

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-541347
(P2013-541347A)

(43) 公表日 平成25年11月14日(2013.11.14)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2013-537769 (P2013-537769)
(86) (22) 出願日 平成23年11月1日 (2011.11.1)
(85) 翻訳文提出日 平成25年6月28日 (2013.6.28)
(86) 国際出願番号 PCT/US2011/058854
(87) 国際公開番号 W02012/061442
(87) 国際公開日 平成24年5月10日 (2012.5.10)
(31) 優先権主張番号 12/976,827
(32) 優先日 平成22年12月22日 (2010.12.22)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 61/409,106
(32) 優先日 平成22年11月1日 (2010.11.1)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

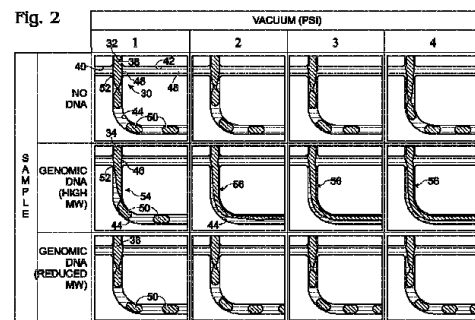
(71) 出願人 504121623
バイオラッド・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州、ハーキユレス、アルフレッド・ノーベル・ドライブ 1000
(74) 代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人 100064908
弁理士 志賀 正武
(74) 代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人 100110364
弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液滴中の断片化ゲノムDNAの分析

(57) 【要約】

ゲノムDNAを分析する方法。標的を含むゲノムDNAを入手してもよい。ゲノムDNAを意図的に断片化して、断片化DNAを生成してもよい。断片化DNAを液滴形成部を通過させて、断片化DNAを含む水性液滴を形成してもよい。液滴に対してアッセイを実施して、標的のレベルを測定してもよい。一部の実施形態において、液滴は、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度でゲノムDNAを含んでもよく、液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成されてもよく、液滴は、各液滴の平均体積が約10ナノリットル未満であってもよく、液滴は、約50ナノリットル/秒を超える流速で形成されてもよく、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的を含むゲノムDNAを入手するステップ;

前記ゲノムDNAを意志的に断片化して、断片化DNAを生成するステップ;

前記断片化DNAを少なくとも1つの液滴形成部を通過させて、前記断片化DNAを含む水性液滴を形成するステップ;および

前記液滴に対してデジタルアッセイを実施して、前記標的のレベルを測定するステップを含む、ゲノムDNAを分析する方法。

【請求項 2】

前記液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記液滴は、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度で前記ゲノムDNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、前記液滴は、前記液滴形成部を通る前記水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満であり、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度で前記ゲノムDNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満であり、前記ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、前記液滴は、前記液滴形成部を通る前記水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記液滴は、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度で前記ゲノムDNAを含み、前記ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、前記液滴は、前記液滴形成部を通る前記水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、前記液滴は、前記液滴形成部を通る前記水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、請求項6に記載の方法。

【請求項 10】

前記液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、請求項6に記載の方法。

【請求項 11】

前記液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、請求項7に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、請求項8に記載の方法。

【請求項 13】

前記液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満である、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記断片化ステップは、前記ゲノムDNAを制限酵素で消化するステップを含む、請求項1に記載の方法。

50

- 【請求項 15】
前記制限酵素は、前記ゲノムDNAを1キロベースあたり平均約1回未満、切断する、請求項14に記載の方法。
- 【請求項 16】
前記断片化ステップは、前記ゲノムDNAを剪断するステップを含む、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 17】
前記断片化ステップは、前記ゲノムDNAを超音波処理するステップを含む、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 18】 10
前記液滴は、1液滴あたり平均約2コピー未満の前記標的を含む、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 19】
前記液滴は、1液滴あたり平均約2ゲノム当量未満の前記ゲノムDNAを含む、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 20】
前記断片化ステップは、前記標的を実質的に破壊しない、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 21】 20
前記デジタルアッセイを実施するステップは、前記液滴中の前記標的を増幅するステップを含む、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 22】
前記標的は、PCRによって増幅される、請求項21に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記デジタルアッセイを実施するステップは、前記液滴から蛍光を検出するステップを含む、請求項21に記載の方法。
- 【請求項 24】
前記デジタルアッセイを実施するステップは、ポアソナルゴリズムを用いて前記標的のレベルを測定するステップを含む、請求項21から23のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 25】 30
前記液滴は、平均体積が約0.1~10ナノリットルである、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 26】
少なくとも約5ng/マイクロリットルの濃度でDNAを含むサンプルを入手するステップ；
前記DNAを意志的に断片化して、断片化DNAを生成するステップ；および
前記サンプルを液滴形成部を通過させて、前記断片化DNAを含む水性液滴を形成するステップであって、前記液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成され、平均体積が約10ナノリットル未満であるステップ
を含む、DNAを含む水性サンプルを液滴に分割する方法。
- 【請求項 27】 40
ゲノムDNAを含むサンプルを入手するステップ；
前記DNAを意志的に断片化して、断片化DNAを生成するステップ；および
前記サンプルを液滴形成部を通過させて、前記断片化DNAを含む水性液滴を形成するステップであって、前記液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成され、平均体積が約10ナノリットル未満であるステップ
を含む、DNAを含む水性サンプルを液滴に分割する方法であって、
前記ゲノムDNAは、前記通過させるステップが前記DNAを断片化せずに同条件下で実施される場合に液滴形成を妨げる濃度である、方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】 50
優先出願の相互参照

