴を融合させることにより、試薬が微小液滴に添加される、88～93のいずれかに記載の方法。

95. 液滴合体またはピコ注入のいずれかを用いて、試薬が微小液滴に添加される、88～94のいずれかに記載の方法。

96. 88～95のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により試薬が微小液滴に添加される、方法：

a) 液滴流へ試薬を乳化させることであって、ここで、当該液滴は、微小液滴のサイズよりも小さいものであり；

b) 微小液滴と液滴を共に流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

30

97. 88～96のいずれか1つに記載の方法であって、以下を含む方法により試薬が微小液滴に添加される、方法：

a) 試薬を噴流へと噴出させること；

b) 微小液滴に沿って噴流を流すこと；および、

c) 微小液滴と液滴を融合させること。

98. 電極として微小液滴へと注入される液体を用いることを含む方法により、試薬が微小液滴に添加される、88～97のいずれかに記載の方法。

99. 検出成分は、蛍光における変化に基づいて検出される、88～98のいずれかに記載の方法。

100. PCR增幅産物の存在または非存在の検出は、微小液滴を繰り返し画像撮影することを含む、88～99のいずれかに記載の方法。

40

101. PCR增幅が可能となる条件の下に微小液滴が供されてPCR增幅産物が產生される間、当該微小液滴が繰り返し画像撮影される、100に記載の方法。

102. 微小液滴を選別することを含む、88～101のいずれかに記載の方法。

103. 微小液滴は、サイズ、粘度、質量、浮力、表面張力、電気伝導率、電荷、または磁性を含む特性に基づいて選別される、102に記載の方法。

104. PCR增幅産物の存在または非存在の検出に少なくとも部分的に基づいて選別することを含む、88～103のいずれかに記載の方法。

105. 以下をさらに含む、88～104のいずれか1つに記載の方法：

希釈剤を微小液滴に注入すること；および、

50

微小液滴が分割される状態の下で、電場が適用されているマイクロ流体学的なチャネルを通して、微小液滴を流すこと。

106. 対象が、哺乳類である、88～105のいずれかに記載の方法。

107. 対象が、ヒトである、88～106のいずれかに記載の方法。

108. 対象が、癌を有すると診断されている、88～107のいずれかに記載の方法。

109. 以下を含むマイクロ流体学的デバイス：

微小液滴中に、対象の血液試料から得た細胞を内包化するための細胞内包化デバイス；
細胞内包化デバイスと流体連通にある第一のチャンバーであって、当該第一のチャンバーは、第一の試薬を微小液滴に添加するための、第一の試薬注入器構成要素、および発熱体を含有する第一のチャンバー；

10

第一のチャンバーと流体連通にある第二のチャンバーであって、当該第二のチャンバーは、第二の試薬を微小液滴に添加するための、第二の試薬注入器構成要素、および発熱体を含有し、ここで、当該発熱体は、2以上の温度で微小液滴を加熱するよう構成されている第二のチャンバー；および、

第二のチャンバーから反応産物の存在または非存在を検出する、第二のチャンバーと流体連通にある検出領域。

110. 第二のチャンバーの発熱体は、ペルチェプレート、放熱板、および制御コンピューターを含有する、109に記載のマイクロ流体学的デバイス。

111. 当該マイクロ流体学的デバイスは、1以上の液体電極を含有する、109に記載のマイクロ流体学的デバイス。

20

112. 以下を含む单一細胞RT-PCRマイクロ流体学的デバイス：

微小液滴をマイクロ流体学的デバイスへ導入するための、ドロップメーカーに連結されたインプットマイクロチャネル；

当該インプットマイクロチャネルと流体連通にある対形成マイクロチャネル；

微小液滴よりも大きい体積である、希釈緩衝液のドロップを作製するための、および、1つの微小液滴と1滴の希釈緩衝液の対を形成するための、当該対形成マイクロチャネルと流体連通にある希釈緩衝液ドロップメーカー；

当該対形成マイクロチャネルからの、希釈緩衝液と微小液滴の対形成されたドロップを受け入れるための、当該対形成マイクロチャネルと流体連通にある融合マイクロチャネル；

30

融合マイクロチャネルにおいて希釈緩衝液と微小液滴の対形成されたドロップを融合させ、希釈微小液滴を形成することができる、電場を生じさせるための、融合マイクロチャネルに沿って位置づけられた第一の電場生成器；

融合チャネルからの希釈微小液滴を受け取り、希釈微小液滴の内容物を混合するための、融合マイクロチャネルと流体連通にある混合マイクロチャネル；

希釈微小液滴の試料を抽出するための、混合マイクロチャネルとの流体連通にあるドロップサンプラー；

ドロップサンプラーと流体連通にあるピコ注入マイクロチャネルであって、ここで、ピコ注入マイクロチャネルは、ピコ注入器を備え、および、希釈微小液滴の試料を受け取り、当該試料内へのRT-PCR試薬をピコ注入するためのものである、ピコ注入マイクロチャネル；

40

第二の電場生成器であって、ここで、当該第二の電場生成器は、ピコ注入マイクロチャネルに沿って位置づけられ、試料内へのRT-PCR試薬のピコ注入が可能となるために十分な電場を生じせるものである、第二の電場生成器；

RT-PCR試薬をピコ注入された試料にRT-PCR反応を行うための、ピコ注入マイクロチャネルと流体連通にあるサーモサイクラー発熱体。

113. 微小液滴への細胞および溶解試薬の内包化のための、インプットマイクロチャネルと流体連通にある内包化チャンバーをさらに備える、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

114. 第一および/または第二の電場生成器が、電源、または、高電圧増幅器に連結さ

50

れている液体電極である、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

115. インプットマイクロチャネルの下流の、マイクロ流体学的流れチャネルの1以上の壁に切り込みを備え、ここで、当該切り込みは、油層を捕捉し、流れチャネルの1以上の壁が濡れることを防ぐよう構成されている、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

116. 対形成マイクロチャネルの下流の、マイクロ流体学的流れチャネルの1以上の壁に切り込みを備え、ここで、当該切り込みは、油層を捕捉し、流れチャネルの1以上の壁が濡れることを防ぐよう構成されている、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

117. ピコ注入マイクロチャネルの下流の、マイクロ流体学的流れチャネルの1以上の壁に切り込みを備え、ここで、当該切り込みは、油層を捕捉し、流れチャネルの1以上の壁が濡れることを防ぐよう構成されている、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

118. 当該ピコ注入マイクロチャネルは、サンプランナーにおけるRT-PCR反応を経た試料を受け取り、PCR試薬を試料にピコ注入するよう構成されている、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

119. サーモサイクラーが、PCR試薬でピコ注入された試料にPCR反応を行うように構成されている、118に記載のマイクロ流体学的デバイス。

120. 当該PCR試薬および当該RT-PCR試薬が、同じプライマーを含有する、118に記載のマイクロ流体学的デバイス。

121. 当該PCR試薬および当該RT-PCR試薬が、異なるプライマーを含有する、118に記載のマイクロ流体学的デバイス。

122. 当該RT-PCR試薬が、蛍光色素と結合されたビーズおよび核酸プローブを含有する、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

123. 当該RT-PCR試薬が、蛍光DNAプローブを含有する、112に記載のマイクロ流体学的デバイス。

124. 以下を含む单一細胞RT-PCRマイクロ流体学的デバイス：

微小液滴をマイクロ流体学的デバイスへ導入するための、流れ焦点ドロップメーカーに連結されたインプットマイクロチャネルであって、ここで、当該流れ焦点ドロップメーカーは、大量の油によりインプットマイクロチャネルにおける微小液滴間の間隔をあけ、および、ここで、各微小液滴は細胞溶解試料を含有している、インプットマイクロチャネル；

当該インプットマイクロチャネルと流体連通にある対形成マイクロチャネル；

微小液滴よりも大きい体積である、希釈緩衝液のドロップを作製するための、および、1つの微小液滴と1滴の希釈緩衝液の対を形成するための、当該対形成マイクロチャネルと流体連通にある希釈緩衝液ドロップメーカー；

当該対形成マイクロチャネルからの、希釈緩衝液と微小液滴の対形成されたドロップを受け入れるための、当該対形成マイクロチャネルと流体連通にある融合マイクロチャネル；

融合マイクロチャネルにおいて希釈緩衝液と微小液滴の対形成されたドロップを融合させ、希釈微小液滴を形成することができる、融合チャネル全体にわたり電場を生じさせるための、融合マイクロチャネルに沿って位置づけられた第一の電場生成器；

融合チャネルからの希釈微小液滴を受け取り、希釈微小液滴の内容物を混合するための、融合マイクロチャネルと流体連通にある混合マイクロチャネル；

希釈微小液滴の試料を抽出するための、混合マイクロチャネルと流体連通にあるドロップサンプランナー；

ドロップサンプランナーと流体連通にあるピコ注入マイクロチャネルであって、ここで、ピコ注入マイクロチャネルは、ピコ注入器を備え、および、希釈微小液滴の試料を受け取り、当該試料内へRT-PCR試薬をピコ注入するためのものである、ピコ注入マイクロチャネル；

第二の電場生成器であって、ここで、当該第二の電場生成器は、ピコ注入マイクロチャネルに沿って位置づけられ、試料内へのRT-PCR試薬のピコ注入が可能となるために

10

20

30

40

50

十分な、ピコ注入マイクロチャネル全体にわたる電場を生じさせるものである、第二の電場生成器；

R T - P C R 試薬でピコ注入された試料に R T - P C R 反応を行うための、ピコ注入マイクロチャネルと流体連通にあるサーモサイクラー発熱体。

125. 微小液滴への細胞および溶解試薬の内包化のための、インプットマイクロチャネルと流体連通にある内包化チャンバーをさらに備える、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。

126. 第一および／または第二の電場生成器が、電源、または、高電圧増幅器に連結されている液体電極である、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。 10

127. インプットマイクロチャネルの下流の、マイクロ流体学的流れチャネルの1以上の壁に切り込みを備え、ここで、当該切り込みは、油層を捕捉し、流れチャネルの1以上の壁が濡れることを防ぐよう構成されている、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。

128. 対形成マイクロチャネルの下流の、マイクロ流体学的流れチャネルの1以上の壁に切り込みを備え、ここで、当該切り込みは、油層を捕捉し、流れチャネルの1以上の壁が濡れることを防ぐよう構成されている、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。

129. ピコ注入マイクロチャネルの下流の、マイクロ流体学的流れチャネルの1以上の壁に切り込みを備え、ここで、当該切り込みは、油層を捕捉し、流れチャネルの1以上の壁が濡れることを防ぐよう構成されている、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。

130. 当該ピコ注入マイクロチャネルが、サンプラーにおけるR T - P C R 反応を経た試料を受け取り、P C R 試薬を試料にピコ注入するよう構成されている、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。 20

131. サーモサイクラーが、P C R 試薬でピコ注入された試料にP C R 反応を行うように構成されている、130に記載のマイクロ流体学的デバイス。

132. 当該P C R 試薬および当該R T - P C R 試薬が、同じプライマーを含有する、130に記載のマイクロ流体学的デバイス。

133. 当該P C R 試薬および当該R T - P C R 試薬が、異なるプライマーを含有する、130に記載のマイクロ流体学的デバイス。

134. 当該R T - P C R 試薬が、蛍光色素に結合されたビーズおよび核酸プローブを含有する、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。 30

135. 当該R T - P C R 試薬が、蛍光D N A プローブを含有する、124に記載のマイクロ流体学的デバイス。

136. 1～20のいずれかに記載の方法であって、試薬が、以下により微小液滴に添加される、方法：

油と微小液滴とを接触させ、それにより油が微小液滴を内包化し、二重乳剤を形成すること；

当該二重乳剤と、試薬を含有するドロップを接触させ、それにより試薬を含有するドロップが二重乳剤を内包化し、三重乳剤を形成すること；

当該三重乳剤に電場を適用させ、それにより三重乳剤の液体接触面が破壊され、微小液滴および試薬が混合されること。 40

137. 電場が、1以上の液体電極により適用される、136に記載の方法。

138. 流れチャネル、当該流れチャネルに流体的に連結されたマイクロ流体学的接合部、および、当該マイクロ流体学的接合部のすぐ下流のマイクロ流体学的流れチャネルの1以上の壁の切り込み、を含有するマイクロ流体学的デバイス。

139. 切り込みが、油層を捕捉し、流れチャネルの1以上の壁が濡れることを防ぐ、138に記載のマイクロ流体学的デバイス。

140. 1以上の切り込みのそれぞれのベースは、約10ミクロン～約20ミクロンの長さである、138に記載のマイクロ流体学的デバイス。

141. 1以上の切り込みのそれぞれのピークが、約1～約10ミクロンの幅を有する、138に記載のマイクロ流体学的デバイス。 50

142. 1以上の切り込みのそれぞれの高さが、約5ミクロン～約15ミクロンである、
138に記載のマイクロ流体学的デバイス。

143. 1以上の切り込みのそれぞれのベースと、1以上の切り込みのそれぞれの高さの
比率が、約1.0：0.75～約0.75：1.0である、138に記載のマイクロ流体
学的デバイス。

144. 1以上の切り込みのそれぞれのベースと、1以上の切り込みのそれぞれの高さと
、1以上の切り込みのピークの幅が、約1：0.75：0.5である、138に記載のマ
イクロ流体学的デバイス。

145. 切り込みが、約50ミクロン～約500ミクロンのチャネル壁に沿った距離にわ
たっている、138に記載のマイクロ流体学的デバイス。 10

146. 切り込みが、チャネル壁に沿った距離にわたっており、チャネル壁に沿った距離
と、チャネルの幅の間の比率が、約10：1～約1：2である、138に記載のマイクロ
流体学的デバイス。

【実施例】

【0169】

上述に示した本開示から理解されるように、本開示は、多種多様な用途を有する。した
がって、以下の実施例は、当業者に本発明の作製方法および使用方法を完全に開示および
説明するために提示され、本発明者が発明とみなすものの範囲を限定することを意図せず
、また、以下の実験が全てまたは実行された唯一の実験のであることを表すことを意図し
ない。当業者は、本質的に同様な結果を得るために変更または修正し得る様々な重要でない
パラメータを容易に認識できるであろう。したがって、当業者に本発明の作製方法および
使用方法を完全に開示および説明するために提示され、本発明者が発明とみなすものの
範囲を限定することを意図せず、また、以下の実験が全てまたは実行された唯一の実験の
であることを表すことを意図しない。使用される数値（例えば量、温度、等）に関しては
正確さを確保する努力がなされたが、いくつかの実験誤差および偏差を説明しなければな
らない。 20

