(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4982387号
(P4982387)
(45)発行日　平成24年7月25日(2012.7.25)　(24)登録日　平成24年4月27日(2012.4.27)

(51)Int.Cl.		F I		
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04	ZNA
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 25　(全 51 頁)

(21)出願番号　特願2007-556351 (P2007-556351)
(86)(22)出願日　平成18年2月17日 (2006.2.17)
(65)公表番号　特表2008-529555 (P2008-529555A)
(43)公表日　平成20年8月7日 (2008.8.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/005780
(87)国際公開番号　WO2006/089192
(87)国際公開日　平成18年8月24日 (2006.8.24)
審査請求日　平成20年11月14日 (2008.11.14)
(31)優先権主張番号　60/653,978
(32)優先日　平成17年2月18日 (2005.2.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　507028217
キヤノン　ユー．エス．　ライフ　サイエンシズ，　インコーポレイテッド
ＣＡＮＯＮ　Ｕ．Ｓ．　ＬＩＦＥ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　メリーランド州　２０８５０，ロックビル，スイート　Ａ－１００，メデイカル　センター　ドライブ　９８００
９８００　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　Ｄｒｉｖｅ　Ｓｕｉｔｅ　Ａ－１００　Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ　２０８５０　Ｕ．Ｓ．Ａ．
(74)代理人　100094112
弁理士　岡部　讓

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微生物のゲノムＤＮＡを同定するデバイスおよび方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１つの吸引部と、
流体を連続的に流すための少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、
前記少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路の加熱およびまたは前記インライン反応流路内の流体運動のための少なくとも１つの金属トレースと、を備え、
前記少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路は、
（１）試薬集合領域と、
（２）複数の低温領域と、複数の高温領域と、前記複数の低温領域および前記複数の高温領域の間の温度を持つ複数の温度領域と、を制御するように構成されている第１温度制御領域内の増幅領域と、
（３）複数の低温領域と、複数の高温領域と、前記複数の低温領域および前記複数の高温領域の間の温度を持つ複数の温度領域とを制御するように構成されている、１つ以上の温度で検出することが可能な、第２温度制御領域内の検出領域と、
を流れ抜けることを特徴とするミクロ流体デバイス。
【請求項２】
前記少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路が、検出領域の下流にバルブをさらに備えることを特徴とする請求項１に記載のミクロ流体デバイス。
【請求項３】

少なくとも１つの吸引部と、
流体を連続的に流すための少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、
前記ミクロ流体のインライン反応流路の加熱およびまたは前記インライン反応流路内の流体運動のための少なくとも１つの金属トレースと、を備え、
前記少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路は、
試薬集合領域と、
増幅領域と、
検出領域と、を流れ抜け、
前記少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路は、前記検出領域の下流にバルブを更に備えており、
前記バルブは、選択のために収集されたデータに基づいて、前記少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路内の前記流体の流れを選択的に第１方向から第２方向に切り替えることを特徴とするミクロ流体デバイス。
【請求項４】
請求項１に記載の前記ミクロ流体デバイス内の流体運動と、前記ミクロ流体デバイスの加熱および冷却と、前記ミクロ流体デバイスからのデータ収集とを制御する機器であって、
前記機器と前記ミクロ流体デバイスとを接続するカートリッジを備えることを特徴とする機器。
【請求項５】
請求項３に記載の前記ミクロ流体デバイス内の流体運動と、前記ミクロ流体デバイスの加熱および冷却と、前記ミクロ流体デバイスからのデータ収集とを制御する機器であって、
前記機器と前記ミクロ流体デバイスとを接続するカートリッジを備えることを特徴とする機器。
【請求項６】
請求項３に記載の前記ミクロ流体デバイスと、
前記ミクロ流体デバイス内の流体運動と、前記ミクロ流体デバイスの加熱および冷却と、前記ミクロ流体デバイスからのデータ収集とを制御する機器と、
を備えることを特徴とする装置。
【請求項７】
前記機器と前記ミクロ流体デバイスとを接続するカートリッジをさらに備える事を特徴とする請求項６に記載の装置。
【請求項８】
サンプル中の微生物を決定する方法であって、
（ａ）前記サンプルを取得する工程と、
（ｂ）前記サンプル中に前記微生物が存在する場合は、前記微生物のゲノムＤＮＡの少なくとも１コピーを単離する工程と、
（ｃ）ＳＧＰプライマーと、ヌクレオチドと、ＤＮＡポリメラーゼと、挿入剤とを含む第１混合物を前記微生物のゲノムＤＮＡに導入して第２混合物を形成する工程と、
（ｄ）前記第２混合物を第１温度に加熱して、前記ゲノムＤＮＡが存在する場合は前記ゲノムＤＮＡを第１および第２ゲノムテンプレートＤＮＡに変性させる工程と、
（ｅ）前記第２混合物を第２温度に冷却して、前記プライマーが各ゲノムテンプレートＤＮＡにアニーリングする工程と、
（ｆ）前記第１温度と前記第２温度の間の温度である第３温度まで前記第２混合物を再加熱し、前記プライマーが前記ゲノムＤＮＡにアニーリングすることを可能にし、前記ＤＮＡポリメラーゼが前記アニーリングされたプライマーから生じる核酸ポリマーを伸長する工程と、
（ｇ）前記第３温度を第１時間の長さだけ維持する工程と、

（ｈ）工程（ｄ）～（ｇ）を少なくとも１回繰り返す工程と、
（ｉ）工程（ｄ）～（ｆ）を繰り返す工程と、
（ｊ）前記第３温度を前記第１時間の４０～６０％の長さである第２時間だけ維持する工程と、
（ｋ）前記第２混合物を前記第２温度以下の温度である第４温度まで再度冷却して、挿入剤を含む高次構造の形成を可能にさせる工程と、
（ｌ）前記形成した高次構造を検出する工程と、
（ｍ）融解温度分析を行う工程と、
（ｎ）波形プロファイルを検出する工程と、
（ｏ）前記サンプルが前記微生物を含んむ場合に、前記サンプルから正の波形プロファイルを特定する工程と、
を有し、
少なくとも工程（ｃ）～（ｍ）は、請求項６に記載の前記装置内で起こることを特徴とする方法。
【請求項９】
前記第３温度が前記第１時間の長さの５０％である第２の長さの時間だけ維持されることを特徴とする請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
工程（ｄ）～（ｇ）が、工程（ｈ）で繰り返される回数が２０～５０回であることを特徴とする請求項８に記載の方法。
【請求項１１】
工程（ｄ）～（ｇ）が、工程（ｈ）で繰り返される回数が２２～２４回であることを特徴とする請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
工程（ｉ）～（ｊ）を、工程（ｋ）の前に一回以上繰り返す工程を更に有することを特徴とする請求項８に記載の方法。
【請求項１３】
サンプル中に微生物が存在するか存在しないかを検出するための方法であって、
（ａ）前記サンプルを取得する工程と、
（ｂ）前記サンプル中に前記微生物が存在する場合は、前記微生物のゲノムＤＮＡの少なくとも１コピーを単離する工程と、
（ｃ）少なくとも一滴のサンプルをミクロ流体の反応流路に吸引する工程と、
（ｄ）前記少なくとも一滴のサンプルを、少なくとも１つのプライマーとヌクレオチドとＤＮＡポリメラーゼと挿入剤とを含む増幅試薬を有するプライマープラグと混合させることによって、少なくとも１つのサンプルプラグを形成する工程と、
（ｅ）前記少なくとも１つのサンプルプラグを第１温度に加熱して、前記ゲノムＤＮＡが存在する場合に前記ゲノムＤＮＡの各コピーが第１および第２のゲノムテンプレートＤＮＡに変性する工程と、
（ｆ）前記少なくとも１つのサンプルプラグを第２温度に冷却して、前記プライマーが各ゲノムテンプレートＤＮＡにアニーリングする工程と、
（ｇ）前記第１温度と前記第２温度の間の温度である第３温度に再度加熱し、（１）前記プライマーが前記ゲノムＤＮＡにアニーリングされ続けて（２）前記アニーリングされたプライマーから生じる核酸ポリマーを伸長させることを可能にする工程と、
（ｈ）前記第３温度を第１の長さの時間だけ維持する工程と、
（ｉ）工程（ｅ）～（ｈ）を少なくとも１回繰り返す工程と、
（ｊ）増幅して得られる産物を検出する工程と、
を有し、
少なくとも工程（ｃ）～（ｊ）は、請求項６に記載の前記装置内で起こることを特徴とする方法。
【請求項１４】

前記プライマープラグが一対のＰＣＲプライマーを含むことを特徴とする請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
工程（ｊ）の検出工程は１つの温度で行われることを特徴とする請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記プライマープラグは波形プロファイリングプライマーを含むことを特徴とする請求項１３に記載の方法。
【請求項１７】
工程（ｊ）の検出する工程がある温度範囲で行われることを特徴とする請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
工程（ｉ）の後でかつ工程（ｊ）の前に行う工程として、
（１）工程（ｅ）～（ｇ）を繰り返す工程と、
（２）前記第３温度を前記第１時間長さの４０～６０％の時間と等しい時間だけ維持する工程と、
（３）前記少なくとも１つのサンプルプラグを前記第２温度以下の温度である第４温度に冷却して、挿入剤を含む高次構造の形成を可能にする工程と、
を更に有することを特徴とする請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
さらなる分析を行うためのサンプルプラグを選択する最終工程をさらに有し、
前記選択する工程は、前記装置内の前記バルブで行われることを特徴とする請求項１３乃至請求項１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
汚染物を見つけるために供給サンプルをスクリーニングする方法であって、
（ａ）前記供給サンプルからサンプル液滴を少なくとも１つのミクロ流体の反応流路中に連続的に取得する工程と、
（ｂ）各サンプル液滴を増幅試薬を含むプライマープラグと混合することによってサンプルプラグを形成する工程と、
（ｃ）ゲノム材料を含むサンプルプラグ中でＤＮＡを増幅する工程と、
（ｄ）増幅した産物が存在するか存在しないかを検出する工程と、
を有し、
工程（ａ）～（ｄ）は、請求項６に記載の前記装置内で行われることを特徴とする方法。
【請求項２１】
微生物を同定する方法であって、
（ａ）前記微生物から分離したＤＮＡ分子を含む、少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを調製する工程と、
（ｂ）前記少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に取得する工程と、
（ｃ）前記少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを、少なくとも１つの既知の第１プライマーを含む増幅試薬を含むプライマープラグと混合することによって、少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを形成する工程と、
（ｄ）前記少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを少なくとも１回の増幅サイクルに晒して、前記少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグが検出可能な増幅したＤＮＡ産物を持つ工程と、
（ｅ）前記増幅したＤＮＡ産物を検出する工程と、
（ｆ）前記増幅した産物の検出に基づいて前記微生物を同定する工程と、
（ｇ）前記微生物の前記同定の正確さを上げるために、前記既知の第１プライマーとは異なる既知のプライマーを含む増幅試薬を用いて工程（ａ）～（ｆ）を任意に繰り返す工程