本出願は、以下の先の出願の優先権を主張するものである：2010年11月1日に出願された米国仮特許出願第61/409,106号および2010年12月22日に出願され、2011年9月8日に米国特許出願公開第2011/0217712(A1)号として公開された米国特許出願第12/976,827号。この両特許出願の内容全体を、あらゆる目的において参照によって本明細書に組み込んだものとする。

【0002】

他の参考文献の相互参照

本出願は、あらゆる目的において参照によって以下の文献を本明細書に組み込んだものとする：2006年5月9日に発行された米国特許第7,041,481号、2010年7月8日に公開された米国特許出願公開第2010/0173394(A1)号、2011年9月29日に公開されたPCT国際公開第W02011/120024号およびJoseph R. Lakowicz, PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY(第2版、1999年)。

10

【背景技術】

【0003】

緒言

多くの生物医学的適用は、標的核酸についてのサンプルのハイスループットアッセイに依存している。例えば、研究および臨床分野の適用では、標的特異的な試薬を使用したハイスループット遺伝子検査により、特に、薬物の発見、バイオマーカーの発見および臨床診断法のための正確で高精度な標的核酸の定量化が可能である。

【0004】

20

エマルジョンは、標的のハイスループットアッセイに大きな変革をもたらす多大な期待を有する。乳化技術により、生化学的反応のための独立した反応容器として機能する多くの水性液滴を作り出すことが可能である。例えば、水性サンプル(例えば、20マイクロリットル)を複数の液滴(例えば、それぞれが1ナノリットルの20,000の液滴)に分割することが可能であり、これにより、それぞれの液滴を用いて標的に対する個々の試験を行うことができる。

【0005】

水性液滴をオイル中に懸濁させて油中水滴型エマルジョン(W/O)を作り出すことが可能である。界面活性剤によりエマルジョンを安定化することによって加熱、冷却および移動の間に液滴同士が凝集するのを低減することができ、これにより熱サイクルを行うことが可能になる。したがって、エマルジョンは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して、液滴中で標的核酸分子の単一コピーの増幅を行うために使用されてきた。液滴中の個々の標的分子の存在を検出する性能によってデジタルアッセイが可能になる。

30

【0006】

例示的な液滴ベースのデジタルアッセイでは、サンプルは、標的の限界希釈で一組の液滴に分割される(すなわち、一部の液滴は、標的の分子を含まない)。標的分子が液滴間でランダムに分配される場合、液滴中にある標的の所定の平均濃度に基づいて、液滴中に厳密に0、1、2、3個またはそれ以上の標的分子が見つかる確率がポアソン分布によって示される。反対に、液滴中(したがって、サンプル中)の標的分子の濃度は、液滴中に所定の数の分子が見つかる確率から算出してもよい。

40

【0007】

標的分子が見つからない確率と1つまたは複数の標的分子が見つかる確率の推定値は、デジタルアッセイにおいて測定されてもよい。2値アプローチ(binary approach)では、各液滴を試験して、液滴がポジティブ、ゆえに少なくとも1つの標的分子を含むか、または液滴がネガティブ、ゆえに標的分子を含まないかを求めてもよい。液滴中に標的分子が見つからない確率は、試験した液滴のネガティブであるフラクション(「ネガティブフラクション」)によって、少なくとも1つの標的分子が見つかる確率は、試験した液滴のポジティブであるフラクション(「ポジティブフラクション」)によって概算することができる。ポジティブフラクションまたはネガティブフラクションの値は、その後、液滴中の標的濃度を算出するためのポアソナルゴリズム(Poisson algorithm)に利用することができ

50

る。他の場合には、デジタルアッセイは、2 値より多いデータを生成してもよい。例えば、アッセイでは、ネガティブ(0)またはポジティブ(>0)より大きい分解能で各液滴中に標的分子がいくつ存在するかを評価してもよい(例えば、0、1または>1分子;0、1、2または>2分子など)。

【0008】

さまざまなサンプルの液滴ベースのDNAアッセイがハイスループットと正確さとを併せ持つためには、液滴は、速やかに均等な大きさ(すなわち、単分散の液滴)で形成される必要がある。しかしながら、特に、液滴形成頻度が高い場合に、液滴がバルクサンプル相から分離する能力をサンプル構成成分が妨げることがある。結果的に、形成される液滴の大きさあるいは液滴を形成する能力さえもサンプル毎に変化してアッセイの信頼度が低下する可能性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国仮特許出願第61/409,106号