【0170】

実施例1：単細胞PCR反応を実施するためのマイクロ流体システム

装置の製作：チップを、上述の他の装置と同じフォトリソグラフィ方法を使用して、
ポリジメチルシリコキサンで作製した。チップの一般的な概略図を図1に示す。そのような
チップにより実施される一般的な手法を図6に示す。 30

【0171】

試料調製：5～25mLの全血試料を対象から注射器により抽出した。有核細胞を、
オンチップピンチフロー分別（pinched-flow fractionation）を使用して、Lab on a chip, 2005, 5, 778-784（その開示が参照により本明細書に組み込まれる）に一般に記載されるように分離した。有核
細胞をその後の分析用に回収した。

【0172】

PCR反応：検定は、濃縮した細胞溶解物を含有するドロップでのRT-PCR反応
処理を必要とするが、細胞溶解物はRT-PCRを阻害する（図7）。この阻害を解決す
るために、細胞溶解物中の阻害性タンパク質を消化するプロテイナーゼKを利用する手順
が開発されている。プロテイナーゼKの使用により、50pLに1細胞の程度の濃度の溶
解物での有効な増幅が可能となり、200pLでの1細胞で最適な増幅が生じる（図7）。
したがって、本システムは、この濃度で操作する。 40

【0173】

細胞封入、溶解、およびプロテイナーゼK消化は、組み込まれたマイクロ流体システム
を使用して達成される（図8パネル1～3）。細胞は、70μmのドロップ（200pL
）に、非イオン性洗浄剤およびプロテイナーゼKを含有する細胞溶解緩衝液と共に、30
×30μmのフローフォーカス（flow focus）型の装置を使用して共封入され
る。重要なことは、細胞がドロップに封入されるまで細胞溶解緩衝液に曝露されず、封入 50

前に溶解が生じないようにすることである。これはマイクロ流体流路での層流状態により可能となり、この状態は拡散混合が流体の対流と比較してわずかなものにしている。封入後、密集したドロップは、55のインキュベーション流路を20分間で通過し、細胞の溶解およびプロテイナーゼKの阻害性タンパク質消化を可能にする。次いで、ドロップを、階層的な分取器(hierarchical splitter)を使用して、同じ大きさのドロップに分割し(図5；図8パネル3)、ピコ注入およびMegadroppletアレイの撮像に望ましい小型のドロップを作製する(図12～13)。

【0174】

RT-PCR試薬および酵素の注入前に、ドロップを95で10分間加熱することにより、プロテイナーゼKを不活性化する。次いで、ドロップに、同量の2×プライマーおよびRT-PCR試薬を注入する(図9パネルA)。ピコ注入後、乳剤をPCRチューブに回収し、熱サイクルを実施する。ドロップに癌細胞が含まれるかどうかの判定のために、EpCAM単位複製配列をハイブリダイズするTaqMan(登録商標)プローブもまた含まれ；これによりプローブがTaqDNAポリメラーゼの5' - 3'ヌクレアーゼ活性によりハイブリダイズされ、消光している3'末端修飾から5'フルオロフォアを遊離させてドロップの蛍光性を発する。一方で、癌細胞を含有しないドロップはEpCAM単位複製配列を有さず、したがってTaqMan(登録商標)プローブは消光および非蛍光のままである(図4パネルA～B)。その結果、明るいドロップは、EpCAM陽性癌細胞の存在と関係している(図9パネルB～C；図10)。熱サイクルされたドロップを、30μmの高さおよび54cm²の面積のフローセルに注入し；フローセルの垂直方向の狭い間隙(vertical gap)が乳剤を単分子層に押し込み、ドロップの全ての落射蛍光の可視化を何にも遮られずに可能にする。蛍光撮像では、自動顕微鏡が全フローセルのモザイクを取得し、画像をハードディスク装置に保管する。画像を、蛍光性ドロップを特定するカスタム化Matlabコードで処理し、その輝度を測定する。全データは、デジタル処理で保管し、カスタム化されたアルゴリズムを使用して分析される。

【0175】

実施例2：定量多重化分析

1以上の遺伝子を同時にスクリーニングするために、多重化qPCR反応を利用してもよい。反応は、PCRチューブにより最初に大量に実施して、反応条件を最適化された。これらを使用して、好結果の多重化が、3種類のTaqMan(登録商標)プローブ、EpCAM、CD44およびCD45に関して、液滴デジタルRT-PCR中に達成された。この多重化の例を図11に示すが、この際、EpCAMおよびCD44プローブが両標的転写産物を含有するドロップで多重化された。全PCRプライマーセットは長いイントロンに及ぶように設計され、多重反応におけるこれらのより長いゲノムPCR産物の可能性を極めて低くした。さらに、全TaqMan(登録商標)プローブは、エクソン-エクソン接合部にハイブリダイズするように設計されている。本プローブセットはgDNAを認識しない。

【0176】

Megadroppletアレイによる単細胞qPCR： 単細胞でのqPCR検定を実施するために、ドロップを熱サイクルする際に撮像する。これには、熱サイクルの間、ドロップが一定位置に固定される必要があり、したがって、ドロップは繰り返し撮像され得る。ドロップを作製するために使用されるマイクロ流体システムは、上述および実施例1のように作製された。ドロップが形成されて、細胞およびqPCR試薬で充填された後、ドロップをMegadroppletアレイに取り込む(図12パネルA～C；図13)。アレイは流路からなるが、流路には流路天井面が何百万もの直径25μmの円形トラップでくぼみが付けられている。ドロップがアレイに流れると、流路の鉛直高さが15μm、またはドロップより10mm短いため、形状がわずかに平たくなる。ドロップがトラップに近づくと、その接触面では、より大きく、よりエネルギー的に好ましい曲率半径をとる。その表面エネルギーを最小限にするために、ドロップはトラップを完全に充填して、最も小さな、最もエネルギー的に好ましい平均の曲率半径をとるようにする。ドロップの毛

10

20

30

40

50

細管圧は、流れによりもたらされた剪断より数桁大きく、ドロップが無傷なままで、トラップに閉じ込められたままであることを確実にする。トラップがドロップで満たされた後、1つのドロップのみを固定するのに十分な大きさであることから、他のドロップは進入することができず；さらなるドロップは、下流に迂回させられ、出会う最初の空のトラップを満たす。アレイは、密集した乳剤を使用して満たされ、したがって、全てのトラップはドロップにより満たされる。液滴アレイが満たされた後、油を注入して過剰なドロップを取り除き、アレイに熱サイクルおよび撮像を実施する。

【0177】

温度循環に関する熱システムおよび撮像：アレイがドロップおよび細胞で一旦充填されると、装置に熱サイクルと、同時にドロップの撮像を行ない、qPCRに必要な時間依存的情報を取得する。熱サイクルは、ペルチェプレート、放熱板、および制御コンピュータからなるカスタム化加熱器を使用して達成される（図13）。ペルチェプレートは、印加電流の制御によりチップを室温より高くまたは低く加熱または冷却することができる。制御温度および再現温度を確実にするために、コンピュータが、組み込まれた温度プローブを使用してアレイの温度を監視し、必要に応じて印加電流を調整して加熱および冷却する。銅板は、一定の加熱および冷却サイクルの際の過剰な熱の消散を可能にし、2時間足らずのqPCR法のうち1分足らずの実行で95から60まで冷却することができる。温度循環中の液滴を撮像するために、カスタム化されたCanoscan9000Fスキャナーベッド（9600dpi×9600dpiの解像度を有する）が利用される。1000万の六方充填（hexagonal packed）25μmのドロップ（54cm²）では、最も高い解像度で、8億画素を必要とする。1ドロップあたり20画素の解像度により、全画像は3秒で取得され得る。アレイは、多重化TaqMan（登録商標）プローブのために異なる染料を可視化する異なる励起用フィルタおよび発光用フィルタにより、1サイクルあたり数回撮像される。

【0178】

実施例3：マイクロ流体ドロップのドロップの非電極でのピコ注入

マイクロ流体装置を、軟質フォトグラフ（soft photolithographi c）技術を使用して、ポリ（ジメチルシリコサン）（PDMS）で製作した。装置は、直径が50μmの油中水型液滴のピコ注入に最適な、30μmの流路の高さを有していた。装置の設計は、Abate, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2010, 107, 19163（その開示が参照により本明細書に組み込まれる）に以前説明されたものと同様である。しかしながら、重要な相違は、金属のはんだ電極用の流路を取り除くことである。さらに、「ファラデーモータ」（導電性水溶液で充填された空の流路）を、注入部位と液滴スペーサとの間を流れるように実行する（図15パネルBに示す）。モータは、ピコ注入器から生じる電場より、ピコ注入部の上流で、再注入ドロップを電気的に分離し、意図しない融合を防ぐ。ピコ注入された乳剤は、MiliQH₂O中に溶解した3.8mMのフルオレセインナトリウム塩（C₂₀H₁₀Na₂O₅）の単分散液滴からなる。液滴は、溶解した2%（wt/wt）の生体適合性界面活性剤を含むNovoc HFE-7500フッ素系オイルのキャリアオイルに懸濁される。ピコ注入流体は、それぞれ3.8mMフルオレセインナトリウム塩を含有する0～500mMのNaCl希釈系列からなる。この濃度範囲は、大部分の生物学的緩衝液および試薬に存在する溶解したイオンのモル濃度を反映している。したがって、大部分の用途で、流体はすでに必要なイオンを含むため、本技術はさらなる試薬を溶液に添加することなく使用され得る。

【0179】

液滴およびキャリアオイルを、シリングポンプ（New Era）より導入し、上述の同じキャリアオイルおよび界面活性剤混合物（図15パネルA～B）を使用して間隔を空けた。ピコ注入流体を、BDファルコンチューブに収めた。図15パネルAに示すように、ファルコンチューブのキャップを通して、ワイヤ電極を流体に沈めた。キャップの間隙を、LocTite UV硬化ワックスで密閉した。ピコ注入流体を、0～5ボルトの範

10

20

30

40

50

周の 10 kHz 正弦波信号を出力する関数発生器を使用して帯電した。この出力を、Treke 609E-6 モデルの高電圧 (HV) 増幅器により 1000 倍に増幅した。増幅器の正電圧出力 (positive output) を、ワニ口クリップで、ピコ注入流体に沈んだワイヤに接続した。増幅器の接地電極を、1 m の NaCl 溶液を含有する注射器の金属針に接続し、ファラデーモータに導入した (図 15 パネル A)。2 電極は、決して電気的接触であることはなく、装置を出る乳剤を、別個の、電気的に絶縁された容器に回収して閉回路を回避し電流の流れを防いだ。

【0180】

ピコ注入された試薬を、カスタム化した LabVIEW ソフトウェアで制御された空気圧力ポンプ (Control Air Inc.) を使用して、PE-2 管 (Scientific Commodities) を介して装置に注入した。注入流体を加圧し、ピコ注入開口部 (orifice) での油 / 水接触面が液滴流路と力学的に平衡状態にあるようにし；接触面全体の圧力差は、ラプラス圧 (Laplace pressure) と同等であり、注入流体が液滴流路中に膨らんで、そのドロップ自体を形成することなく膨張させる (図 15 パネル C)。この装置に関して、ドロップおよびスペーサーオイルを、それぞれ 200 μL / 時間および 400 μL / 時間の流量で注入した。これらの流量では、ピコ注入流体の接触面は、約 13 psi の印加圧力について力学的に平衡状態にある。より長い管はより高い電気抵抗を有し、ピコ注入を始動させるために印加された AC 信号を減衰させるので、ファラデーモータとして機能する注入流体および溶液を運搬する管の長さを調節した。

【0181】

ドロップに試薬をピコ注入するために、予め形成させた単分散の乳剤を、ピコ注入装置に再注入した。乳剤を高体積分率で取り込み、キャリアオイルがほとんど含まれず、ドロップが共に過密しているようにする。過密ドロップは、これらのドロップを縦一列にさせる狭くなる流路を通過した。界面活性剤を含むさらなるオイルを、図 15 パネル B に示すように、2 垂直流路より添加し、均一にドロップに間隔をあける。単純な T 字形接合部スペーサが機能していることも認められた。その後、液滴はピコ注入器、添加する試薬が含まれる狭い流路を通過した。ピコ注入を始動させるために、電圧信号を注入流体に沈めた電極に印加し、ドロップが注入部を通過する際に、ピコ注入器で電場を発生させた。これにより、ドロップが注入流体と合体した。ドロップが通過する際、流体は 2 流体が合体した後に形成される液体架橋を介してドロップ内に注入された。印加信号は、溶液中で、荷電粒子の電気泳動を阻害する原点オフセットを有するはずである。さらに、信号の周波数は、注入に際して、電場の表れが正極および負極の間で何回も切り替わることを確実にするのに十分なものである必要があり、液滴に付加される電場の正味電荷は、およそゼロである。これは、注入器を離れた液滴が正味電荷ゼロを有することを実現し、このことは液滴が安定状態にあることを実現する重要なことであった。10 kHz の信号を印加した。

【0182】

ピコ注入器の動作を分析するため、注入部を顕微鏡で観察した。電場がない場合では、明確な境界が、液滴と注入流体との間に認められた (図 16 パネル A)。250 V の信号をピコ注入器に印加すると、図 16 パネル B に証明されたように、境界が消失 (vanish) し液滴合体が見られる。したがって、注入流体の帯電は、ピコ注入を始動させるのに最適であり、電気的に絶縁された電極を必要としないことが実証される。

【0183】

印加電圧を使用して注入量を変えることが可能であるかを判断するため、電圧を 0 ~ 5000 V に変動し、得られた液滴量変化を測定した。注入量は、光学的な蛍光検出装置により定量された。ドロップが、ピコ注入器の約 1 cm 下流の液滴流路に焦点を合わせた 472 nm 波長のレーザーを通過した際、ドロップ内に含まれる溶解したフルオレセインから発する蛍光信号は、光電子増倍管 (PMT) により増幅され、LabVIEW FPG A により解析された電圧信号に変換される。ドロップがレーザーを通過すると、それらの蛍光信号は、ドロップの輝度および長さにそれぞれ対応した振幅および幅との、時間関数

10

20

30

40

50

としての矩形波と酷似している。ドロップは、流路の径より大きい球径を有し、円筒の形状になった。したがって、ドロップ体積は、長さの関数としてほぼ直線状である。体積分率(V_f)上昇を算出するために、ピコ注入前およびピコ注入後のドロップ長の割合を測定した。これらの測定を、注入流体中の印加電圧およびNaClのモル濃度のある範囲について繰り返し実施した。

