

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6603663号
(P6603663)

(45) 発行日 令和1年11月6日 (2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日 (2019.10.18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 M 1/26 (2006.01)	C 1 2 M 1/26

請求項の数 37 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2016-540965 (P2016-540965)	(73) 特許権者	514304762
(86) (22) 出願日	平成26年12月18日 (2014.12.18)		パークレー ライツ, インコーポレイテッ ド
(65) 公表番号	特表2017-504315 (P2017-504315A)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94 608, エメリービル, ホールトン スト リート 5858, スイート 320
(43) 公表日	平成29年2月9日 (2017.2.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/071323	(74) 代理人	100079108
(87) 国際公開番号	W02015/095623		弁理士 稲葉 良幸
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015.6.25)	(74) 代理人	100109346
審査請求日	平成29年12月18日 (2017.12.18)		弁理士 大貫 敏史
(31) 優先権主張番号	14/133,361	(74) 代理人	100117189
(32) 優先日	平成25年12月18日 (2013.12.18)		弁理士 江口 昭彦
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体デバイスにおける個々の生体細胞から特定の核酸材料を捕捉する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個々の生体細胞から核酸材料を捕捉する方法であって、

個々の生体細胞をマイクロ流体デバイスのチャネルに対して開口した単離囲い中へ置く
ステップであって、ここで、前記単離囲いは、

開口であって、前記囲い内の第一液体媒体と、前記チャネル内の前記開口に流出する
第二液体媒体とを拡散によって交換するように構成された前記開口と、

筐体であって、前記単離囲いの内側空間を含み、前記内側空間内の生体細胞または捕
捉物体と、前記マイクロ流体デバイスのもう一つの単離囲いの内側空間内の生体細胞また
は捕捉物体とが混合することを防ぐように十分に囲む、前記筐体を含む、前記ステップ；

前記単離囲いにおける前記個々の細胞を溶解するステップ；

前記単離囲いにおける捕捉物体で前記溶解された細胞からの核酸材料を捕捉するステッ
プ；および

前記捕捉の後に、前記単離囲いから前記捕捉物体を取り除くステップを含む、前記方法
。

【請求項 2】

置くステップが：

前記マイクロ流体デバイスにおける共有空間における生体細胞の群から前記個々の生体
細胞を選択すること；および

前記共有空間から前記マイクロ流体デバイスにおける前記単離囲い中へ前記個々の細胞

10

20

を移動することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記選択するステップが、前記マイクロ流体デバイスにおける前記生体細胞の群の特定の特徴をテストすることを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記個々の生体細胞が、前記特定の特徴のテストで陽性である前記群における前記生体細胞の 1 つである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記選択するステップが、前記マイクロ流体デバイスの内側の前記共有空間中へ投影される光パターンによって前記個々の細胞を捕える個々の光ケージを生成することをさらに含む、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記移動するステップが、前記個々の光ケージを前記共有空間から前記単離囲い中へ移動することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記特定の特徴が、前記生体細胞のサイズまたは前記生体細胞の形態を含む、または、前記特定の特徴が、前記生体細胞が特定の材料を含むか、または前記生体細胞が特定の材料を作り出すかどうかを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

各単離囲いが単一の個々の細胞を包含するように、複数の個々の細胞が対応する複数の単離囲い中へ置かれる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記溶解するステップが：

溶解試薬を前記単離囲いが位置する前記マイクロ流体デバイスにおけるチャンネルを通して流すこと、

電磁エネルギーのビームを前記個々の細胞に向けること、

前記個々の細胞を電気穿孔すること、

前記個々の細胞を十分に溶解するように前記細胞の温度を変化させること、または

前記個々の細胞を溶解するように前記個々の細胞に十分な音響エネルギーを適用することを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記溶解するステップが、前記個々の細胞の第 1 の内部要素の膜を傷つけることなしに、前記個々の細胞の外側膜を傷つけることを含み、

前記外側の膜を傷つけることで、前記個々の細胞から第 1 の種類の核酸を解放し、および、

前記捕捉物体が、前記第 1 の種類の核酸を捕捉するように構成された第 1 の捕捉物体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記溶解するステップおよび前記捕捉するステップを以下のように繰り返すことをさらに含む、請求項 10 に記載の方法であって、

40

前記第 1 の内部要素の前記膜を傷つけることによって、前記単離囲いにおける前記個々の細胞の前記第 1 の内部要素を溶解する、および

前記第 1 の内部要素を溶解することによって解放された第 2 の種類の核酸材料を前記単離囲いにおける第 2 の捕捉物体によって捕捉する、前記方法。

【請求項 12】

前記第 1 の内部要素が、細胞核の 1 つまたは前記細胞の 1 つの細胞小器官である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞の 1 つを溶解することが、前記細胞の 1 つの第 2 の内部要素の膜を傷つけることなしに、前記細胞の 1 つの前記外側膜を傷つけることをさらに含む、請求項 12 に記載

50

の方法。

【請求項 1 4】

前記溶解するステップおよび前記捕捉するステップを以下のように再び繰り返すことをさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法であって、

前記第 2 の内部要素の前記膜を傷つけることによって、前記単離囲いにおける前記個々の細胞の前記第 2 の内部要素を溶解する、

前記第 2 の内部要素を溶解することによって解放された第 3 の種類の核酸材料を前記単離囲いにおける第 3 の捕捉物体として捕捉する、前記方法。

【請求項 1 5】

前記第 1 の内部要素または前記第 2 の内部要素の 1 つが、前記細胞の 1 つの細胞核である、および、

前記第 1 の内部要素または前記第 2 の内部要素の別の 1 つが、前記細胞の 1 つの細胞小器官である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記第 1 の種類の核酸材料が、前記第 2 の種類の核酸材料とは異なる種類の核酸材料である、

前記第 2 の種類の核酸材料が、前記第 3 の種類の核酸材料とは異なる種類の核酸材料である、および

前記第 1 の種類の核酸材料が、前記第 3 の種類の核酸材料とは異なる種類の核酸材料である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記溶解するステップが、前記複数の単離囲いにおける前記複数の個々の細胞を溶解することを含み、

前記捕捉するステップが、前記溶解された細胞から前記複数の単離囲いの核酸材料における複数の捕捉物体を捕捉することを含み、および

前記取り除くステップが、前記複数の単離囲いから前記複数の捕捉物体を取り除くことを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記捕捉物体の各々が、前記複数の他の捕捉物体毎から前記各捕捉物体を一意的に識別する識別子を含み、

前記方法が、前記各捕捉物体と、前記捕捉物体によって捕捉された核酸材料に関するデータとの相関関係をメモリデバイスに格納することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記データが、前記捕捉物体によって捕捉された前記核酸材料の種類を含む、または、前記相関関係が、前記捕捉物体によって捕捉された前記核酸材料が由来する前記溶解された細胞の 1 つの特徴を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記単離囲いの開口にブロック物体を実質的に置くことをさらに含む、前記ブロック物体が前記溶解された細胞から核酸材料を捕捉するように構成されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記個々の生体細胞が、クローン細胞集団からの細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記置くことが、前記マイクロ流体デバイスにおけるクローン細胞集団から前記単離囲い中へ前記個々の細胞を移動することを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記溶解するステップが、前記単離囲いにおける前記個々の細胞を溶解することを含み、

前記捕捉するステップが、前記溶解された細胞から前記単離囲いにおける核酸材料の 1

10

20

30

40

50

または 2 以上の捕捉物体を捕捉することを含み、および

前記取り除くステップが、前記単離囲いから 1 または 2 以上の捕捉物体を取り除くことを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記捕捉物体の各々が、前記捕捉物体の他の 1 つ毎から前記各捕捉物体を一意的に識別する識別子を含み、

前記方法が、前記各捕捉物体の識別子と、前記捕捉物体によって捕捉された核酸材料が由来する前記細胞の 1 つからの前記クローン細胞集団の識別との相関関係をメモリデバイスに格納することを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記溶解することが、前記単離囲いの 1 つにおける前記細胞の 1 つを第 1 回目に溶解することを含み、

前記方法が、前記単離囲いの第 2 の 1 つにおける前記細胞の第 2 の 1 つを第 2 回目に溶解することをさらに含み、および

前記第 2 回目が、前記第 1 回目の後である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記マイクロ流体デバイス内部の事象のために前記マイクロ流体デバイスを監視することをさらに含む、請求項 2 5 に記載の方法であって、

前記第 1 回目が、前記事象の検出からの第 1 期間であり、および

前記第 2 回目が、前記事象の前記検出からの第 2 期間である、前記方法。

【請求項 2 7】

前記マイクロ流体デバイスにおける生体細胞の群の特定の特徴をテストすることをさらに含む、請求項 2 5 に記載の方法であって、

前記細胞の 1 つを、前記特徴の第 1 の 1 つで陽性であるとテストする、および

前記細胞の前記第 2 の 1 つを、前記特徴の第 2 の 1 つで陽性であるとテストする、前記方法。

【請求項 2 8】

マイクロ流体デバイスであって、

電極起動基板であって、前記基板の表面に誘電泳動 (DEP) 電極を含み、前記各電極が選択的に起動および停止されるように構成される、前記電極起動基板；

前記基板の前記表面と共にマイクロ流体チャネルを画定する、マイクロ流体構造；および

前記チャネルにおいて配置された複数の単離囲いであって、各単離囲いは前記マイクロ流体デバイスのチャネルに対して開口しており、さらに、各単離囲いは、

開口であって、前記囲い内の第一液体媒体と、前記チャネル内の前記開口に流出する第二液体媒体とを拡散によって交換するように構成された前記開口と、

筐体であって、前記単離囲いの内側空間を含み、前記内側空間内の生体細胞または捕捉物体と、前記複数の単離囲いのもう一つの単離囲いの内側空間内の生体細胞または捕捉物体とが混合することを防ぐように十分に囲む、前記筐体を含む、前記複数の単離囲い；を含み、

前記捕捉物体が、前記単離囲いの 1 つにおいて置かれるように寸法決めされており、前記各捕捉物体が、他の種類の核酸材料よりも特定の種類の核酸材料に少なくとも 2 倍の特異性を有する捕捉材料を含む、

前記マイクロ流体デバイス。

【請求項 2 9】

前記単離囲いにおける生体細胞を溶解するための溶解手段をさらに含む、請求項 2 8 に記載のデバイス。

【請求項 3 0】

前記電極の起動された 1 つが、前記電極の前記起動された 1 つに隣接する前記チャネルにおける生体細胞を捕えるのに十分な DEP 力を生み出す、請求項 2 8 または 2 9 に記載

10

20

30

40

50

のデバイス。

【請求項 3 1】

前記電極が、前記基板の前記表面上の仮想電極である、または、

前記各電極が、前記基板の前記表面に固定された電気導電端子を含む、請求項 2 8 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 3 2】

前記各電極が、前記基板の前記表面の上に向けられた変化する光のパターンに応じて選択的に起動および停止される、請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 3 3】

前記捕捉物体の各々が、前記捕捉物体の他の 1 つ毎から前記捕捉物体を一意的に識別する識別子を含む、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のデバイス。

10

【請求項 3 4】

生体細胞および前記生体細胞から核酸を捕捉するように構成された捕捉物体を含有するように各々が寸法決めされた単離囲いを含む、マイクロ流体デバイスを制御するコントローラであって、

前記流体デバイスにおける生体細胞の個々の 1 つを選択し、および前記細胞の前記選択された 1 つを前記単離囲い中へ移動するための、選択 / 移動手段；

前記単離囲いにおける前記生体細胞の溶解を制御するように構成された制御モジュール；および

前記単離囲いにおける前記複数の捕捉物体の各々の 1 つと、前記捕捉物体の 1 つによって捕捉された核酸材料が由来する前記単離囲いにおける対応する生体細胞の 1 つとを関連させる関連記録を生み出すための関連手段を含む、前記コントローラ。

20

【請求項 3 5】

前記関連記録が、前記捕捉物体の各々の 1 つと、前記細胞の前記対応する 1 つが由来する細胞のクローン集団との関連である、請求項 3 4 に記載のコントローラ。

【請求項 3 6】

前記選択 / 移動手段が、前記生体細胞の任意の所望の 1 つを選択的に捕える、誘電泳動 (D E P) 力を生み出すための D E P デバイスの一部である、請求項 3 4 または 3 5 のコントローラ。

【請求項 3 7】

前記選択 / 移動手段が、光電ピンセットデバイスを含む、または、

前記選択 / 移動手段が、O E W デバイスを含む、請求項 3 4 ~ 3 6 に記載のコントローラ。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

背景

生物学的分野において、生体細胞から核酸材料を抽出および捕捉することは有用であり得る。かかる核酸材料の例は、デオキシリボ核酸 (D N A)、リボ核酸 (R N A)、D N A または R N A のポリマー、D N A または R N A を包含する細胞小器官、もしくは D N A または R N A のポリマーまたはオリゴマーを包含する細胞小器官、および同様のものを含む。本発明の態様は、個々の生体細胞から特定の種類の核酸材料を抽出および選択的に捕捉するためのデバイスおよび方法を含む。

40

【発明の概要】

【0 0 0 2】

概要

本発明のいくつかの態様において、個々の生体細胞から核酸材料を捕捉する方法は、個々の生体細胞をマイクロ流体デバイスにおける異なる単離囲い (isolation pen) 中に配置することを含み得る。この方法はまた、単離囲いにおける細胞の 1 つを溶解し、および単離囲いにおける溶解した細胞から核酸材料における捕捉物体を捕捉することを含み得る

50

。方法は、捕捉物体を単離囲いから取り除くことをさらに含み得る。

【0003】

本発明のいくつかの態様において、マイクロ流体デバイスは、共通空間、単離囲い、捕捉物体および選択手段を含み得る。捕捉物体は、単離囲いの1つにおいて置かれるように寸法決めされ得る。捕捉物体の各々は、他の種類の核酸材料に結合するよりも少なくとも2倍の特異度を以て特定の種類の核酸材料に結合する捕捉材料を含み得る。選択手段は、選択された細胞を異なる単離囲い中へ移動するためのものであり得る。

【0004】

本発明のいくつかの態様において、マイクロ流体デバイスは、単離囲い、移動手段および相関手段を含み得る。単離囲いは、生体細胞および捕捉物体を包含するように寸法決めされることができ、それが生体細胞から核酸を捕捉するように構成され得る。移動手段は、個々の生体細胞を単離囲い中へ移動するためのものであり得る。相関手段は、単離囲いにおける捕捉物体と、単離囲いにおける生体細胞が由来するクローン細胞集団 (clonal cell colonies) とを相関させる相関記録を生み出すためのものであり得る。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】図1は、本発明のいくつかの態様に従う生体細胞から核酸材料を選択的に捕捉するための方法の例である。

【図2A】図2Aは、図1の方法が実施され得る、本発明のいくつかの態様に従うマイクロ流体デバイスの斜視図である。

【図2B】図2Bは、図2Aのマイクロ流体デバイスの水平、断面図である。

【図2C】図2Cは、図2Aのマイクロ流体デバイスの垂直、断面図である。

【0006】

【図3】図3は、単離囲いが基部中のくぼみとして構成される例を示す、本発明のいくつかの態様に従う図2Aのマイクロ流体デバイスの基部の部分的な垂直断面図である。

【図4A】図4Aは、マニピュレータが光電ピンセット (OET) として構成される、本発明のいくつかの態様に従う図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの部分的な垂直断面図である。

【図4B】図4Bは、図4Aの部分的な水平、断面図である。

【図5】図5は、本発明のいくつかの態様に従う図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの選択部における複数の細胞の例を図説する。

【0007】

【図6】図6は、本発明のいくつかの態様に従うデバイスにおいて、図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの選択部における個々の生体細胞を選択し、および選択された細胞を単離囲い中へ移動する例である。

【図7】図7は、本発明のいくつかの態様に従う、図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの単離囲いにおける細胞を溶解試薬で溶解する例を示す。

【図8】図8は、本発明のいくつかの態様に従う、図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの単離囲いにおける細胞を溶解機構で溶解する例である。