と、
を有し、
少なくとも工程（ｂ）～（ｅ）は、請求項６記載の前記装置内で行われることを特徴とする微生物を同定する方法。
【請求項２２】
サンプル中のゲノム材料の濃度を定量化するための方法であって、
（ａ）前記ゲノム材料の前記濃度が最大であってもサンプル１滴につき１分子であるように、希釈係数を用いて前記サンプルを希釈する工程と、
（ｂ）少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路中にサンプル液滴を取得する工程と、
（ｃ）各サンプル液滴を、増幅試薬を含むプライマープラグと混合して２つ以上のサンプルプラグを形成する工程と、
（ｄ）各サンプルプラグを増幅サイクルに晒して、少なくとも１つのＤＮＡ分子を有する各サンプルプラグが検出可能な増幅したＤＮＡ産物を有するようにかつＤＮＡ分子を含まない各サンプルプラグが増幅したＤＮＡ産物を全く検出しないようにする工程と、
（ｅ）各サンプルプラグ中に増幅したＤＮＡ産物が存在しないか存在するかを検出する工程と、
（ｆ）検出可能な増幅したＤＮＡ産物を含むサンプルプラグと、全く検出されないという結果をもたらすサンプルプラグとの比率を決定する工程と、
（ｇ）前記希釈係数を用いて前記サンプル中のゲノム材料の初期濃度を計算する工程と、
を有し、
少なくとも工程（ｂ）～（ｅ）が請求項６記載の前記装置内で行われることを特徴とする方法。
【請求項２３】
さらなる分析のためにサンプルプラグを選択する最終工程をさらに有し、
前記選択する最終工程は、前記装置内の前記バルブで行われることを特徴とする請求項２０乃至請求項２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記サンプルプラグが混合しない非水流体によって囲まれている工程を更に有することを特徴とする請求項１３乃至請求項１８および請求項２０乃至請求項２２のうちのいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
サンプル中のゲノムＤＮＡが存在するまたは存在しないかを決定するための方法であって、
（ａ）サンプル中に前記ゲノムＤＮＡが存在する場合、前記ゲノムＤＮＡの少なくとも１コピーを単離する工程と、
（ｂ）少なくとも１つのプライマーと、少なくとも１つのヌクレオチドと、少なくとも１つのＤＮＡポリメラーゼと、少なくとも１つの挿入剤とを含む第１混合物を導入し、前記第１混合物が第２混合物を生成するために前記サンプルと混合される工程と、
（ｃ）前記第２混合物を第１温度に加熱し、前記ゲノムＤＮＡが存在する場合、前記ゲノムＤＮＡが第１および第２のゲノムＤＮＡテンプレートに変性する工程と、
（ｄ）前記第２混合物を第２温度に冷却し、前記少なくとも１つのプライマーが各ゲノムＤＮＡテンプレートにアニーリングする工程と、
（ｅ）前記第２混合物を前記第１温度と前記第２温度との間の温度である第３温度に再加熱し、前記プライマーが前記ゲノムＤＮＡにアニーリングすることを可能にし、前記ＤＮＡポリメラーゼが前記アニーリングしたプライマーから発生する核酸ポリマーを伸長する工程と、
（ｆ）前記第３温度を第１の時間の長さだけ維持する工程と、
（ｇ）工程（ｃ）～（ｆ）を少なくとも１回繰り返す工程と、
（ｈ）工程（ｃ）～（ｅ）を繰り返す工程と、

（ｉ）流体の連続的な流れを達成するためにミクロ流体のインライン反応流路に沿って前記第２混合物の少なくとも一部を動かす工程であって、前記ミクロ流体のインライン反応流路は、低温領域と高温領域とを含む温度制御領域内の検出領域を流れ抜け、前記温度制御領域内の前記低温領域と高温領域は１つ以上の温度での検出を可能にする工程と、
（ｊ）前記サンプル中にゲノムＤＮＡが存在しないか否かを決定するために前記波形プロファイルの融解温度分析を実行する工程と、
を有し、
少なくとも工程（ｂ）～（ｊ）は、請求項６に記載の前記装置内で起こることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、サンプル中の微生物を迅速に検出および／または分類するために、微生物のゲノム材料の準備、増幅、検出および／または、任意には、さらなる分析を行うために選択する方法（例としては、微生物のゲノム物質をスクリーニング、同定、定量および／または、任意には、さらにシークエンシングなどにより分析すること）に用いることができる装置に関する。

【背景技術】

【０００２】

［関連出願］

本出願は、２００５年２月１８日出願の米国仮出願第６０／６５３，９７８号の利益を主張するものであり、米国仮出願第６０／６５３，９７８号を引用することによって、その内容を本明細書に合体する。

【０００３】

最近の基礎および革新的な発展により、バイオテクノロジープロセスはさらに高性能化したと同時にその複雑さは以前より増した。例えば、ＤＮＡの準備、増幅、検出、および同定にかかるコストの削減、およびこれらの単純化、規格化のために多くの有効な技術が開発されてきたが、上述の、スクリーニング、定量化、同定および／またはさらなる分析を行うためのプロセスを完全に自動化する、発売されている装置は知られていない。

【０００４】

バイオテクノロジー分野において、各種サンプル中（例えば、環境および医療サンプル）に存在する細菌やウイルスなどの微生物の迅速な検出および／または分類が必要とされる。例えば、細菌の迅速な検出、およびそれに続く種および／または株の分類は、例えば、地元の水供給、病院、または食品加工工場へ品質保証を提供するために必要な可能性がある。すなわち、汚染微生物の存在を検出するために空気、埃、水、血、組織、植物、食品などを含み、これらには限定されない各種サンプルをモニターし、公衆による汚染微生物の消費、露出および／または使用以前または使用中に分類することが必要な可能性がある。

【０００５】

微生物を検出および／または分類する標準的な微生物法、例えば、培養し、グラム染色または他の生化学的性質の検査をする方法は正確ではなく、異なる微生物、ましてや１つの微生物の異なる種を識別することができない場合が多い。これらより正確な微生物を検出および／または同定する方法は微生物のゲノムＤＮＡに基づいている。広く知られている検出および／または同定（分類）方法の一例として、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）が知られており、その処理能力および自動化が技術的発展により向上されてきた。

【０００６】

ＰＣＲは２つの別かつ異なる（第１および第２の）プライマーにより成し遂げられ、各プライマーは、二本鎖ゲノムＤＮＡの２つの鋳型（テンプレート）のいずれかにおいて見られるヌクレオチド配列にそれぞれ相補的である。２つのプライマーの配列は２つのゲノムＤＮＡ鋳型の配列に基づくので、２つのプライマーは、二本鎖ゲノムＤＮＡの１つの孤

立した遺伝子座（ｌｏｃｕｓ）と結合し囲む（一括する）。このようなプライマーの対を使用するＰＣＲは、二本鎖ゲノムＤＮＡの指数関数的増幅をもたらし、この二本鎖ゲノムＤＮＡは、２つのプライマーと相補的なヌクレオチド配列によって囲まれるゲノムの１つの孤立した遺伝子座、すなわち１つのゲノムＤＮＡ鋳型の３’端上の第１のプライマー結合部位および他のゲノムＤＮＡ鋳型の３’端上の第２のプライマー結合部位の側面に位置するＤＮＡの遺伝子座と同一である。

【０００７】

ＰＣＲを使用して少量のゲノム物質を検出することができるのは、二本鎖ＤＮＡを指数関数的に増幅させるからだけでなく、ＰＣＲの処理能力および自動化のレベルを向上させる新しい技術の開発も原因である。このような技術の一例として、例えば米国特許第６５００３２３号および第６６７０１５３号に記載のミクロ流体デバイスの制御／検出インターフェースを含むミクロ流体システムがある。このようなミクロ流体システムは、自動インラインＰＣＲプラットフォームとまとめて呼ばれ、当技術分野で周知であるが、以下に一般的に記載する。

【０００８】

ほとんどの自動インラインＰＣＲプラットフォームは、自動サンプル取得、ミクロ流体のＰＣＲ試薬アセンブリ、ＰＣＲサーマルサイクリング、および光学的検出スペクトロスコピーのために制御／検出インターフェースと連携したミクロ流体チップを利用する。ミクロ流体チップは、一般に、少なくとも１つのミクロエッチングされた流体（ミクロ流体）インライン反応流路を有する第１のプレートを備え、第１のプレートは、金属トレースおよび流体だめを中に含み得る第２のプレートに接着され得る。２つのプレートが互いに接着され、ミクロ流体チップが形成された場合は、第１のプレートの各ミクロ流体の反応流路は、遺伝子座特定の試薬が流体だめからミクロ流体のインライン反応流路に届くことを可能にするために第２のプレートの流体だめと接続され得る。

【０００９】

通常は、ミクロ流体チップを使った自動インラインＰＣＲはチェンバーの中では行われなく、サンプルがミクロ流体のインライン反応流路に沿ってその内部を移動する際に反応が起こる。インラインＰＣＲは、キャピラリー（毛細管）すなわち「シッパー（吸引部）」がサンプル液滴（ＤＮＡサンプル液滴であってもなくても良い、すなわち微生物から孤立されたゲノム材料を含むサンプル液滴）を、例えば（例えばロボット型ハンドラー由来の）マイクロタイタープレートから少なくとも１つのミクロ流体に吸引したときに、開始する。サンプル液滴をミクロ流体のインライン反応流路に吸引した後で、シッパーは、バッファーがミクロ流体チップに引きずり込まれるようにバッファートローフに移動され得る。従って、各サンプル液滴はバッファースペーサーにより隣接したサンプル液滴から孤立しているため、サンプル液滴間の二次汚染は最小限になる。次に、各サンプル液滴は、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って動き、チップのＰＣＲアセンブリ領域に到達し、ここでサンプル液滴は、例えば一対のプライマー、ＤＮＡポリメラーゼ、ｄＮＴＰ、および例えば挿入剤などの検出可能な薬剤と混合されてサンプルプラグになる。任意には、バッファースペーサーは、ＰＣＲに必須である試薬とも混合され、負のコントロールとしての機能を果たし得る。ＰＣＲに必須である検出可能な試薬と混合された後、サンプルプラグ（ＤＮＡサンプル液滴であってもなくても良い、すなわち微生物から孤立されたゲノム材料を含むサンプル液滴）は、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って動き、例えば、サンプルプラグ上にＰＣＲが成し遂げられる増幅領域などの、チップの異なる領域に到達する。