【0184】

図17パネルA～Cでは、体積の上昇を、注入流体の代表的な3種類のモル濃度に関する印加電圧の関数として表示した。全ての場合で、注入量が印加電圧により上昇したが、この効果は、図17パネルAに示す100mM注入溶液で最も顕著である。液滴体積の印加電圧への依存性は、液滴がピコ注入器を通過する際に完全には円筒状にはなっておらず、むしろ液滴が「弾丸」型であり、前縁が後縁より曲率半径が小さい知見に起因する。その結果、ドロップがピコ注入器を通過する際、ドロップの接触面をピコ注入流体の膨らみから離している油層の厚みは、減少する。電気的に誘発された薄膜の不安定性に関しては、接触面を破壊するのに必要な閾値電圧は、膜の厚みに依るものであり、膜が薄くなるほど減少する。したがって、ドロップがピコ注入器を通過する際に膜厚が減少することから、合体時間は電場の大きさに依り：すなわち、比較的高い電場では、比較的厚い膜を破壊することが可能であり、より早い時点でのピコ注入が可能となり；逆に、比較的低い電場では、比較的薄い膜が破壊され、より遅い時点でピコ注入が生じる。注入量は、ピコ注入の持続時間に依ることから、注入量も印加電圧に依る。このことは、全モル濃度に関して印加電圧に依存することを示すデータにより裏付けられる（図17パネルA～C）。注入量を印加電圧と関連付ける曲線は、図17パネルBおよびCでのそれぞれ50mMおよび25mMデータで示されるように、比較的低いモル濃度ではより低いことも認められた。このことは、モル濃度が低い溶液ほど伝導性が低いという事実に起因する場合があり、したがって、注入を始動させるために使用されるAC信号を減衰させ、特定の印加電圧については注入量を減少させる可能性がある。

【0185】

3000V超および100mMでは、注入量は減少し始め、ドロップ径の変動性が上昇する。これらの電圧でのシステム画像では、ピコ注入流体は、ピコ注入開口部では平衡状態をこれ以降持続していないが、代わりに、流路壁を濡らし、流路中に小型のドロップを作り出すことが認められた。

【0186】

無電極ピコ注入器の動作を全パラメータに関して特徴化するために、注入量を、モル濃度および印加電圧の関数として測定し、得られたデータを2次元ヒートマップに示した（図18）。このデータにより、本技術は、試験を行った範囲内のモル濃度を通常有する、大部分の生理的緩衝液について、制御されたピコ注入を可能にすることが実証された。

【0187】

高電圧信号により発生した電場および電流が下流分析に必要とされる生体分子を分断する場合があるかどうかを調査するため、ピコ注入器を使用してRT-PCR反応用の液滴を調製した。MCF7ヒト細胞株から分離した全RNAを含有するドロップに、酵素、逆転写酵素（RT）およびTaqDNAポリメラーゼを含有するRT-PCR反応用混合液をピコ注入した。陰性対照ドロップに、酵素を含有しない混合液を注入した。さらなる乳化されていない陽性および陰性対照反応を、同じRT-PCR混合液で、並行して実施した。熱サイクル後、乳剤を破壊し、增幅産物を臭化エチジウム染色2%アガロースゲルで可視化した。陽性対照でかつピコ注入されたドロップは、予想される100bpの単位複製配列長と同程度の強度のPCRバンドを示した（図19に出現）。これに対し、陰性対照は、増幅を示さず、このことは、ピコ注入流体への始動信号の印加は、ドロップの下流RT-PCR反応を可能にするために、十分生体適合性を有することを実証している。

【0188】

実施例4：試薬を液滴に添加するための三重乳剤の合体

液滴反応を実行するのに重要な1つの段階は、試薬を前から存在するドロップに添加す

10

20

30

40

50

る能力である。ある例として、最終ドロップ反応が予加熱段階で変性し得る試薬を必要とする場合、ドロップ添加が有利な場合がある。ドロップ安定化界面活性剤を使用しない場合、試薬の添加は、第2の試薬を充填したものとドロップを接触させるほどの簡単なものであり得る。しかし、標準のドロップ処理および保管は、多くの場合、界面活性剤で安定化したドロップを必要とし、局所的な電場はドロップ対を選択的に分断および融合するために利用されてきた。融合は、元々のドロップと試薬ドロップの流れのタイミングを合わせる必要があり、これによりドロップが対形成し接触する。第2の戦略は、電場を使用して通過するドロップを不安定にし、通過するドロップに試薬を共に側方流路から注入されるようにする。このことは、同期(synchronization)の問題を回避するが、側方流路と合流する際に、各ドロップが相互汚染される可能性があるという欠点がある。さらに、通過中のドロップ量以下ののみが注入され得る。

【0189】

試薬をドロップと融合または注入するよりも、元のドロップより大型の試薬の液滴中に内包し、次いで両方を電場を適用することにより合体させる、異なるスキームを本明細書に提供する。いくつかの実施形態では、この内包化(enveloping)は1つの元のドロップと1つの試薬外被(envelope)の対形成を促進する。この混合の包含する特性はまた、相互汚染を制限し、液滴注入器と比較して任意の体積の増加を容易にする。

【0190】

ドロップ外被の対形成は、界面化学により可能になる。界面エネルギーを低減するために、親水性流路は、可能な場合は、水性試薬中で油被覆したドロップを封入する。次いで、その後の疎水性流路は、そのドロップを油中で封入し、油中水型ドロップ中の安定な油中水型ドロップ、すなわち三重乳剤(E3)を形成する。流路の疎水性を交互に変えるこの手法は、次のより高位な乳剤の形成を始動する各低位の乳剤を有し、信頼性のある5重の(quintuple)乳剤さえ可能である。始動で、1外被あたり、当初の1滴の適切な対形成を生じる。そこで、元のドロップ表面は、試薬外被の内面と最大限に接触し、その後の電気的合体(electro-coalescence)を促進する。この接触は、試薬のいずれの量、すなわちわずかな量の薄殻(thin-shelled)試薬外被から 10^2 、 10^3 、 10^4 倍またはそれ以上の外被までもが元のドロップに添加され得ることを意味する。

【0191】

E3スキームの詳細な図を図23に示す。最初に、予め作製した油中水型乳剤(E1)を親水性流路を介して装置に再注入した(図23、左上)。ドロップは、並行流の試薬が個々にドロップを摘み取る接合部(junction)と接触し、この試薬がドロップを取り囲んで表面反発を減少させる。E1の油は、当初の各ドロップを収容した薄く安定な殻を形成した。接合部の直後の流路は、本明細書に記載のような接合部を含むように設計され、水性流体のポケットを閉じ込める。これは、油が膨らむ際の壁に接触すること、およびそれらの疎水性を潜在的に変化させることを阻止した。次いで、水中油中水型二重乳剤(E2)は、油を運ぶ疎水性流路に接触している第2の接合部に移動した(図23、左下)(二重乳剤のさらなる説明および特徴化ならびにその形成は、図38~51の説明に記載されている)。ここでは、水性試薬が壁から反発し、E3ドロップを形成した。図では、E2を、試薬流体の親水性流路への癒着(adhesion)を弱めることによりE3を播種(seeding)するステップで示す。試薬と当初のE1ドロップとの体積比を、第1接合部での流量により決定した。

【0192】

形成後、E3を狭い圧縮部を通過させて、電場により合体させた。電場を、2塩類溶液収容流路間、すなわち高い交流電圧を伝導する電極、および接地モート(ground moat)(図23、下)に発生させた。圧縮部は、試薬外被が電場から内部を保護し得る流動性が高いイオン(mobile ion)を収容していたことから、ドロップへの電場の印加を促進していた可能性がある。図に見られるように、E3の圧縮は、内部のド

10

20

30

40

50

ロップを流路の壁に押しつける。合体後、オイルシェルは崩壊 (collapse) し、また反転した油水油型二重乳剤 (E 2') の最内部相となった。

【0193】

装置自体を、従来の P D M S 加工技術を使用して組み立てた。最初に、マスター (master) を、シリコンウェハ上の S U - 8 レジスト層をスピニングし、UV光 (B la k r a y) およびパターン化されたマイラーマスク (m y l a r m a s k) (F i n e l i n e I m a g i n g) により順次曝露して作製した。C D - 3 0 での発現後、S U - 8 マスターを、P D M S (P D M S manufacturer) で 1 0 : 1 の高分子と架橋剤混合物により被覆し、捕捉した空気を取り除くため真空下に置き、1時間、75度加熱 (b a k e) した。次いで、装置を取り外し、0.75 mm の生検パンチでアクセスホールを穿孔した。次に、装置を、1 mm 厚のスライドガラスと、1 m b a r の O₂ に 3 0 0 W のプラズマ洗浄装置に 2 0 秒間両者を曝露し、接触させ、その後 1 0 分間、75度加熱することにより接着させた。

【0194】

最終処理段階で親水性および疎水性流路を作製した。最初に、A q u a p e l (登録商標) を、装置を介して後方に、ドロップ出口へ、およびキャリアオイル注入口外へと流出させた。同時に、ドロップ再注入器の流体入口を 1 5 p s i 空気で加圧し、A q u a p e l (登録商標) が二重乳剤、装置の親水性部分に流入するのを防いだ。次に、A q u a p e l (登録商標) に曝露された同じ流体入口に、P E E K チューブ (R e s o l u t i o n S y s t e m s, T P K . 5 1 5 - 5 M) で埋め込み (p l u g) 、装置を 1 m b a r の O₂ プラズマに、同じ洗浄装置で 1 分間、再曝露した。プラズマは、曝露された流路を親水性にし、その間、プラグはそのまま疎水性流路を維持していた。この親水性処理は、半永久的にすぎず、ここで使用していない他の方法は、堅牢な親水性流路を製造することが可能である。

【0195】

操作を行うために、適切な流体を充填した注射器を、P E - 2 チューブ (S c i e n t i f i c C o m m o d i t i e s, # B B 3 1 6 9 5) および同様の P E E K チューブにより最終装置に接続し、注射器ポンプ (N e w E r a) を使用して加圧した。再注入ドロップは、1% w / w の生体適合性界面活性剤を含む、超純水のフッ素化油 (N o v e c H F E 7 5 0 0) からなった。ドロップを 2 0 μ L / 時間の比較的遅い流量で流し、蛇行流路を使用して (図 2 3、左上) 流れ抵抗を増加させ、また、いずれの圧力変動もフィルターにかけた。検査試薬は、0.1% プルロニック系界面活性剤 (モデル番号) を含む P B S 緩衝液 (モデル番号) であり、およびキャリアオイルは再注入ドロップと同様のものであった。これらを 2 0 0 μ L / 時間 ~ 1 2 0 0 μ L / 時間の同等の速度で流した。電極およびモートに、3.0 N a C l 溶液を充填させた。流路の空気が P D M S に吸収されるまで、終端の電極を溶液充填用の注射器で加圧した。それを 5 0 0 V で駆動する 2 0 k H z の高電圧発振器 (J K L C o m p o n e n t s C o r p, B X A - 1 2 5 7 9) に接続した。ドロップの融合または注入に印加されるそのような高電圧は、生物学的に適合することが示されている。

【0196】

図 2 4 は、作動中の E 3 装置の顕微鏡画像を示す。図 2 4 パネル A の上部から移動していく再注入された E 1 は、完全に異なる油と水の屈折率が背面照明を屈折させたことにより、完全な輪郭を描いている。E 1 が接合部で、側方から流れ込む試薬により封入されて E 2 になった後、内部および外部の屈折率が適合し、その境界線は極めて不鮮明になった。これは、オイルシェルが薄いことを示すが、感知できないほどの屈折であった。図 2 4 パネル A では、E 1 は 3 0 μ m 径のドロップ (1 5 p L) からなり、ここにある全流路は親水性で一辺が 3 0 μ m の正方形であった。

【0197】

図 2 4 パネル B に見られる次の接合部で、E 2 は親水性流路を出て一辺が 6 0 μ m である大きな正方形の疎水性流路で E 3 となった。最初の乳剤に関してのように、これらの E

3 ドロップの縁は、屈折率が不適合であるため、鮮明に見ることができた。おそらくは、内部の E 1 が大型のドロップの形成と同期化する必要があったことから、この段階によりタイミングの問題が生じた。しかし、E 1 の接合部への到着が試薬相の親水性流路への接着を弱め、膨らみ (budding) を導いたことから、この問題は回避された。このステップ (図 24 パネル B の差しみ図に示す) により、E 1 のごく一定間隔の充填で E 3 となった。

【0198】

E 3 の合体を、図 24 パネル C に示す。60 μm 幅の流路を 15 μmまで狭くし、E 1 を電極から電場が侵入し得る壁に押しつけた。合体した E 2' 生成物が右側に見られる。崩壊した油残留物は、高コントラストで現れ、1 μm 厚の当初のオイルシェルに対しておよそ 2 pL の量を有する。残留物は、E 3 を、油が存在しない流路壁に押しつけた事実を除けば、おそらく、合体の際、キャリアオイルと融合した可能性がある。差しみ図では、圧縮部は、電場なしで示される。合体は生じず、圧縮部では内部相を背面に移動させた。合体の規則性を図 24 パネル D の上部で実証するが、ここでは、ドロップの水性内容物をホモジナイズするための混合流路を示す。

【0199】

E 3 合体の正確な動力学 (precise dynamics) を、高速カメラを使用して判定した。2つの時系列を図 25 に示し、内部 E 1 のオイルシェルは、青色に強調表示している (図 25 では矢印で示される)。各々は、時間 $t = -0.7$ ミリ秒で開始され、この場合、内部 E 1 は、まだ収縮せず球状である。E 1 が圧縮部の壁に押し付けられ、わずかに平らになった際の、破壊する直前に、時間 $t = 0.0$ ミリ秒が設定された。次のフレーム、 $t = 0.1$ ミリ秒までに、E 1 は破裂した。図 25 パネル A では、破裂により E 1 の内容物をドロップの後方に放出し、一方で、図 25 パネル B では、内容物は前方に放出された。高次の乳剤では、内部相の拘束されていない表面は次の最外部相の表面とある 1 点で接して界面エネルギーを減少させている (すなわち、相は完全には同心ではない)。この不規則な位置にある接点が融合の役に立ち、ドロップが破裂する箇所を決定し得る。破裂後、 $t = 1.1$ ミリ秒のフレームに示すように、オイルシェルが崩壊した。

【0200】

このステップの頑強性は、親水性または疎水性である適した流路に依存する。装置の第 1 部が完全に親水性でない場合、E 1 の油は接合後直ぐに流路壁を濡らす場合がある。球体として、図 24 パネル A 流路の中央に流下する代わりに、これらは、半球形体として側方に流下し、次の接合部で分散媒に、内包化した乳剤よりむしろ単一乳剤として滑動する場合がある。装置の第 2 部が完全に疎水性でない場合、圧縮部での電気湿潤 (electro-wetting) が生じる場合があり、小型のサテライトドロップが通過中の E 3 の最後で研磨する。現状では、このスキームは、上述した融合および注入方法 (strateg) の純粋な水性ドロップ (E 1) とは対照的に、その乳剤 (E 2') に油を含む水性ドロップを生成する。所望の生成物に依り、このスキームは許容され得るが、そうでない場合は、マイクロ流体の遠心分離またはドロップ分割のような様々な技術を使用して、油を取り除くことができる。