【図9】図9は、本発明のいくつかの態様に従う、図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの単離囲いの内側空間中で溶解した細胞から流れる核酸材料を示す。

【0008】

【図10】図10は、本発明のいくつかの態様に従う、図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの囲いの1つにおける捕捉物体の例を図説する。

【図11】図11は、本発明のいくつかの態様に従う、捕捉物体の構成例を示す。

【図12A】図12Aは、細胞の外側膜を示す図2A～2Cのマイクロ流体デバイスの囲いにおける細胞の例および細胞内部の要素の例を図説する。

【図12B】図12Bは、本発明のいくつかの態様に従う、図12Aの細胞を溶解する例を示す。

【0009】

10

20

30

40

50

【図 1 2 C】図 1 2 C は、本発明のいくつかの態様に従う、図 1 2 A の細胞の内部要素の 1 つを溶解する例である。

【図 1 2 D】図 1 2 D は、本発明のいくつかの態様に従う、図 1 2 A の細胞の細胞核を溶解する例を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、本発明のいくつかの態様に従う、捕捉物体を選択し、および単離囲いから図 2 A ~ 2 C のマイクロ流体デバイスの搬出部に移動する例である。

【0 0 1 0】

【図 1 4】図 1 4 は、本発明のいくつかの態様に従う、核酸材料をクローン生体細胞から選択的に捕捉するための方法の例である。

【図 1 5】図 1 5 は、本発明のいくつかの態様に従う、個々のクローン生体細胞をマイクロ流体デバイスにおける異なるクローン集団から選択し、および選択された細胞をデバイスにおける単離囲い中へ移動する例を図説する。

【図 1 6】図 1 6 A ~ 1 6 D は、マイクロ流体デバイスにおける単離囲いの内側で溶解される細胞の画像である。図 1 6 A は、溶解バッファ (lysis buffer) をマイクロ流体デバイス中へ導入する前の細胞を含有する囲いの画像である。図 1 6 B、1 6 C および 1 6 D は夫々、溶解バッファ導入後の時間 $t = 0$ 分、5 分および 1 0 分での同じ囲いの画像である。Calcein AM 細胞染色が、溶解した細胞を監視するマーカーとして使用される。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 1】

例示態様の詳細な記載

本明細書は、本発明の例示態様および適用を記載する。しかしながら、本発明は、これらの例示態様および適用に、あるいは、例示態様および適用が動作するかまたは本明細書に記載されるやり方に限定されない。また、図は、簡略化されたかまたは部分的な図を示してもよく、図中の要素の寸法は、大きく見せてもよいし、またはそうでなければ、釣り合いが取れていてもよい。加えて、用語「の上にある(on)」、「付着されている(attached)」または「とカップリングされている(coupled to)」が本明細書に使用されるとき、1 つの要素 (例えば材料、層、基板など) は、1 つの要素が直接、他の要素の上に、それに付着されているか、または、それとカップリングされているか否かにかかわらず、あるいは、1 つまたは 2 つ以上の介在要素が一方の要素と他方の要素との間にあるか否かにかかわらず、別の要素「の上にある」か、それ「に付着されている」か、または、それ「とカップリングされてい」てもよい。提供される場合、方向 (例えば、上へ(above)、下へ(below)、上端(top)、下端(bottom)、横へ(side)、上方へ(up)、下方へ(down)、下へ(under)、上へ(over)、上方へ(upper)、下方へ(lower)、水平の(horizontal)、垂直の(vertical)、「x」、「y」、「z」など) もまた相対的なものであって、図説および検討を容易にするため例を用いて単に提供されるものであり、限定する目的はない。加えて、要素の一覧 (例えば要素 a、b、c) を参照する場合、かかる参照は、載せられた要素のいずれか 1 つそれ自体、載せられた要素の全部より少ないものからなるいずれかの組み合わせ、および/または、載せられた要素の全部からなる組み合わせを含むことを意図する。

【0 0 1 2】

本明細書に使用される「実質的に」は、本来の目的どおりに働くのに充分であることを意味する。よって、用語「実質的に」は、完全なまたは完璧な状態、寸法、大きさ、結果からの有意でない小さな変動量、あるいは、例えば当該技術分野における当業者に予期されるであろうが、全体的な性能に感知できるほどに影響を及ぼさない同種のものを許容する。数値またはパラメータまたは数値で表現され得る特徴に関して使用されるとき、「実質的に」は 1 0 パーセント以内を意味する。用語「1 つ (複数) (ones)」は 1 つより多いことを意味する。

本明細書に使用される用語「配置される」は、その意味「位置される」の範囲を包括的に含む。

【0 0 1 3】

本明細書に使用される用語「捕捉物体」は、以下の1つまたは2つ以上を包含し得る：微小粒子、マイクロビーズ（例としてポリスチレンビーズ、Luminex（登録商標）ビーズまたは同種のもの）、磁性ビーズ、マイクロロッド(microrod)、マイクロワイヤ(microwire)、量子ドットなどの無生物の微小物体；細胞等の生物学的な微小物体、リボソーム（例として合成のまたは膜調製物から派生した）、脂質ナノラフト(lipid nanoraft)など；または、無生物の微小物体と生物学的な微小物体との組み合わせ（例として細胞に付着されているマイクロビーズ、リボソームで被覆されたマイクロビーズ、リボソームで被覆された磁性ビーズまたは同種のもの）。脂質ナノラフトは、例としてRitchie et al. (2009) "Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs," *Methods Enzymol.*, 464:211-231に記載されている。

10

【0014】

用語「細胞」は、生体細胞を意味し、かかる生体細胞は、植物細胞、動物細胞、細菌性細胞、真菌細胞、胚、卵母細胞、精子、組織から解離された細胞、血液細胞、ハイブリドーマ、培養細胞、細胞株からの細胞、がん細胞、感染した細胞、形質移入および/または形質転換された細胞、レポーター細胞などであり得る。動物細胞は、例えば、ヒト、マウス、ラット、馬、山羊、羊、牛、霊長目または同種のものなどの哺乳類からのものであり得る。

【0015】

生体細胞について使用される「溶解する」は、核酸材料を細胞から解放するのに十分に細胞の少なくとも膜を破壊すること、破裂させること、または傷つける（compromise）ことを意味する。生体細胞について使用されるとき、「内部要素」は、細胞の外側膜内にありおよびそれ自身の膜で仕切られた生体細胞のいずれかの要素または成分を意味し、内部要素を溶解することは、核酸材料を要素から解放するのに十分に要素の少なくとも膜を破壊すること、破裂させること、または傷つけることを意味する。細胞の内部要素の例は、細胞の細胞核および細胞小器官を含む。

20

【0016】

本発明のいくつかの態様において、個々の生体細胞は、いくつかの、異なった使用できる特徴うちのいずれかのものに基づいてマイクロ流体デバイスにおいて選択され得る。次に、細胞がマイクロ流体デバイスにおける単離囲いにある間に、核酸材料が個々の細胞から抽出される。囲いにおける捕捉物体は、各々、細胞から特定の種類の核酸材料を捕捉し得、その後、捕捉物体は、例えばマイクロ流体デバイスから搬出することで、囲いから取り除かれ得る。捕捉物体は、各捕捉物体を物体によって捕捉された核酸が由来する個々の細胞に相関させる、一意的な識別子を含み得る。一意的な識別子はまた、細胞から捕捉された核酸材料の種類などの追加の情報を提供し得る。

30

【0017】

図1は、ステップ102で、個々の生体細胞がマイクロ流体デバイスにおいて選択され、およびステップ104で、デバイスにおける単離囲い中へ移動される、方法100の例を図説する。代替的に、ステップ102で、既に囲いにある個々の細胞が1または2以上の特定の特征のために選択され得、およびステップ104で、特徴（単数）または特徴（複数）が欠如して囲いにおける細胞が囲いの外に移動され得、囲いにおいて選択された細胞を残す。これに関わらず、ステップ106で、選択された細胞は単離囲いにおいて溶解され得、溶解された細胞から囲い中へ核酸材料を解放する。ステップ108で、囲いにおける捕捉物体が、特定の種類の核酸材料を捕捉し得る。次にステップ110で、捕捉物体は囲いから取り除かれ得、マイクロ流体デバイスから搬出、において格納、または、において処理される。

40

【0018】

図2A～2Cは、その上で図1の方法100が実施され得るマイクロ流体デバイス200の例を示し、図4Aおよび4Bは、光電ピンセット（ET）デバイスとして構成されるデバイス200のマニピュレータ222の例を図説する。図5～12は、マイクロ流体デバイス200上で実施される図1の方法100の例を図説し、マニピュレータ222は

50

、例えば図 4 A および 4 B に図説されるような O E T デバイスとして構成される。図 5 ~ 1 2 に図説されたデバイス 2 0 0 で実施される方法 1 0 0 の例に移る前に、マイクロ流体デバイス 2 0 0 が検討される。

【 0 0 1 9 】

図 2 A ~ 2 C は、その上で方法 1 0 0 が実施され得るマイクロ流体デバイス 2 0 0 の例を図説する。示されるように、マイクロ流体デバイス 2 0 0 は、ハウジング 2 0 2、マニピュレータ 2 2 2、検出器 2 2 4、流量コントローラ 2 2 6、搬出機構 2 2 8 および制御モジュール 2 3 0 を含み得る。

示されるように、ハウジング 2 0 2 は、液体媒体 2 4 4 を含有するための 1 または 2 以上のチャンネル 2 4 0 を含み得る。図 2 B は、その上に媒体 2 4 4 が平らに（例えば凹凸のない）および平坦に配置され得るチャンネル 2 4 0 の内表面 2 4 2 を図説する。しかしながら、内表面 2 4 2 は、代替的に平らではなく（例えば凹凸がある）、および電気端子（示されず）などの機能を含み得る。

【 0 0 2 0 】

ハウジング 2 0 2 は、それを通して媒体 2 4 4 がチャンネル 2 4 0 中へ投入され得る、1 または 2 以上の入口 2 0 8 を含み得る。入口 2 0 8 は、例えば、入口ポート、開口、バルブ、別のチャンネル、流体コネクタ（fluidic connectors）または同種のものであり得る。ハウジング 2 0 2 はまた、1 または 2 以上の出口 2 1 0 を含み得る。例えば、媒体 2 4 4 は出口 2 1 0 を通して取り除かれ得る。出口 2 1 0 は、例えば、出口ポート、開口、バルブ、他のチャンネル、流体コネクタまたは同種のものであり得る。別の例として、出口 1 1 0 は、2013 年 4 月 4 日に出願された U.S. 特許出願第 13/856,781 号（attorney docket no. BL 1-US）に開示されているいずれの排出メカニズムなどの液滴排出メカニズムを含み得る。

【 0 0 2 1 】

1 つの入口 2 0 8 および 1 つの出口 2 1 0 が図説されているが、1 つ以上の入口 2 0 8 および / または 1 つ以上の出口 2 1 0 があり得る。さらに、入口 2 0 8 および / または出口 2 1 0 は、図 2 A ~ 2 C に示されるものと異なる位置であり得る。例えば、選択されなかった細胞などの廃棄物のためのデバイス 2 0 0 の選択部 2 1 2 として以下に記載される部分からの出口（示されず）を設けることができる。

【 0 0 2 2 】

ハウジング 2 0 2 はまた、基部（例えば、基板）2 0 6 上に配置されたマイクロ流体構造 2 0 4 を含み得る。マイクロ流体構造 2 0 4 は、ガス透過性であり得る可撓性の材料（例えば、ゴム、プラスチック、エラストマー、シリコン、ポリジメチルシロキサン（「PDMS」）または同種のもの）を含み得る。代替的に、マイクロ流体構造 2 0 4 は、剛性の材料、または可撓性および剛性材料の組み合わせを含む他の材料を含み得る。少なくとも一部が可撓性（例えば変形可能な）表面で仕切られるチャンネルおよびチャンバ（または囲い）などのマイクロ流体要素を画定するマイクロ流体構造の例は、U.S. 仮特許出願第 62/089065 号（2014 年 12 月 8 日に出願）で説明されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。基部 2 0 6 は、1 または 2 以上の基板を含み得る。単一の構造として説明されているが、基板 2 0 6 は、多数の基板などの多数の相互接続された構造を含み得る。マイクロ流体構造 2 0 4 は同様にして、相互接続され得る多数の構造を含み得る。

【 0 0 2 3 】

マイクロ流体構造 2 0 4 および基部 2 0 6 は、チャンネル 2 4 0 および / または 1 以上のチャンバ（例えば、単離囲い 2 5 2）を画定し得る。図 2 A ~ 2 C において 1 つチャンネル 2 4 0 が示されているが、マイクロ流体構造 2 0 4 および基部 2 0 6 は、媒体 2 4 4 のためのチャンネル、チャンバおよび / または同様ものなどの多数を画定し得、かかるチャンネルおよびチャンバは、マイクロ流体回路を形成するために相互接続されることができる。

【 0 0 2 4 】

図 2 B および 2 C に示されるように、単離囲い 2 5 2 は、チャンネル 2 4 0 内に配置され得る。例えば、各単離囲い 2 5 2 は、内側空間 2 5 6 およびチャンネル 2 4 0 から内側空間 2 5 6 への開口 2 5 8 を画定する筐体 2 5 4 を含み得る。かかる多くの単離囲い 2 5 2 が

10

20

30

40

50

いずれかのパターンでチャンネル 2 4 0 において配置され得、単離囲い 2 5 2 は、多くの異なる寸法および形状のいずれかであり得、および囲い 2 5 2 は、1 以上の開口 2 5 8 を有し得る。各単離囲い 2 5 2 の開口 2 5 8 は、囲い 2 5 2 における液体媒体 2 4 4 と、例えば拡散によって囲い 2 5 2 の開口 2 5 8 で流出する液体媒体 2 4 4 との自然な交換を可能にするように寸法決めおよび位置づけられる。

【 0 0 2 5 】

代替的に、各単離囲い 2 5 2 の開口 2 5 8 は、水性の媒体（例えば、1 または 2 以上の細胞、1 または 2 以上の捕捉物体、および / または溶解バッファなどの試薬を含む）の小滴が単離囲い 2 5 2 の中へまたは外へ移動することが可能になるように寸法決めおよび位置決めされる。そうでない場合でも、しかし、筐体 2 5 4 は、1 つの囲い 2 5 2 の内側空間 2 5 6 における生体材料または物体（示されず）（例えば、生体細胞、分泌材料、核酸材料、または同様のもの）と、任意の別の囲い 2 5 2 の内側空間 2 5 6 における生体材料または物体などが混合することを防ぎ、以下に記載されるように、1 つの囲い 2 5 6 における捕捉物体と、いずれかの別の囲い 2 5 6 の捕捉物体とが混合することを防ぐように、囲い 2 5 2 の内側空間 2 5 6 を十分に囲み得るものである。

10

【 0 0 2 6 】

3 つの列に配置された 1 2 の囲い 2 5 2 が示されているが、囲い 2 5 2 はそれ以上またはそれ以下であり得、囲い 2 5 2 は、他のパターンにおいて配置され得る。さらに、囲い 2 5 2 は、示されるものとは異なる形状、寸法、向き、または同様のものを有し得る。例えば、囲い 2 5 2 は、いずれかの形状、寸法または方向、もしくは U.S. 特許出願第 2014/0 116881 号（2013 年 10 月 22 日に出願）または U.S. 特許出願第 14/502,568 号（2014 年 10 月 22 日に出願）に記載されているいずれかのパターンにおいても配置され得る。

20

【 0 0 2 7 】

単離囲い 2 5 2 は、図 2 C に図説されるように、チャンネル 2 4 0 の全体の高さに延伸する（例えば、基部 2 0 6 の表面 2 4 2 からマイクロ流体構造 2 0 4 の上部へ）筐体 2 5 4 を含むが、これは例示であり、様々な変形が考えられる。例えば、筐体 2 5 4 は、チャンネル 2 4 0 の全体の高さに延伸する必要はない。