【特許文献2】米国特許出願第12/976,827号

【特許文献3】米国特許第7,041,481号

【特許文献4】米国特許出願公開第2010/0173394(A1)号

【特許文献5】PCT国際公開第WO2011/120024号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Joseph R. Lakowicz, PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY(第2版、1999年)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

高い形成頻度で、確実に一貫した液滴形成を提供する新しいアプローチが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本開示は、ゲノムDNAを分析する方法を提供する。標的を含むゲノムDNAを入手してもよい。ゲノムDNAを意志的に断片化して、断片化DNAを生成してもよい。断片化DNAを液滴形成部(droplet generator)を通過させて、断片化DNAを含む水性液滴を形成してもよい。液滴に対してデジタルアッセイが実施して、標的のレベルを測定してもよい。一部の実施形態において、液滴は、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度でゲノムDNAを含んでもよく、液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度(droplet generation frequency)で形成されてもよく、液滴は、各液滴の平均体積が約10ナノリットル未満であってもよく、液滴は、約50ナノリットル/秒を超えるサンプル流速で形成されてもよく、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本開示の態様に従ったゲノムDNA分析の例示的な方法を示すフローチャートである。

【図2】3つの異なるサンプルを4つの異なる駆動圧のそれぞれにおいて処理している液滴形成部の写真から作製されたマトリックス図である。

【図3】ゲノムDNAを含まない、あるいは消化(EcoRI)または未消化のゲノムDNA(RajiもしくはCoriell)を含むサンプルについて液滴形成頻度の関数としてグラフ化した液滴の体積のグラフである。

【図4】図3の各サンプルについてサンプル流速の関数としてグラフ化した液滴の体積のグラフである。

10

20

30

40

50

【図5】図3の各サンプルについて液滴形成頻度の関数としてグラフ化した最大伸長のグラフである。

【図6】図3の各サンプルについてサンプル流速の関数としてグラフ化した最大伸長のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本開示は、ゲノムDNAを分析する方法を提供する。標的を含むゲノムDNAを入手してもよい。ゲノムDNAを意志的に断片化して、断片化DNAを生成してもよい。断片化DNAを液滴形成部を通過させて、断片化DNAを含む水性液滴を形成してもよい。液滴に対してアッセイを実施して、標的のレベルを測定してもよい。一部の実施形態において、液滴は、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度でゲノムDNAを含んでもよく、液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成されてもよく、液滴は、各液滴の平均体積が約10ナノリットル未満であってもよく、液滴は、約50ナノリットル/秒を超える流速で形成されてもよく、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。

10

【0015】

本明細書中で開示されるように、液滴中のゲノムDNAを分析する方法は、その他の液滴ベースのアプローチに比べて相当の利点がある。その利点としては、頻度が高い、単分散性が高い、DNAの含有量が多い、かつ/または実質的にゲノムDNAからの干渉が少ない状態で液滴を形成することが挙げられる。

【0016】

上記およびその他の本開示の態様については、以下のセクション:(I)ゲノムDNA分析の例示的な方法についての概要、(II)液滴形成試験の例示的なデータおよび(III)選択された実施形態に記載される。

20

【0017】

1. ゲノムDNA分析の例示的な方法についての概要

図1は、ゲノムDNA分析の例示的な方法20を図示したフローチャートを示している。提示されるステップは、任意の適当な順序で任意の適当な組み合わせで行われてもよい。

【0018】

ゲノムDNAを入手してもよく、これを22とする。DNAは、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、サルなど)、非哺乳脊椎動物、無脊椎動物、酵母菌もしくは真菌、植物、原生動物、細菌などの任意の適当な生物から入手してもよい。DNAは、商業的に購入する、寄贈品として受け取る、細胞または体液からの抽出によって得る、臨床サンプルとして受け取るなどの任意の適当な方法によって入手してもよい。DNAは、比較的高分子量の状態で入手してもよく、例えば、特に、分子量が少なくとも約 10^4 、 10^5 または 10^6 キログルトン(例えば、平均長さが少なくとも約25、50、100、200、500または1,000キロベース)である。

30

【0019】

液滴の形成前にゲノムDNAを断片化してもよく、これを24とする。断片化は、意志的な行為、すなわち、故意に行われてもよい。断片化には、一般に、DNA鎖を切断(cutting)またはブレイク(breaking)することなどによってゲノムDNAの分子量を実質的に減少させる任意の手順が含まれる。断片化により、平均分子量および/または長さを、特に、少なくとも約5、10、20、50または100分の1など任意の適当な量に減少させてもよい。ゲノムDNAを断片化する例示的なアプローチとしては、制限酵素(例えば、特に、4、5、6または8ヌクレオチドの認識部位を有する酵素)による消化が挙げられる。標的は、標的分子のいかなる切断も避けるために制限酵素の認識部位を含まなくてもよい。制限酵素消化は、完全に行われても、または部分消化であってもよい。その代わりに、またはそれに加えて、ゲノムDNAの水性サンプルは、加熱してDNAを断片化してもよい。DNAを断片化する典型的な加熱は、特に、少なくとも95の温度で、少なくとも約10、15、20または30分間行ってもよい。他の場合には、DNAは、剪断、超音波処理、噴霧、放射線照射などによって断片化してもよい。