【0201】

上述の研究から、三重乳剤の合体方法は、試薬をドロップ回収物に添加する頑強な方法であることが実証された。そのような三重乳剤合体は、完全な同期よりむしろ流路の界面化学により、ドロップの減少またはドロップ混合なしに実行された。

【0202】

実施例 5 : ピコ注入は、液滴 R T - P C R による R N A 分子のデジタル検出を可能にする大部分の生物検定は、異なる時間での試薬の段階的付加を必要とする。したがって、最も広く使用されるマイクロ流体技術については、試薬をドロップに添加する手順が頑強であることが重要である。これを達成する 1 つの技術は、ドロップの電気合体 (electrocoalescence) であり、この技術では、電場を使用して試薬ドロップとドロップを融合することにより、試薬を添加させる。別の技術は、ピコ注入であり、これは

10

20

30

40

50

、加圧した流路に流すことにより試薬を直接ドロップに注入し、電場を印加する。ピコ注入の利点は、ドロップの2つの流れを同期する必要がなく、容易に実行でき、操作がより頑強であるという点である。しかしながら、ドロップからドロップへ注入される量の変動性および電場による試薬の潜在的な分解が、分析を妨げる場合がある。さらに、ピコ注入の際、ドロップは試薬流体と一時的に融合し、ドロップ間の物質の移動、および相互汚染をもたらす可能性がある。

【0203】

本研究は、ピコ注入の、ドロップで実施される生物検定への影響およびドロップ間の物質移動範囲を調査した。感度が高いデジタルRT-PCR法を使用して、ピコ注入がドロップへの試薬の添加に頑強な方法であり、ピコ注入を組み入れていない反応と同程度のRNA転写物検出を可能にすることを示す。また、ドロップ間の物質の移動がごくわずかであることを決定した。ピコ注入を組み込んだワークフローの、ピコ注入を組み込んでいないワークフローを上回る利点とは、ピコ注入は試薬が段階的に添加されることを可能にし、デジタルRT-PCRを不均一な核酸、ウイルス、および細胞集団の解析への適用に新しい可能性を広げるという点である。

10

【0204】

材料および方法

マイクロ流体装置の作製

マイクロ流体装置は、スライドガラスに結合したポリジメチルシリコサン(PDMS)流路から構成した。PDMS金型を作製するために、装置マスターを、最初にフォトレジスト(SU-8 3025)の30mm厚膜をシリコンウェハ上にスピンドルコートして作製し、その後、パターン化したUV曝露およびレジスト現像を行なった。次に、ポリマーと架橋剤の未硬化混合物(10:1)を、マスター一面に注ぎ、80°Cの1時間で加熱した。硬化した金型を剥離した後、PDMS厚板で、アクセスホールを0.75mm生検コア針(coring needle)で穿孔した。装置をイソプロパノールで洗浄し、空気で乾燥させ、次いで、スライドガラスと結合させた後、300Wのプラズマ洗浄器で1mbarのO₂プラズマ処理を20秒間行った。装置を疎水性にするために、流路をAquapel(登録商標)で流し、80°Cで10分間加熱した。

20

【0205】

RNA単離

30

ヒトPC3前立腺癌またはRaji Bリンパ球細胞株を、10%FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した適切な増殖培地で、37°C、5%CO₂で培養した。RNA単離前に、Raji細胞をペレット状にし、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で1回洗浄した。融合性(confluent)および接着性(adhered)のPC3細胞を、最初にトリプシン処理し、その後、ペレット化して洗浄した。全RNAを、細胞ペレットから、RNasey Mini Kit(Qiagen)を使用して単離した。全RNAを分光光度計を使用して定量し、RNAの表示量(150~1000ng)をその後の25mlのRT-PCR反応に使用した。

【0206】

TaqMan(登録商標)RT-PCR反応

40

RT-PCR反応に使用される增幅プライマーの塩基配列は次のとおりであった：EpCAMフォワード5'-CCTATGCATCTCACCCATCTC-3'、EpCAMリバース5'-AGTTGTTGGATTGTTGTG-3'、CD44フォワード5'-ACGGTTAACAA TAGTTATGGTAATTGG-3'、CD44リバース5'-CAACACCTCCCAGTATGACAC-3'、PTPRC/CD45フォワード5'-CCATATGTTGCTTCCCTCTCC-3'、PTPRC/CD45リバース5'-TGGTGACTTTGGCAGATGA-3'。全PCRプライマーを検証した後、チューブに基づくRT-PCR反応を伴うマイクロ流体液滴試験に使用した。これらの反応からの産物を、アガロースゲル上で電気泳動し、予測単位複製配列サイズの単一バンドを各プライマーセットについて観察した。TaqMan

50

(登録商標) プローブの塩基配列は次のとおりであった： E p C A M 5 ' - / 6 - F A M / A T C T C A G C C / Z E N / T T C T C A T A C T T T G C C A T T C T C / I A B k F Q / - 3 ' ; C D 4 4 5 ' - / C y 5 / T G C T T C A A T G C T T C A G C T C C A C C T / I A b R Q S p / - 3 ' ; P T P R C / C D 4 5 5 ' - / H E X / C C T G G T C T C / Z E N / C A T G T T C A G T T C T G T C A / I A B k F Q / - 3 ' 。予混合した増幅プライマーおよびTaqMan(登録商標)プローブを、Integrated DNA Technologies(IDT)社からPrimeTime Standard qPCR法として注文し、推奨される1倍使用濃度で使用した。Superscript III逆転写酵素(Invitrogen)をPCR反応に直接添加して、第1鎖(stand)cDNA合成を行えるようにした。RT-PCR試薬の乳化またはピコ注入後、ドロップをPCRチューブで回収し、T100 Thermal Cycler(Biorad)に移動させた。反応は、50で15分、続いて93で2分、および次の41サイクルでインキュベートした：92で15秒および60で1分。
【0207】

乳剤生成およびピコ注入

反応混合物を1mLの注射器に充填し、マイクロ流体T字形接合部ドロップ生成器(maker)に、カスタム化したLabVIEWソフトウェアで制御された注射器ポンプ(New Era)により注入した。装置の径および試薬の流量を調整し、所望の30mmサイズのドロップを得た。ピコ注入に電場を印加するため、電極および周辺のモート流路を3MのNaCl溶液で充填し、約0.1S/cmの伝導率を得た。電極に、ワニ口クリップで注射針と接続された蛍光灯インバータ(JKL Components Corp)により生成した20kHz、300VAC信号を使用して、電圧を加えた。
【0208】

免疫蛍光の撮像

熱サイクルを行った液滴を撮像するため、乳剤の10mLをCountessチャンバー型カバーガラス(Invitrogen)中にピペットで分取した。スライドをNikon Eclipse Ti倒立顕微鏡で、従来の広視野落射蛍光および4倍の対物レンズを使用して撮像した。蛍光フィルタを選択して、シグナル強度を最適化し、多重化反応で使用される染料のスペクトル重複による背景蛍光を軽減させた。画像を、Nikon社のNIS Elements撮像ソフトウェアを使用して取り込んだ。
【0209】

データ解析

液滴画像を、カスタム化したMATLABソフトウェアを使用して解析した。各視野について、明視野の蛍光画像を取り込んだ。最初に、ソフトウェアで円(circle)をドロップ接触面に適合させることにより、明視野の画像の全ドロップを探し出した。次に、蛍光画像での背景光を、ドロップより極めて大きい縮尺まで変化させるよう制約した平滑な多項式曲面(smooth polynomial surface)を使用して、取り除いた。その後、ソフトウェアで、各液滴の円形境界中の平均蛍光強度を測定した。得られた強度値をオフセットし、その結果、最小強度(空)群が平均で0となった。ドロップを、「陽性」か「陰性」かを、ドロップの強度がそれぞれ規定の閾値のプラスまたはマイナスに収まっているかに基づいて、判定した。
【0210】

結果

ピコ注入されたドロップでのRNA転写物の検出

RT-PCR法でピコ注入を使用する際の、可能性のある懸念は、それがドロップでの反応を妨げる場合があるという可能性であり；例えば、この処理は、電場への曝露直後のドロップ中の試薬量の変動または主要成分の分解を生じる場合がある。これらの問題を調査するため、癌関連の2つのヒト転写物、EpCAMおよびCD44の検出を、ピコ注入および非ピコ注入のドロップで、TaqMan(登録商標)RT-PCRを使用して比較した(図26)。EpCAM検出用のTaqMan(登録商標)プローブを、フルオロフ
50

オア6カルボキシフルオロセイン(carboxyfluorescein) (F A M)に結合させ、 C D 4 4 のプローブには染料 C y 5 を結合させた。プローブ混合物はまた、 T a q M a n (登録商標) プローブの側面に位置する、およびこれらの遺伝子から約 1 5 0 塩基の単位複製配列を回収するプライマーを含んでいた。

【 0 2 1 1 】

非ピコ注入された対照ドロップを調製するために、プローブ混合物を、ヒト P C 3 前立腺癌細胞株から単離された全 R N A の 1 5 0 n g を含有する 2 5 m l の R T - P C R マスター ミックス反応物に添加した。 R T - P C R 溶液は、 T 字形接合部ドロップ生成器により乳化されて単分散 3 0 m m (1 4 p L) ドロップになったものであり、ドロップは、 P C R チューブに回収され、熱サイクルを行った (図 2 6 パネル A および図 2 6 パネル C) 10 。熱サイクルの際、少なくとも 1 つの E p C A M または C D 4 4 転写物を含有するドロップが増幅され、関連する F A M および C y 5 染料の波長で蛍光性を有するようになった。一方で、分子を含まないドロップは増幅されず、標準 T a q M a n (登録商標) に基づくデジタル液滴 R T - P C R では、不鮮明なままであった。熱サイクル後、ドロップをチャンバ 型スライドガラスにピペットで分取し、蛍光顕微鏡により撮像した。原溶液での E p C A M および C D 4 4 の濃度を測定するため、 F A M または C y 5 の蛍光性を有するドロップ数を計測した。反応は、 E p C A M および C D 4 4 プローブの両方に対してデジタル蛍光信号を示し、これらの転写物が、図 2 7 パネル A に示すように、ドロップで限定的な濃度で存在することを示唆している。逆転写酵素を省略した対照反応は、蛍光信号が生成できず、これは、 T a q M a n (登録商標) 分析が特異的であり、乳化処理により生じる T a q M a n (登録商標) プローブの非特異的開裂の結果ではないことを示唆する。 20

【 0 2 1 2 】

ピコ注入が T a q M a n (登録商標) R T - P C R に与える影響を検査するために、上述と同様に実験を行ったが、 R T - P C R 試薬は、 2 液に分割して異なる時間に添加した。全 R N A 、 R T - P C R 緩衝液、プライマー、プローブ、および D N A ポリメラーゼを乳化して 3 0 m m 径のドロップにし；これらのドロップは、逆転写酵素がないため R T - P C R を行うことができなかった。ピコ注入を使用して、同量の 2 倍の逆転写酵素を、 P C R 緩衝液で導入し、ドロップを熱サイクルさせた。非ピコ注入の対照によるものと全く同程度に、この乳剤は頑強なデジタル信号を示し、また、図 2 7 パネル A および B に示すように、蛍光性ドロップ対非蛍光性ドロップは同等の比率であった。蛍光性が、背景にある T a q M a n (登録商標) プローブの加水分解、プローブの電場による破壊、またはいくつかの他の因子によるものでないことを確かめるため、逆転写酵素に欠くピコ注入流体を R N A 含有ドロップに添加した際の、さらなる反応を実施した。これらのドロップでは、熱サイクル後には明らかに蛍光性ではなく (図 2 7 パネル C) 、信号が R N A 分子のデジタル検出のまさにその結果であったこと、およびこれらの分析が特有なものであったことが実証された。 30

【 0 2 1 3 】

ピコ注入ドロップでの R T - P C R 検出率の定量化

ピコ注入の T a q M a n (登録商標) R T - P C R 転写物検出への影響を正確に定量化するために、ピコ注入および非ピコ注入ドロップの異なる 4 レプリカを回収した。データ解析を自動化するため、カスタム化された M A T L A B ソフトウェアを使用して画像中のドロップを探し、その蛍光強度を測定した。特定の流路 (F A M または C y 5) については、各ドロップ内の蛍光強度を平均化し；全ドロップ量を順次オフセットし、その結果、空のドロップ群は平均で 0 になった (材料および方法を参照のこと) 。両流路についての 1 つの閾値を使用して、各ドロップを、図 2 8 パネル A に示すように、ドロップの強度がそれぞれ閾値のプラスまたはマイナスに収まっているかに基づいて、 E p C A M および C D 4 4 について陽性または陰性と明示した。総合して、 1 6 , 2 1 6 の対照ドロップおよび 1 4 , 2 5 4 のピコ注入ドロップを、実験用の 4 レプリカより解析した。ピコ注入ドロップの非ピコ注入対照ドロップに対する T a q M a n (登録商標) 検出率を決定するため、各レプリカでの C D 4 4 (C y 5) および E p C A M (F A M) 陽性対照ドロップの総 40

数を正規化した。逆転写酵素のピコ注入後、CD44陽性ドロップの92% (+/-26%) およびEpCAM陽性ドロップの87% (+/-34%) を、対照ドロップと比較して検出した(図28パネルB)。ピコ注入ドロップに関する平均の転写物検出率は、一定のRNA濃度に関する対照ドロップのものよりわずかに低かったが、その差は統計学的に有意ではなく、また、いくつかの実験用のレプリカのピコ注入ドロップの検出率は、対照に関するものより高かった。これらの結果に基づき、ピコ注入が、反応成分を異なる時間に添加可能であるという利点を有しながら、デジタルRT-PCRと同等の転写物検出率が得られるという結論に達した。