【 0 0 2 8 】

図 3 は、筐体 2 5 4 ではなく基部 2 0 6 においてくぼみを含む、単離囲い 3 5 2 の別の例を図説する。例えば、示されるように、各囲い 3 5 2 は、基部 2 0 6 中へのくぼみの側壁 3 5 4 によって画定される内側空間 3 5 6 を含み得る。かかる各囲い 3 5 2 の開口 3 5 8 は、基部 2 0 6 の表面 2 4 2 であり得る。本文中で、囲い 2 5 2 への言及、検討、図説、または同様のもののいずれかは、側壁 3 5 4、内側空間 3 5 6 および開口 3 5 8 がそれぞれ、筐体 2 5 4、内側空間 2 5 6 および囲い 2 5 2 の開口 2 5 8 に対応し得る、囲い 3 5 2 に置き換え得る。

30

【 0 0 2 9 】

媒体 2 4 4 は、単離囲い 2 5 2 における開口 2 5 8 で流出し得る（例えば、入口 2 0 8 から出口 2 1 0 へ）。かかる媒体 2 4 4 の流れは、例えば、単離囲い 2 5 2 における生体物体（示されず）へ栄養塩類を提供し得る。別の例として、媒体 2 4 4 の流れはまた、単離囲い 2 5 2 からの廃棄物の除去を提供し得る。また、示されるように、媒体 2 4 4 の流れは、媒体における材料（例えば、以下に記載される、図 7 に図説されるような溶解試薬 7 0 6）と、囲い 2 5 2 における媒体 2 4 4 との混合を引き起こし得る。代替的に、媒体 2 4 4 は、水性の媒体の小滴を含有するオイルベースの媒体であり得る。小滴は、単離囲い 2 5 2 中へ移動され、および任意にそこで組み合わされる、細胞、捕捉物体、および / または試薬（例えば、溶解バッファ）を含有し得る。

40

【 0 0 3 0 】

マニピュレータ 2 2 2 は、媒体 2 4 4 における物体（示されず）上に、選択的に動電学的な力を生成するように構成され得る。例えば、マニピュレータ 2 2 2 は、チャンネル 2 4 0 の内表面 2 4 2 で誘電泳動（DEP）電極を選択的に起動（例えば電源を入れる）および停止（例えば電源を切る）するように構成され得る。DEP 電極は、各電極を個々に起

50

動および停止するために、それを通して電流および/または電圧レベルを変化させ得る電氣的接続に各々接続され得る。別の例として、DEP電極は、以下に記載されるように、図4Aおよび4Bにおいて図説される例のように、光によって起動および停止できる。これに関わらず、DEP電極は、媒体244における物体(示されず)を引き寄せまたは遠ざける力を媒体244において生成し得、次にマニピュレータ222は、媒体244における1または2以上の物体を選択および移動できる。

【0031】

例えば、マニピュレータ222は、1または2以上の光(例えば、レーザー)ピンセットデバイス、1または2以上の光電ピンセット(OET)デバイス(例えば、U.S.特許第7,612,355号(これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)または2013年10月10日に出願されたU.S.特許出願第2014/0124370号(これもまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるような)、および/または、フォトトランジスタ(例えば、ラテラルバイポーラトランジスタ)を有する1または2以上のデバイスを含み得る。さらに別の例として、マニピュレータ222は、物体の1または2以上が懸濁された媒体244の小滴を移動するための1または2以上のデバイス(示されず)を含み得る。かかるデバイス(示されず)は、光電ウェットティング(OEW)デバイス(例えばU.S.特許第6,958,132号に開示されるとおりであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)などのエレクトロウェットティングデバイス、片面OEWデバイス(例えば2011年7月31日に出願されたU.S.特許出願第2012/0024708号、または2014年12月5日に出願されたU.S.仮特許出願第62/088532号に開示されるとおりであり、参照によりその両方の全体が本明細書に組み込まれる)、または他のエレクトロウェットティングデバイスを含み得る。よってマニピュレータ222は、いくつかの態様において、DEPデバイスとして特徴付けられ得る。

【0032】

図4Aおよび4Bは、DEPデバイスの種類であるOETデバイス400を含むマニピュレータ222の例を図説する。示されるように、OETデバイス400は、第1電極404、第2電極410、電極起動基板408、電源412(例えば、交流電流(AC)電源)、および光源420を含み得る。チャンネル240における媒体244および電極起動基板408は、電極404、410を隔て得る。光源420からの光422のパターンを変化させることで、チャンネル240の内表面242の領域414でのDEP電極のパターン変化を選択的に起動および停止できる(以下、領域414は、「電極領域」ともいう)。

【0033】

図4Bに説明される例において、基部206の内表面242上へ向けられる光パターン422'は、示される四角いパターンとして斜交ハッチングで示された電極領域414aに光を当てる。他の電極領域414には光が当てられず、それを以下「暗」電極領域414という。各暗電極領域414から第2電極410へ電極起動基板408に渡る電気インピーダンスは、第1電極404からチャンネル440における媒体244を渡り暗電極領域414に至るインピーダンスより大きい。しかしながら、電極領域414aに光を当てることは、光が当てられた電極領域414aから第2電極410への電極起動基板408に渡るインピーダンスを、第1電極404からチャンネル240における媒体244を渡り光が当てられた電極領域414aへ至るインピーダンス未満まで、低減させる。

【0034】

電源412が起動されると、前述のものは、光が当てられた電極領域414aと、近接した暗電極領域414との間の媒体244における電場勾配を引き起こし、これが順に、媒体244における近くの物体(示されず)を引き寄せるかまたは遠ざける局所的なDEP力を生じさせる。よって、媒体244における物体を引き寄せるかまたは遠ざけるDEP電極は、光源420(例としてレーザー源、高輝度放電ランプまたは他のタイプの光源)からマイクロ流体デバイス200中に投影される光パターン422を変化させることによって、チャンネル240の内表面242での多くの異なるかかる電極領域414で、選択

的に起動および停止され得る。DEP力が近くの物体を引き寄せるかまたは遠ざけるかは、電源412の周波数ならびに媒体244および/または物体(示されず)の誘電特性といったパラメータに依存し得る。

【0035】

図2Bに説明される、光が当てられた電極領域414aの四角いパターン422'は、例でしかない。電極領域414のいずれのパターンも、デバイス200において投影される光のパターン422によって、光が当てられ得、光が当てられる電極領域422'は、光パターン422を変化させることによって繰り返し変化され得る。

【0036】

いくつかの態様において、電極起動基板408は光伝導材料であってもよく、内表面242は特色がないものであってもよい。かかる態様において、DEP電極414は、光パターン422に従い(図4Aを参照)、チャンネル240の内表面242上、どこにでも、いずれのパターンにおいても、生じさせられ得る。よって、電極領域414の数およびパターンは、確定されるものではないが、光パターン422に対応する。例は、上記U.S.特許第7,612,355号中に図説される。ここで、前述した特許の図面において示されている非ドーブの非晶質ケイ素材料24が、電極起動基板408を構成し得る光伝導材料の例であり得る。

【0037】

他の態様において、電極起動基板408は、半導体分野において知られているような半導体集積回路を形成する複数のドーブ層、電気絶縁層および導電層を含む半導体材料などの回路基板を含み得る。かかる態様において、電気回路要素は、チャンネル240の内表面242での電極領域414と、光パターン422によって選択的に起動および停止され得る第2電極410との間の電氣的接続を形成し得る。電極起動基板408のかかる構成の非限定例は、U.S.特許第7,956,339号の図21および22において説明される光トランジスタをベースとしたOETデバイス400ならびに上記U.S.特許出願第14/051,004号(attorney docket no. BL9-US)において図面全体を通して図説されるOETデバイスを含む。フォトトランジスタは、例えばラテラルバイポーラトランジスタであり得る。

【0038】

いくつかの態様において、該して図4Aに説明されるとおり、第1電極404は、ハウジング202の第1壁402の一部であり得、電極起動基板408および第2電極410は、ハウジング202の第2壁406の一部であり得る。示されるとおり、チャンネル240は、第1壁402と第2壁406との間にあり得る。しかしながら、前述のものは、例に他ならない。他の態様において、第1電極404は、第2壁406の一部であり得、電極起動基板408および/または第2電極410の一方または両方は、第1壁402の一部であり得る。別の例として、第1電極404は、電極起動基板408および第2電極410と同じ壁402または406の一部であり得る。例えば、電極起動基板408は、第1電極404および/または第2電極410を含み得る。また、光源420は代替的に、ハウジング202の下に位置づけられ得る。

【0039】

よって、図4Aおよび4BのOETデバイス400として構成されると、チャンネル240の内表面242の電極領域414での1つまたは2つ以上のDEP電極を起動するため、光パターン422を、物体を捕捉するパターンでデバイス200において投影することによって、マニピュレータ222は、チャンネル240における媒体244における物体(示されず)を選択し得る。その後、マニピュレータ222は、デバイス200に対して光パターン422を移動させることによって、捕捉された物体を移動し得る。代替的に、デバイス200は、光パターン422に対して、移動され得る。例は、図6および12において図説され、以下で検討される。単離囲い252を画定する筐体254が、図2Bおよび2Cにおいて図説され、上記で物理的な筐体として検討されたが、筐体254は、代替的に光パターン422によって起動されるDEP力を含む仮想的な筐体であり得る。

【0040】

上述のように、図 4 A および 4 B の O E T デバイス 4 0 0 は、しかし、マニピュレータ 2 2 2 の例である。例えば、電極領域 4 1 4 は、光パターン 4 2 2 を変化させることによって起動および停止されるように図説および検討されたが、デバイス 4 0 0 は、その代わりに各電極領域 4 1 4（表面 2 4 2 での電気導電端子を含み得る）への電気接続（示されず）を提供し得、電気接続を通して各電極領域 4 1 4 へ提供される電圧および／または電流を制御することによって各電極領域 4 1 4 を個々に起動および停止することもできる。そのように構成されると、デバイス 4 0 0 は、光源 4 2 0 を含んだり、または光パターン 4 2 2 をデバイス 4 0 0 中へ向けたりする必要がなくなる。別の代替案は、2014年4月25日に出願されたU.S. 特許出願第14/262,140号、2014年4月25日に出願されたU.S. 特許出願第14/262,200号で説明されているような、片面 O E W デバイスなどの O E W デバイス、または O E T / O E W デバイスの組み合わせであり、参照によりその両方の全体が本明細書に組み込まれる。加えて、重力などのマイクロ流体デバイスに渡って均一に適用され得る力は、2014年12月10日に出願されたU.S. 仮特許出願第62/090,303号で説明されているような記述のいずれかと併せて使用され得、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 4 1 】

再び図 2 A ~ 2 C を参照して、検出器 2 2 4 は、チャンネル 2 4 0 における事象を検出するための機構であり得ることが言及される。例えば、検出器 2 2 4 は、媒体における物体（示されず）の 1 または 2 以上の放射エネルギーの特徴（例えば、蛍光発光またはルミネッセンス）を検出することができる光検出器を含み得る。かかる検出器 2 2 4 は、例えば、媒体 2 4 4 における 1 または 2 以上の物体（示されず）が放射する電磁放射、および／または放射の近似的な波長、明るさ、強度または同様のものを検出するように構成され得る。好適な光検出器の例は、限定されず、光電子増倍管検出器およびアバランシェ光検出器を含み得る。

【 0 0 4 2 】

検出器 2 2 4 は、媒体 2 4 4 における物体（示されず）を含むチャンネル 2 4 0 のデジタル画像を捕捉するための撮像デバイスを代替的または追加的に含み得る。検出器 2 2 4 が含み得る好適な撮像デバイスの例は、デジタルカメラ、または C C D および相補的な M O S イメージセンサーなどの光センサーを含み得る。画像は、かかるデバイスで捕捉および解析（例えば、制御モジュール 2 3 0 によって）され得る。かかる画像はまた、コンピュータモニター（示されず）などのディスプレイデバイス上に表示され得る。

【 0 0 4 3 】

流量コントローラ 2 2 6 は、チャンネル 2 4 0 における媒体 2 4 4 の流れを制御するように構成され得る。例えば、流量コントローラ 2 2 6 は、流れの方向および／または速さを制御し得る。流量コントローラ 2 2 6 の非限定例は、1 つまたは 2 つ以上のポンプまたは流体アクチュエータ(actuator)を含む。いくつかの態様において、流量コントローラ 2 2 6 は、例えばチャンネル 2 4 0 における媒体 2 4 4 の流れの速さを感知するための 1 つまたは 2 つ以上のセンサ（示されず）などの追加の要素を含み得る。

【 0 0 4 4 】

搬出機構 2 2 8 は、マイクロ流体デバイス 2 0 0 からの物体（示されず）の搬出を促進し得る。例えば、図 2 B および 2 C に図説されるように、搬出機構 2 2 8 は、ステージ領域 2 4 8 およびハウジング 2 0 2 を通る通路 2 4 6 を含み得る。通路 2 4 6 は、代替的に、マイクロ流体構造 2 0 4 の基部 2 0 6 または側壁を通り得る。物体（示されず）は、ステージ領域 2 4 8 に移動され、および通路 2 4 6 を通してデバイス 2 0 0 から搬出され得る。搬出機構 2 2 8 は、例えば、U.S. 特許出願第14/520,510号（2014年10月22日に出願）で説明されているような搬出機構の例のいずれかの様であり得る。代替的に、搬出機構 2 2 8 は、単純に出口 2 1 0 を含み得る。

【 0 0 4 5 】

制御モジュール 2 3 0 は、マニピュレータ 2 2 2、検出器 2 2 4、流量コントローラ 2 2 6、および／または搬出機構 2 2 8 からの信号を受信し、ならびに、それらを制御するように構成され得る。示されるとおり、制御モジュール 2 3 0 は、コントローラ 2 3 2 お

よびメモリ 2 3 4 を含み得る。いくつかの態様において、コントローラ 2 3 2 は、デジタル電子的な、光学的なまたは磁気的なメモリデバイスであり得るメモリ 2 3 4 に非一過性の信号として保存された機械読取り可能な命令（例としてソフトウェア、ファームウェア、マイクロコードまたは同種のもの）に従って動作するように構成されたデジタル電子コントローラ（例としてマイクロプロセッサ、マイクロコントローラ、コンピュータまたは同種のもの）であり得る。代わりに、コントローラ 2 3 2 は、実配線のデジタル回路および/またはアナログ回路あるいは機械読取り可能な命令に従って動作するデジタル電子コントローラと、実配線のデジタル回路および/またはアナログ回路との組み合わせを含み得る。

【0046】

10

図説されるように、マイクロ流体デバイス 2 0 0 は、選択部 2 1 2（デバイス 2 0 0 における共有空間の例であり得る）、単離部 2 1 4、および/または搬出部 2 1 6 を含み得る。これら部 2 1 2、2 1 4、2 1 6 は、デバイス 2 0 0 の物理的なパーティション、または単に概念上のパーティションに相当し得る。これに関わらず、示されるように、生体細胞（示されず）は、生体細胞（示されず）の個々の 1 つが識別および選択され得る選択部 2 1 2 中へ注入され得る。単離部 2 1 4 は、選択部 2 1 2 において選択された個々の生体細胞（示されず）が置かれ、および別のものと単離される、単離囲い 2 5 2 を含み得る。

【0047】

言及されたように、図 5 ~ 1 2 は、図 2 A ~ 2 C のマイクロ流体デバイス 2 0 0 上の方法 1 0 0 の操作の例を図説する。方法 1 0 0 が、図 5 ~ 1 2 において図説される例を参照して検討される。

20

【0048】

図 1 に示されるように、方法 1 0 0 では、ステップ 1 0 2 で、個々の生体細胞を選択でき得る。図 5 および 6 は、例を図説する。図 5 に示されるように、マイクロ流体デバイス 2 0 0 の選択部 2 1 2 において生体細胞 5 0 2 がある。細胞 5 0 2 は、全てが同じ種類の細胞であり得る。代替的に、細胞 5 0 2 は、様々な異なる種類の細胞を含み得る。これに関わらず、細胞 5 0 2 は、例えば入口 2 0 8 を通して、マイクロ流体デバイス 2 0 0 中へ注入され得る。