40

50

【0020】

ゲノムDNAは、標的、一般に試験対象の配列を含んでいてもよい。ゲノムDNAの断片化は、標的を実質的に破壊することなく行われてもよく、これは、断片化の工程によって破壊された(例えば、ブレイクまたは切断)ゲノムDNAの標的配列が半分未満であることを意味する。

【0021】

断片化DNAを含む液滴を形成してもよく、これを26とする。1つまたは複数の液滴形成部のそれぞれにより連続的に液滴を形成してもよい。断片化DNAを少なくとも1つの液滴形成部を通過させて、液滴を形成してもよい。一般に、断片化DNAは、水性サンプル中に入れられ、水性サンプルおよび非混和性の連続相は液滴形成部を通過して断片化DNAを含む水性液滴が形成され、それが連続相中に入る。適当な場合もある液滴形成部およびエマルジョン相のさらなる態様は、相互参照において先に列挙した文献に記載されており、それらの文献を参照によって本明細書に組み込んだものとし、特に、2010年7月8日に公開された米国特許出願公開第2010/0173394(A1)号および2011年9月29日に公開されたPCT国際公開第WO2011/120024号である。

10

【0022】

液滴は、任意の適当な大きさであってよい。例えば、液滴の平均体積は、特に、約1 μ L、100nL、10nL、1nL、100pL、10pLまたは1pL未満であってよい。代わりに、あるいはさらに、液滴の平均体積は、特に、約10fL、100fL、1pL、10pLまたは100pL超であってよい。ある場合には、液滴の平均体積は、特に、約1pLから100nL、1pLから10nLまたは0.1から10nLであってよい。液滴は、単分散であってよい。

20

【0023】

液滴は、任意の適当な濃度の断片化DNAを含んでもよい。例えば、断片化DNAは、特に、少なくとも約0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50ng/Lの濃度で液滴中に入れられてもよい。ある場合には、濃度は、約0.1~50または0.2~20ng/Lであってよい。DNAを断片化することにより、液滴中に組み込まれるDNAの含有量をさらに多くできる。断片化DNAは、1液滴あたり平均約2ゲノム当量未満で存在してもよい。標的は、1液滴あたり平均約2分子未満で存在してもよい。

【0024】

液滴は、特に、少なくとも約10、20、50、100、200、500または1,000Hz(液滴/秒)などの任意の適当な液滴形成頻度で形成されてもよい。一般に、液滴形成頻度は、形成されている液滴の大きさに反比例し、小さな液滴ほど液滴形成頻度を高くできる。

30

【0025】

液滴を形成するために使用される(断片化DNAを含む)水性サンプルは、任意の適当な流速で液滴形成部を通過させ、かつ/または液滴に変換してもよい。適している場合もある例示的な流速として、特に、少なくとも約1、5、10、20、50、100、200、500、1,000、5,000または10,000nL/秒が挙げられる。一般に、サンプル流速は、形成されている液滴の大きさに直接関係し、大きな液滴ほど速い流速が可能になる。

【0026】

例示的な液滴の体積、DNA濃度、液滴形成頻度および流速についての値(または範囲)は、上で挙げた(1つまたは複数の)任意の適当な組み合わせで組み合わせられてもよい。

40

【0027】

液滴に対してアッセイを実施してもよく、これを28とする。アッセイは、各液滴中の個々の標的分子を検出するデジタルアッセイであってよい。デジタルアッセイには、特に、PCRまたはリガーゼ連鎖反応によるものなどの標的分子の増幅が含まれてもよい。デジタルアッセイには、液滴からの蛍光の検出も含まれてよい。アッセイは、さらにポアソナルアルゴリズムを用いた各液滴中の標的のレベル(例えば、濃度)の測定を含んでもよい。

【0028】

II. 液滴形成試験の例示的なデータ

このセクションでは、断片化したまたは断片化していないゲノムDNAを含む液滴形成試

50

験の代表的なデータを提示する。図2~6を参照のこと。

【0029】

マイクロ流体デバイスにおける液滴の形成は、サンプルが液滴形成部に移動する流速および液滴が形成される頻度に依存する場合もある。速い流速では、サンプル流が非混和性の連続相中に噴出し(jet into)、液滴を形成することができない場合もある。噴出限界(jetting limit)に近い形成速度では、液滴が形成される前にサンプルが排出流路の下に向かって伸長し始める。伸長する長さは、一連の形成条件が噴出限界にどれほど近いかを調べるために使用できる。