【００１０】

通常、各サンプルプラグ（例えば、ＤＮＡサンプルプラグ）がミクロ流体のインライン反応流路を貫流すると、増幅領域、すなわち温度制御された領域に入り、ＰＣＲの変性、アニーリング、および伸長の工程が流路の中を移動している各サンプルプラグに施されるように、ミクロ流体のインライン反応流路は、たびたびかつ急速に、局所的な形で加熱および冷却される。当業者は、ＤＮＡの増幅は、ＤＮＡサンプルプラグ、すなわちゲノム物

質を含むサンプルプラグでのみ起こることを理解し得る。増幅領域での温度制御法として、ジュール加熱がある（例えば米国特許第５９６５４１０号および第６６７０１５３号を参照）。一般には、ＰＣＲの各サイクル（すなわち変性、アニーリング、および伸長からなるサイクル）に必要とされる異なる温度を達成するために、金属トレースには、制御された局所的な形で電圧が適用されることができる。反応の冷却は、例えばミクロ流体のインライン反応流路から熱エネルギーを熱という形で運ぶためにコイルの中を通る冷却流体を用いるか、または、例えばミクロ流体チップの底面に冷却水を与えることによって迅速な熱放散を可能にすることにより達成することができる。ミクロ流体流路内の流体の量が少なく、金属トレースがミクロ流体のインライン反応流路の非常に近くにあるため、流路（および従ってサンプルプラグ）内での流体の加熱および冷却は非常に急激に達成される。従って、ＤＮＡサンプルプラグはＰＣＲを受け、ＰＣＲサイクルは、例えば３０サイクルが９分未満で行われるように繰り返される。ミクロ流体流路を通るＤＮＡサンプルプラグのそれぞれが、チップの温度制御領域で受けるＰＣＲサイクル数は、１）金属トレースにかける電圧のタイミング、および２）ミクロ流体流路を通るＤＮＡサンプルプラグの流速の一方または両方を変えることによって変更することができる。

【００１１】

ミクロ流体チップは、ミクロ流体のインライン反応流路の数だけポリメラーゼ連鎖反応を同時に行うことができる。例えば、ゲノム物質を含むサンプルは、複数の異なるミクロ流体のインライン反応流路の中に吸引されることができ、各ミクロ流体のインライン反応流路には、異なる遺伝子座に特異的である試薬（例えば、ゲノム物質（例えばＤＮＡ）上の異なる遺伝子座を囲む異なる一対のプライマー）が加えられる。これにより、幾つかの異なる（例えば、同じ微生物から単離したゲノム物質上にある）遺伝子座を同時に検出することが可能になる。あるいは、特異的な一対のプライマーを含む試薬が、複数の異なるミクロ流体のインライン反応流路に吸引され得る。これにより、（例えば、異なる微生物から単離したゲノム物質上にある）遺伝子座を同時に検出することが可能になる。さらに、同じミクロ流体の反応流路に複数のサンプル液滴が吸引され得る。

【００１２】

検出領域は、通常は温度制御された増幅領域の下流にあり、一般には増幅したＤＮＡ産物（例えばＰＣＲ産物）の観察および検出を可能にする透明な領域である。検出領域では、各ミクロ流体のインライン反応流路は、通常は、互いに近い位置に配置され、検出器の下を通せられる。光学的検出領域を通る、検出可能であるエージェント（例えば、各流路（例えば各ＤＮＡサンプルプラグ）から放射される蛍光）が同時に測定可能になるように、光源は、ミクロ流体のインライン反応流路の全体を覆うように配置されている。検出領域の後、各ミクロ流体のインライン反応流路は、通常は各サンプルプラグを廃棄物だめに排出する。

【００１３】

ミクロ流体のインライン反応流路内では、流体の動きを３つの異なる方法によって発生させる。これらの方法は、動電学、圧力、またはこれら２つの組合せに関連する（例えば、米国特許第６６７０１５３号を参照）。圧力ベースのフローシステムでは、インライン反応流路内での流体の流れを内部または外部の駆動源によって発生させ得る。例えば、各ミクロ流体のインライン反応流路の端にある廃棄物だめを減圧にし、シッパー（吸引部）を稼働させ、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って流体を廃棄物だめの方向へ動かし得る。あるいは、ゲノム物質が荷電されているため、動電学、すなわち（例えば、電荷を金属トレースに印加することによる）電圧勾配の発生を用いて、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って荷電流体を駆動することができる。インライン反応流路に沿って流体を駆動するための３つ目の方法では、動電学と圧力の両方が用いられる。結果としては、ミクロ流体のインライン反応流路内の流体の連続した流れが得られ、サンプルプラグ（例えば、ＤＮＡサンプルプラグ）は、連続して混合されるか、またはチップの別の領域（例えば、ＰＣＲアセンブリ領域、温度制御領域、検出領域など）に動かされる。

【００１４】

動電学的に発生しおよび／または圧力によって発生する流体運動、加熱サイクルおよび冷却サイクル、検出、並びに、ミクロ流体チップに関連するデータ取得は、チップに対してまたはチップとともに接合する機器によって制御され得る（例えば米国特許第６５８２５７６号に一般的に記載されている）。機器のインターフェースは、通常は、チップ上の試薬溝をふさぐＯリングシールと、チップ上の金属トレースに接合し、温度サイクルのための電荷を提供し得るポゴピンと、流体をチップに流すために減圧にし得る、廃棄物だめのためのＯリングシールと、循環冷却水からチップの底をシールし、温度サイクル中に冷却を迅速に行うために使用され得る大きなＯリングと、並びに、例えば蛍光検出のための検出域とを含む。当業者は、ミクロ流体チップが通常は閉鎖システムであり、サンプルプラグ（例えばＤＮＡサンプルプラグ）は物的障壁（例えばバッファースペーサー）によって分離され、連続流がサンプルプラグが逆行するのを防ぐため、このシステムにおける汚染危険が最小限であることを理解し得る。

【００１５】

ＰＣＲはＤＮＡを指数関数的に増幅させるので、ＰＣＲを使用して少量のゲノム物質を検出することができる。しかしながらＰＣＲは、知られており当該遺伝子座を囲むゲノム物質の配列と特異的相補性があるプライマーを必要とするので、知られている微生物の検出および分類のみに使用することができる点でＰＣＲは制限される。言い換えると研究者は、微生物を検出する如何なる試みの前にも、微生物の分類（すなわち、使用するための適切なプライマーの対）を知る、あるいは推測することを必要とされる。ＰＣＲの他の制約は、分析中に使用する２つのプライマーと相補的な配列に関する情報以外、増幅ＤＮＡ配列に関する情報を研究者が得ることができないことである。ＰＣＲ（従って、自動インラインＰＣＲプラットフォームも同様）に関わる別の制限は、研究者が、分析に使われた２つのプライマーに相補的な配列の情報以外の増幅ＤＮＡに関する配列情報を得ることができないということである。また、自動インラインＰＣＲプラットフォームは、ミクロ流体のインライン反応流路の長さを移動した後に、ゲノム物質（例えばＤＮＡサンプルプラグ）をさらに解析（例えば、シークエンシング）する手段を提供しない。ゲノム物質のさらなる解析（例えば、配列を提供すること）は、例えば、病原株を非病原株から識別したり、新しい株の配列を検出および提供したりするためなどに重要かつ有用であり得る。

【００１６】

ＰＣＲの幾つかの制約を克服するために、幾つかの波形プロファイリング法が開発された（例えば、特開２００３－３３４０８２号および特開２００３－１８０３５１号中に記載された波形プロファイリング法を参照）。波形プロファイリング法は、研究者が検出前に微生物の分類を知る、あるいは推測することを必要とせずに、ゲノム物質（例えば、細菌などの微生物から単離したＤＮＡ）を分析し概略付けするための方法を与える。簡潔には、波形プロファイリングは、一般に、高次構造、例えば三重鎖、四重鎖などを形成する幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーを直線的に増幅させるための鋳型として、独特なプライマーおよびゲノムＤＮＡの２本の変性鎖の多数のコピーを使用して、微生物のゲノムＤＮＡを分析する。微生物のゲノムＤＮＡは鋳型（テンプレート）として使用されるので、生成する一本鎖核酸ポリマーは異なり、微生物に独特な配列を含み得る。したがって、一本鎖核酸ポリマーは、微生物に独特な配列に基づいて高次構造を形成し得る。従って、検出剤、例えば蛍光挿入剤を使用して実施することができる、このような独特な高次構造の検出は、微生物を分類することができる。

【００１７】

幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーは一般に、その構造および長さによって特徴付けられる単一型生成波形プライマーを使用して生成される。波形プライマーは一般に２つの部分、非特異的安定部分および特異的部分からなる。以下で論じるように、非特異的安定部分は高次構造の形成を誘導する手助けをすることができる。対照的に、特異的部分は波形プライマーを誘導して、その独自の配列と相補的な配列と特異的に結合させる。波形プライマーの長さ（例えば、８～３０塩基長）は通常重要である、何故ならその長さが、プライマーの特異的部分と、幾つかの異なるプライマー結合部位、すなわちゲノムＤＮＡ鋳型

（テンプレート）の長さ部分に沿って波形プライマーと相補的な配列が特異的に結合するのを可能にするからである。波形プライマーと、それぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型（テンプレート）に沿った幾つかのプライマー結合部位の結合は、幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーの生成を可能にし、その生成はこの方法にとって重要である。

【００１８】

波形プライマーを利用すること以外に、これらの波形プロファイリング法は数サイクルの直線的増幅も利用して、幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーのそれぞれの多数のコピーを与え；従って、波形プライマーの多くのコピーを、直線的増幅の最初のサイクルの前に当該ゲノムＤＮＡを含む溶液に加える。直線的増幅の１サイクルは以下の工程を含み得る、すなわち、１）変性工程、すなわち別々または個々の一本鎖（例えば、２つの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型（テンプレート）に変性した二本鎖ゲノムＤＮＡのそれぞれのコピー）への二本鎖ＤＮＡの変性を可能にする条件を与える工程と、２）アニーリング工程、すなわち相補的一本鎖ＤＮＡとそれぞれ他のＤＮＡ（すなわち、それぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型（テンプレート）上の幾つかの異なるプライマー結合部位とアニーリングした波形プライマー）の結合を可能にする条件を与える工程と、３）伸長工程、すなわち鋳型ＤＮＡの領域（例えば、それぞれのゲノムＤＮＡ鋳型（テンプレート）に沿ってプライマー結合部位と結合した幾つかの波形プライマーのそれぞれから伸長した、幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマー）上のプライマー配列のＤＮＡポリメラーゼ誘導型伸長を可能にする条件を与える工程と、を含み得る。

【００１９】

直線的増幅の１サイクル中に、ゲノムＤＮＡの温度を（例えば９５～９８℃に）上昇させて、ゲノムＤＮＡのそれぞれのコピーを２つの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型（テンプレート）に変性させる。その後温度を（例えば２５℃に）低下させて、それぞれの変性ゲノムＤＮＡ鋳型の長さ部分に沿った幾つかの異なるプライマー結合部位と波形プライマーが結合するのを可能にする。サイクル中の最終工程、それぞれの結合した波形プライマーからの幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーの伸長は、ポリメラーゼ、例えばＴａｑポリメラーゼを使用して～７２℃で実施する。この最終工程後、サイクルを繰り返す。