【0049】

30

方法 1 0 0 では、様々な異なる基準または所望の特徴のいずれかに基づいて細胞 5 0 2 の 1 または 2 以上を個々に選択でき得る。例えば、方法 1 0 0 では、ステップ 1 0 2 の一環として、デバイス 2 0 0 の選択部 2 1 2 における細胞 5 0 2 を 1 または 2 以上の特定の特徴のためにテストし、および特徴（単数）または特徴（複数）を有すると決定されたその細胞 5 0 2 を選択する。別の例として、方法 1 0 0 では、特徴（単数）または特徴（複数）を有しないと決定されたその細胞 5 0 2 を選択でき得る。

【0050】

ステップ 1 0 2 の一環としてテストされ得る特徴の例は、細胞 5 0 2 の寸法および/または形態（例えば、形状と構造）を含み得る。したがって、例えば、検出器 2 2 4 は、デバイス 2 0 0 の選択部 2 1 2 における細胞 5 0 2 の画像を捕捉し得る。細胞 5 0 2 の捕捉された画像は、1 または 2 以上の事前設定された寸法または形態の特徴を満たす細胞 5 0 2 の 1 つを識別するために解析され得る。例えば、細胞 5 0 2 の捕捉された画像は、寸法に関連した以下のような特徴の 1 または 2 以上を満たす、細胞 5 0 2 の 1 つを識別するために解析されることができ、該特徴は：事前設定された寸法閾値より大きい、より小さい、または実質的に等しい、もしくは、高い寸法閾値と低い寸法閾値との間の寸法範囲内などがある。

40

【0051】

別の例として、細胞 5 0 2 の捕捉された画像は、細胞 5 0 2 の形状および/または構造に関する事前設定された形態の特徴の 1 または 2 以上を満たす細胞 5 0 2 のそれを識別するために解析され得る。これに関わらず、細胞 5 0 2 の捕捉された画像は、ヒトのオペレ

50

ータによって表示（例えば、電子ディスプレイデバイス（示されず））および解析され得る。代替的または追加的に、細胞502の捕捉された画像は、制御モジュール230によって解析され得る。例えば、制御モジュール230は、メモリ234において格納される機械可読命令（例えば、ソフトウェア、ファームウェアまたは同様のもの）、および/または、かかる画像を解析し、および寸法または形態に関する特定の基準を満たす細胞502のそれを識別するための組み込み実配線の電子回路（示されず）を含み得る。

【0052】

ステップ102の一環としてテストでき得る特徴の他の例は、細胞502が、特定の物質（例えば、特定のタンパク質、特定の抗体、または同様のもの）の1または2以上を含むまたは作り出す（例えば、発現または分泌）ことができるかどうかを決定することを含む。例えば、細胞502は、かかる特定の物質の1または2以上の存在に顕著に検出できる方法で反応する試薬と共に処理され得る（デバイス200の選択部212中へ充填される前または後）。かかる試薬の例は、特定の物質を含むまたは作り出す染色細胞502のマーカーを含む。検出器224は、デバイス200の選択部212において処理された細胞502の画像を捕捉し得、および細胞502の画像は、特定の物質の存在（または不在）を指摘する細胞502のそれを識別するために解析され得る。言及されたように、細胞502の画像は、ヒトの利用者によって表示および解析され得、および/または上記で検討されたように概して制御モジュール230によって解析される。寸法、形態、および/またはタンパク質の発現（例えば、抗体の発現）などの細胞性の特徴を検出する方法は、例えば、共に2014年10月22日に出願されたU.S.特許出願第14/520,568号および14/521,447号で説明されており、参照によりその両方の全体が本明細書に組み込まれる。

【0053】

デバイス200の選択部212における細胞502の画像を解析するようにプログラムされた検出器224および/またはコントローラ230は、特定の特征のために個々の生体細胞を識別するための手段の例であり得る。

【0054】

したがって、ステップ102で、方法100では、1または2以上の特定の特征（異なる特徴であり得る）のために、デバイス200の選択部212における細胞502をテストし、およびこれらの特定の特征の1または2以上の陽性をテストする細胞502の1または2以上を選択できる。代替的に、方法100では、ステップ102で、かかる特征のために陰性をテストする細胞502の1または2以上を選択できる。

【0055】

これに関わらず、方法100では、ステップ104で、ステップ102でデバイス200の選択部212から選択された細胞502を、デバイス200の単離部214における単離囲い252中へ移動でき得る。例えば、各選択された細胞502は、各囲い252がステップ102で選択された唯一の細胞502を含有するように、異なる囲い252中へ移動でき得る。

【0056】

図6は、デバイス200の選択部212における個々の細胞502を選択して（ステップ102の一部であり得る）、選択された個々の細胞502を単離囲い252中へ移動する（ステップ104）例を図説する。図6に示されるように、方法100では、デバイス200の選択部212における光トラップ602で所望の細胞502を捕えることによって、ステップ102で特定の、個々の細胞502を選択できる。例えば、図4Aおよび4BのOETデバイス400として構成されるマニピュレータ222（図2A～2C参照）は、個々の細胞502を捕える光トラップ602を生み出し得る。次にOETデバイス400は、光トラップ602を囲い252中に移動し得、それにより捕えられた細胞502を囲い252中へ移動する。図説されたように、各細胞502は、個々に捕えられ、および保持囲い252中へ移動され得る。

【0057】

光トラップ602は、図4Aおよび4Bに関連して上記で検討されたように、マイクロ

流体デバイス 200 のチャンネル 240 の内表面 242 の上に投影される光の変化パターン 422 の一部であり得る。選択された細胞 502 が囲い 252 に入ると、細胞 502 に対応する光トラップ 602 は電源が切られる。検出器 224 は、細胞 502 および囲い 252 の画像を含む、チャンネル 240 の全てまたは一部の画像を捕捉し得、およびこれらの画像は、特定の、個々の細胞 502 を捕えて、および特定の囲い 252 中へ移動することを促進する。したがって、検出器 224 および / または マニピュレータ 222 (例えば、図 4A および 4B の OET デバイスとして構成された) は、デバイス 200 の単離部 214 において個々の細胞 502 を選択部 212 から選択および囲い 252 中へ移動するための手段の 1 または 2 以上の例であり得る。

【0058】

マニピュレータ 222 は、個々の生体細胞 502 を選択して (例えば、デバイス 200 の選択部 212 および / または 囲い 252)、および選択された個々の細胞 502 を (例えば、単離囲い 252 中または外へ) 移動するための手段の例である。したがって、本明細書において図説、検討または開示されたマニピュレータ 222 の構成のいずれかは、デバイス 200 における個々の生体細胞 502 を選択する、および / または デバイス 200 において選択された個々の細胞 502 を移動するための手段の例であり得る。重力などの全地球的に作用する力 (例えば、マイクロ流体デバイス 200 を傾けるか、または傾け可能なサポートを使用して適用される) は、細胞 502 の移動を補助するために使用でき得る。代替的に、水性の媒体の小滴内に含有される個々の細胞 502 が、OEW デバイスを使用して選択され、および保持囲い 252 中へ移動され得る。

【0059】

上記で言及されたように、代替的に、細胞 502 は、ステップ 102 の前に囲い 252 にあってもよく、方法 100 では、ステップ 102 で、上記のように概してに 1 または 2 以上の特徴のために囲い 252 における細胞 502 を選択でき得る。方法 100 では、ステップ 104 で、選択されなかった細胞 502 を囲い 252 の外に移動して、選択された細胞 502 を囲い 252 に残すことができる。

【0060】

図 1 を再び参照して、方法 100 では、ステップ 106 で、単離囲い 252 における細胞 502 を溶解できる。図 7 および 8 は、囲い 252 における細胞 502 を溶解する例を図説し、したがってそれは囲いの溶解の例であり得る。ステップ 106 で溶解された細胞 502 は、図 7 ~ 12 において 702 でラベルされる。

【0061】

図 7 に示されるように、単離囲い 252 における細胞 502 は、デバイス 200 の単離部 214 を通した溶解試薬 706 の流れ 704 によって、溶解細胞 702 を作り出すために溶解され得る。例えば、溶解試薬 706 は、溶解試薬 706 が囲い 252 の内側空間 256 中へ入り (例えば、囲い 252 の開口 258 を通した拡散によって)、および囲い 252 における細胞 502 を溶解するのに十分な期間、入口 208 から出口 210 へ流され得る。示されていないが、その後の媒体 244 は、溶解試薬 706 をデバイス 200 から十分に洗い流すように、デバイスの単離部 214 を通して流され得る。代替的に、融解試薬 706 の 1 または 2 以上の小滴は、各囲い 252 中へ移動され (例えば、OEW デバイスを使用して)、溶解される細胞 502 を含む小滴とマージされ得る。

【0062】

溶解試薬 706 は、当技術分野で周知の好適な溶解バッファのいずれか (または、組み合わせ溶解 / 核酸結合バッファ) であり得る。例えば、溶解バッファは、緩衝剤、キレート剤、塩、洗浄剤またはカオトロピック剤、RNase 阻害剤、プロテアーゼ、変性剤、または、それらのいずれの組み合わせを含み得る。緩衝剤は、例えば、トリス塩酸などのトリス緩衝剤 (例えば、約 10 mM ~ 約 100 mM の濃度で) であり得る。緩衝剤は、生理学的 - 相溶性の pH (例えば、約 pH 7.0 ~ 約 pH 8.5) を提供し得る。キレート剤は、例えば、EDTA または EGTA (例えば、約 1 mM ~ 約 10 mM の濃度で) などの二価陽イオンキレート剤であり得る。

10

20

30

40

50

【0063】

塩は、例えば、塩化リチウム、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム（例えば、約100 mM～約1 Mの濃度で）などの塩化物塩であり得る。洗浄剤は、例えば、硫酸ドデシルナトリウム（SDS）、硫酸ドデシルリチウム（LiDS）または同様のもの（例えば、約0.1%～約1.0%の濃度）などのイオン性洗浄剤、もしくはTriton X-100（登録商標）、NP-40（登録商標）、Tween（登録商標）洗浄剤（例えば、Tween 20（登録商標））または同様のもの（例えば、約0.1%～約2.0%の濃度で）などの非イオン性洗浄剤でありうる。カオトロピック剤は、例えば、グアニジン（塩化グアニジンまたはグアニジンイソチオシアネート）または尿素（例えば、約0.1 M～約6.0 Mの濃度で）を含み得る。RNase阻害剤は、マイクロリットルあたり、約0.1～2.0ユニットの濃度であり得る。

10

【0064】

プロテアーゼは、例えば、プロテイナーゼKまたは同様のもの（例えば、約100 ng/ml～約1 mg/mlの濃度で）であり得る。変性剤は、例えば、ホルムアミドまたはDTT（例えば、約0.01 M～約1 Mの濃度で）を含み得る。したがって、ある態様において、溶解試薬706は、緩衝剤（例えば、トリス塩酸）、塩化物塩（例えば、塩化ナトリウム）、イオン性および/または非イオン性洗浄剤（例えば、SDS）、プロテイナーゼ、およびRNase阻害剤を含み得る。他の態様において、溶解試薬706は、緩衝剤（例えば、トリス塩酸）、塩化物塩（例えば、塩化リチウム）、二価陽イオンキレート剤（例えば、EDTA）、変性剤（例えば、DTT）、およびイオン性および/または非イオン性洗浄剤（例えば、LiDS）を含み得る。

20

【0065】

図8は、溶解細胞702を作り出すために囲い252における細胞502を溶解する別の例を図説する。示されるように、図8は、デバイス200の一部または分離したものであり得る、溶解機構806を含む。溶解機構806は、溶解細胞702を作り出すために、囲い252における細胞502の1または2以上に溶解ビーム808を向けるように制御し得る。各溶解ビーム808は、細胞502の1つを溶解するのに十分なエネルギーを含み得る。溶解機構806は、例えば、レーザー機構であり得、および溶解ビーム808は、レーザービームを含み得る。溶解機構806は、細胞502の特定の1つに溶解ビーム808を向けるように制御し得る（例えば、図2Aの制御モジュール230によって）。

30

【0066】

溶解機構806は、個々の細胞502を選択的に一度に一つずつ溶解するように制御され得る。例えば、溶解機構806は、囲い252における細胞502を一つずつ順次連続的に一度の溶解するように制御され得る。別の例として、溶解機構806は、囲い252における1つ以上で全てより少ない細胞502のサブセットを実質的に並行して溶解するように制御され得る。さらに別の例として、溶解機構806は、囲い252における細胞502のすべてを実質的に同時に溶解するように制御され得る。

【0067】

図7および8は、囲い252における細胞502を溶解する例を図説する。溶解の他の例は、電気穿孔法、温度（例えば、溶解閾値の上限を超える熱、または溶解閾値の下限以下の冷氣）、電界エネルギー、または音響エネルギーを囲い252における細胞502の1または2以上に適用することを含む。例えば、溶解機構806は、細胞502を溶解するために細胞502の1または2以上に電気穿孔法、電界エネルギー、または音響エネルギーを適用する、またはその温度を制御するための同様の機構に置き換え得る。細胞502を溶解するための代替的な別の例は、細胞502を捕捉して、刃構造、槍構造または同様のものなどの機械的穿刺デバイス（示されず）と接触させるために（例えば、図2A～2Cのマニピュレータ222で）移動することである。ステップ106で溶解細胞702を作り出すために、前述のまたは他のデバイスおよび方法のいずれかが、囲い252における細胞502の1または2以上を溶解するために使用され得る。

40

50

【0068】

どのように溶解されるかに関わらず、溶解細胞702の膜は、溶解細胞702からの核酸材料が溶解細胞702の外に対応する囲い252の内側空間中（または、対応する囲い252内に包含される水性の小滴内）へ自由に流れるように、十分に破壊される。図9において示される例は、囲い252における溶解細胞702からの核酸材料902を示す。言及されたように、単離囲い252は、1つの囲い252における溶解細胞702からの核酸材料902が、別の囲い252における異なる溶解細胞702からの核酸材料902中へ流れて混合されることを防ぎ得る。単離囲い252はまた、1つの囲い252における小滴、材料、要素または物体（例えば、以下で検討される捕捉物体1002）が、他の囲い252における小滴、材料、要素または物体と混合されることを防ぎ得る。

10

【0069】

核酸材料902は、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）または同様のものを含み得る。かかるDNAは、ミトコンドリアDNA（mitDNA）、核DNA（nDNA）、またはエキソームDNAを含む、いずれの種類のDNAであり得る。かかるRNAは、マイクロRNA（miRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、リボゾームRNA（rRNA）、核内低分子RNA（rnRNA）、または転移RNA（tRNA）を含む、いずれの種類のDNAであり得る。

【0070】

溶解エネルギー808（例えば、レーザービーム）を生み出して単離囲い252における個々の細胞502に向けるように構成される溶解機構806（例えば、レーザー）、単離囲い252における細胞502に電気穿孔法で穴をあけるように構成される電気穿孔デバイス、細胞502を十分に溶解するように単離囲い252における細胞502を熱するまたは冷却するように構成される温度制御デバイス、または細胞502を溶解するように単離囲い252における細胞502に十分な音響エネルギーを適用するように構成される音響デバイスは、全て、単離囲い252における細胞502を溶解するための溶解手段の例である。

20

いくつかの態様において、方法100では、ステップ106の一環として、囲い252における細胞502の1または2以上の溶解の時間を制御し得る。

【0071】

例えば、方法100では、ステップ106の一環として、細胞502を選択するためのステップ102で使用する細胞502の1または2以上の特徴に対応するように、囲い252における1または2以上の細胞の溶解の時間を合わせ得る。したがって、方法100では、ステップ102の一環として検出された細胞502の特定の形態または寸法、もしくは材料構成、もしくは細胞502からの分泌に対応するように、囲い252における1または2以上の細胞の溶解タイミングを制御できる。したがって、例えば、第1の寸法範囲の寸法を有する囲い252における1または2以上の細胞502が、第1の時間に溶解され、次に第2の寸法範囲（第1の寸法範囲と異なり得る）の寸法を有する囲い252における1または2以上の細胞502が、第2の時間（第1の時間と異なる（例えば、時間的に遅いまたは早い）時間であり得る）に溶解され得る。