【0030】

図2は、4つの異なる駆動圧、したがって流速のそれぞれにおいて3つの異なる水性サンプル32~36を処理している液滴形成部30の写真から作製されたマトリックス図を示している。3つのサンプルは、(a) DNAを含まない対照サンプル32(鋳型を含まないPCR緩衝液)、(b)未消化で、高分子量(MW)であるヒトゲノムDNA(Raji、18.75ng/L)の水性サンプル34および(c)制限酵素によって消化され、分子量が減少したヒトゲノムDNA(Raji、18.75ng/L)の水性サンプル36である。4つの駆動圧(1、2、3および4)は、液滴形成部の下流にかけられる負の圧力(減圧)であり、ポンド/平方インチ(psi)で表わされ、1psiが約6.9キロパスカルに相当する。減圧のレベルにより、サンプル流速、全体の流速および液滴形成頻度を制御してもよい。

10

【0031】

液滴形成部30は、サンプル注入流路38、少なくとも1つまたは1組のオイル注入流路40、42および排出流路44からなる流路ネットワークによって形成されてもよい。注入流路38は、水性サンプル32、34または36のバルク水相46を液滴形成部に送る。注入流路40、42は、連続相48(例えば、オイルと界面活性剤)を液滴形成部に送る。排出流路44は、流路交差部52から連続相48に液滴50を送る。

20

【0032】

上の列は、ゲノムDNAを含まない対照サンプル32の液滴形成を示す。液滴50はおよそ1nLであり、異なる減圧レベルでも大きさがあまり変化していない。

【0033】

真ん中の列は、未消化のゲノムDNAを含むサンプル34を用いた液滴形成を示す。ゲノムDNAが液滴形成を大幅に低下させており、試験された最も低い減圧レベル(1 psi)でのみ液滴形成が起こっている。最も低いレベルでも、流路交差部52を通過したバルク水相46は、54の矢印で示される通りかなり伸長しており、液滴50も大きい。さらに高い減圧レベル(例えば、1psiを2~4psiと比較する)および流速では、サンプルの流れが、56の矢印で示される通り液滴に分裂することなく排出流路44に急速に流れ込むため液滴が形成されない。したがって、ヒトゲノムDNAが存在すると、液滴形成が大幅に妨げられる可能性があり、低いDNA濃度、遅い流速および低い液滴形成頻度を使用する必要がある場合もある。結果として、サンプルの処理が大幅に遅くなることもある。また、エマルジョン中の標的を含む液滴の出現率が実質的に低下する場合もあり(DNA濃度が低いため)、測定される標的レベルについて同じ信頼度を達成するためにはより多くの液滴を分析する必要があるであろう。

30

40

【0034】

下の列は、サンプル34と同じゲノムDNA濃度(単位体積当たりの質量)を含むがDNAが制限酵素で短いフラグメントに消化された後のものであるサンプル36を用いた液滴形成を示している。ここで示されている圧力(および流速)では、断片化された状態のゲノムDNAは、確認できるほど液滴の形成を低下させていない。このサンプルは、DNAが含まれていない対照サンプル32と同様の液滴50を生成する。

【0035】

液滴形成中の、形成減圧、サンプル流速、液滴形成頻度、排出流路における速度、液滴の大きさおよび最大のサンプル伸長の間の関係を定量的に評価するためにさらに研究を行った。使用した水性サンプルは、Spectral Dye Buffer(図2のものと同じ対照サンプルで

50

あるが、DNAポリメラーゼを含まない)、RajiヒトゲノムDNA(Loftstrand Laboratories)(「Raji」)および19205ヒトDNA(Coriell Institute)(「Coriell」)とした。DNAサンプルは、未消化か、または制限酵素EcoRIで消化したもののいずれかとした。20U/ μ Lの濃度のEcoRI(New England Biolabs)のNEB #4緩衝液溶液を用いて、最終濃度が200ng/ μ LのゲノムDNAでDNAの消化を行った。その混合物を37℃で1時間インキュベートし、その後、さまざまな最終濃度に希釈した。

【0036】

図3~6のグラフは、Master Mix(DNAを含まない)、EcoRIで消化した18.75ng/ μ LのRaji DNA、EcoRIで消化した18.75ng/ μ LのCoriell 19205 DNA、未消化の18.75ng/ μ LのRaji DNAおよび未消化の18.75ng/ μ LのCoriell 19205 DNAのサンプルを用いて行われた液滴形成実験の結果を示している。図3は、各サンプルについて液滴形成頻度の関数としてグラフ化した液滴の体積のグラフを示している。図4は、各サンプルについてサンプル流速の関数としてグラフ化した液滴の体積のグラフを示している。図5は、各サンプルについて液滴形成頻度の関数としてグラフ化した最大伸長のグラフを示している。図6は、図3の各サンプルについてサンプル流速の関数としてグラフ化した最大伸長のグラフを示している。