【００２０】

次の変性工程中、幾つかの異なる核酸ポリマーがゲノムＤＮＡ鋳型から変性し、一本鎖核酸ポリマーになり、それぞれの一本鎖核酸ポリマーは、そこから一本鎖核酸ポリマーが伸長した波形プライマーのヌクレオチド配列を含む５’→３’ヌクレオチド配列、および次に、波形プライマーと結合したゲノムＤＮＡ配列の下流に存在したゲノムＤＮＡ鋳型の領域の配列と相補的な異なるヌクレオチド配列を有する。それぞれの一本鎖核酸ポリマーはその５’端に波形プライマーの配列を含むので、それぞれの一本鎖核酸ポリマーは波形プライマーの非特異的安定部分も含む。波形プライマーの非特異的安定部分は一般に、それぞれの一本鎖核酸ポリマーが高次構造を形成するのを誘導し、先に伸長した一本鎖核酸ポリマーが後の増幅サイクル中に任意の波形プライマーと結合するのを妨げる。

【００２１】

波形プライマーの非特異的安定部分の結果として、一本鎖核酸ポリマーは後の増幅サイクル中に鋳型として使用されず、それぞれの増幅サイクルは直線的である。言い換えると、それぞれの増幅サイクルは、微生物に独特な配列、すなわちプライマー結合部位と結合した波形プライマーの下流に存在するゲノムＤＮＡ鋳型の配列と相補的な配列を含む、幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーのそれぞれの単コピーのみを生成する。従って、ＰＣＲとは対照的に、波形プロファイリング法は一般に、微生物に独特な配列を含む幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーの指数関数的増幅をもたらすことはない。

【００２２】

それぞれの一本鎖核酸ポリマーは、プライマー結合部位と結合した波形プライマーの下流に存在するゲノムＤＮＡ鋳型の配列と相補的な塩基配列を含み、従って、異なるゲノムＤＮＡの多数の部位に存在する塩基配列の違いを比較し、区別することができる。前に記載したように、幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーのそれぞれの多数のコピーは、互いに

相互作用して高次構造、すなわち１つまたは複数の一本鎖の異なる核酸ポリマーを含む複合体（例えば、三重鎖および四重鎖）を形成し得る。高次の核酸構造は、一本鎖核酸ポリマーの塩基配列に応じて、すなわち微生物の独特なゲノム情報に基づいて、異なる安定性を有し異なる融解温度（Ｔｍ）で解離し得る。

【００２３】

波形プロファイリングは一般に、鋳型（テンプレート）として個々の微生物のゲノムＤＮＡを使用して生成される、さまざまな異なる高次構造の融解温度（Ｔｍ）を測定および記録することを必要とし、高次ＤＮＡ構造中に挿入される蛍光剤、すなわち挿入剤を使用することによって、これを実施することができる。波形プロファイリングによって生成される高次ＤＮＡ構造は、サンプルの温度を上昇させることによって解離させることができる。高次ＤＮＡ構造が解離すると、これらの高次構造中に挿入される蛍光剤も解離し得る。融解温度分析は、温度上昇の関数としてこれらの高次構造の解離によって得られた蛍光強度の変化率をプロットし、微生物のゲノムＤＮＡおよび利用する波形プライマーに独特な波形を生成する、すなわち、異なるＴｍにおける高次ＤＮＡ構造の解離を観察および記録して、微生物、例えば細菌のそれぞれの種（または菌株）に特徴的な「波形プロファイル」を生成する。従って、波形プロファイリングを使用して、それぞれの微生物に関する独特な波形プロファイルを得ることができ、後の融解温度分析を使用して、独特な波形プロファイルを検出して、第１の微生物から単離したゲノムＤＮＡと第２の微生物から単離したゲノムＤＮＡを区別することができる。

【００２４】

（波形プロファイリングに関する）前に記載した方法は直線的増幅に頼るので、この方法を使用する難点の１つは、検出および／または分類する個々の微生物（例えば細菌）由来の多大な初期量のゲノムＤＮＡが必要であることである。従って、微生物が所与のサンプル中に多数（例えば10^{6}以上の微生物）存在する場合のみ、波形プロファイリング法を使用して微生物を検出および分類することができるが、非常に少数の微生物を検出および／または分類するのに有効ではない。さらに、ＰＣＲと同様に、この方法のもう１つの短所はゲノム物質の、例えば配列情報などの詳細な情報を提供できない点である。

【００２５】

従って、波形プロファイリング法は、一般に、例えば汚染の開始時に水供給または供給源から採取したサンプル中に、少数で存在する微生物を検出および／または分類する際、または微生物のゲノム物質について詳細な情報を提供する際に有用ではない。ＰＣＲは、多量の初期サンプルを必要とする波形プロファイリング法の制約を解決することができるが（何故なら、ＰＣＲはゲノムＤＮＡの指数関数的増幅をもたらし、少数で存在する微生物の検出を可能にするからである）、ＰＣＲ増幅から生じるＤＮＡの相補的二本鎖種を使用して生成される波形プロファイルは、個々のゲノム配列を分類するのに不充分であることは、当技術分野で知られている（例えば、Ａｄｇｅｎｅ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ．により印刷および配給された「Ｇｏｏｄｂｙｅ　ＤＮＡ　Ｃｈｉｐ、Ｈｅｌｌｏ　Ｇｅｎｏｐａｔｔｅｒｎ　ｆｏｒ　２１ｓｔ　Ｃｅｎｔｕｒｙ」を参照）。言い換えると、従来技術は、標準的ＰＣＲ産物の融解温度（Ｔｍ）分析を使用して、（微生物のさまざまな種または菌株由来の）ゲノム物質を比較、区別および分類することは不可能であることを明らかに教示している。

【００２６】

さらに、波形プロファイリング法は、微生物の迅速な検出および／または分類を可能にし得るが、これらの方法はおよびＰＣＲおよびインライン自動ＰＣＲプラットフォームの方法は、シークエンシングチップ（例えば、米国特許公開公報第２００５／０００９０２２号を参照）とは違って配列情報などのゲノム物質について詳細な情報を提供しないため、限界がある。配列情報の分析などのゲノム物質のさらなる分析は、（例えば、特定のＰＣＲプライマーまたは波形プライマーを用いても検出できない）同じ微生物の異なる株のゲノム変異が、これらの株にそれぞれ異なる病原性を与えるときのように、公衆衛生などへ大きな脅威をもたらし得る病原菌（例えば、インフルエンザウイルスや生物学兵器の種

類）の新株の検出に重要であり得る。
【特許文献１】米国特許第６５００３２３号
【特許文献２】米国特許第６６７０１５３号
【特許文献３】米国特許第５９６５４１０号
【特許文献４】米国特許第６５８２５７６号
【特許文献５】特開２００３－３３４０８２号
【特許文献６】特開２００３－１８０３５１号
【特許文献７】米国特許公開公報第２００５／０００９０２２号
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００２７】
上述のように、微生物の検出および／または分類をする分野では、さまざまな基礎的な方法（例えば、ＰＣＲ波形プロファイリング法など）があり、革新的な技術的発展（例えば、自動インラインＰＣＲプラットフォーム）が行われてきた。このような方法および発展は、より優れたものになってきており、微生物の検出および／または分類をより効率的にしたが、当発明者は、同時に上記の方法および発展の自動化を可能にする周知の装置、すなわち、ＰＣＲ、波形プロファイリングおよび／またはゲノム物質をさらなる分析（例えば、シークエンシング）のために任意に選択することを可能にする自動インラインプラットフォーム、を認知していない。本発明は、この制限を克服するために、準備（例えば、単離、処理、反応試薬と混合など）、（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリングなどによる）増幅、検出および／または、任意には、さらなる分析（例えばシークエンシング）のために選択することを自動化する方法によって、サンプル中の（微生物（例えば細菌またはウイルス）から単離した）ゲノム物質を検出および／または分類（例えば、スクリーニング、定量、同定および／またはシークエンシングなどによるさらなる分析（例えばシークエンシング）のために任意に選択する）するために用いることができるミクロ流体デバイスを含む装置を提供する。
【課題を解決するための手段】
【００２８】
本発明は、ゲノム物質の分析、すなわち、ゲノム物質の準備（例えば、単離、処理、反応試薬と混合など）、増幅（例えば、ＰＣＲおよび／または波形プロファイリング）、検出（すなわち、スクリーニング、同定および／または定量）、および、任意には、ゲノム物質のさらなる分析を完全に自動化するための装置を提供することを目的とする。本発明は、社会に役立つ、装置を使用するための複数の方法（例えば、ゲノム物質をスクリーニング、同定、定量および／またはさらに分析（例えば、シークエンシング）するために選択する方法のために使用され得る装置）を提供することをもう１つの目的とする。
【００２９】
サンプルをスクリーニングし、未知であり、かつ汚染可能性を持つ任意の微生物を検出することは、特に生活必需品（例えば、水およびエアサプライ）を監視し守護するための連続的（すなわち、一日２４時間、週７日間、年３６５日）な対策（例えば、テロ対策）として、本発明の装置を使用する上で重要であり、最初の方法でもある。生活必需品（例えば水）は安全だという期待があるため、このような生活必需品の持続したスクリーニングは、常に陰性（例えば、汚染が全く検出されない）の結果の取得につながり得る。そうすると、持続したスクリーニングは高額かつ一見不必要なものになる。本発明の装置を、ゲノム物質（すなわち、汚染）の有無を検出するために使用する利点は、持続したスクリーニングにかかる費用が比較的低いことである。
【００３０】
同定することは、本発明の装置を使用するもう１つの方法であり、ゲノム物質の分析では一般的に用いられる。本発明の装置は、既知のプライマーによって増幅したＤＮＡ産物および／または微生物のゲノム物質に基づいてプロファイルを形成する　増幅したＤＮＡ産物を検出する方法に使用され得るため、ゲノム物質の有無を検出するために本発明の装

置を使用する方法は、ゲノム物質を単離した微生物を同時に同定することを可能にする。さらに、本発明の装置および方法を用いて増幅産物の有無を検出することは、２つ以上の汚染微生物がサンプル中に存在するかどうかの同定を可能にする。

【００３１】

別の実施形態では、本発明の装置が、サンプル中に存在するゲノム物質の量を定量する方法に用いられる。このような定量化は、（例えば、病気の進行、第１および第２の微生物の有無における数の差など）測定のより深い分析に役立つことができる。

【００３２】

さらに分析（例えばシークエンシング）するためにゲノム物質を選択することは、本発明の最後（任意）の方法である。当業者は、検出、同定および／または定量の方法を用いた結果が汚染微生物が脅威を与えることを示唆する場合は、さらに分析が必要とされ得ることを理解し得る。