30

【0072】

別の例として、特定の形態特徴を有する囲い252における細胞502が第1の時間で溶解され得、次に異なる形態特徴を有する囲い252における細胞502が第2の時間（例えば、第1の時間と異なる（例えば、時間的に遅いまたは早い）時間であり得る）で溶解され得る。ある態様において、1または2以上の細胞を溶解するのに要する総時間は、例えば、約1～約10分（例えば、約5～約10分）であり得る。

40

【0073】

ステップ106で溶解のタイミングを制御する別の例として、方法100では、特定の事象に対応するように囲い252における1または2以上の細胞502の溶解の時間を合わせ得る。例えば、ステップ106は、特定の事象のために囲い252および/または選択領域212を監視することを含み得るものであり、および、方法100では、囲い25

50

2における1または2以上の細胞502の溶解の時間を検出される事象から合わせ得る。事象の例は、囲い252または選択領域212における1または2以上の細胞502の形態または分泌または分割における変化を含み得る。囲い252および/または選択領域212の画像を検出器224で捕捉することによって、かかる事象のために選択領域212および/または囲い252を監視でき、ならびに、画像は、ヒトのオペレータ、および/または、かかる画像を概して上記で検討されたように解析するように構成された(例えば、ソフトウェア、マイクロコード、ファームウェア、または同様のものでプログラムされた)制御モジュール230によって解析され得る。

【0074】

溶解のタイミングは、上記で検討された溶解機構のいずれかを制御することによって制御され得る。例えば、ヒトの利用者および/または制御モジュール230は、囲い252における特定の細胞502を特定の時間で溶解するように、溶解機構806を制御し得る。別の例として、示されてはいないが、デバイス200は、チャンネル240の様な多数のチャンネルを含み得るものであり、これらチャンネル240の各々は、単離囲い252のセットを含み得る。かかる各チャンネル240における囲い252における細胞502の溶解時間は、各チャンネル240への溶解の適用を選択的に制御することによって制御され得る。例えば、溶解試薬(例えば、706の様な)は、各個々のチャンネル240を通して異なる回数で流され得る。別の例として、溶解温度、溶解電界エネルギー、溶解音響エネルギー、または同様のものは、各チャンネル240に異なる回数で選択的に適用でき得る。

【0075】

再び図1を参照して、ステップ106で溶解された細胞からの1または2以上の種類の核酸材料は、ステップ108で、囲いにおける1または2以上の捕捉物体と共に捕捉され得る。囲い252の1つを描く図10は、例を図説する。

【0076】

図10に示されるように、1または2以上の捕捉物体1002(2つが示されるがそれ以上またはそれ以下であり得る)は、溶解細胞702と共に囲い252の内側空間256において配置され得る。分かるように、かかる各捕捉物体1002は、囲い252における溶解細胞702からの特定の種類の核酸材料902に結合するように構成され得る。デバイス200における囲い252の各々において1または2以上の類似の捕捉物体が存在し得る。

【0077】

図11は、物体1002の構成例を図説する。つまり、デバイス200の囲い252のいずれかにおける各捕捉物体1002は、図11において図説される捕捉物体1002の様に構成され得る。

【0078】

図11に示されるように、捕捉物体1002は、基部1102および捕捉材料1104を含み得る。基部1102は、マイクロ-ビーズ、マイクロ-ロッド、または同様のもののなどのマイクロ-物体であり得る。基部は、例えば、ストレプトアビジン被覆のビーズ、磁気ビーズ、または同様のものであり得る。捕捉材料1104は、他の種類の核酸材料よりも、非常に大きな(例えば、2倍、3倍、5倍、10倍、またはそれ以上大きな)特異性で特定の種類の核酸材料に結合する材料を含み得る。例えば、捕捉材料1104は、他の種類のDNAまたはRNAのいずれかよりも、大きな(例えば、2倍、3倍、5倍、10倍、またはそれ以上大きな)特異性で特定の種類のDNAまたはRNA(上記で確認されたいずれかの種類のDNAまたはRNA)に結合し得る。

【0079】

溶解細胞702を伴う囲い252における各捕捉物体1002は、異なる捕捉材料1104を有し得るため、囲い252における溶解細胞702から異なる種類の核酸材料(例えば、DNAまたはRNA)を捕捉する。代替的に、溶解細胞702を伴う囲い252における各捕捉物体1002は、同じ捕捉材料1104を有し得る。1つの例において、mRNAに結合するためにpoly-dTオリゴが使用され得る。代替的に、オリゴは、抗

体重鎖および／または軽鎖をエンコードするmRNAの保存された領域に特異的に結合し得る。

【0080】

図11にも示されるように、各捕捉物体1002は、捕捉物体1002を一意的に識別するコードを含み得る。囲い252における各捕捉物体1002は、したがって、デバイス200における捕捉物体1002の全てが別々に一意的に識別され得るように、一意的な識別子1106を有し得る。

【0081】

識別子1106は、捕捉物体1002を一意的に識別し、および1つの捕捉物体1002を別の捕捉物体1002と区別するのを促進し得る要素または材料のいずれかであり得る。例えば、識別子1106は、捕捉物体1002を一意的に識別する生体物質を含み得る。一意的な、ユーザー指定の配列を有するように製造された、オリゴヌクレオチド（例えば、比較的短い、一本鎖のDNAまたはRNA分子）などの人工的な核酸材料は、かかる識別子1106の例である。複数の捕捉物体1002の各々の識別子1106は、異なるかかるユーザー指定の配列を有し得、捕捉物体1002が別々に簡単に区別されることを可能にする。別の例として、識別子1106は、捕捉物体1002を一意的に識別するコードを具備する、電子的、光学的または磁氣的に可読の要素を含み得る。

【0082】

捕捉物体1002は、図1のステップ108の一環として囲い252中に置かれ得る。代替的に、捕捉物体1002は、ステップ102～106のいずれかの前、間または後に、囲い252中に置かれ得る。捕捉物体1002は、捕捉物体1002と標的核酸との間の結合を促す結合バッファに沿って、囲い252中に置かれ得る。

【0083】

結合バッファは、上記のような溶解バッファと同一であり得る。したがって、例えば、化合された溶解／結合バッファは、図1の方式のステップ106および108の両方のために使用され得る。ある態様において、好適な溶解／結合バッファは、緩衝剤、キレート剤、塩、洗浄剤、変性剤、またはこれらいずれかの組み合わせを含み得る。緩衝剤は、例えば、トリス塩酸などのトリス緩衝剤（例えば、約10mM～約100mMの濃度で）であり得る。緩衝剤は、生理学的・相溶性のpH（例えば、約pH7.0～約pH8.5）を提供し得る。キレート剤は、例えば、EDTAまたはEGTA（例えば、約1mM～約10mMの濃度で）などの二価陽イオンキレート剤であり得る。

【0084】

塩は、例えば、塩化リチウム、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム（例えば、約100mM～約1Mの濃度で）などの塩化物塩であり得る。洗浄剤は、例えば、硫酸ドデシルトリウム（SDS）、硫酸ドデシルリチウム（LiDS）または同様のもの（例えば、約0.1%～約1.0%の濃度）などのイオン性洗浄剤、もしくはTriton X-100（登録商標）、NP-40（登録商標）、Tween（登録商標）洗浄剤（例えば、Tween20（登録商標））または同様のもの（例えば、約0.1%～約2.0%の濃度で）などの非イオン性洗浄剤でありうる。変性剤は、例えば、ホルムアミドまたはDTT（例えば、約0.01M～約1Mの濃度で）を含み得る。したがって、例えば、化合された溶解／結合バッファは、緩衝剤（例えば、トリス塩酸）、塩化物塩（例えば、塩化リチウム）、二価陽イオンキレート剤（例えば、EDTA）、変性剤（例えば、DTT）、およびイオン性および／または非イオン性洗浄剤（例えば、LiDS）を含み得る。

【0085】

ある態様において、好適な結合バッファは、緩衝剤、キレート剤、塩、または、それらのいずれの組み合わせを含み得る。緩衝剤は、例えば、トリス塩酸などのトリス緩衝剤（例えば、約10mM～約100mMの濃度で）であり得る。緩衝剤は、生理学的・相溶性のpH（例えば、約pH7.0～約pH8.5）を提供し得る。キレート剤は、例えば、EDTAまたはEGTA（例えば、約1mM～約10mMの濃度で）などの二価陽イオンキレート剤であり得る。塩は、例えば、塩化リチウム、塩化ナトリウムまたは塩化カリウ

10

20

30

40

50

ム（例えば、約 100 mM ~ 約 1 M の濃度で）などの塩化物塩であり得る。したがって、例えば、緩衝剤は、緩衝剤（例えば、トリス塩酸）、塩化物塩（例えば、塩化リチウム）、および二価陽イオンキレート化剤（例えば、EDTA）を含み得る。

【0086】

特定の個々の捕捉物体 1002 は、囲い 252 の各々において置かれ得、例えば、同様に、選択された細胞 502 は、囲い 252 中に置かれ：捕捉物体 1002 は、入口 208 を通してデバイス 200 の選択部 212 中へ充填され得、および特定の個々の捕捉物体 1002 は、上記で検討されたように、概して選択された細胞 502 が光トラップ 602 によって捕えられおよび囲い 252 中へ移動される様に、光トラップ（示されず）で個々に捕えられ、および特定の囲い 252 中へ移動され得る。代替的に、捕捉物体 1002 は、
10 水性の小滴内に含有され得、小滴は例えば OEW を使用して囲い 252 中へ移動され得る。個々の捕捉物体 1002 は、囲い 252 中へ移動され得、かかる移動は、並行して、一つずつが連続して、または一部が並行しておよび一部が連続して起こり得る。

【0087】

言及されたように、溶解細胞 702 を伴う囲い 252 における 1 または 2 以上の物体 1002 の各々は、異なる捕捉材料 1104 を有し得、したがって、異なる、特定の種類の核酸材料を囲い 252 における溶解細胞 702 から捕捉し得る。

【0088】

言及されたように、各囲い 252 の筐体 254 は、核酸材料 902 を囲い 252 の内側空間 256 内に保つように構成され得る。代替的または追加的に、ブロック物体 1004
20 は、例えば、図 10 において図説されるように、概して囲い 252 の開口 258 において置かれ得る。ブロック物体 1004 は、囲い 252 における溶解細胞 702 からの異なる種類の核酸材料 902 のほとんどまたは全てと比較的高い特異性で結合するように構成され得ることを除いては、概して捕捉物体 1002 と類似し得る。他に代替的に、OEW-タイプの構成に使用されるオイルは、単離囲い 252（例えば、チャネル）と、任意に囲い 252 の開口 258 との間の空間において位置づけられ得る。ブロック物体 1004 またはオイル（示されず）は、囲い 252 からの溶解細胞 702 からの核酸材料 902 が、
囲い 252 を逃れ、および別の囲い 252 における核酸材料 902 と混合することを防ぐ。

【0089】

ブロック物体 1004 は、捕捉物体 1002 と類似のものであり得る。例えば、ブロック物体 1004 は、基部（示されないが、図 11 の基部の様であり得る）および捕捉材料（示されないが、捕捉材料 1104 の様であり得る）を含み得る。言及されたように、
30 かしながら、ブロック物体 1004 の捕捉材料（示されず）は、囲い 252 における溶解細胞 702 からの核酸材料 902 のほとんどまたは全てと結合し得る。

【0090】

図 7 ~ 10 において図説される例において、囲い 252 における細胞 502 の外側膜および細胞 502 の内側にある要素の膜のゼロから全てまでのいずれの数の膜も、図 1 のステップ 1006 で溶解され得る。したがって、各溶解細胞 702 は、自身の外側膜、および
40 ステップ 1006 で溶解された細胞 702 の内側の内部膜のいずれかを、有さないか、いくつか有するか、またはすべてを有し得るものであり、核酸材料 902 は、溶解細胞 702 の内側の核酸材料 902 のいくつかまたは全てを含み得る。上記で検討されたように、ステップ 1008 で、囲い 252 における特定の種類の核酸材料 902 は囲い 252 における 1 または 2 以上の捕捉物体 1002 で捕捉できる。

【0091】

図 12A および 12B は、膜の全てではなく、細胞 502 の膜の選択された 1 または 2 以上だけが溶解されるように実施され得る、図 1 のステップ 1006 の例を図説する。

【0092】

図 12A（図 10 の様に、デバイス 200 における囲い 252 の 1 つを示す）は、囲い 252 における細胞 502 の成分例を図説する。細胞 502 の成分は、細胞核 1204 お
50

よび細胞小器官（２つが示されるが、それ以上またはそれ以下であり得る）を含み得る。知られているように、外側膜１２０２は、細胞の境界であり、核膜１２０６は、細胞核１２０４の境界であり、ミトコンドリア膜１２１０は、各細胞小器官１２０８の境界である。

【００９３】

図１２Ｂに示されるように、ステップ１０６で、囲い２５２における細胞５０２の全ての膜１２０２、１２０６、１２１０を溶解するのではなく、膜１２０２、１２０６、１２１０の１または２以上であるが全てより少ない膜をステップ１０６で溶解し得る。例において、図１２Ｂにおいて図説される、細胞５０２の核膜１２０６ではなく外側膜１２０２、または、ミトコンドリア膜１２１０のいずれかが、ステップ１０６で溶解される。したがって、解放された核酸材料１２２２は、細胞核１２０４または各細胞小器官１２０８の内部からの核酸材料を含まない。したがって、図１２Ｂにおいて図説された例において、解放された核酸材料１２２２は、RNA（例えば、上記で識別されたいずれの種類のRNA）であり得る。

10

【００９４】

したがって、ステップ１０６は、概して上記で検討されたように、溶解細胞７０２から現在解放された核酸材料１２２２の種類の１または２以上を捕捉するように実施され得る。例えば、図１２Ｂにおいて示されるように、溶解細胞７０２から解放された１または２以上の種類の核酸材料１２２２を捕捉するように構成された１または２以上の物体１００２a（１つが示されるがそれ以上であり得る）が囲い２５２においてあり得る。

20

【００９５】

図１２Ｃおよび１２Ｄにおいて図説されるように、ステップ１０６および１０８は、囲い２５２における現在の溶解細胞７０２の１または２以上のさらなる膜を溶解するように１または２以上の回数で繰り返され得、したがって、各さらなる膜が溶解されることで解放されるさらなる種類の核酸材料を解放および捕捉する。

【００９６】

図１２Ｃにおいて図説された例において、各細胞小器官１２０８の１つのミトコンドリア膜１２１０は、図１のステップ１０６の繰り返して溶解され、それで現在の溶解細胞小器官１２３８から核酸材料１２２４を解放し得る（溶解細胞小器官１２０８は図１２において１２３８でラベルされる）。解放された核酸材料１２２４は、通常細胞小器官で見つけられるmtDNAなどの核酸材料を含み得る。したがって、図１のステップ１０８は、溶解細胞小器官１２３８から解放された１または２以上の種類の核酸材料１２２４を捕捉するために、概して上記で検討されたように繰り返され得る。例えば、図１２Ｃにおいて示されるように、溶解細胞小器官１２３８から解放された１または２以上の種類の核酸材料１２２４を捕捉するように構成された１または２以上の物体１００２b（１つが示されるがそれ以上であり得る）が囲い２５２においてあり得る。細胞核１２０４を溶解する前に細胞小器官１２０８が溶解されるこの例においては、囲い２５２の内側空間２５６における細胞核１２０４からの自由な核DNAがないため、溶解細胞小器官１２０８からの高い濃縮性のmtDNAが捕捉され得る。

30

【００９７】

図１２Ｄにおいて図説された例において、細胞核１２０４からの核膜１２０６は、図１のステップ１０６の別の繰り返して溶解され得、現在の溶解細胞核１２３４から核酸材料１２２６を解放し得る。（溶解細胞核１２０４は、図１２Ｄにおいて１２３４でラベルされる）。解放された核酸材料１２２６は、細胞の細胞核において通常見つかる、様々な種類のDNAなどの核酸材料を含み得る。したがって、ステップ１０８は、溶解細胞核１２３４から解放された１または２以上の種類の核酸材料１２２６を捕捉するために、概して上記で検討されたように再び繰り返され得る。例えば、図１２Ｄにおいて示されるように、溶解細胞核１２３４から解放された１または２以上の種類の核酸材料１２２６を捕捉するように構成された１または２以上の捕捉物体１００２c（１つが示されるがそれ以上であり得る）が囲い２５２においてあり得る。