【0037】

未消化のヒトゲノムDNAについては、噴出(jetting)が起こるまでには、非常に低い液滴形成頻度または非常に遅いサンプル流速のみが可能であった。例えば、Coriell 19205 DNAについては、最大で60Hzおよび83nL/秒であった。Raji DNAについては、最大で120Hzおよび162nL/秒であった。しかしながら、こうした限界より低くても、形成された液滴の体積はDNAを含まないものよりも大きく、サンプルが排出流路にずっと長く伸長した状態で液滴が形成された。

【0038】

これらのグラフは、同じ濃度の消化されたDNAでは、液滴形成に対するDNAの影響は認められなかったことも示している。試験されたあらゆる流速または形成頻度においても、噴出または長いサンプルの伸長は観察されず、液滴の体積は、DNAを含まないサンプルと同じである。

【0039】

これらの結果は、未消化のヒトDNAの存在下では液滴形成が大幅に阻害されるが、制限酵素による消化後には阻害されないことを示している。

【0040】

III. 選択された実施形態

このセクションでは、本開示の選択された実施形態について一連の見出しをつけた段落として記載する。これらの実施形態は、本開示の全範囲を限定するものではない。

【0041】

A. (i) 標的を含むゲノムDNAを入手するステップ;(ii) 該ゲノムDNAを意志的に断片化して、断片化DNAを生成するステップ;(iii) 該断片化DNAを少なくとも1つの液滴形成部を通過させて、該断片化DNAを含む水性液滴を形成するステップ;および(iv) 該液滴に対してデジタルアッセイを実施して、該標的のレベルを測定するステップを含む、ゲノムDNAを分析する方法。

【0042】

B. 該液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満である、段落Aに記載の方法。

【0043】

C. 該液滴は、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度で該ゲノムDNAを含む、段落Aに記載の方法。

【0044】

D. 該ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、該液滴は、該液滴形成部を通る該水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、段落Aに記載の方法。

【0045】

E. 該液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、段落AからDのいず

10

20

30

40

50

れかに記載の方法。

【 0 0 4 6 】

F. 該液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満であり、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度で該ゲノムDNAを含む、段落Aに記載の方法。

【 0 0 4 7 】

G. 該液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満であり、該ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、該液滴は、該液滴形成部を通る該水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、段落Aに記載の方法。

【 0 0 4 8 】

H. 該液滴は、少なくとも約5ナノグラム/マイクロリットルの濃度で該ゲノムDNAを含み、該ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、該液滴は、該液滴形成部を通る該水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、段落Aに記載の方法。

10

【 0 0 4 9 】

I. 該ゲノムDNAは、水性サンプル中に入れられ、該液滴は、該液滴形成部を通る該水性サンプルの流速が約50ナノリットル/秒を超える流速で形成される、段落Fに記載の方法。

【 0 0 5 0 】

J. 該液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、段落Fに記載の方法。

【 0 0 5 1 】

K. 該液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、段落Gに記載の方法。

20

【 0 0 5 2 】

L. 該液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成される、段落Hに記載の方法。

【 0 0 5 3 】

M. 該液滴は、平均体積が約10ナノリットル未満である、段落Lに記載の方法。

【 0 0 5 4 】

N. 該断片化ステップは、該ゲノムDNAを制限酵素で消化するステップを含む、段落AからMのいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 5 】

O. 該制限酵素は、該ゲノムDNAを1キロベースあたり平均約1回未満、切断する、段落Nに記載の方法。

30

【 0 0 5 6 】

P. 該断片化ステップは、該ゲノムDNAを剪断するステップを含む、段落AからMのいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 7 】

Q. 該断片化ステップは、該ゲノムDNAを超音波処理するステップを含む、段落AからMのいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 8 】

R. 該液滴は、1液滴あたり平均約2コピー未満の該標的を含む、段落AからQのいずれかに記載の方法。

40

【 0 0 5 9 】

S. 該液滴は、1液滴あたり平均約2ゲノム当量未満の該ゲノムDNAを含む、段落AからRのいずれかに記載の方法。

【 0 0 6 0 】

T. 該断片化ステップは、該標的を実質的に破壊しない、段落AからSのいずれかに記載の方法。

【 0 0 6 1 】

U. 該デジタルアッセイを実施するステップは、該液滴中の該標的を増幅するステップを含む、段落AからTのいずれかに記載の方法。

50

【0062】

V. 該標的は、PCRによって増幅される、段落Uに記載の方法。

【0063】

W. 該デジタルアッセイを実施するステップは、該液滴の蛍光を検出するステップを含む、段落AからVのいずれかに記載の方法。

【0064】

X. 該デジタルアッセイを実施するステップは、ポアソナルゴリズムを用いて該標的のレベルを測定するステップを含む、段落AからWのいずれかに記載の方法。

【0065】

Y. 該液滴は、平均体積が約0.1~10ナノリットルである、段落AからXのいずれかに記載の方法。

10

【0066】

Z. (i) 少なくとも約5ng/マイクロリットルの濃度でDNAを含むサンプルを入手するステップ;(ii) 該DNAを意志的に断片化して、断片化DNAを生成するステップ;および(iii) 該サンプルを液滴形成部を通過させて、該断片化DNAを含む水性液滴を形成するステップであって、該液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成され、平均体積が約10ナノリットル未満であるステップを含む、DNAを含む水性サンプルを液滴に分割する方法。