【００３３】

本発明の別の目的は、サンプル中に少ない数の微生物が存在する場合でも、そのサンプル中の微生物から単離したゲノム物質の波形プロファイリングにおける改良法を提供することである。改良された波形プロファイリング法は、本発明の装置と使用され得る。

【００３４】

従って、本発明は、ＰＣＲおよび／または（本発明の波形プロファイリングの改良方法を含む）波形プロファイリングにより増幅したゲノム物質の自動インライン検出を可能にする装置を提供し、さらに、その後にさらなる分析のための選択肢を提供する。

【００３５】

特に、本発明は、波形プロファイリング法により生成し増幅したＤＮＡ産物を生成および検出できるミクロ流体システム、すなわちインライン自動プラットフォームに関する。

【００３６】

本明細書に記載したミクロ流体システムは、ＰＣＲおよび波形プロファイリングの一方または両方の方法、ならびに、任意には、他のＤＮＡ分析方法（例えばシークエンシング方法）に使用され得る新規のインライン自動プラットフォームにつながる。本発明は、初期量が少量であるゲノム物質の波形プロファイリングを可能にする改変型ＰＣＲが組み込まれるように、波形プロファイリング法に新しい改良を与えるものである。本発明はさらに、本発明のインライン自動プラットフォーム、すなわち本明細書に記載したデバイスを含む装置を、サンプル中の微生物から単離したゲノム物質を準備、増幅、検出（例えば、スクリーニング、定量、同定）および／または、任意には、さらに分析（例えばシークエンス）するために選択するために使用する方法を提供する。当業者は、本発明の自動インラインプラットフォーム、波形プロファイリング法に対する本発明の改良、ならびに、本発明の自動インラインプラットフォームを使用するための開示された方法（例えば、改良型波形プロファイリング法）が、微生物からのゲノム物質の持続した検出（例えば、スクリーニング、同定、定量）および／またはさらなる分析（例えばシークエンシング）のための選択を可能にし、微生物が少数存在する場合でさえ、例えば、水供給または供給源の汚染開始時においてさえもサンプル中に存在する微生物の数で、微生物の検出および分類を可能にすることを理解し得る。

【００３７】

従って、本発明は、増幅したＤＮＡ産物（例えば、ＰＣＲ増幅産物、波形プロファイルの高次構造など）の検出を可能にし、検出したＤＮＡの、例えば配列分析によるさらなる分析のために任意に選択することを可能にするミクロ流体デバイスを対象とする。本発明の一実施形態では、本発明のインライン自動ミクロ流体デバイスは、それが装置の検出領域に入るときに第２温度制御領域内にある単数または複数のミクロ流体のインライン反応流路を含む。第２温度制御領域内にミクロ流体の反応流路が配置されることによって、ＰＣＲ増幅産物の検出が可能になるだけでなく、第２温度制御領域内では、異なる融解温度において高次の核酸構造は解離するので、すなわち融解温度分析が可能になるので、波形プロファイリング法（または、その改良法は本明細書および米国仮出願第６０／５９１，

５９６号に記載されている）によって生成された高次の核酸構造の検出も可能になる。

【００３８】

従って、本発明は、少なくとも１つのシッパー（吸引部）と、試薬集合領域と、第１温度制御部内の増幅領域と、第２温度制御部内の検出領域と、を通り、検出領域の下流に設けられたバルブをさらに備える、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、増幅ＤＮＡ産物の検出が、２つ以上の温度でされ得る（すなわち、２つ以上の温度で検出され得る）、前記ミクロ流体のインライン反応流路を加熱するためのおよび／または流体を運動させるための少なくとも１つの金属トレースと、を備えることを特徴とするミクロ流体デバイスを提供する。

【００３９】

本発明の別の実施形態では、「バルブ」を通るＤＮＡサンプルプラグが（例えば廃棄物だめへ）吸引されるか、またはさらなる（例えば、ＤＮＡシークエンシングチップを用いての）分析のために選択されるかの決定がされ得るように、ミクロ流体流路は、検出領域の下流にある「バルブ」を備える。

【００４０】

従って、本発明は、少なくとも１つのシッパー（吸引部）と、試薬集合領域と、増幅領域と、検出領域と、を通り、検出領域の下流に設けられたバルブをさらに備える、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、前記ミクロ流体のインライン反応流路を加熱するためのおよび／または流体を運動させるための少なくとも１つの金属トレースと、を備えることを特徴とするミクロ流体デバイスを提供する。

【００４１】

本発明は、少なくとも１つのシッパー（吸引部）と、試薬集合領域と、第１温度制御部内の増幅領域と、第２温度制御部内の検出領域と、を通り、検出領域の下流に設けられたバルブをさらに備える、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、増幅したＤＮＡ産物の検出が、２つ以上の温度でされ得る、前記ミクロ流体のインライン反応流路を加熱するためのおよび／または流体を運動させるための少なくとも１つの金属トレースと、を備えることを特徴とするミクロ流体デバイスを提供する。

【００４２】

さらに、本発明は、本発明のミクロ流体デバイス内における流体運動の制御、ミクロ流体デバイスの加熱および冷却、ならびに、ミクロ流体デバイスからのデータ収集を行うことができる機器（すなわち、制御器、検出器）を対象とする。従って、本発明は、ミクロ流体デバイス内の流体運動と、ミクロ流体デバイスの加熱および冷却と、ミクロ流体デバイスからのデータ収集を行う機器と、機器を本発明のミクロ流体デバイスに接続するカートリッジと、を含む機器を提供する。一実施形態では、機器は、増幅した産物の設立、モニター、制御、および検出を第２温度制御領域内で行う。本発明の別の実施形態では、機器は、バルブにおけるサンプルプラグが廃棄物だめへ向けられるか、またはさらなる分析（例えばシークエンシング）のために選択されるかを決定することができる。

【００４３】

当業者は、上記に記載の装置および機器が、ハイスループット自動インラインＰＣＲに役立つだけではなく、ハイスループット自動インライン波形プロファイリングおよび／または任意的にはそれ以外の分析の方法（例えばＤＮＡシークエンシング）にも有用であることを理解し得る。

【００４４】

本発明のミクロ流体デバイスおよび機器は、ＰＣＲおよび波形プロファイリング法（ならびに、任意には、例えばシークエンシング分析）の一方または両方のための自動インラインプラットフォームを提供するために連携するように構成されている。従って、本発明は、本発明のミクロ流体デバイスおよび本発明の機器を含む装置をさらに提供する。さらに、装置は、機器と本発明のミクロ流体デバイスとを接続するカートリッジを含み得る。

このようなカートリッジは、当技術分野では周知である。

【００４５】

さらに本発明は、集合的に単一ゲノム・プロファイリング（Ｓｉｎｇｌｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ：ＳＧＰ）と呼ぶ波形プロファイリングの改良法を対象とする。ＳＧＰは、幾つかの異なる「ＳＧＰ核酸ポリマー」を増幅させるためにプライマー（「ＳＧＰプライマー」）の使用を必要とする。ＳＧＰプライマーは、その長さ、およびゲノムＤＮＡの長さ部分に沿った幾つかの異なる部位と特異的に結合する能力によって特徴付けられる。ＳＧＰプライマーは非特異的安定部分を含まないので、（例えば一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上の、幾つかの異なるＳＧＰプライマー結合部位と結合した本発明のＳＧＰプライマーから伸長した）ＳＧＰ核酸ポリマーは、後の増幅反応においてＳＧＰプライマーと自由に結合する。ＳＧＰプライマーは、一本鎖ＳＧＰ核酸ポリマーの長さ部分に沿った相補的ヌクレオチド配列と特異的に結合することができるので、ＳＧＰプライマーは（改変型ＰＣＲ、すなわち「ｍＰＣＲ」において）正方向および逆方向プライマーとしても機能して、幾つかの異なる「ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー」を増幅させることができ、そのそれぞれが、ＳＧＰプライマー結合部位によって囲まれる（一括される）ゲノムＤＮＡの数箇所の領域の１配列と同一のヌクレオチド配列を含む、すなわち、それぞれのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー配列は、その５’端にＳＧＰプライマーの配列を有し、その３’端にＳＧＰプライマーの逆相補配列を有する。従って、ＳＧＰプライマーのヌクレオチド配列およびＳＧＰプライマーの逆相補配列を含む、幾つかの異なるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの増幅は指数関数（非直線）式に起こり、微生物が少数で存在する場合でも、本発明を使用して微生物のゲノムＤＮＡを検出および分類するのを可能にする。当業者は、ＲＮＡ系ゲノム（例えば、レトロウイルスのゲノム）に本発明を実施する際には、ＳＧＰおよび関連ｍＰＣＲサイクルを始める前に、逆転写反応を実施しなければならないことを理解し得る。

【００４６】

本発明はさらに、最終増幅サイクルに付随する「半分の時間での伸長工程」を提供する。本発明では、最終増幅サイクルに付随する伸長工程の時間の長さは、時間の減少を含み（好ましくは時間の長さの減少は約４０～６０％であり、より好ましくは時間の長さの減少は約５０％である）、最終増幅サイクル中の「半分の時間」での伸長工程という結果をもたらす。このような半分の時間での伸長工程は、通常、多くのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの指数関数的増幅を排除し得る、何故なら、ＳＧＰプライマーからＳＧＰプライマーの逆相補配列に核酸ポリマーを伸長させるのには、不充分な時間だからである。したがって、縮小型のＳＧＰ核酸ポリマー（「縮小ＳＧＰ核酸ポリマー」）が半分の時間での伸長工程中でＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーから生成され得る。当業者は、改変型ＰＣＲ、すなわちｍＰＣＲを用いた数サイクルの指数関数的増幅の後に、半分の時間での伸長工程を実施することによって、各縮小ＳＧＰ核酸ポリマーから多くのコピーが生成されることを理解し得る。さらに、後の変性工程中に、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは一本鎖になり得る。最終的に、縮小一本鎖ＳＧＰ核酸ポリマーは、ｍＰＣＲを用いて本発明を実施する際に検出される高次構造を形成する。

【００４７】

本発明はさらに、改良法において使用するプライマー、およびこれらのプライマーを作製するための方法、ならびに指数関数的増幅を利用し波形プロファイリング法の変わりやすさを低下させる方法を提供する。

【００４８】

本発明はさらに、単数または複数のサンプルを、汚染する微生物が存在しないか存在するかを連続的にモニターし、それに続く汚染する微生物の任意の分類を行う方法を提供する。本発明の方法において、微生物のゲノム物質の準備（例えば、単離、処理、反応試薬と混合など）、（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリングなどによる）増幅、検出（スクリーニング、同定、定量）、および、任意には、さらなる分析（例えば、シークエンシング）のために、本発明の自動インラインプラットフォームが使用される。一般に、本発明