40

50

【 0 0 9 8 】

図 1 2 A ~ 1 2 D において図説された例において、膜 1 2 0 2、1 2 0 6、1 2 0 8 は、溶解され得、捕捉物体 1 0 0 2 a、1 0 0 2 b、1 0 0 2 c は、上記の図説または検討のいずれかの方法において、囲い 2 5 2 中へ移動され得る。さらに、各捕捉物体 1 0 0 2 a、1 0 0 2 b、1 0 0 2 c は、ステップ 1 0 8 の各繰り返しの最後で囲い 2 5 2 から取り除かれ得（例えば、概して図 1 3 に示され、および以下で検討されるように）、または、全ての捕捉物体 1 0 0 2 a、1 0 0 2 b、1 0 0 2 c は、ステップ 1 0 8 の各繰り返しの後で囲い 2 5 2 から取り除かれ得る（例えば、概して図 1 3 に示され、および以下で検討されるように）。

【 0 0 9 9 】

図 1 2 C および 1 2 D は、細胞小器官 1 2 0 8 を溶解し、次に細胞核 1 2 0 4 を溶解したが、他の順序も可能である。例えば、細胞核 1 2 0 4 は、細胞小器官 1 2 0 8 を溶解する（図 1 2 C で図説されたように）前に、溶解され得る（図 1 2 C で図説されたように）。別の例として、多数の細胞小器官 1 2 0 8 が溶解され得（図 1 2 C で図説されたように）、および核膜 1 2 0 6 が細胞小器官 1 2 0 8 の 2 つを溶解する間に溶解され得る（図 1 2 C で図説されたように）。図 1 2 A ~ 1 2 D は、デバイス 2 0 0 の 1 つの囲い 2 5 2 だけを図説しているが、これらの図において図説された捕捉物体 1 0 0 2 を伴う溶解および捕捉はまた、デバイス 1 0 0 における他の囲い 2 5 2 において実施され得る。図 1 2 A ~ 1 2 D における細胞 5 0 2 の例は、核膜 1 2 0 6 を有し、したがって真核生物細胞として図説されているが、図面において図説され、および本明細書で検討される細胞 5 0 2 は、原核生物細胞などの他の種類の細胞であり得る。

【 0 1 0 0 】

再び図 1 に戻って、方法 1 0 0 では、ステップ 1 0 0 で、囲い 2 5 2 の 1 または 2 以上から捕捉物体 1 0 0 2 の 1 または 2 以上を取り除き得る。図 1 3 は、光ケージ（cage）1 3 0 2 が囲い 2 5 2 における捕捉物体 1 0 0 2 を捕え、および捕捉物体 1 0 0 2 をデバイス 2 0 0 の搬出部 2 1 6 中に移動する例を示す。（したがって、上記で検討または触れられた、図 4 A および 4 B において図説されたように構成される O E T デバイスを含む、いずれかの D E P デバイス、および代替的に O E W デバイスが、デバイス 2 0 0 の単離囲い 2 5 2 における個々の捕捉物体 1 0 0 2（または、かかる捕捉物体を含有する小滴）を選択する手段の例であり、選択された捕捉物体 1 0 0 2 を単離囲い 2 5 2 の外へ移動する。）

【 0 1 0 1 】

例えば、捕捉物体 1 0 0 2 は、搬出機構 2 2 8 のステージ領域 2 4 8 へ移動され、および通路 2 4 6 を通してデバイス 2 0 0 から搬出され得る。前述のものは、例えば、上述の U.S. 特許出願第 14/520,510 号（2014 年 10 月 22 日に出願）（代理人番号 B L 1 4 - U S）で説明されている、いずれかの方法において実施され得る。代替的に、捕捉物体 1 0 0 2 は、出口 2 1 0 を通してデバイス 2 0 0 から搬出され得る。さらに別に代替的に、ステップ 1 1 0 で囲い 2 5 2 から取り除かれた捕捉物体 1 0 0 2 は、デバイス 2 0 0 における他の位置に格納されおよび / またはさらに処理され得る。

【 0 1 0 2 】

したがって、図 1 の方法 1 0 0 では、1 または 2 以上の特定の特徴を有すると決定された特定の個々の細胞 5 0 2 をマイクロ流体デバイス 2 0 0 における細胞の群から選択し得、および方法 1 0 0 は、囲い 2 5 2 の各々が 1 つだけの選択された細胞 5 0 2 を含有するように、デバイス 2 0 0 における単離囲い 2 5 2 中へ選択された細胞 5 0 2 を個々に置き得る。方法 1 0 0 では、核酸材料を囲い 2 5 2 の 1 つにおける単一の細胞 5 0 2 から抽出し得、囲い 2 5 2 における 1 または 2 以上の捕捉物体 1 0 0 2 で、単一の細胞 5 0 2 からの 1 または 2 以上の特定の種類の核酸材料（上記で識別された D N A または R N A の種類の 1 または 2 以上のいずれか）を捕捉し得る。

【 0 1 0 3 】

代替的に、方法 1 0 0 では、1 つ以上の細胞 5 0 2 を囲い 2 5 2 に、および / または単

10

20

30

40

50

一の細胞 5 0 2 を囲いに置き得、囲い 2 5 2 において育成して、多数のかかる細胞として倍増させ得る。これに関わらず、したがって、方法 1 0 0 では、捕捉物体 1 0 0 2 を個々に取り除き、および、したがって、捕捉物体 1 0 0 2 によって囲い 2 5 2 から核酸材料を捕捉し、デバイス 2 0 0 から捕捉物体 1 0 0 2 を搬出し、捕捉物体 1 0 0 2 をデバイス 2 0 0 における他の位置において格納し、またはデバイス 2 0 0 における捕捉物体 1 0 0 2 をさらに処理でき得る。

【 0 1 0 4 】

言及されたように、各捕捉物体 1 0 0 2 は、各捕捉物体 1 0 0 2 上の核酸材料と、核酸材料が由来する細胞 5 0 2 とを相関させるのを促進し得る、一意的な識別子 1 0 0 6 を有し得る。例えば、制御モジュール 2 3 0 は、捕捉物体 1 0 0 2 の一意的な識別子 1 0 0 6 の各々のデジタル記録、および各捕捉物体 1 0 0 2 のための捕捉物体 1 0 0 2 によって捕捉された核酸材料に関する情報を維持（例えば、メモリ 2 3 4 において格納される）するようにプログラムされ得る。例えば、コントローラ 2 3 0 は、特定の捕捉物体 1 0 0 2 の一意的な識別子 1 1 0 6 に関連する以下の情報のいずれもメモリ 2 3 4 において格納し得、かかる情報は：核酸材料が捕捉された特定の囲い 2 5 2 の識別、核酸材料が捕捉された細胞 5 0 2 の特徴、捕捉された核酸材料の種類、核酸材料が捕捉された方法の条件、および/または同様のものである。上記に記載されたようにプログラムされるコントローラ 2 3 0 は、捕捉物体と、各捕捉物体によって捕捉された核酸材料に関するデータとの相関を格納するための手段の例であり得る。

【 0 1 0 5 】

事実、図 2 A の制御モジュール 2 3 0 は、制御するように構成され得（例えば、ソフトウェア、ファームウェア、マイクロコードまたは同様のもの；実配線；または同様のもの）、または、方法 1 0 0 のいくつか、ほとんど、または全てをヒトのオペレータによって制御されるように提供し得る。例えば、制御モジュール 2 3 0 は、上記のいずれの方法における方法 1 0 0 のステップ 1 0 2 ~ 1 1 0 のいずれかまたは全てを実行するためのマニピュレータ 2 2 2、検出器 2 2 4、流量コントローラ 2 2 6、および/または出力機構 2 2 8 の操作を制御するように構成され得る。

【 0 1 0 6 】

図 1 に示された方法 1 0 0、および図 5 ~ 1 3 において図説された方法 1 0 0 の操作は、例に過ぎず、変形が考えられる。例えば、ステップ 1 0 2 ~ 1 1 0 の 1 または 2 以上は、図 1 に示されるものと異なる順序において実施され得る。別の例として、ステップ 1 0 2 ~ 1 1 0 の全てが実施される必要はなく、したがって、方法 1 0 0 は、ステップ 1 0 2 ~ 1 1 0 の全てより少ないステップを含み得る。さらに別の例として、ステップ 1 0 2 ~ 1 1 0 に追加したステップが実施され得る。例えば、捕捉物体 1 0 0 2 の 1 または 2 以上を洗浄するなど、1 または 2 以上の洗浄ステップが、ステップ 1 0 2 ~ 1 1 0 のいずれかの前、間または後で、実施されてもよい。

【 0 1 0 7 】

方法 1 0 0 は上記のように 1 つの細胞 5 0 2 だけを囲い 2 5 2 に置き、および各囲い 2 5 2 において単一の細胞 5 0 2 からのみ核酸材料を抽出および捕捉するように図説および記載されているが、さらに別の例として、方法 1 0 0 は、代替的に多数の細胞 5 0 2 を囲い 2 5 2 に置いて、囲い 2 5 2 における多数の細胞から核酸材料を抽出および捕捉し得る。さらに別の例として、個々の細胞 5 0 2 が囲い 2 5 2 において置かれ、細胞 5 0 2 の 1 または 2 以上から核酸材料を抽出および捕捉する前に、育成して多数の細胞に倍増することを可能にし、育成され溶解される。溶解されなかった追加的な細胞 5 0 2 は、溶解細胞 7 0 2 の生存後代（living progeny）として囲い 2 5 2 から搬出され得る。

【 0 1 0 8 】

図 1 4 は、生体細胞から核酸材料を抽出および捕捉するための別の例の方法 1 4 0 0 を図説する。分かるように、方法 1 4 0 0 では、選択されたクローン細胞をクローン細胞集団から単離囲い中へ移動し得、ここで、方法 1 4 0 0 では、クローン細胞を溶解し、および細胞から解放された核酸材料を囲いにおいて捕捉物体で捕捉でき得る。方法ではまた、

かかる捕捉物体と、捕捉物体によって核酸が捕捉されたクローン細胞が取得されたクローン細胞集団とを相関させる相関記録を格納し得る。

【0109】

図15は、方法1400がその上で実施され得るマイクロ流体デバイス1500の例の上部断面図を示す。デバイス1500は、デバイス1500が選択部212ではなく培養部1512を含み得ることを除いて、概してデバイス200（例えば、図3、4A、4B、7および8のいずれにおいて図示された、いずれの変形を含む図2A～2Cにおいて図示されたような）と同様であり得る。示されるように、培養部1512において培養囲い1552（2つが示されるが、それ以上またはそれ以下であり得る）が存在し得る。培養囲い1552以外にも、培養囲い1512は、本明細書において図示または記載されたいずれの変形を含む図2A～2Cの選択部212と概して同一または類似であり得る。

10

【0110】

培養囲い1552の例が、図15において図説される。示されるように、各培養囲い1552は、概して単離囲い252に類似し得る。例えば、培養囲い1552は、内側空間1556、およびチャネル240から内側空間1556への開口1558を画定する筐体1554を含み得る。筐体1554、内側空間1556、および開口1558は、それぞれ、図2A～2Cのデバイス200の筐体254、内側空間256、および内側空間256（本明細書において図示または記載されたいずれの変形も含む）と概して類似し得る。例えば、筐体1554は、筐体254に関して上記で触れた材料のいずれも含み得る。

【0111】

20

別の例として、各単離囲い1552の開口1558は、囲い1552における液体媒体244と、囲い1552の開口1558で流出する液体媒体244との自然交換を可能にするために寸法決めおよび位置づけられ得る。そうでなければ、しかし、筐体1554は、1つの培養囲い1552の内側空間1556における生体細胞、細胞、または物体と、別の培養囲い1552のいずれかの内側空間1556におけるかかる生体細胞、細胞、または物体との混合を防ぐように、培養囲い1552の内側空間1556を十分に囲い得る。

【0112】

図5において図説された培養囲い1552の数、パターンおよび構成は、例であって、変形が可能である。例えば、各培養囲い1552は、代わりに図3において図説された囲い352の様であり得る。

30

【0113】

概して図15に図示されるように、クローン細胞1504の集団（colony）は、培養囲い1552の1または2以上において培養され得る。図15の例において、クローン細胞1502aの第1集団1504aは、第1培養囲い1552aにおいて培養され、およびクローン細胞1502bの第2集団1504bは、第2培養囲い1552bにおいて培養される。言及されたように、2つ以上の培養囲い1552があり得、クローン細胞1502の異なる集団1504が、いずれかの数の培養囲い1552の各々において培養され得る。

【0114】

40

各かかる集団1504は、親細胞を囲い252中に置き、親細胞が囲い1552において娘細胞を作り出すことを可能にすることによって、培養囲い1552の1つにおいて生成され得る。例えば、親細胞および結果として生じる娘細胞は、チャネル240における媒体244の培養囲い1552の開口1558で流出する流れにおいて栄養塩類の流れを提供することによって、囲い1552において培養され得る。例えば、開口1558を通じた媒体244の拡散によって、かかる栄養塩類は囲い1552中に流れ、および細胞廃棄物は囲い1552中の外へ流れ得る。

【0115】

したがって、特定の培養囲い1552における細胞1502の全ては、囲い1552中に置かれた親細胞、および親細胞によってまたはから作り出された娘細胞からのみで成り

50

得る。したがって、例えば、第1培養囲い1552aにおける第1集団1504aにおける細胞1502aの全ては、親細胞または親細胞の後代のどちらかであり得る。したがって、第1集団1504aは、クローン集団であり得、第1集団1504aの細胞1502aの全ては、クローン細胞であり得る。同様に、第2培養囲い1552bにおける第2集団1504bにおける細胞1502bの全ては、親細胞または親細胞の後代のどちらかであり得る。したがって、第2集団1504bは、クローン集団であり得、第2集団1504bの細胞1502bの全ては、クローン細胞であり得る。

【0116】

図14を参照して、方法1400では、ステップ1402でデバイス1500における培養囲い1552における集団1504から個々のクローン細胞1502を選択し得、方法1400では、ステップ1404で選択された個々のクローン細胞1502をデバイス1500の単離部214における単離囲い252中へ移動し得る。図15は、例を図示する。図15において示されるように、第1集団1504aからの単一の、個々の細胞1502aは、第1培養囲い1552aにおいて選択され、および1502aをそこから単離囲い252aの第1の1つへ移動し得る。ある態様において、デバイス1500の単離部214は、OEW用に構成され得、第1集団1504aからの個々の細胞1502aの移動は、オイル媒体において個々の細胞1502aを含有する水性の媒体の小滴を生成すること、および小滴を単離囲い252a中に移動することを含み得る。

【0117】

先に言及されたように、単離囲い252は、溶解囲いの例であり得る。同様に、第2集団1504bからの単一の、個々の細胞1502bは、第2培養囲い1552bにおいて選択され得、およびそこから単離囲い252bの第2の1つに移動され得る。言及されたように、2つ以上のかかる培養囲い1552が存在し得、したがって、クローン細胞集団1504からのクローン細胞1502は、単離囲い252の複数（例えば、すべて）において置かれ得る。例えば、1つおよび1つだけのクローン細胞1502が、複数の単離囲い252の各々において置かれ得り、各かかるクローン細胞1502が、異なる培養囲い1552における異なるクローン細胞集団1504からであり得る。代替的に、1以上のクローン細胞1502が、単離囲い252において置かれ得るが、いずれか1つの単離囲い252において置かれたクローン細胞1502の全てが、同じクローン細胞集団1504からであり得る。