【0067】

A1. (i) ゲノムDNAを含むサンプルを入手するステップ;(ii) 該DNAを意志的に断片化して断片化DNAを生成するステップ;および(iii) 該サンプルを液滴形成部を通過させて、該断片化DNAを含む水性液滴を形成するステップであって、該液滴は、少なくとも約50液滴/秒の液滴形成頻度で形成され、平均体積が約10ナノリットル未満であるステップを含む、DNAを含む水性サンプルを液滴に分割する方法であって、該ゲノムDNAは、該通過させるステップが該ゲノムDNAを用いて該DNAを断片化せずに同条件下で実施される場合に液滴形成を妨げる濃度である、方法。

20

【0068】

上記の開示は、独立して有用性をもつ複数の異なる発明を含むこともある。こうした発明をそれぞれ、好適な(1つまたは複数の)形態で開示したが、本明細書中で開示され、例示されたそれらの特定の形態は、数々の変形物が可能であるため限定の意味で考えるべきではない。本発明の主題には、本明細書中で開示されるさまざまな要素、特徴、機能および/または特性の新規で自明のものではないあらゆる組み合わせならびにサブコンビネーションが含まれる。添付の特許請求の範囲では、特に新規で自明のものではないとされる特定の組み合わせおよびサブコンビネーションを指し示す。特徴、機能、要素および/または特性のその他の組み合わせならびにサブコンビネーションで具現化される発明が、本出願または関連出願の優先権を主張する出願において特許請求されることもある。そのような請求項は、異なる発明または同じ発明を対象としようが、もとの請求項に対して広い、狭い、同等または異なる範囲であろうが、それらもまた本開示の発明の主題の範囲内に含まれると見なされる。さらに、特定の要素に対して第1、第2または第3などの順序を表わす表示が各要素を区別する目的で使用されているが、具体的に明記されている場合を除いて、それらの要素の特定の位置または順序を示すものではない。

30

40

【符号の説明】

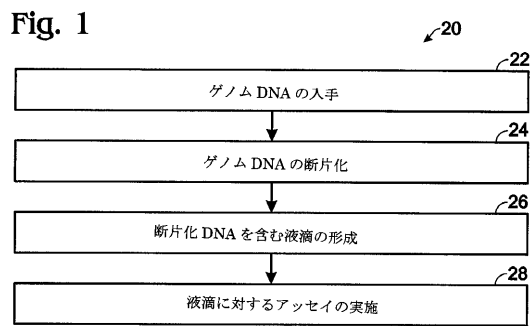
【0069】

- 30 液滴形成部
- 32 サンプル
- 34 サンプル
- 36 サンプル
- 38 サンプル注入流路
- 40 オイル注入流路
- 42 オイル注入流路
- 44 排出流路