【0214】

個別のドロップ群は、最小限の相互汚染でピコ注入され得る

10

試薬をドロップに添加する際の重要な特徴は、各ドロップの固有の内容物を維持すること、およびドロップ間の物質の移動を防ぐことである。個別の2ドロップの融合とは異なり、ピコ注入ドロップの内容物は、図26、パネルBに示すように、添加される流体と瞬間に結合する。流体からのドロップの断絶後、ドロップは物質を流体から離し、順次、その後に続くドロップに付加されてもよい。これは、ドロップ間の材料の移動、および相互汚染を引き起こし得る。ピコ注入が相互汚染をもたらす範囲を検証するために、TaqMan(登録商標)RT-PCR反応は、極めて感受性が高く単一のRNA分子だけの移動を検出することができることから、再度使用した。FAM結合したTaqMan(登録商標)プローブを、EpCAM転写物の標的化に使用し、また、ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)結合したTaqMan(登録商標)プローブを、Bリンパ球特異的転写物PTPRCの認知用に使用した。全RNAを、EpCAMを発現するがPTPRCを発現しないPC3細胞、およびPTPRCを発現するがEpCAMを発現しないBリンパ球由来細胞株(Raji)より単離した。ドロップの対照セットについて、両細胞型からのRNAを混合し、TaqMan(登録商標)プローブおよびRT-PCR試薬を添加し、その溶液を乳化して30mmのドロップにした。ドロップをチューブに回収し、熱サイクルを行い、撮像した(図29A)。画像では、多数のドロップがFAMおよびHEX蛍光を呈し、PTPRCおよびEpCAM転写物の多重化TaqMan(登録商標)検出を示す。比較的ごくわずかが純緑色または赤色の蛍光性を有し、これらの分子のうち当初の1つのみを含有していたことを示唆し、一方で、ごく少数が不鮮明であり、したがってこれらの転写物を有していないことを示している。

20

【0215】

ピコ注入の相互汚染率を確認するため、対向するT字形接合部からドロップの2群を同時に生成するマイクロ流体装置を使用した(図29パネルBに示す)。図29パネルBに示すように、一方の群はRaji細胞RNAおよびPTPRC転写物のみを含有し；他方の群はPC3細胞RNAおよびEpCAM転写物のみを含有した。両群は、EpCAMおよびPTPRCに関するプライマーおよびTaqMan(登録商標)プローブを含有し、したがっていずれの転写物の存在をも信号で伝えることが可能であった。形成直後に、ドロップに2倍の逆転写酵素をピコ注入し、これによりTaqMan(登録商標)分析用の第1鎖cDNA鑄型合成が可能となり、および汚染する機会ができた。RNAがドロップ間で移動した場合、ドロップのうちいくつかが多重化TaqMan(登録商標)信号を呈するはずであったが、一方で、汚染がない場合、明確な2群と非多重化群が存在するはずであった。蛍光画像では、図29パネルBに示すように、EpCAM(FAM)に陽性の一群およびPTPRC(HEX)に陽性の他群の、明確な2群が認められ、多重化信号を示唆する黄色の多重化ドロップはほとんど存在しなかった。これにより、ピコ注入の際の相互汚染が稀であることが実証された。

30

【0216】

正確な相互汚染率を測定するため、自動化した液滴検出ソフトウェアを使用して、数千のドロップを分析し(図30パネルA)、その結果をTaqMan(登録商標)陽性ドロップの総数のパーセントで示した(図30パネルB)。総数で5771のTaqMan(登録商標)陽性対照ドロップおよび7329のTaqMan(登録商標)陽性ピコ注入ド

40

50

ロップを、異なる実験用3レプリカから分析した。R a j i およびP C 3 R N Aを組み合わせた対照ドロップでは、多重化率(m u l t i p l e x i n g r a t e)44%(+/-9.26)が認められた。一方で、ピコ注入ドロップでは、図30パネルBに示すように、0.31%(+/-0.14)のみの多重化ドロップが認められた。したがって、ピコ注入によりいくらかの多重化が存在し、その割合はごく低いものであったが、R N A移動の他の原因(熱サイクル中のドロップの融合または液滴接触面間でのR N A輸送等)によるものとして除外することができない。

【0217】

形成直後にドロップをピコ注入した2段階の実験により、相互汚染の正確な量が推定可能になったが、生物学的検査でのピコ注入の実際の実行のほとんどでは、ドロップを1つの装置で形成し、インキュベーションまたは熱サイクルのためにラインから離した状態に取り外し、次いでピコ注入のために別の装置に再注入する。ピコ注入がこれらの条件下で実施されるデジタルR T - P C R反応に有効であることを実証し、また、相互汚染率を推定するために、ドロップの2段階群を再度作製したが、この時、ドロップをラインから離した状態に取り出し、1mL注射器に保管して、ドロップを再注入およびピコ注入した。まさに以前と同様に、ほぼ全てのドロップが純緑色または赤色であり、これは図31に示すように最小限の相互汚染を示唆している。しかし、画像の稀な黄色ドロップに示すように、多重化シグナルを有するいくつかのドロップも認められた。この実験では、形成直後にピコ注入したドロップの場合と比べて1%高い多重化率であった。ピコ注入器での相互汚染は除外することはできないが、比較的高い多重化率は、ラインから離した状態での保管および再注入の間(その間、ドロップが融合機会を増す可能性がある埃、空気、せん断力を受ける場合がある)でのドロップの融合の結果であると推測される。このことは、乳剤の再注入の際に、偶発的な大型の融合ドロップが存在するという知見、また図31に示すようにピコ注入された乳剤が若干多分散的であった知見により裏付けられる。それにもかかわらず、これらの粗野な条件下でさえ、ドロップの大多数が多重化を呈しておらず、ドロップが個別の反応体(re a c t o r)としてその完全性を維持していたことが示唆される。

【0218】

これらの研究から、ピコ注入は、液滴デジタルR T - P C Rに適合し、ピコ注入を組み込まないワークフローと同等の単一のR N A分子検出率を提供することが実証された。このことにより、ピコ注入が、核酸、酵素、緩衝液、および染料のような通常の生体成分に関連する反応に適合することが示された。また、ピコ注入の際に、ドロップ間での物質のわずかな移動が存在することが認められた。これらの結果は、ピコ注入が、超ハイスループット生物学的分析のために試薬をドロップに添加する、強力かつ頑強な技術であることを裏付ける。

【0219】

実施例6：単細胞R T - P C Rマイクロ流体装置

図32は、本明細書で提供される単細胞R T - P C Rマイクロ流体装置の1つの実施形態を示す。対象の細胞を、最初に、プロテアーゼおよび洗浄剤を含む溶解試薬を含有するドロップに封入し、ラインから離した状態でインキュベートした。次いで、これらのドロップをこの装置に導入し、微小液滴を導入する注入用(input)微小流路およびフローフォーカス型(flow focus)ドロップ生成器を使用して、油により間隔を開けた(パネルA)。対形成用(pairing)微小流路(microchannel)では、次いで、間隔を開けたドロップを、希釈緩衝液ドロップ生成器により生成された希釈緩衝液を含有する大型のドロップと、対形成用微小流路との流体連通で、対形成した(パネルB)。次いで、大型のおよび小型のドロップを、融合用微小流路で、電場により融合し(パネルC)、小型のドロップ内容物を大型のドロップに付加した。融合したドロップは混合用微小流路を通過し、次いで、その少量をドロップ試料採取器(drop sampler)により試料採取した(パネルD)。次いで、その少量はピコ注入微小流路を通過し、その際、その少量にR T - P C R試薬をピコ注入した(パネルE)。次いで、ド

10

20

30

40

50

ドロップに、R T - P C R 反応のための熱サイクルを行った。

【0220】

このシステムは、単細胞 R T - P C R を促進したが、これは、R T - P C R 試薬の添加前に、細胞溶解およびタンパク質消化の 1 段階での実施（表示されず）、および続くドロップ中の溶解物の希釈を可能にしたことによる。希釈なしでは、溶解物が R T - P C R 反応を阻害する可能性があった。

【0221】

装置は、各マイクロ流体成分のタイミングを、希釈ドロップを生成する大型のドロップ生成器の周期性（*periodicity*）により設定したため、頑強に、少なくともある程度機能した。この周期的なドロップ形成なしでは、装置は安定に動作しない場合があり、また多分散性のドロップを生成する可能性がある。10

【0222】

実施例 7：マイクロ流体液滴形成装置の切り込みを備えた流路を利用した試験

T 字形接合部の下流に配置された流路切り込みを備えた、または備えていない T 字形接合部ドロップ生成器を試験し、液滴形成性能に対するそのような切り込みの有効性を判定した。流路幅は約 30 μm であり、切り込みのピーク幅は、約 5 ~ 約 10 μm であった。図 33 を参照のこと。

【0223】

P D M S マイクロ流体装置を、本明細書に記載のように一般的に作製し、10 秒間でプラズマ処理した。流量比を監視し（個々の流量の合計 (Q_{sum})、(Q_{in}) + (Q_{aq}) は約 1000 μl / 時間および流量比 (R) = Q_{aq} / Q_{sum} であった）、液滴形成を可視化した。20

【0224】

切り込みを備えていない装置で流量比を上昇させると、ドロップ生成器はドロップ形成を停止し、代わりに長い噴流を形成した。いかなる特定の理論にも束縛されるものではないが、これは、噴流が流路壁を湿らせ、接着し、ドロップ形成を阻害するためであると考えられる。図 33 左側を参照のこと。切り込みを備えた装置については、切り込みが壁近くに油を成功裏に捕捉し、水相で湿りにくくする。これにより、装置がより高い流量比でドロップの形成が可能となり、その後、最終的には $R = 0.9$ で湿らせた。このことから、切り込みによりドロップ生成器が、切り込みがない場合で可能であり得た範囲より広範囲にわたり機能することが実証された。図 33 の画像の上部および下部セットは、異なる装置で実行する実験に対応する。実験を第 1 対の装置で実施した場合、最大 Q_{aq} / Q_{in} で 21 倍の増大が達成された。同様の実験を第 2 対の装置で実施した場合、最大 Q_{aq} / Q_{in} で 8 倍の増大が達成された。この不一致は、噴出を引き起こす湿潤性が多少、予測不可能であり、ヒステリシス（*hysteresis*）であり、また変動傾向にあることから、実験の変動性（*experimental variability*）に起因する場合がある。30

【0225】

実施例 8：液体電極の製作および試験

多くのマイクロ流体装置は、電場を形成するために金属電極を、そのような電場が特定のマイクロ流体装置の用途に必要とされる場合、利用する。しかしながら、そのような金属電極の使用への欠点、例えば増加した製作ステップ数および電極欠陥の可能性等が存在する場合がある。40

【0226】

有利にも、本開示には、製作ステップを単純化し、かつ、金属電極と同様のおよび／または改良された性能を提供する、液体電極の製作および使用について説明している。

【0227】

図 34 は、例示的な液体電極製作方法の概要を示す。最初に、S U - 8 フォトレジストマスターを Si ウエハに製作した（A）。次いで、P D M S を鋳造し、脱気し、硬化させた（B）。流体入口を P D M S で穿孔し、その P D M S をスライドガラスに接着させた（50

C)。最後に、流路にNaCl溶液を充填した。図35は、電極流路に塩水を充填させた際の異なった時間で撮影された一連の3画像を示す（時間的経過は、左から右に進む）。塩水を流路の流体入口に導入し、加圧し、塩水を流路にゆっくり充填させた。流路に当初存在した空気をPDMSに押し込み、その結果、末端まで液体を完全に充填させた。

【0228】

図36に示すように、様々な液体電極構造の電場線を模倣した。模倣図は、異なる3形状の等電位線を示す正極および接地電極の模倣図である。

【0229】

液体電極は、図37（大型のドロップと小型のドロップを液体電極を利用して融合する液滴融合装置のうち2画像を提供する）に示すように、電場の印加によりドロップを融合することが可能であった。ドロップを融合するため、塩水電極を使用して電場を印加した。電場がオフ状態の場合はドロップに融合は生じず（右）、電場がオン状態の場合はドロップに融合が生じた（左）。

【0230】

実施例9：アゾスピラ（Azospirala）/大腸菌混合物のPCR解析およびFACS選別

異なる2種の細菌、アゾスピラおよび大腸菌を、微小液滴に封入した。液滴内PCR（in droplet PCR）を、アゾスピラおよび/または大腸菌について、TaqMan（登録商標）およびプライマーを使用して実施した。図52は、封入したアゾスピラで、TaqMan（登録商標）のPCR反応を実施したドロップを示す画像である。上部画像は110bp単位複製配列を生成した反応に対応し、これに対し、下部画像は、147bp単位複製配列に対応している。図53は、アゾスピラおよび大腸菌に関する16Sプライマーを検査したゲルの写真を示す。ゲルには、2種類のTaqMan（登録商標）PCR反応の単位複製配列に対応するバンドを示され、1つは464bp単位複製配列であり、1つは550bp単位複製配列である。図54は、液滴内PCR反応が、複数のプライマーセットを細菌含有試料に添加することにより多重化し得ることを実証するゲルの写真を示す。図55は、TaqMan（登録商標）反応がアゾスピラについてのみのプライマーおよびプローブを有していた実験結果を示し、したがって、これらの細菌のうち1つを含有するドロップが増幅を受けて蛍光性になったが、空のドロップまたは大腸菌によるドロップは不鮮明のままであった。次いで、乳剤を、マイクロ流体装置を使用して、二重乳剤に封入し、FACSで選別した。図55の右側のプロットは、FACSデータを示す。上部プロットは、ドロップ蛍光性の関数として示された散乱断面積を示す。これに基づき、一群に境界線を描くことにより（上述）ゲーティングし、この群をドロップ強度に基づき選別した。ゲーティング（gating）により、小型の油滴または取り除くべき埃による誤事象（erroneous event）が認められた。二重乳剤のみを見ると、本群は、比較的低いヒストグラムに示すように、蛍光性ドロップおよび非蛍光性ドロップに対応した明確な2ピークを有した。液滴内PCR中に生成される単位複製配列を再増幅させる試みは成功しなかったが、潜在的には、それらが類似の塩基を含むことによる化学構造、またはキャリアオイルの阻害作用に起因する。

【0231】

上述の発明は、明確な理解を目的に、図および実施例を手段として、いくつか詳細に説明してきたが、当業者には、本開示の教示を考慮すると、ある変更および修正が添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲を逸脱せずになされ得るということが容易に理解される。

【0232】

したがって、上述は、本発明の主要部を単に説明しているに過ぎない。当業者は、本明細書に明確に説明または記載されていないが本発明の主要部を具現化する様々な配置を考案することができ、その趣旨および範囲内で包含されることは、当然理解されよう。さらにまた、本明細書に記述される全ての実施例および条件付きの語は、主に、読者が具体的に記述したそのような実施例および状態を限定することなく本発明の主要部を理解することを手助けすることを意図している。さらには、本発明の主要部、態様、および実施形態