【0118】

各クローン細胞1502は、その細胞集団1504からランダムに、または図2のステップ102に関して上記で検討された選択基準のいずれかを使用して選択され得る。クローン細胞1502は、ステップ104に関して上記で検討された方法のいずれかにおいて、培養囲い1552において選択、およびそこから移動され得る。例えば、各クローン細胞1552は、図6に関して上記で検討されたように生み出されおよび操縦され得る、光トラップ602の様な光トラップ（図15には示されず）で捕えられ得る。

【0119】

代替的または追加的に、クローン細胞1502を含有する水性の媒体の小滴を生成するためにOEWが使用され得る。さらに他の代替において、細胞集団1504は、デバイス1500の外側に位置づけられ得、集団1504からの個々のクローン細胞1502は、デバイス1500中に取り込まれ得る（例えば、入口208を通して）。したがって、ステップ1402は、方法1400からスキップまたは排除され得る。一度デバイス1500中に取り込まれると、クローン細胞1502は、単離囲い252中で選択および移動され得る（例えば、概して図5および6に示されるように）。

【0120】

これに関わらず、ステップ1402および/または1404の後、1または2以上のクローン細胞1502は、デバイス1500の複数の単離囲い252の各々にあり、各囲い252における1または2以上のクローン細胞1502は、同じクローン集団1504からであり得る。分かるように、したがって、細胞1502は、ステップ1406で溶解さ

10

20

30

40

50

れ得、溶解細胞 1 5 0 2 から解放された核酸材料は、ステップ 1 4 0 8 で捕捉され得る。以下で検討されるように、ステップ 1 4 0 6 および 1 4 0 8 は、概して図 1 のステップ 1 0 6 および 1 0 8 の様に実施され得る。

【 0 1 2 1 】

例えば、ステップ 1 4 0 6 で、単離囲い 2 5 2 における細胞 1 5 0 2 は、溶解細胞（図 1 5 においては示されず）を作り出すために溶解され得る。細胞 1 5 0 2 は、単離囲い 2 5 2 における細胞 5 0 2 を溶解するためのステップ 1 0 6 に関して上記で検討されたいずれかの方法において、単離囲い 2 5 2 において溶解され得る。例えば、1 または 2 以上の細胞 1 5 0 2 は、図 7 または図 8 で図示されたように、もしくは上記で検討された代替案のいずれかにおいて、単離囲い 2 5 2 において溶解され得る。ステップ 1 4 0 6 での溶解は、概して図 7、8 および 1 2 A ~ 1 2 D において図示されたように、細胞 1 5 0 2 の膜の 1 または 2 以上のいずれかを溶解することを含み得る。概して、図 9 および図 1 2 A ~ 1 2 D に図示されるように、ステップ 1 5 0 2 の溶解では、細胞 1 5 0 2 から単離囲い 2 5 2 の内側空間 2 5 6 中へ核酸材料を解放し得る。

10

【 0 1 2 2 】

ステップ 1 4 0 8 では、ステップ 1 4 0 6 で溶解された細胞 1 5 0 2 からの核酸材料の 1 または 2 以上の種類は、囲い 2 5 2 における 1 または 2 以上の捕捉物体 1 0 0 2 で捕捉され得る。ステップ 1 4 0 8 は、ステップ 1 0 8 が本明細書で図示および検討されたようないずれかの变形を含んで実施されるように、同様の方法で実施され得る。例えば、溶解細胞 1 5 0 2 から解放された核酸材料の 1 または 2 以上の特定の種類は、ステップ 1 0 8 に関して上記で検討されたように、囲い 2 5 2 における 1 または 2 以上の捕捉物体 1 0 0 2 で、単離囲い 2 5 2 において捕捉され得る。

20

【 0 1 2 3 】

方法 1 4 0 0 では、ステップ 1 4 1 0 で、単離囲い 2 5 2 における各捕捉物体 1 0 0 2 と、捕捉物体 1 0 0 2 によって捕捉された核酸材料が由来する細胞 1 5 0 2 のクローン細胞集団 1 5 0 4 とを相関する相関記録を生成および / または維持でき得る。例えば、単離囲い 2 5 2 における各捕捉物体 1 0 0 2 のために、相関記録は、捕捉物体 1 0 0 2 の一意的な識別子（例えば、図 1 で示された識別子 1 1 0 6）と、その核酸材料が捕捉物体 1 0 0 2 によって捕捉された細胞 1 5 0 2 に対する以下の情報のいずれかとを相関し得、該情報は：そこから細胞 1 5 0 2 が取得されたクローン細胞集団 1 5 0 4 の識別情報（例えば、培養囲い 1 5 5 2 などの位置）、細胞 1 5 0 2 の 1 または 2 以上の特徴、および / または同様のものである。

30

【 0 1 2 4 】

図 1 5 は、第 1 細胞集団 1 5 0 4 a からの第 1 細胞 1 5 0 2 a を伴う、第 1 単離囲い 2 5 2 a における第 1 捕捉物体 1 0 0 2 a を示す。ステップ 1 4 0 6 で第 1 細胞 1 5 0 2 a が溶解された後、したがって、第 1 細胞 1 5 0 2 a から解放された核酸材料を捕捉し得る。同様に、第 2 単離囲い 2 5 2 b における第 2 捕捉物体 1 0 0 2 b は、第 2 細胞 1 5 0 2 b が溶解された後に解放された核酸材料を捕捉し得る。したがって、図 1 0 のステップ 1 4 1 0 で生成された相関記録は、第 1 細胞集団 1 5 0 4 a および / またはその培養囲い 1 5 5 2 a の識別と相関された第 1 捕捉物体 1 0 0 2 a の一意的な識別子を含み得、相関記録はまた、第 2 細胞集団 1 5 0 4 a および / またはその培養囲い 1 5 5 2 b の識別と相関された第 2 捕捉物体 1 0 0 2 b の一意的な識別子を含み得る。いくつかの態様において、制御モジュール 2 3 0 は、かかる相関記録を生成、格納（例えば、メモリ 2 3 4 において）および維持（例えば、アップデート）するようにプログラムされ得る（例えば、機械可読の命令（例えば、ソフトウェア、ファームウェアまたはマイクロコード）および / または実配線回路で）。

40

【 0 1 2 5 】

方法 1 4 0 0 では、ステップ 1 4 1 2 で、捕捉物体、および、したがって捕捉物体によって捕捉された核酸材料の 1 または 2 以上を単離囲い 2 5 2 の 1 または 2 以上から取り除き得る。ステップ 1 4 1 2 は、本明細書で図示または検討されたいずれかの变形を含む、

50

概して図1のステップ110の様に実施され得る。

【0126】

方法1400は、例に過ぎず、変形が考えられた。例えば、ステップ1402～1412の1または2以上は、図14に示されるものと異なる順序において実施され得る。別の例として、ステップ1402～1412の全てが実施される必要はなく、したがって、方法1400は、ステップ1402～1412の全てより少ないステップを含み得る。さらに別の例として、ステップ1402～1412に追加したステップが実施され得る。例えば、捕捉物体の1または2以上を洗浄するなど、1または2以上の洗浄ステップが、ステップ1402～1412のいずれかの前、間または後で、実施されてもよい。本発明の特定の態様および応用が本明細書において記載されているが、これらの態様は例に過ぎず、多くの変形が可能である。

10

【0127】

例

例1：囲いにおける細胞溶解

マイクロ流体デバイスの単離囲いにおける細胞溶解をテストするために、単離囲い中に細胞が注入され、溶解バッファはデバイスを通して流れ、細胞溶解は、Calcein AM染色を使用して監視された。この溶解バッファは、以下のようである：

【0128】

RNase阻害剤：2ユニット/マイクロリットル

塩化ナトリウム：0.135M；

トリス塩酸（pH8.0）：9mM；

（DTT）4.5mMおよび

SDS：1%

20

【0129】

図16A～Dにおいて示されるように、囲い（図16A）中に注入された細胞は、溶解バッファを注入した後のt=0分でCalcein AMを使用して検出可能である（図16B）。溶解バッファを注入した後のt=5分で、細胞は、まだ大部分が無傷であるが溶解を開始している（図16C）。溶解バッファを注入した後のt=10分で、細胞は、細胞溶解が完了している（図16D）。

【0130】

当業者によって理解されるように、前述の溶解バッファの成分のいずれも、同等のバッファ、塩、およびキレート剤と交換できる。

30

【0131】

例2：結合条件

マイクロ流体デバイスの単離囲いにおける細胞の溶解（例えば、例1において記載されているように）に続いて、マイクロ流体デバイスを通して結合バッファを流すことによって標的核酸の捕捉物体への結合が実施され得る一方で、捕捉物体は、細胞溶解物の存在下にある。結合バッファは、以下のようであり得る：

トリス塩酸（pH7.5）：20mM；

塩化リチウム：1.0M；および

EDTA：2mM

40

【0132】

当業者によって理解されるように、結合バッファの成分のいずれも、同等のバッファ、塩、およびキレート剤と交換できる。

【0133】

例3：組み合わせ溶解/結合バッファ

分離溶解および結合バッファの使用の代替案として、細胞溶解および核酸捕捉は、組み合わせ溶解/結合バッファを使用して達成可能である。したがって、細胞は、マイクロ流体デバイスにおける単離囲い中へ注入されることができ、組み合わせ溶解/結合バッファは、細胞溶解を達成するのに十分な時間、デバイスを通して流され得る。組み合わせ溶解

50

/ 結合バッファは、溶解される細胞に隣接して捕捉物体が配置される前、実質的に同時、または後に流され得る。

トリス塩酸 (pH 7 . 5) : 1 0 0 m M ;

塩化リチウム : 5 0 0 m M ;

E D T A : 1 0 m M ;

L i D S : 1 % ; および

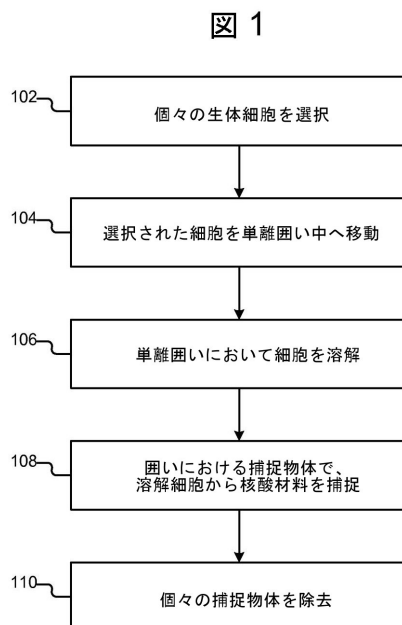
D T T : 5 m M

【 0 1 3 4 】

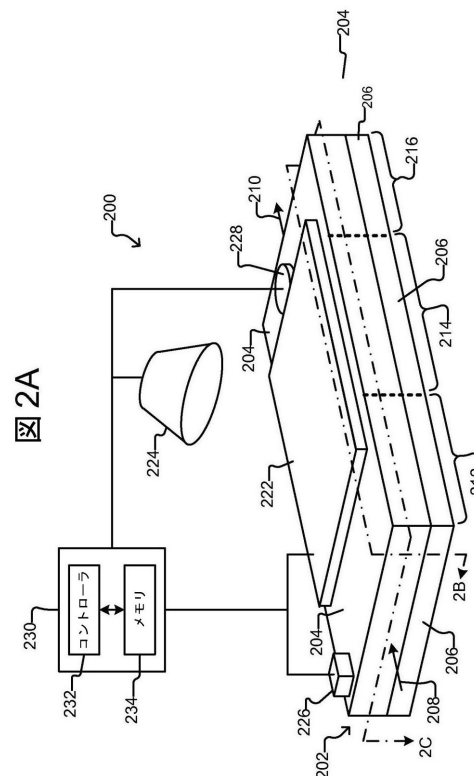
当業者によって理解されるように、前述の組み合わせ溶解 / 結合バッファの成分のいずれかは、同等のバッファ、塩、およびキレート剤と交換できる。