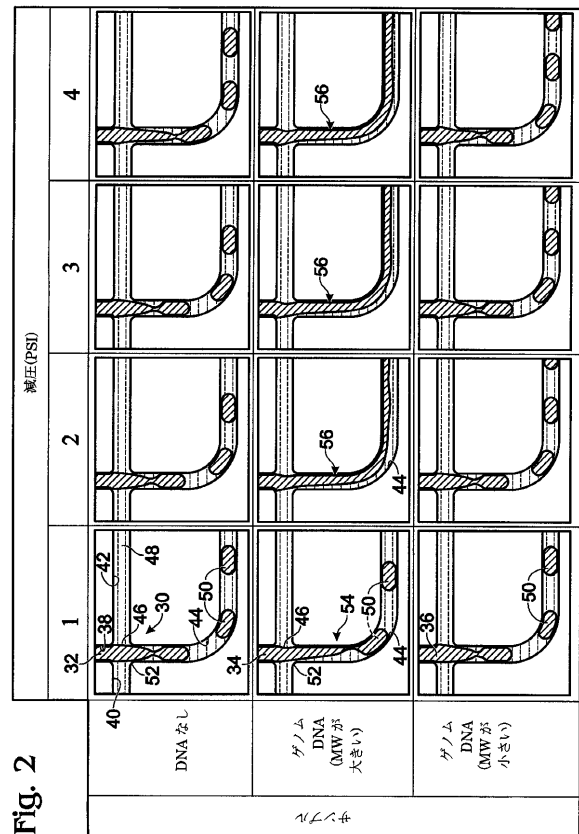
50

- 46 バルク水相
- 48 連続相
- 50 液滴
- 52 流路交差部

【 図 1 】

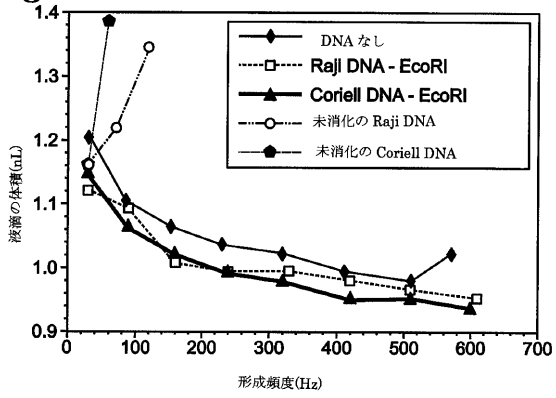


【 図 2 】



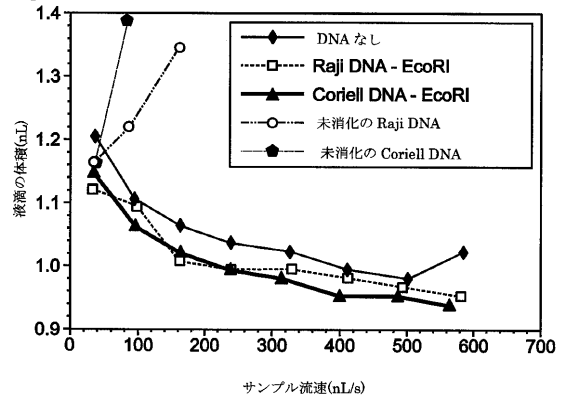
【 図 3 】

Fig. 3



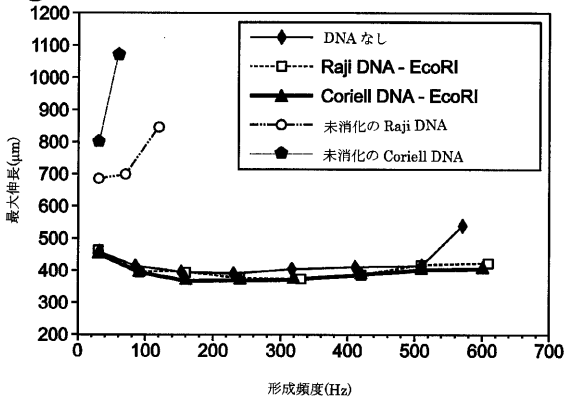
【 図 4 】

Fig. 4



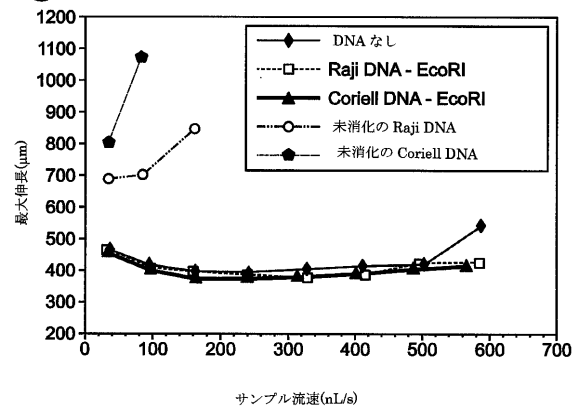
【 図 5 】

Fig. 5



【 図 6 】

Fig. 6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/58854
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8)- C12Q1/68 (2012.01) USPC - 435/6.11 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12Q1/68 (2012.01) USPC: 435/6.11 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST, Google Scholar: nanogram\$2, microliter\$2, DNA, target\$2, droplet\$2, fragment\$2, volitional\$4, digital, assay, PCR, concentration\$2, volume, nanoliter\$2, target\$2, microdroplet\$2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0137163 A1 (LINK et al.) 03 June 2010 (03.06.2010); para [0036], [0038], [0060], [0075], [0114], [0210], [0229], [0230], [0231], [0311], [0325]	1, 18-23
Y		2-17, 24-27
Y	US 2005/0277125 A1 (BENN et al.) 15 December 2005 (15.12.2005); para [0085], [0193]	2-3, 6-13, 25-27
Y	US 2010/0173394 A1 (COLSTON, JR et al.) 08 July 2010 (08.07.2010); para [0149], [0564], [0565]	4-5, 7-8, 11-13
Y	US 2010/0069263 A1 (SHENDURE et al.) 18 March 2010 (18.03.2010); para [0028], [0075], [0136]	14-17
Y	US 5,555,191 A (HRIPCSK) 10 September 1996 (10.09.1996); col 12, ln 8-14	24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 February 2012 (09.02.2012)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">01 MAR 2012</div>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpline: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

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

(72)発明者 ケヴィン・ディー・ニス

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94566・プレザントン・バーナル・アヴェニュー・489
4・#ジェー

(72)発明者 エイミー・エル・ヒデッセン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・95377・トレーシー・レミントン・ウェイ・2663

(72)発明者 ポール・ダブリュー・ワイアット

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94566・プレザントン・ヴィア・デ・ロス・ミラグロス・
2416

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ42 QR08 QR14 QR32 QR42 QR50 QR62 QR66
QS25 QS28 QS36 QS39 QX02