10

20

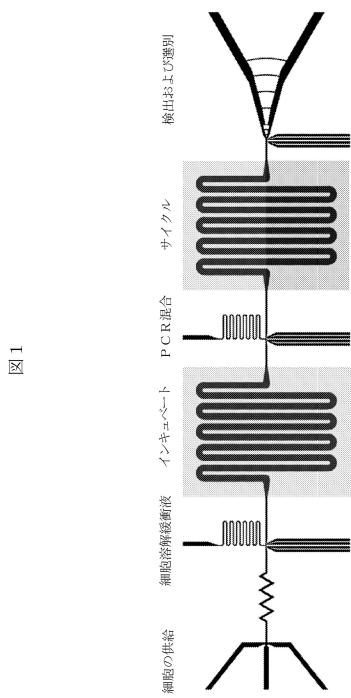
30

40

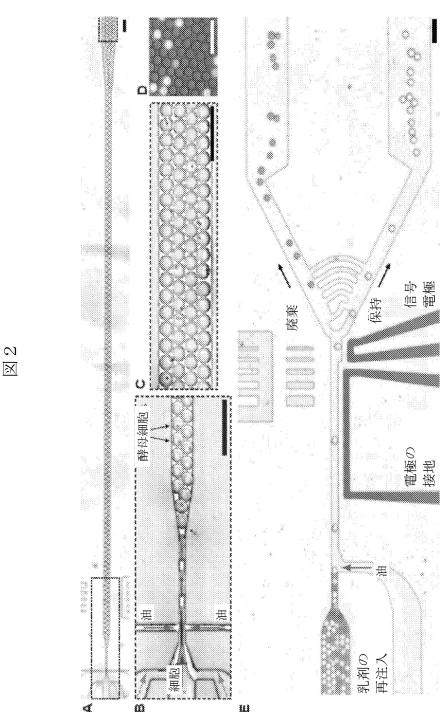
50

ならびにその特定の実施例を記述する本明細書の全ての記載は、その構造的等価物および機能的等価物の両方を包含することを意図する。また、そのような等価物が、既知の等価物および将来開発される等価物の両方、すなわち、構造にかかわらず同様の機能を実行する開発されたいずれの要素も、包含することを意図する。したがって、本発明の範囲は、本明細書に示され、記載された例示的な実施形態に限定されないことを意図する。むしろ、本発明の範囲および趣旨は、添付の特許請求の範囲により具現化される。

【図1】

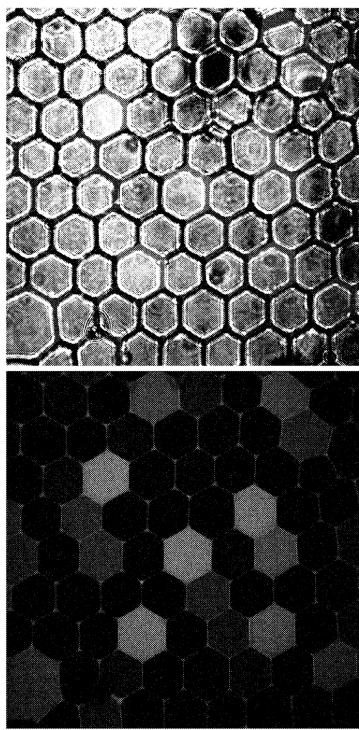


【図2】

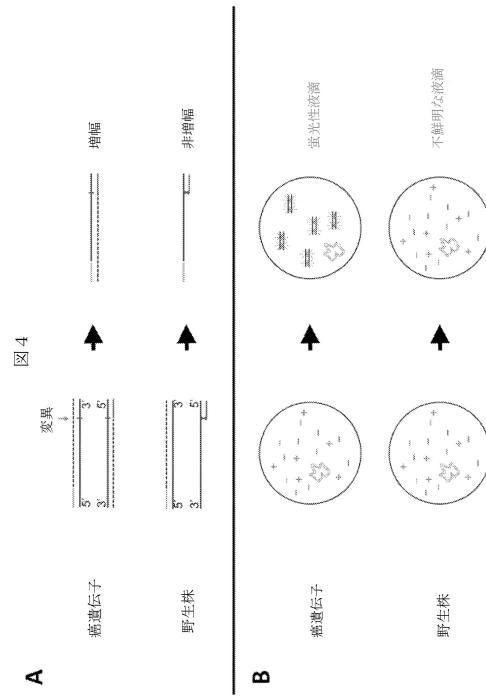


【図3】

図3

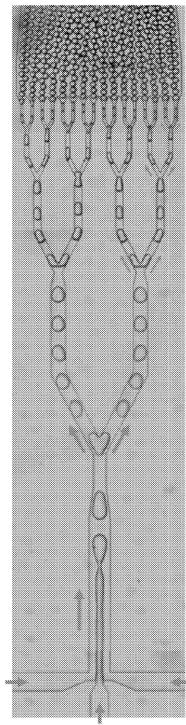


【図4】

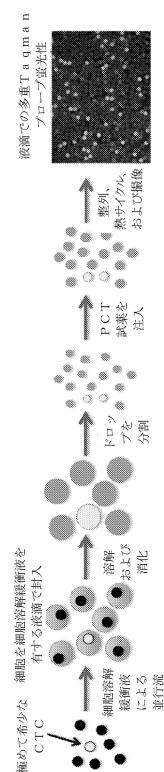


【図5】

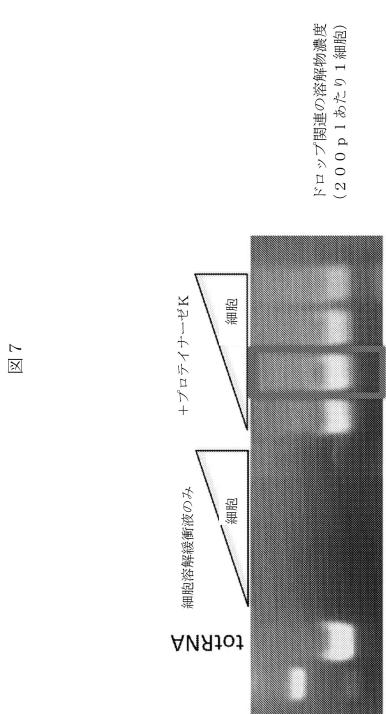
図5



【図6】



【図7】



四七

【図8】

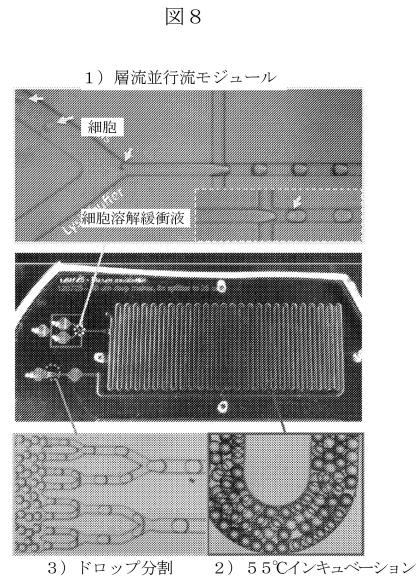
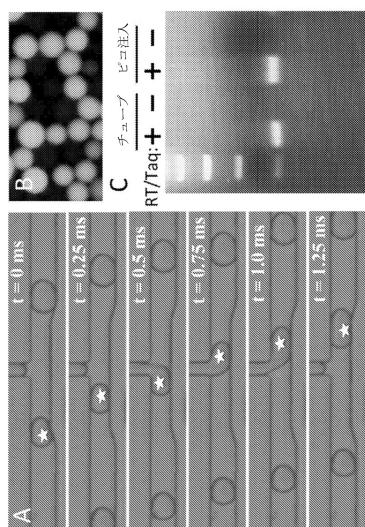


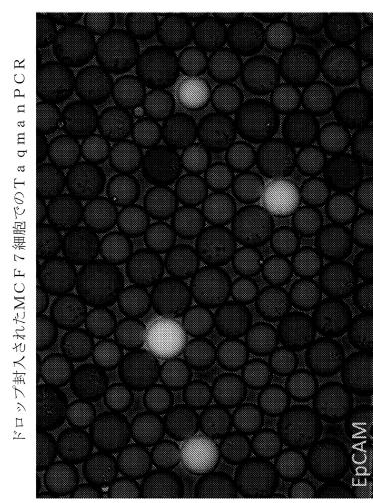
図 8

【 図 9 】



6

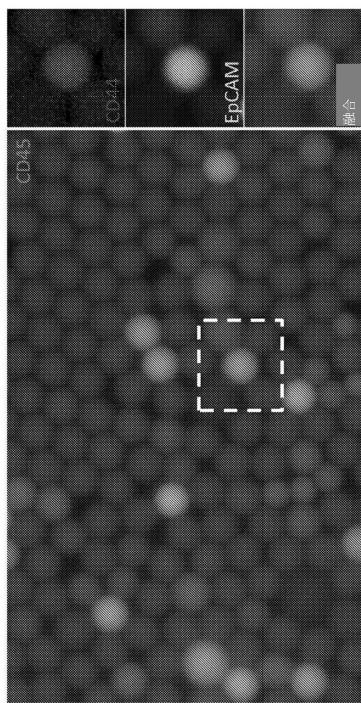
【 図 1 0 】



ドロップ封入されたMCF7細胞でのTaqman PCR

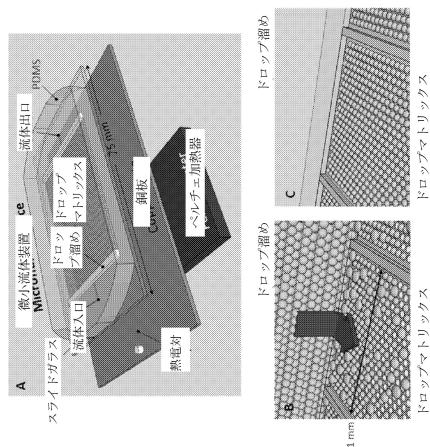
【図 1 1】

図 1 1



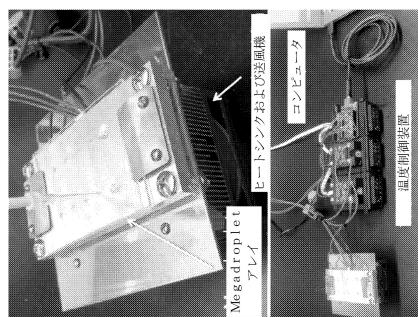
【図 1 2】

図 1 2



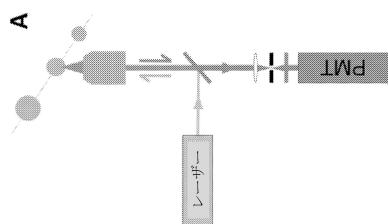
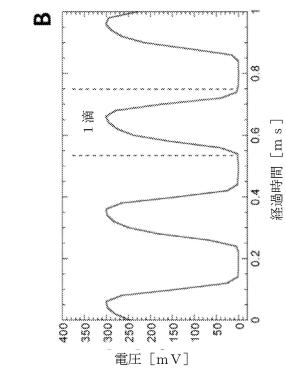
【図 1 3】