の装置を使用する方法は、微生物が存在する場合、その微生物からゲノム物質を単離する工程と、サンプル液滴をサンプルから、シッパー（吸引部）を用いて本発明のミクロ流体のインライン反応流路へ吸引する工程と、およびサンプル液滴をプライマープラグと混合することによってサンプルプラグを形成する工程を含む。次に、サンプルプラグは、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って、サンプルプラグが少なくとも一回の、変性、アニーリング、および伸長を含む増幅サイクルにかけられ、本発明のミクロ流体デバイスの増幅領域（すなわち、第１温度制御領域）へ流れる。次に、サンプルプラグは、本発明のミクロ流体デバイスの、第２温度制御領域でもあり得る検出領域に入る。波形プロファイリングを用いた実施形態では、この検出領域は、第２温度制御領域でもあり、この領域では、各サンプルプラグの検出可能なエージェントは、第１および第２温度の間にある温度で検出されるので、各増幅したＤＮＡサンプルプラグが第１温度から第２温度になる。本発明の幾つかの実施形態では、サンプルプラグは、汚染（例えば、交差汚染）をさらに防ぐために、混合することのできない非水液体（例えば、ミネラルオイル）に囲まれる。

【００４９】

従って、一実施形態では、本発明は、サンプル中の微生物を決定する方法を提供する。この方法は、（ａ）前記サンプルを取得する工程と、（ｂ）前記サンプル中に前記微生物が存在する場合は、前記微生物のゲノムＤＮＡの少なくとも１コピーを単離する工程と、（ｃ）ＳＧＰプライマーと、ヌクレオチドと、ＤＮＡポリメラーゼと、挿入剤とを含む第１混合物を前記微生物のゲノムＤＮＡに導入して第２混合物を形成する工程と、（ｄ）第２混合物を第１温度に加熱して、前記ゲノムＤＮＡが存在する場合は前記ゲノムＤＮＡを第１および第２のゲノムテンプレートＤＮＡに変性させる工程と、（ｅ）前記第２混合物を第２温度に冷却して、前記プライマーが各ゲノムテンプレートＤＮＡにアニールする工程と、（ｆ）前記第１温度と前記第２温度の間の温度である第３温度まで前記第２混合物を再加熱し、前記プライマーが前記ゲノムＤＮＡと前記ＤＮＡポリメラーゼとにアニールされ続けて前記ＤＮＡポリメラーゼがアニールされたプライマーから生じる核酸ポリマーを伸長する工程と、（ｇ）前記第３温度を第１時間だけ維持する工程と、（ｈ）工程（ｄ）～（ｇ）を少なくとも１回繰り返す工程と、（ｉ）工程（ｄ）～（ｆ）を繰り返す工程と、（ｊ）前記第３温度を前記第１時間の約４０～６０％の長さである第２時間だけ維持する工程と、（ｋ）前記第２混合物を前記第２温度以下の第４温度まで再度冷却して、挿入剤を含む高次構造の形成を可能にさせる工程と、（ｌ）前記形成した高次構造を検出する工程と、（ｍ）融解温度分析を行う工程と、（ｎ）波形プロファイルを検出する工程と、（ｏ）前記サンプルが前記微生物を含む場合に、前記サンプルから正の波形プロファイルを特定する工程とを有することを特徴とする方法である。別の実施形態では、第３温度は、第１時間の長さの約４０～６０％（例えば５０％）である第２時間だけ維持される。別の実施形態では、工程（ｄ）～（ｇ）は、工程（ｈ）で２０～５０回繰り返される（例えば、２２～２４回）。別の実施形態では、工程（ｉ）～（ｊ）は、工程（ｋ）以前に一回以上繰り返される。

【００５０】

従って、本発明は、サンプル中に微生物が存在するか存在しないかを検出するための方法を提供する。この方法は、（ａ）前記サンプルを取得する工程と、（ｂ）前記サンプル中に前記微生物が存在する場合は、前記微生物のゲノムＤＮＡの少なくとも１コピーを単離する工程と、（ｃ）少なくとも一滴のサンプルをミクロ流体の反応流路に吸引する工程と、（ｄ）少なくとも一滴のサンプルを、少なくとも１つのプライマーとヌクレオチドとＤＮＡポリメラーゼと挿入剤とを含む増幅試薬を有するプライマープラグと混合させることによって、少なくとも１つのサンプルプラグを形成する工程と、（ｅ）前記少なくとも１つのサンプルプラグを第１温度に加熱して、前記ゲノムＤＮＡが存在する場合に前記ゲノムＤＮＡの各コピーが第１および第２のゲノムテンプレートＤＮＡに変性させる工程と、（ｆ）前記少なくとも１つのサンプルプラグを第２温度に冷却して、前記プライマーが各ゲノムテンプレートＤＮＡにアニーリングさせる工程と、（ｇ）前記第１温度と前記第２温度の間の温度である第３温度に再度加熱し、（１）前記プライマーが前記ゲノムＤＮ

Ａにアニーリングされ続けて（２）前記アニーリングされたプライマーから生じる核酸ポリマーを伸長させることを可能にする工程と、（ｈ）前記第３温度を第１の長さの時間だけ維持する工程と、（ｉ）工程（ｅ）～（ｈ）を少なくとも１回繰り返す工程と、（ｊ）増幅して得られる産物を検出する工程と、少なくとも工程（ｃ）～（ｊ）は、請求項６に記載の前記装置内で起こることを特徴とする方法である。別の実施形態では、この方法は、工程（ｉ）の後、および工程（ｊ）の前に、（１）工程（ｅ）～（ｇ）を繰り返し、（２）前記第３温度を前記第１温度の約４０～６０％の時間だけ維持し、（３）挿入剤を含む高次構造の形成を可能にするように、前記サンプルプラグの少なくとも１つを、前記第２温度以下である第４温度に冷却することをさらに特徴とする。別の実施形態では、工程（ｊ）の検出工程は、１つの温度で行われる。別の実施形態では、工程（ｊ）の検出工程は、ある範囲内の温度で行われる。別の実施形態では、さらなる分析を行うためのサンプルプラグを選択する最終工程をさらに備え、前記選択する工程が、装置内のバルブで行われる。当業者は、上述の実施形態における検出工程が、スクリーニング、定量、同定および／または、任意には、さらなる分析のための選択につながるということを理解し得る。

【００５１】

従って、本発明は、汚染物を見つけるために本発明の装置を使用して供給サンプルをスクリーニングする方法を提供する。この方法は、少なくとも１つのミクロ流体の反応流路に、サンプル液滴を前記供給サンプルから継続的に吸引し、各サンプル液滴を、増幅試薬を含むプライマープラグと混合することによってサンプルプラグを形成し、ゲノム材料を含むサンプルプラグ中でＤＮＡを増幅し、増幅産物が存在しないか存在するかを検出し、これらの工程は、本発明の装置内で起こることを特徴とする。本発明のこの実施形態では、増幅したＤＮＡ産物の連続的な欠如（すなわち、全く検出されないこと）は、汚染されていない供給サンプルを示す。一方、増幅した産物の存在は、汚染された供給サンプルを示す。

【００５２】

本発明はさらに、本発明の装置を使用して微生物を同定する方法を提供する。この方法は、（ａ）前記微生物から分離したＤＮＡ分子を含む、少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを調製する工程と、（ｂ）前記少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に取得する工程と、（ｃ）前記少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを、少なくとも１つの既知の第１プライマーを含む増幅試薬を含むプライマープラグと混合することによって、少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを形成する工程と、（ｄ）前記少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを少なくとも１回の増幅サイクルに晒して、前記少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグが検出可能な増幅したＤＮＡ産物を持つ工程と、（ｅ）前記増幅したＤＮＡ産物を検出する工程と、（ｆ）前記増幅した産物の検出に基づいて前記微生物を同定する工程と、（ｇ）前記微生物の前記同定の正確さを上げるるために、前記既知の第１プライマーとは異なる既知のプライマーを含む増幅試薬を用いて工程（ａ）～（ｆ）を任意に繰り返す工程と、を有し、少なくとも工程（ｂ）～（ｅ）は、本発明の装置内で行われることを特徴とする。本発明の一実施形態では、プライマーはある微生物を同定するために選ばれる（例えば、上述の方法を用いて増幅した産物が検出されたことが、微生物の同定を意味するように、特定の微生物のゲノムＤＮＡに特異的に結合する特定のＴＡＱＭＡＮ（登録商標）を選び得る）ため、増幅したＤＮＡ産物の検出は、ＤＮＡを単離した微生物の同定を意味する。別の実施形態では、本発明の波形プライマーまたはＳＧＰプライマーが使用され、検出された波形プロファイルが微生物の同定を意味する。

【００５３】

本発明はさらに、供給サンプル中における汚染レベル（すなわち、サンプル中におけるゲノム物質の濃度）を定量化するための方法を提供する。本発明の装置を使用した本発明の定量化法は、（ａ）前記ゲノム物質の前記濃度が最大であってもサンプル１滴につき約１分子であるように、希釈係数を用いて前記サンプルを希釈する工程と、（ｂ）少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路にサンプル液滴を取得する工程と、（ｃ）各サ

ンプル液滴を、増幅試薬を含むプライマープラグと混合して、２つ以上のサンプルプラグを形成する工程と、（ｄ）少なくとも１つのＤＮＡ分子を有する各サンプルプラグが検出可能な増幅したＤＮＡ産物を有し、かつ、ＤＮＡ分子を含まない各サンプルプラグが増幅したＤＮＡ産物を全く検出しないように、各サンプルプラグを増幅サイクルに晒す工程と、（ｅ）各サンプルプラグ中に増幅したＤＮＡ産物が存在しないか存在するかを検出する工程と、（ｆ）検出可能な増幅したＤＮＡ産物を含むサンプルプラグと、全く検出されないという結果をもたらすサンプルプラグとの比率を決定する工程と、（ｇ）前記希釈係数を用いて前記サンプル中のゲノム材料の初期濃度を計算する工程と、を有し、少なくとも工程（ｂ）～（ｅ）が本発明の装置内で行われることを特徴とする。

【００５４】

ゲノム物質のシークエンシング分析は、微生物を分類する上での基準法である。従って、本発明の別の目的は、本発明の装置を使用してゲノム物質のさらなる分析（例えば、上述の任意の方法を用いて分析されたゲノム物質に関する詳細な配列情報が提供され得るように）を可能にする方法を提供することである。従って、本発明は、本発明のミクロ流体デバイスの試薬アセンブリ領域、増幅領域および／または検出領域を移動したＤＮＡサンプルプラグが、さらなるシークエンシング分析のために、任意に選択され得る方法を提供する。この選択プロセスは、本発明のミクロ流体デバイスの「バルブ」にて行われる。選択された後、本発明のミクロ流体デバイスのバルブは、選択されたＤＮＡサンプルプラグが、シークエンシングされるために装置（例えば、ＤＮＡシークエンシングチップ）へ進むことを可能にする。