10

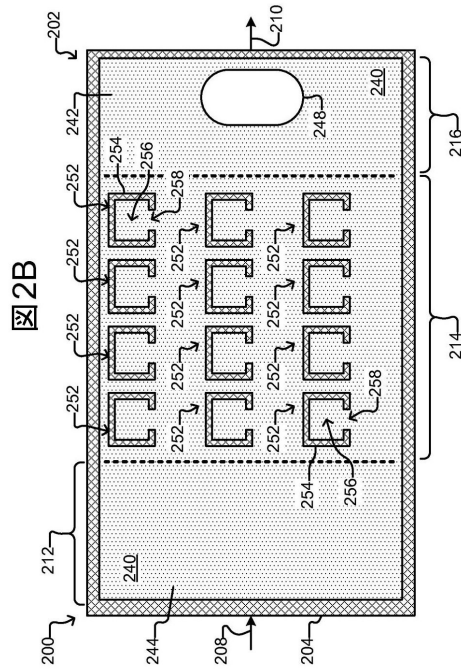
【 図 1 】



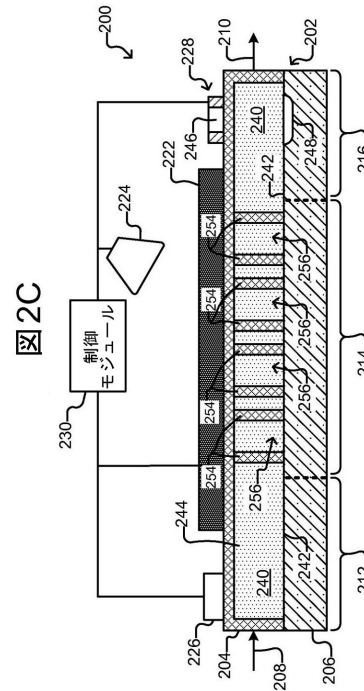
【 図 2 A 】



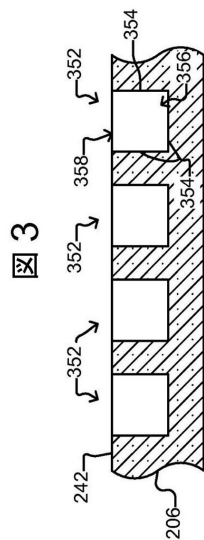
【図 2 B】



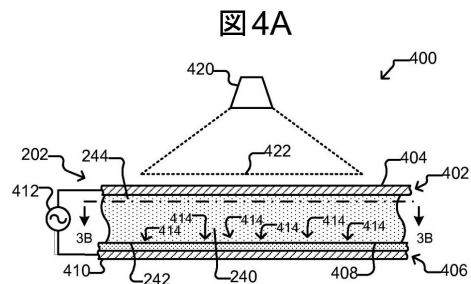
【図 2 C】



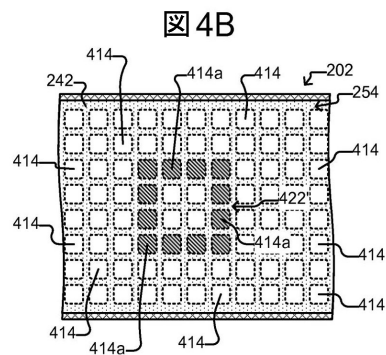
【図 3】



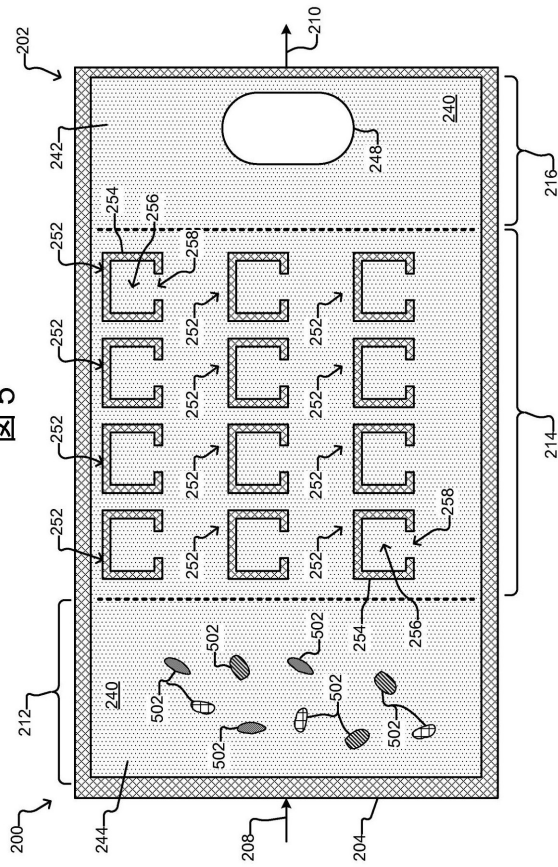
【図 4 A】



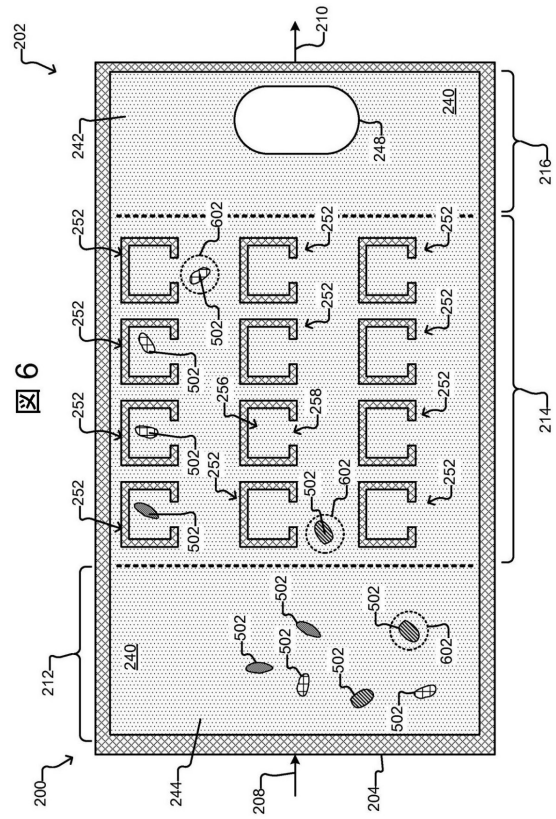
【図 4 B】



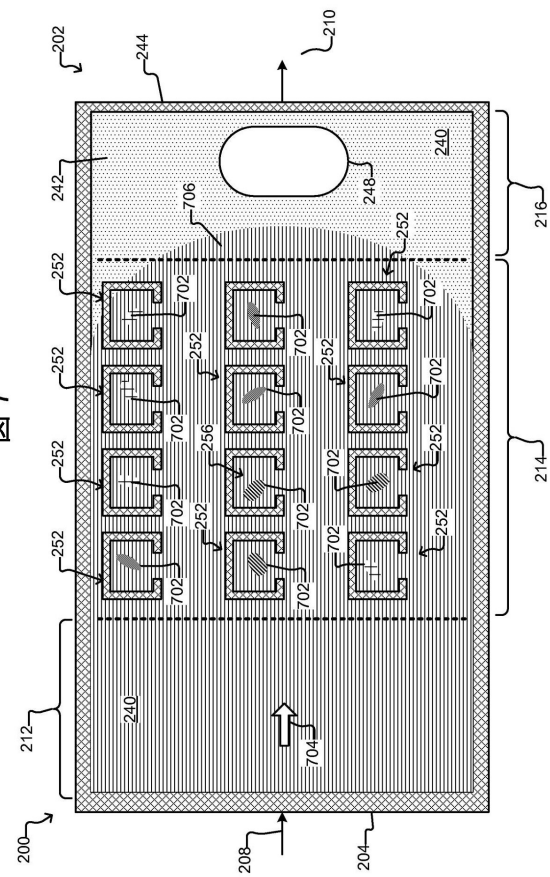
【 図 5 】



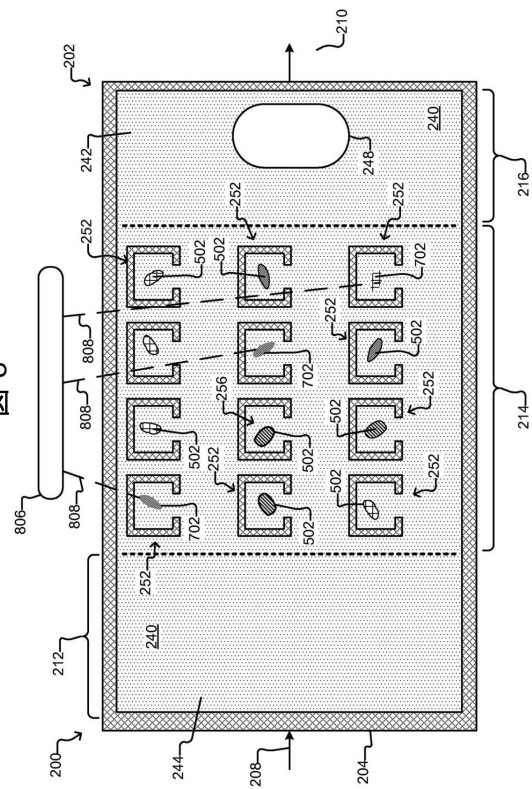
【 図 6 】



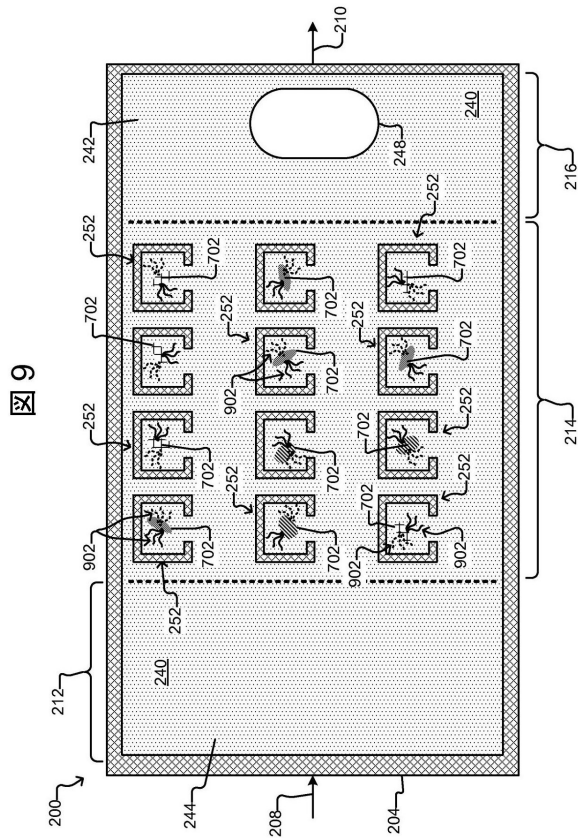
【圖 7】



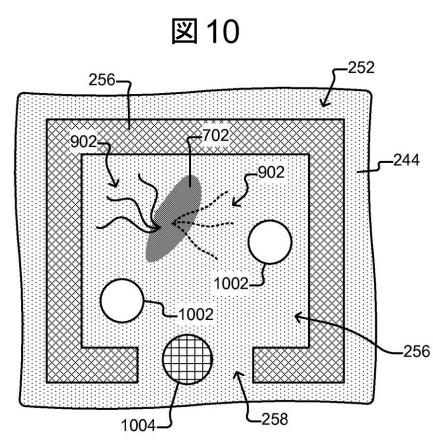
【 図 8 】



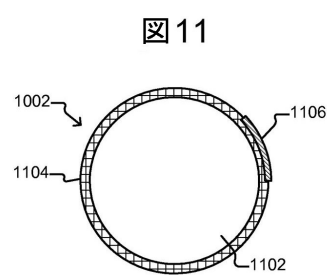
【図 9】



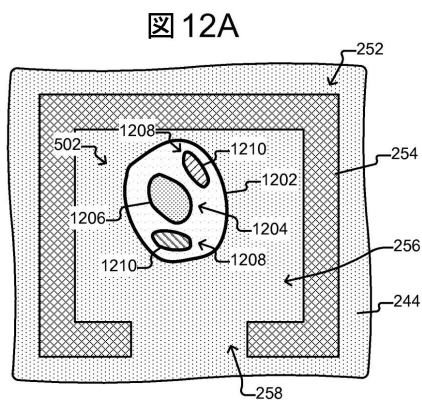
【図 10】



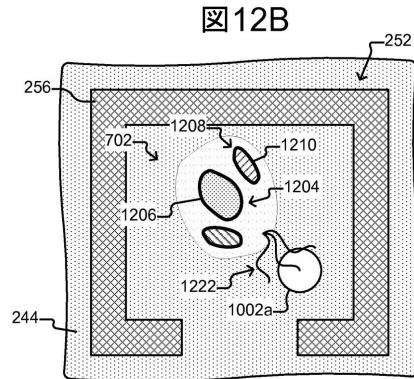
【図 11】



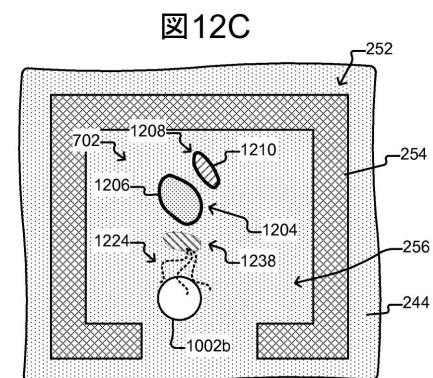
【図 12 A】



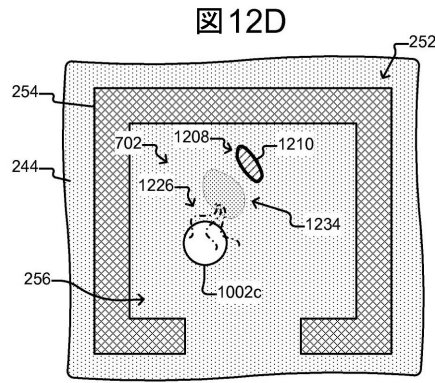
【図 12 B】



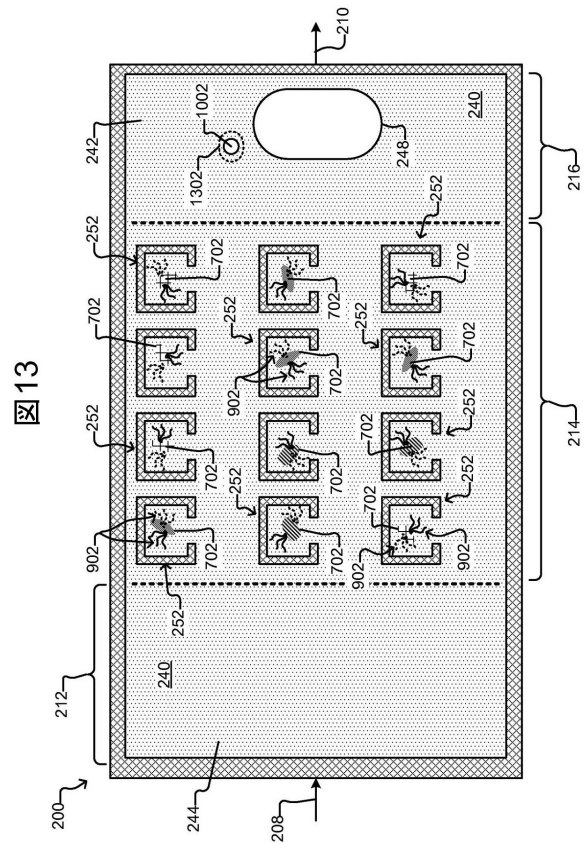
【図 12 C】



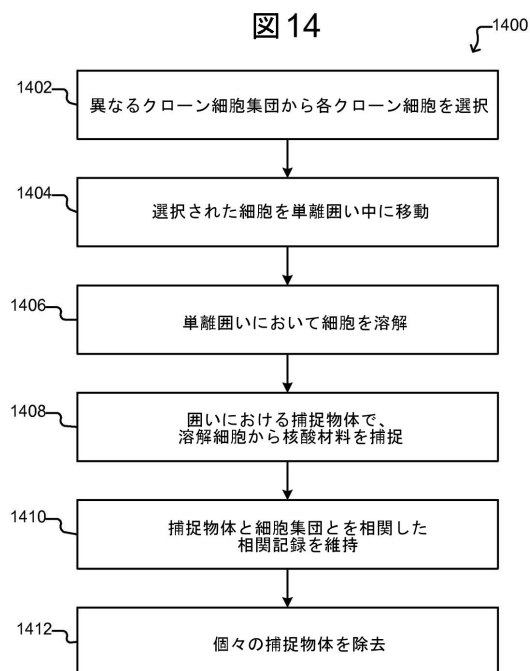
【図12D】



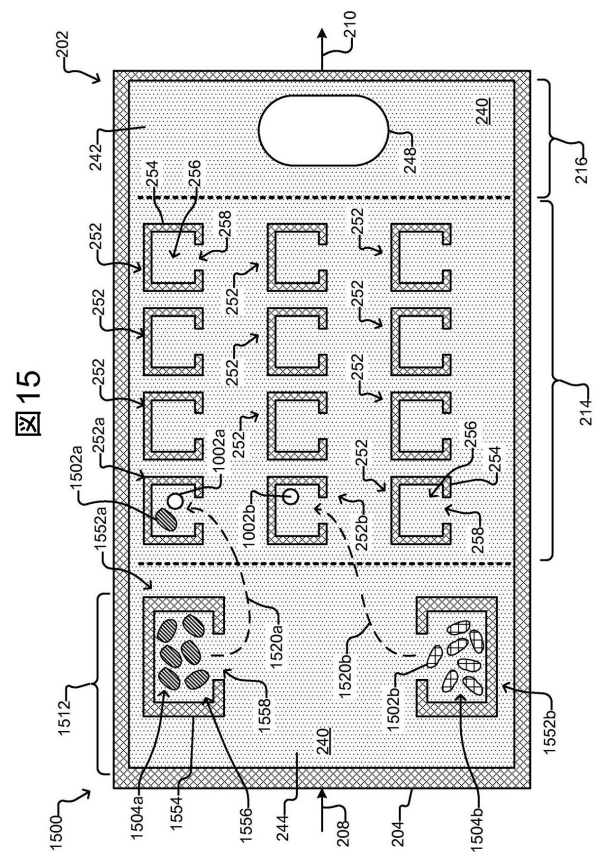
【図13】



【図14】

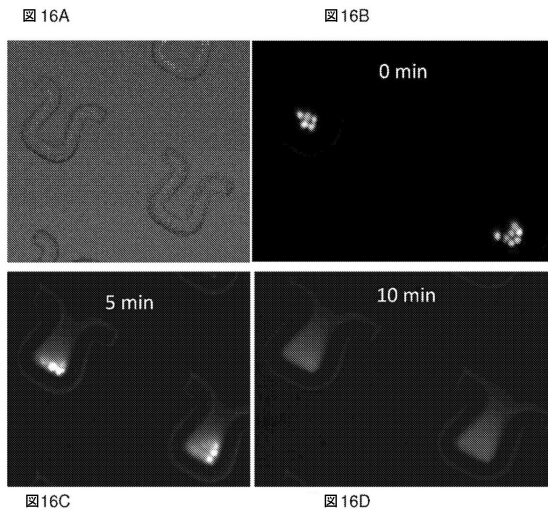


【図15】



【図 16】

図 16



フロントページの続き

- (72)発明者 チャプマン, ケヴィン ティー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94608、エメリービル、ホールトン ストリート 58
58、スイート 320
- (72)発明者 ホップズ, エリック ティー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94608、エメリービル、ホールトン ストリート 58
58、スイート 320
- (72)発明者 ショート, スティーヴン ダブリュ .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94608、エメリービル、ホールトン ストリート 58
58、スイート 320
- (72)発明者 ホワイト, マーク ピー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94608、エメリービル、ホールトン ストリート 58
58、スイート 320
- (72)発明者 マレオ, ダニエレ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94608、エメリービル、ホールトン ストリート 58
58、スイート 320

審査官 金田 康平

- (56)参考文献 国際公開第2013/130714(WO, A1)
特表2007-537729(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00 - 15/90

C12M 1/00 - 3/10

C12Q 1/00 - 3/00

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI(STN)