図 1 3

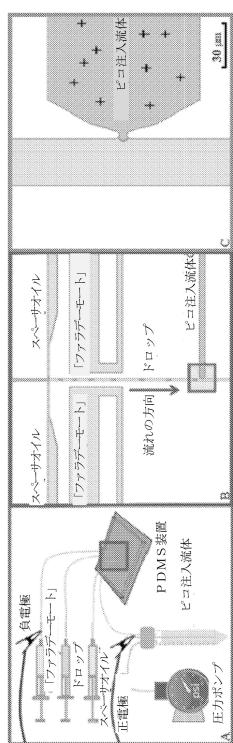


【図 1 4】

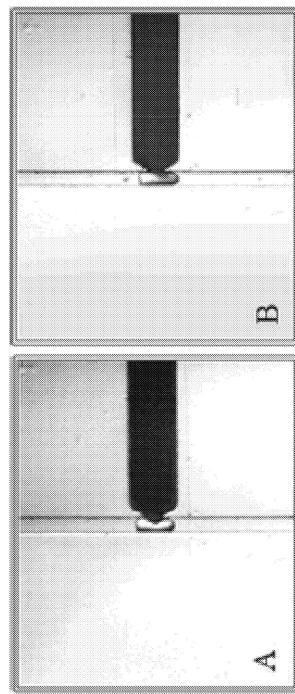
図 1 4



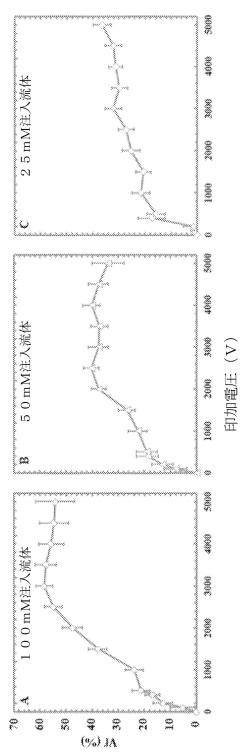
【図15】



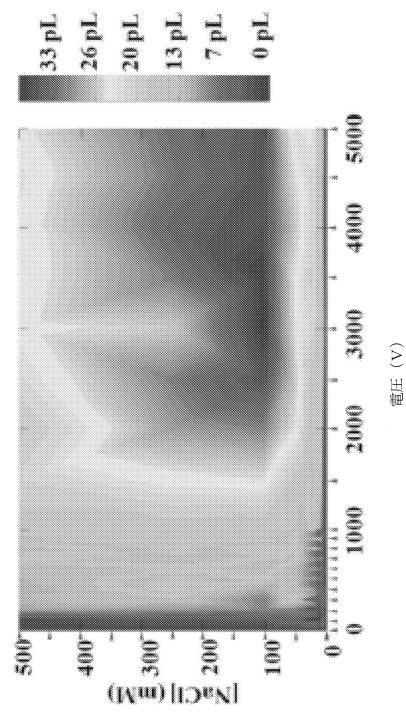
【図 1 6】



【図17】

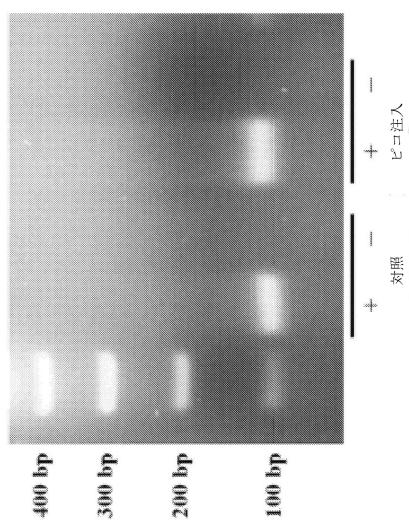


【 図 1 8 】

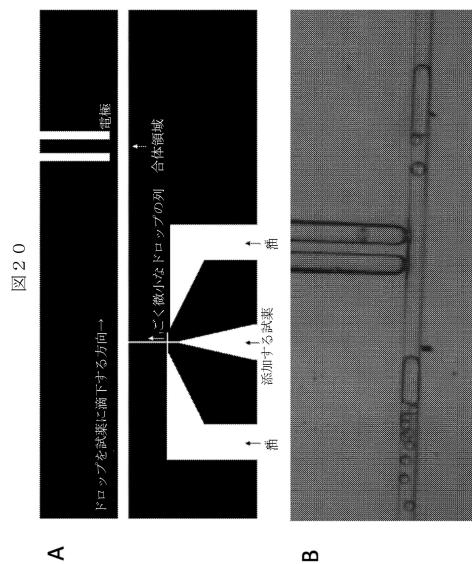


【図 19】

図 19

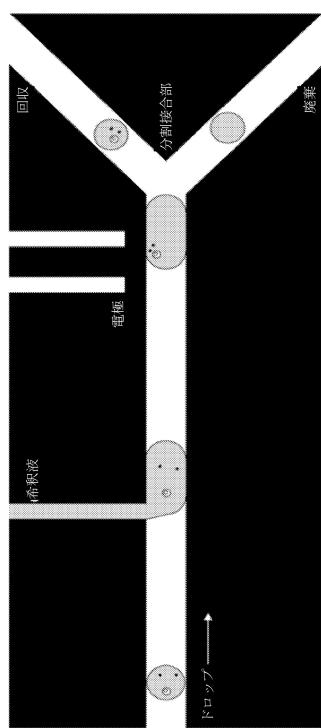


【図 20】



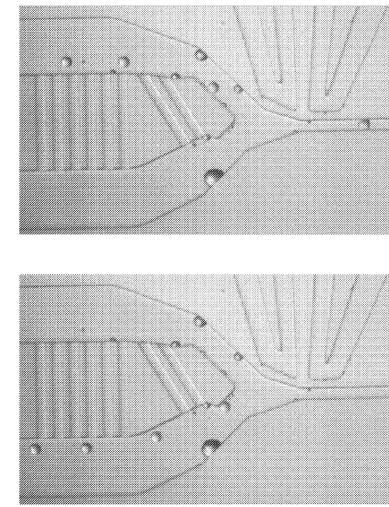
【図 21】

図 21



【図 22】

図 22



【図23】

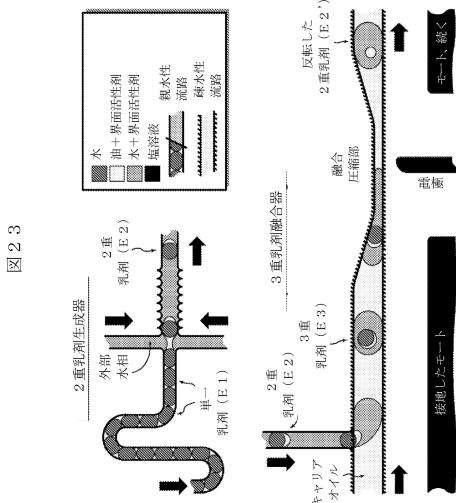


図23

【図24】

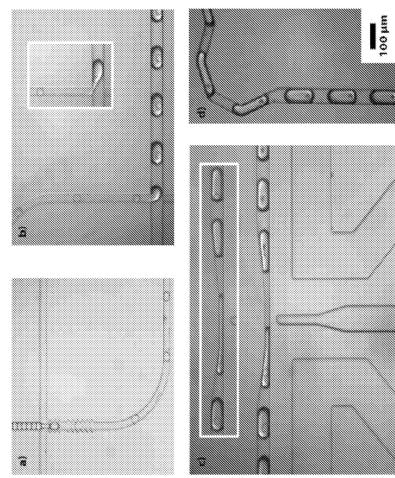


図24

【図25】

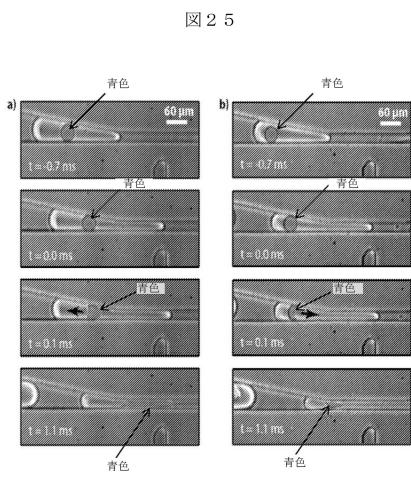


図25

【図26】

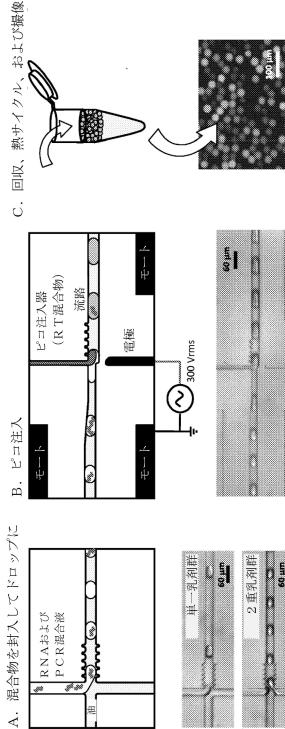
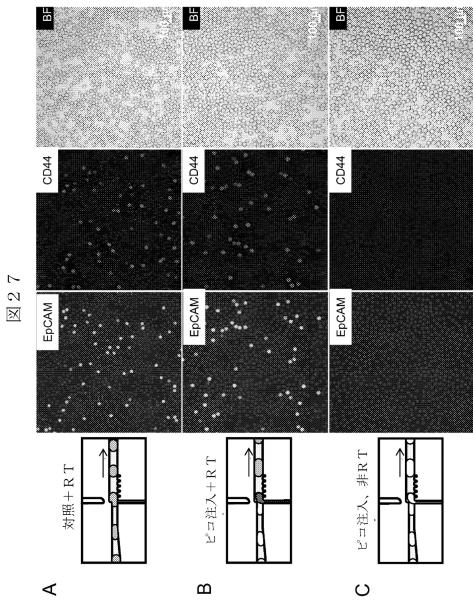
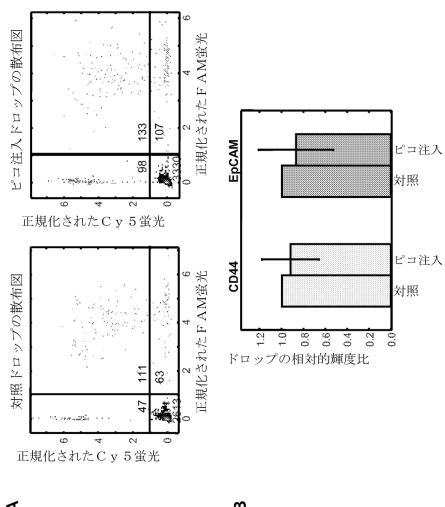


図26

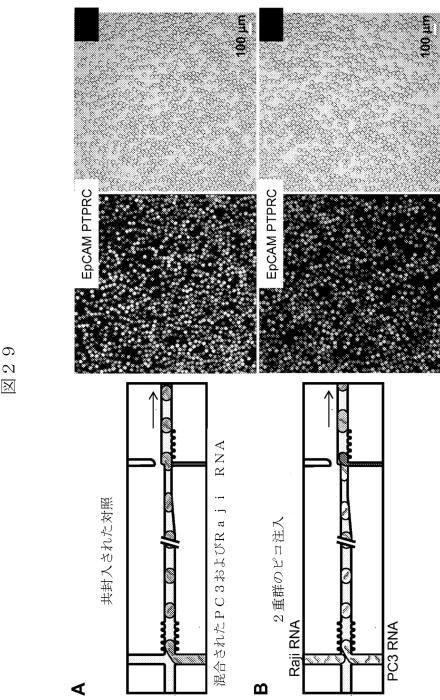
【図 27】



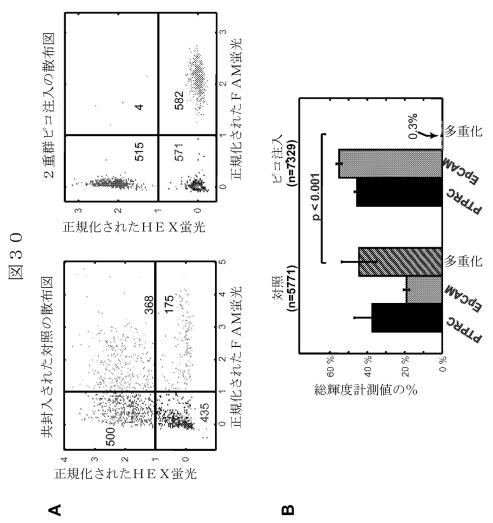
【図 28】



【図 29】

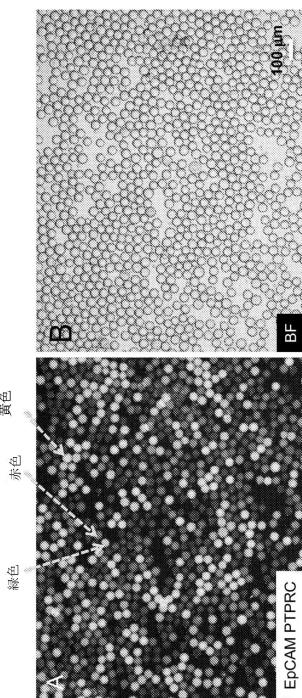


【図 30】



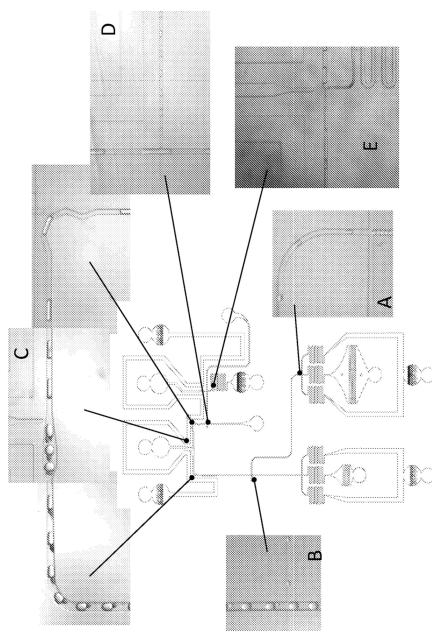
【図31】

図31



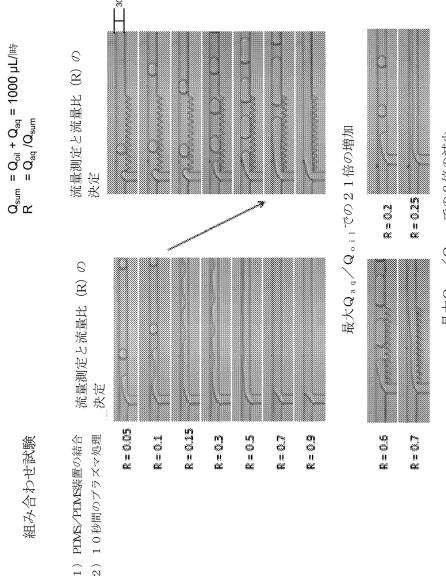
【図32】

図32



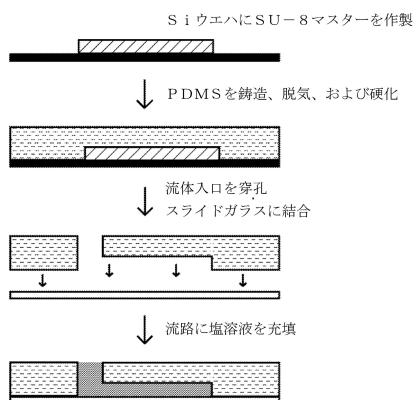
【図33】

図33



【図34】

図34



【図35】

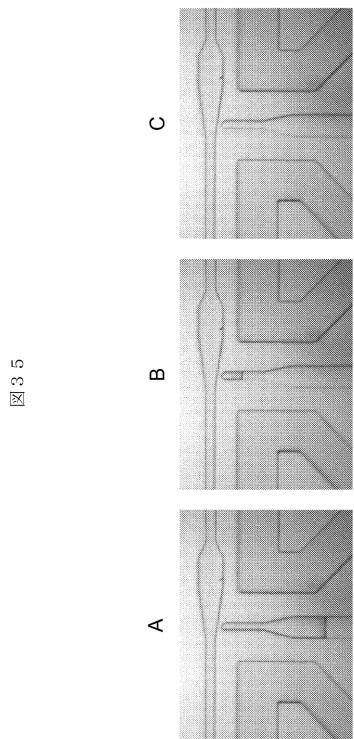


図35

【図36】

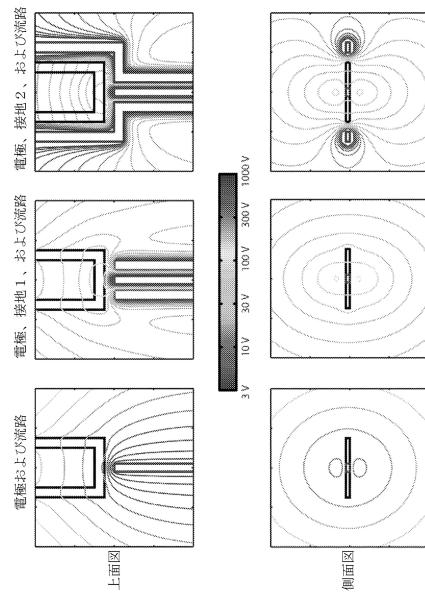


図36

【図37】

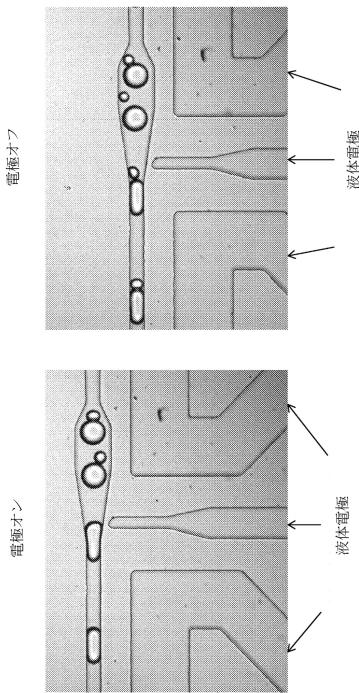


図37

【図38】

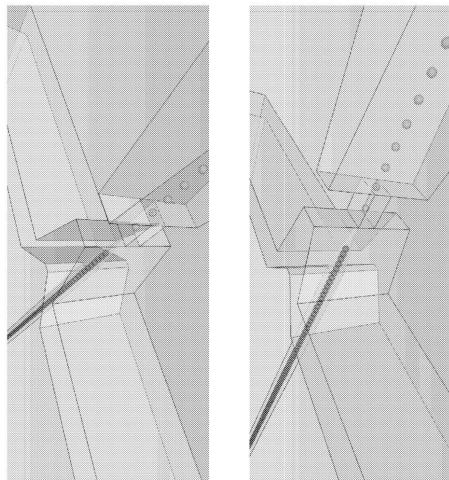
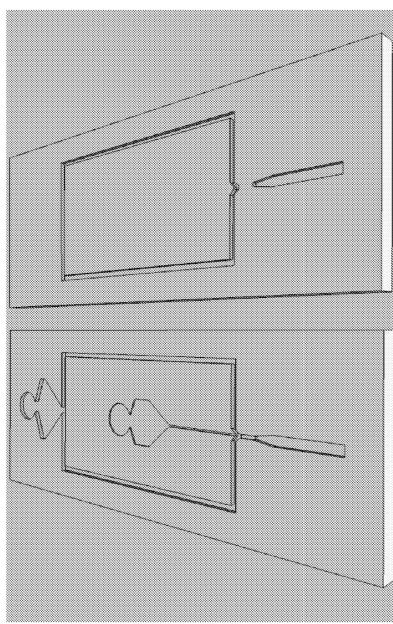