【００５５】

別の実施形態における発明では、サンプルプラグが、混合することができない非水液体に取り囲まれている工程をさらに含むことを特徴とする方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００５６】

本発明は、ミクロ流体デバイス内や機器内の流体運動と、ミクロ流体デバイスや機器の加熱および冷却と、ミクロ流体デバイスや機器からのデータ収集とを行うミクロ流体デバイスや機器を含む装置を提供する。サンプル中の微生物を検出および／または分類する目的で、微生物のゲノム物質を準備（例えば、単離、処理、反応試薬と混合など）、（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリングなどによる）増幅、検出および／または、任意には、さらに分析（例えばシークエンシング）するために選択することを可能にする自動インラインプラットフォームとして、本発明の装置は使用され得る。

【００５７】

さらに本発明は、本発明の装置およびそれとともに使用される方法が、少ないＤＮＡの初期量に対して用いられ得るように、波形プロファイリング法に対して改良を提供するものである。波形プロファイリング法に対しての改良は、改良型ＰＣＲ、すなわちＤＮＡの指数関数的増幅を実施する改良型プライマーを含む。波形プロファイリング法に対する改良は、増幅手順中に半分の時間での伸長工程も含み、改変型ＰＣＲ（すなわちｍＰＣＲ）によって形成される核酸ポリマーの部分集合由来の一組の縮小一本鎖核酸ポリマー（ｓｈｏｒｔｅｎｅｄ ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｐｏｌｙｍｅｒ）の生成を可能にする。当業者は、波形プロファイリング法への改良が、微生物が少数（例えば、汚染の開始時の水供給）で存在するとしても、その微生物の検出および／または分類を可能にすることを理解し得る。従って、本発明は、空気、埃、水、血液、組織、植物、食品だけには限られないが、これらを含めた、微生物によって汚染状態になり得る多くの供給源（例えば、環境系および医学系）に関する品質保証の提供を助長する、改良型波形プロファイリング法を提供する。

【００５８】

さらに、本発明は、微生物のゲノム物質の準備（例えば、単離、処理、反応試薬と混合など）、（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリングなどによる）増幅、検出（スクリーニング、同定、定量）、および、任意には、さらなる分析（例えば、シークエンシング）の

ために開示された装置を使用する方法を提供する。一実施形態では、本発明は、ハイスループット自動インライン波形プロファイリングのための方法を提供し、波形プロファイリングの方法（例えば、本明細書に開示された改良法）は、本明細書に開示されたように、自動インライン波形プロファイリングプラットフォームを用いて行われる。当業者は、本発明が、単一ゲノム、または少数のゲノムの増幅および検出を含むことを理解し得る。

【００５９】

Ｉ．本発明の自動インラインプラットフォーム

ここ数年にわたって、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｅａｃｏｎｓ、Ｅｐｏｃｈ Ｅｃｌｉｐｓｅ Ｐｒｏｂｅｓ、Ａｌｌｅｌｅ Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎなどの様々な、既存の蛍光性の「混ぜて解読」する生化学的手法に適合する、上述した自動インラインＰＣＲプラットフォームが開発されてきた。現在、波形プロファイリングと連携して使用可能の、ＰＣＲと使用するために開発された自動インラインプラットフォームは１つも知られていない。さらに、以前分析されたゲノム物質を、さらに分析（例えば、サンプルの増幅後にＤＮＡサンプルの配列分析を行う）するために選択することができる自動インラインプラットフォームは存在しない。本発明は、このようなプラットフォームを提供する。以下、本発明の自動インラインプラットフォーム、すなわち、ＰＣＲおよび波形プロファイリング法の一方または両方によって増幅したＤＮＡ産物を生成および検出できるミクロ流体デバイスと、ミクロ流体デバイス内で流体の運動を制御し、ミクロ流体デバイスを加熱および冷却し、ミクロ流体デバイスからデータを収集する機器と、を含む装置について説明する。さらに、装置は、機器をミクロ流体デバイスに接続するカートリッジ（または同様の装置、または同様な機能を達成する装置）をさらに含み得る。このようなカートリッジは、当技術分野で周知である。

【００６０】

Ａ．本発明のミクロ流体デバイス

図１Ａ、Ｂおよび図２Ａ、Ｂは、本発明の装置の模式図を提供し、サンプルプラグの準備（図１Ａ）、増幅（図１Ｂ）、検出（図２Ａ）、および選択（図２Ｂ）のプロセスを表すものである。これらのプロセスは、幾つかの異なる目的（例えば、ゲノムＤＮＡのスクリーニング、同定、定量および／またはシークエンシングなどのさらなる分析）を達成するために共通に使用され得る。

【００６１】

１．サンプルプラグの準備

図１Ａは、サンプルプラグを準備するプロセスを表す。簡単に説明すると、サンプル容器（１）から検査されるべきサンプルは、有機細胞の収集および余分な成分の除去のためにろ過装置（２）に送られる。サンプル液体に収集された有機細胞は、例えばウイルス、細菌などのゲノム物質（例えば、細胞膜、細胞小器官、ヒストン、残屑などの除去）の単離のための抽出装置（３）に送られ得る。ゲノム物質の単離後、サンプル液体および任意の単離されたゲノム物質は、ゲノム物質の濃度を調節するために濃度調節器（４）に送られ得る。濃度調節器（４）からのサンプル液体は、ミクロ流体のインライン反応流路（５）に吸引され、ゲノム物質（例えば、少なくとも１つのゲノムＤＮＡ分子）を含み得るか含み得ないサンプル液滴（８）を形成するために、例えばＴ字形の接合部（７）でキャリア液体（６）と混合される。

【００６２】

サンプルプラグを準備するプロセスの一環として、プライマー装置（９）は、ＤＮＡ増幅，および、任意には、検出のための試薬を含むキャリア液体に一連のプライマープラグを作製する。プライマープラグはそれぞれ、サンプルプラグを形成し、サンプルプラグの準備プロセスを成し遂げるために別の接合部（例えば、Ｔ字形の接合部（１０））でサンプル液滴（８）と混合される。

【００６３】

当業者は、本発明の自動インラインプラットフォームを用いて多くの種類のサンプルを検査し得ることを理解し得る。このようなサンプルは、空気、埃、水、血液、組織、植物

、食品、および、体液（例えば、唾液、全血、プラズマ、血漿、尿など）と細胞（例えば、全細胞、細胞分画、および細胞抽出物）と組織とを含む生体サンプルを有するが、これらだけには限定されない。生体サンプルはさらに、組織学的な目的で取得した生検および凍結切片などの組織切片を含む。望ましい生体サンプルとして、血液、血漿、リンパ液、組織生検、尿、ＣＳＦ（脳脊髄液）、滑液、およびＢＡＬ（気管支肺胞洗浄）が含まれる。

【００６４】

検査すべきサンプルは、幾つかの方法によって収集し得る。例えば、水供給の純度をモニターする場合は、水供給に沿って配置されているろ過システムを、細菌などを捕獲するように設計されているフィルターから任意のゲノム物質を単離することによって、所定の間隔（１時間ごと、１２時間ごとなど）でチェックするように構成することができる。このようなろ過システムは、水供給中に存在する細菌を濃縮し得る。このようなろ過システムは、より高感度で検出するために水供給に存在する細菌を濃縮する。また、サンプルは、ろ過および／または濃縮をせずに水供給から直接採取し得る。サンプルの他の供給源については、例えば細菌を捕獲する空気ろ過システムを使用し得る。フィルターに捕獲した物質は、単離手順を始めるために溶液に入れられ得る。他の種類のサンプルには、付加的な工程が必須である。例えば、血液サンプル中の細菌を検出するために本発明を使用することに関する初期手順の一部は、細菌を、ゲノム物質を含むヒト血液成分から分離することを必要とする。例示的なサンプルから細菌および／またはウイルスのゲノム物質を単離する多数の技術およびその他の多数の技術は、当技術分野において周知である。

【００６５】

サンプル中に含まれる任意のゲノム物質の単離は、当業者によく知られている多くの技術によって達成できる。本発明の一実施形態では、ゲノム物質を含むサンプルプラグが、わずか１つのゲノムを含むサンプルプラグから区別されるため、単離手法は、ゲノム物質を単離および捕捉する高性能な技術であるべきである。水試料中に存在する細菌の全ＤＮＡゲノムは、当技術分野において周知である技術（例えば、このような技術のうち１つは、Ｘｔｒａｎａ、　Ｉｎｃ．（Ｂｒｏｏｍｆｉｅｌｄ、ＣＯ）より入手できる）を用いて単離し得る。

【００６６】

Ｘｔｒａｎａは、次の３つのセットのサンプルにおいて、それぞれ異なる技術を開発した。これらは（Ａ）全血、軟膜、口腔スワヴ、および大腸菌からのゲノムＤＮＡ、（ｂ）組織培養細胞からのＲＮＡ、ならびに、（ｃ）組織培養細胞、齧歯類の尾、全組織、血の染み、および酵母からのゲノムＤＮＡである。簡単に説明すると、電気的陽性な親水性マトリクスであるＸｔｒａＢｉｎｄ（Ｘｔｒａｎａ、Ｉｎｃ．）でコーティングしたプラスチックのミクロビーズをサンプルに追加すると、配列に依存しない、基本的に不可逆な形でＲＮＡまたはＤＮＡの一方が吸収される結果になる。当業者は、本明細書に記載されている方法はＤＮＡの増幅プロセスを示すため、単離したゲノム物質がＲＮＡである場合は、増幅前に、まずＤＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ）に逆転写しなければならないことを理解し得る。逆転写の方法は当技術分野において周知である。好ましい一実施形態では、微生物の全ゲノムＤＮＡが単離される。

【００６７】

ゲノムＤＮＡの分離のために使用可能な別の技術として、Ｑｉａｇｅｎ　ＮＡ（Ｑｉａｇｅｎ、Ｖｅｎｌｏ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）、ＭａｇＮＡＰｕｒｅ（Ｒｏｃｈｅ、Ｎｕｔｌｅｙ、ＮＪ）、ＫｉｎｇＦｉｓｈｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ、Ｈｅｌｓｉｎｋｉ、Ｆｉｎｌａｎｄ）、およびＲｅｖＰｒｅｐ　Ｏｒｂｉｔ（ＧｅｎｅＭａｃｈｉｎｅｓ、Ｓａｎ　Ｃａｒｌｏｓ、ＣＡ）がある。

【００６８】

ゲノムＤＮＡがサンプルから一度単離されると、サンプル液体中のゲノムＤＮＡの濃度を調節し得る。本発明の一実施形態では、サンプル液滴が一個のゲノムＤＮＡ分子のみ（すなわち、１つの微生物のみからのゲノム物質）を含むように、またはゲノムＤＮＡ分子