図38

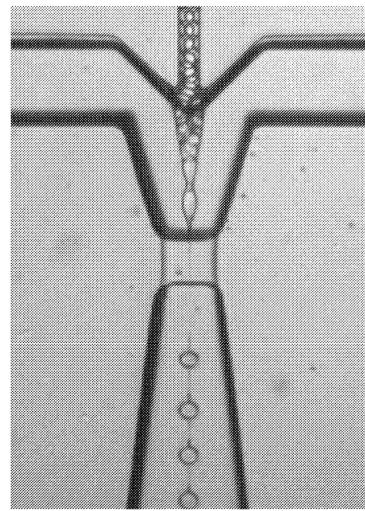
【図 3 9】

図 3 9



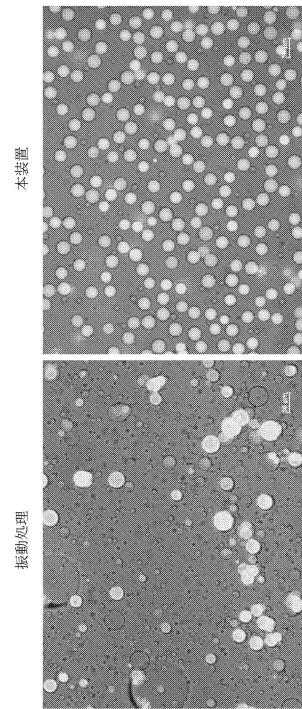
【図 4 0】

図 4 0



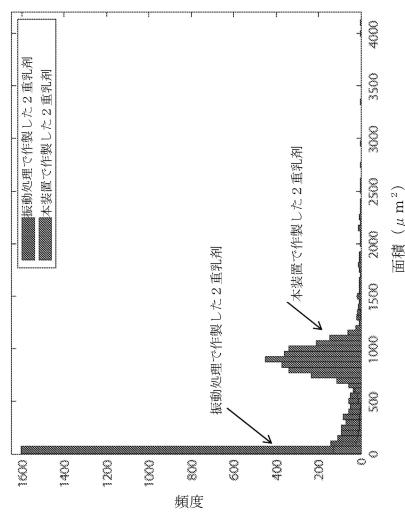
【図 4 1】

図 4 1



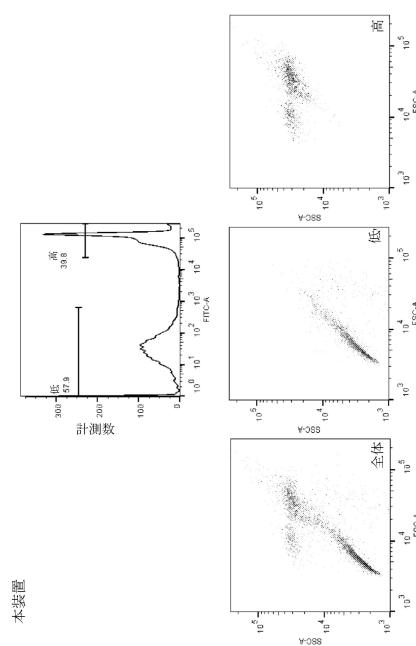
【図 4 2】

図 4 2



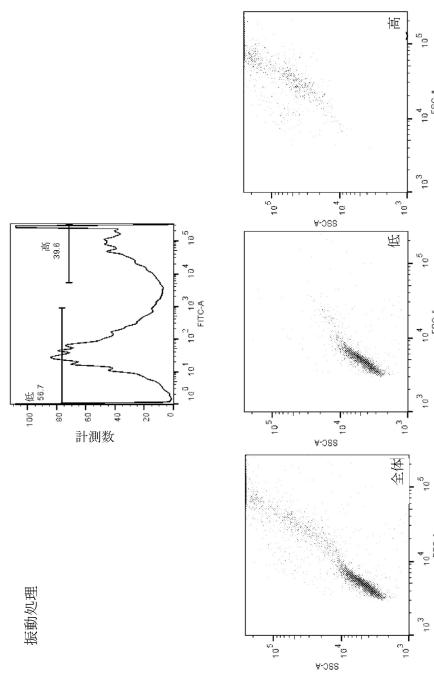
【図43】

図43



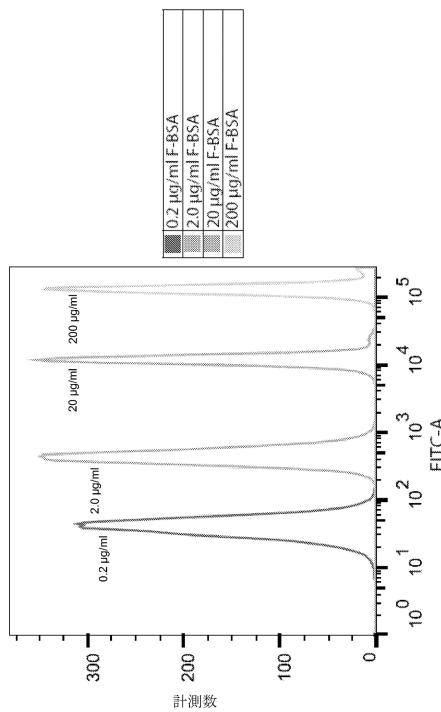
【図44】

図44



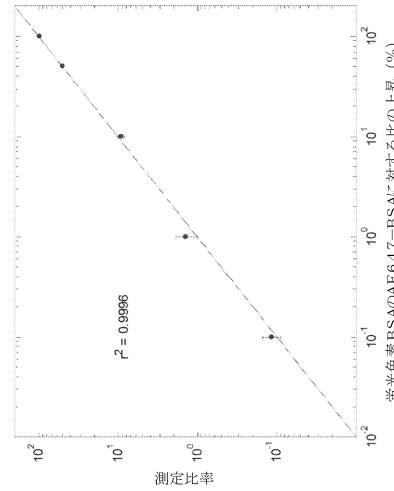
【図45】

図45



【図46】

図46



【図47】

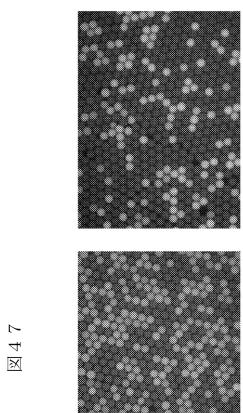


図47

【図48】

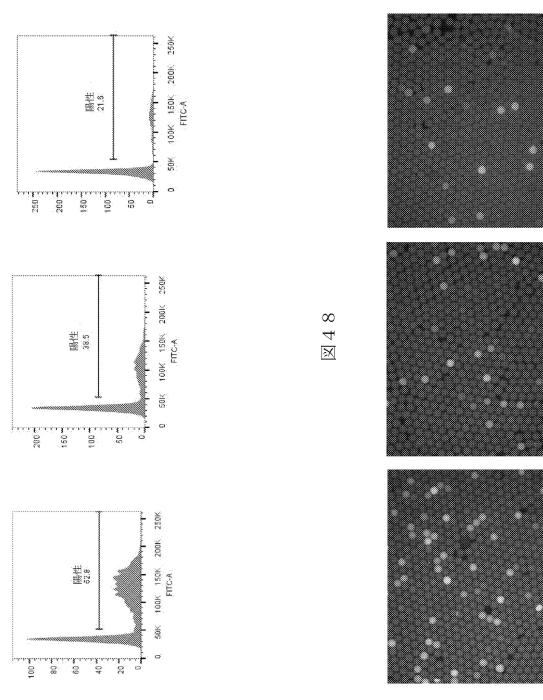
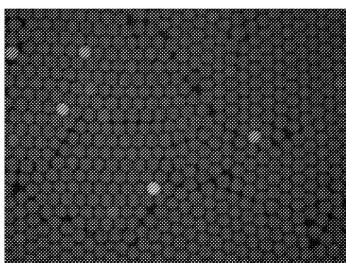


図48

【図49】

図49



【図50】

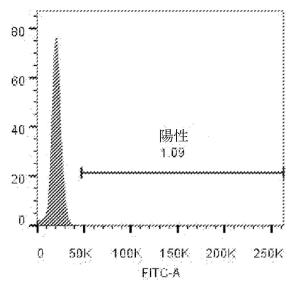
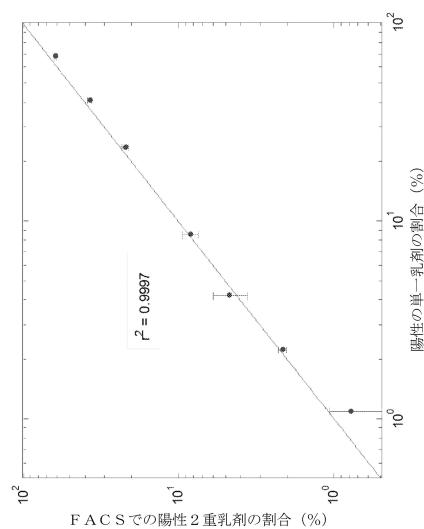
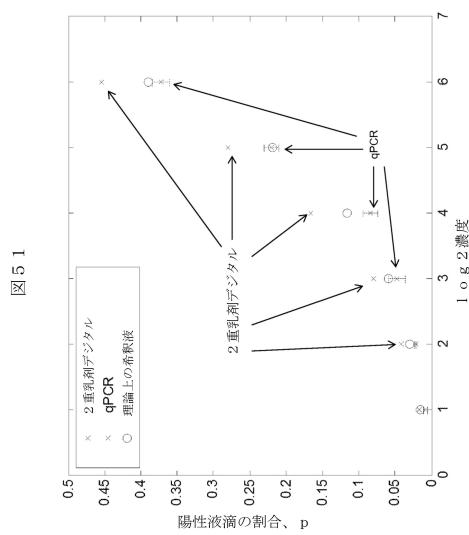


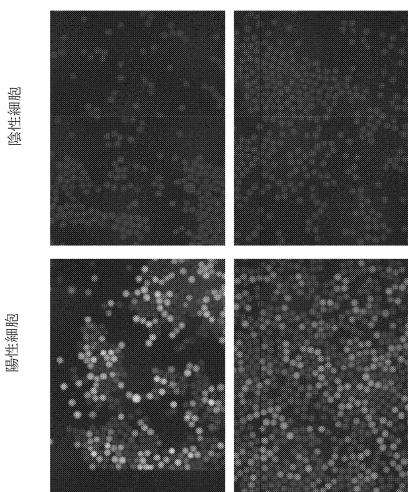
図50



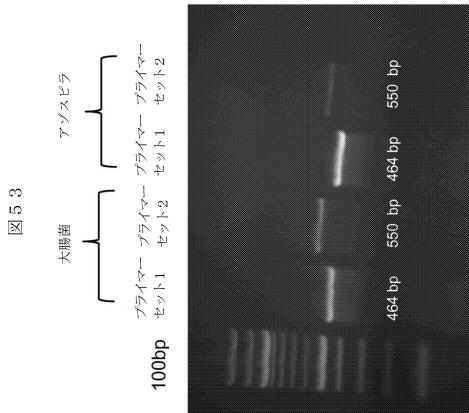
【図 5 1】



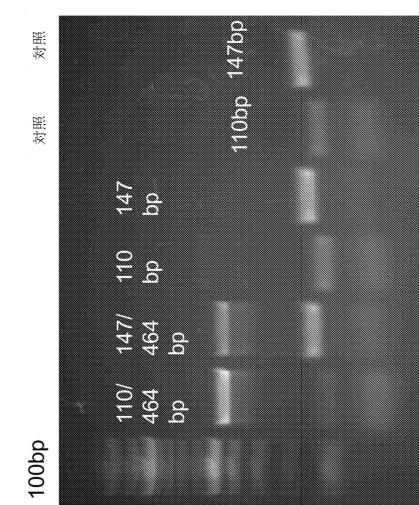
【図 5 2】



【図 5 3】



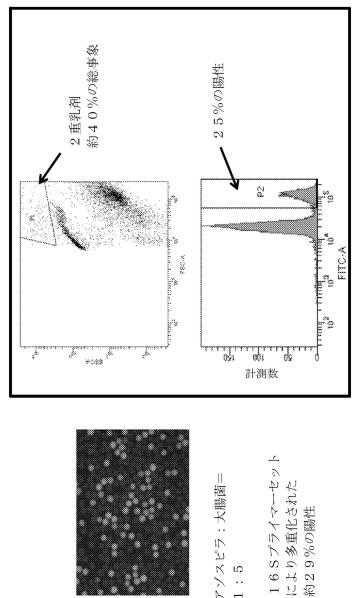
【図 5 4】



【図 5 5】

図 5 5

アソスピラ／大腸菌混合物を選別する FACS



フロントページの続き

(72)発明者 イーストバーン, デニス ジエイ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94010, パーリンゲーム, ペニンシュラ アベニュー
118

(72)発明者 シャンビ, アダム アール.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94158, サンフランシスコ, ジーン フレンド ウェイ
550, ユニット 619

審査官 山村 周平

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0059556(US, A1)

特表2010-506136(JP, A)

MEDKOVA M et al., Analyzing Cancer at Single Cell Resolution with Droplet Technology,
Poster Presentation at AACR, 2010, <URL: http://raindancetech.com/rdt/wp-content/uploads/2012/05/poster_analyzing_cancer_with_droplet_technology.pdf>
PNAS, 2010, Vol.107, p.19163-19166

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus / MEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)