を含まないように、濃度が調節される。他の実施形態では、サンプル液滴一滴につき約０．５個のＤＮＡ分子を含む濃度でもよい。あるいは、濃度は、サンプル液滴が一個以上のＤＮＡ分子で構成されている確率で表現され得る。別の実施形態では、サンプル液滴が二個以上のＤＮＡ分子を含む確率は、例えば３パーセント未満である。

【００６９】

サンプルからのゲノム物質の濃度を調節した際、サンプル液体は、ミクロ流体のインライン反応流路に繰り返し吸引され、連続するサンプル液滴を含むキャリア液体を形成する。好ましくは、各サンプル液滴は、約１－２ｎｌである、または、例えば、直径が約１００μｍであるミクロ流体のインライン反応流路内では長さが約１００μｍである。このような繰り返し形成されたサンプル液滴は、ゲノム物質を含んでもよいし、含まなくてもよい。また、ゲノム物質を含む場合、ＤＮＡサンプル液滴として考えられ得る。さらに、サンプル液滴は、単離手法で使用される任意のビーズ（例えば、Ｘｔｒａｎａのビーズ）を含み得る。あるいは、単離手法に使用される任意のビーズは、サンプル液滴の吸引以前に除去し得る。

【００７０】

一般に、ミクロ流体のインライン反応流路は、直径が５０μｍから３００μｍの間であってもよく、通常、直径は１００μｍである。ミクロ流体のインライン反応流路は、ガラス、石英またはプラスチックによって形成され得る。ミクロ流体のインライン反応流路を形成する方法は、当技術分野では周知である。さらに、当業者は、ミクロ流体のインライン反応流路が、多くの異なる通路（例えば、直線であったり、他のミクロ流体のインライン反応流路と合流する接合部で接合したり、別の接合部で２つ以上のミクロ流体のインライン反応流路に分かれたり、ミクロ流体のインライン反応流路内の流体がたまったりおよび／または混合したりするのを可能にしたり、など）を通り、装置の領域に応じて、異なる材料によって形成され得る（例えば、ミクロ流体デバイスの検出領域内にあるときは透明材料によって形成され得る）ことを理解し得る。

【００７１】

一般に、キャリア液体（６）は、水性の液体であり、サンプル液体と同じ液体である。さらに、キャリア液体は、有機性の液体（例えば、約６０ポイズのシリコン油）、または不混和性の非水の流体である。本発明の一実施形態では、反復的なサンプル液滴は、ミクロ流体のインライン反応流路に吸引され、サンプル液滴は、バッファースペーサーによってそれぞれお互いから孤立される。好ましい一実施形態では、不混和性の非水の流体（例えば、鉱油）または他の何らかの疎水性物質が、バッファースペーサーとして使用され、ＤＮＡ（またはＤＮＡのない）を含む各サンプル液滴を囲み、本発明のミクロ流体のインライン反応流路を移動していくすぐ前またはすぐ後のサンプル液滴から分離するように、シッパー（吸引部）に吸引されている各サンプル液滴に、またはシッパー（吸引部）に吸引されている各サンプル液滴の間に、加えられる。鉱油が反復的なＤＮＡサンプルを分離するのに適した物質であることは、当業者に知られている。さらに、本発明のミクロ流体デバイスにおけるミクロ流体流路の内壁は、不混和性の非水の流体（例えば、鉱油）または他の何らかの疎水性物質によって処理され得る。この一連の疎水性の改良は、サンプル液滴間の交差汚染を減らすまたは防ぐことができる。言い換えれば、ミクロ流体に内在的な動きにかかわらず、キャリア液体とバッファースペーサーとの間の疎水性／親水性の違いは、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って移動中の１個のＤＮＡ分子が液滴（８）またはプラグの中に、バッファースペースと混ざることなく、あるいは隣接する液滴またはプラグと混ざることなく、保たれることを可能にする。

【００７２】

本発明のミクロ流体デバイスでは、各サンプル液滴は、接合部（例えば、Ｔ字形の接合部（１０））にてさらに準備され、増幅試薬（例えば、単数または複数のプライマー、ヌクレオチド、ポリメラーゼなど）と、任意には、検出試薬（例えば、例えばラベル、蛍光プローブ、挿入剤などの検出可能なエージェント）と、を含むプライマープラグと混合されることによってサンプルプラグが形成される。当業者は、どの増幅試薬が各サンプル液

滴と混合されるべきか、および、試薬がどの濃度で使われるべきかを理解し得る。例えば、増幅試薬は、通常、ポリメラーゼ、ｄＮＴＰ、マグネシウム、バッファー、１つまたは一対のプライマーを含む。当業者はさらに、使用すべき１つまたは一対のプライマーを決定することができる。例えば、ＰＣＲの場合、当業者は、一対のプライマーを使用することを理解し得る。一方、当業者が波形プロファイリング分析を行いたい場合、波形またはＳＧＰプライマーを選択する。このようなプライマーの設計および選択は、当技術分野でよく知られている。さらに、このような試薬を用いて直接または間接に増幅したＤＮＡ産物をラベルする検出試薬および方法はよく知られている。

【００７３】

サンプル液滴がミクロ流体のインライン反応流路に吸引され、交差汚染を防ぐために他のサンプル液滴から分離され、サンプルプラグを形成するために増幅試薬と混合された後、このサンプル液滴は、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って、本発明の装置の増幅領域（すなわち、第１温度制御領域）内に吸引される。当業者は、サンプル液滴と同様に、サンプルプラグがゲノム物質を含んでもよいし含まなくてもよいこと、また、ゲノム物質を含む場合、ＤＮＡサンプルプラグとして考えられ得ることを理解し得る。さらに、当業者は、ＤＮＡサンプルプラグだけが、本発明の装置の第１温度制御領域内で増幅されるＤＮＡを含むことを理解し得る。

【００７４】

２．ＤＮＡサンプルプラグ内のＤＮＡの増幅

図１Ｂは、上述のように準備された後のサンプルプラグ内に存在するＤＮＡの増幅を、本発明の装置がどう成し遂げるかの限定されない例を提供する。（プライマープラグと混合したサンプル液滴を含む）サンプルプラグは、インラインミクロ流体の反応流路（５）に沿って連続的に吸引されると、増幅領域（すなわち、例えば温度制御板（１１）であってもよい第１温度制御領域）に向かわされる。ミクロ流体のインライン反応流路の通路（１２）は、各サンプルプラグが、曲がりくねるように温度制御板（１１）の低温度領域（１３）および高温度領域（１４）を往復しながら移動することを可能にし得る。

【００７５】

当業者は、（１）低温度領域（１３）、高温度領域（１４）、ならびに、低温度領域および高温度領域の間の領域と、（２）ミクロ流体のインライン反応流路の通路（１２）と、（３）サンプルプラグがミクロ流体のインライン反応流路を移動する速度と、が適宜調節され得ることを理解し得る。例えば、低温度領域（１３）は、アニーリングを成し遂げるために適切な温度に設定され、高温度領域（１４）は、変性を成し遂げるために適切な温度に設定され得る。さらに、ミクロ流体のインライン反応流路の通路（１２）は、例えば、変性、アニーリングおよび伸長を約２０～４０サイクル成し遂げるように、サンプルプラグが、低温度領域および高温度領域の間を往復することを可能にするように設計され得る。最後に、サンプルプラグ（またはＤＮＡサンプルプラグ）が、ミクロ流体のインライン反応流路中を流れる速度は、各サンプルプラグ（またはＤＮＡサンプルプラグ）が適当な時間の長さだけ変性、アニーリング、または伸長の温度に保たれるように設定され得る。

【００７６】

前述のとおり、各ミクロ流体のインライン反応流路またはその一部は、増幅方法（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリング、（本明細書中に説明されている）ＳＧＰ）の変性、アニーリング、および伸長の工程が、サンプルプラグがミクロ流体のインライン反応流路に沿って移動するとき、および本発明のデバイスの第１温度制御領域を通して移動するとき、局所的および／または繰り返して急速に加熱および冷却され得る。例えば、ジュール加熱（例えば、米国特許第５９６５４１０号および第６６７０１５３号を参照）は、本発明のデバイスの各ミクロ流体のインライン反応流路と並んだまたは十字交差した金属トレースに電圧を印加するために使用され得る。ミクロ流体のインライン反応流路を加熱する別の方法として、例えば、熱水または熱気などを用いることは当技術分野においてよく知られている。さらに、ミクロ流体のインライン反応流路またはその一部の冷却は、熱エネ

ルギーを取り除くようにコイル中を移動する冷却流体を用いること、または急速な熱放散を可能にすることによって達成でき得る。加熱する方法と同様に、ミクロ流体のインライン反応流路を冷却する別の方法は当技術分野ではよく知られている。

【００７７】

当業者は、本発明の装置を使用する異なる方法（例えば、スクリーニング、同定、定量など）において、ＤＮＡの増幅を成し遂げるためにＤＮＡサンプルプラグに施されなければならない温度、その温度の保持時間、およびサイクル数を理解し得る。例えば、好ましい一実施形態では、変性温度は９０℃から９５℃の間であり、アニーリング温度は５５℃から６５℃の間であり、伸長温度は選択したポリメラーゼに左右される（例えば、Ｔａｑポリメラーゼの最適な伸長温度は約７２℃である）。また、当業者は、「ホットスタート」を用いてＰＣＲ増幅を始める方法がよく用いられ、ＤＮＡサンプルプラグの７５℃での最終的な維持を、任意の増幅方法の終わりに任意に加えることができることを理解し得る。

【００７８】

サンプルプラグは、ミクロ流体のインライン反応流路中を５０μｍ／秒から５０００μｍ／秒の範囲の異なる速度で移動され得る。当業者は、サンプルプラグがミクロ流体のインライン反応流路中を移動する速度を変えると、サンプルプラグがある温度（例えば、変性、アニーリング、伸長などに必要な温度）で保たれる時間が変わることを理解し得る。例えば、標準的なサイクリングプロファイルは９４℃を１分、６０℃を１分、７２℃を１分（標準的なルールとして７２℃での伸長は、１０００塩基対につき１分である）などであるが、当業者は、サンプルプラグがある温度で保持される時間は、反応の量およびゲノムＤＮＡの濃度などに依存することを理解し得る。従って、本発明のミクロ流体デバイスを使用するとき、タイミングは、標準的なサイクリングプロファイルと異なり得る。当業者は、各温度での時間がより短くても十分である可能性があることを理解し得る。さらに、当業者は、必要な増幅サイクル数を達成するためにミクロ流体のインライン反応流路が必要とする適切なパスを決定することができる。

【００７９】

サンプルプラグを準備し、ミクロ流体のインライン反応流路に吸引し、交差汚染を防ぐために他のサンプル液滴から分離し、サンプルプラグを形成するために増幅試薬と混合し、ＤＮＡサンプルプラグ中のＤＮＡを増幅した後、各サンプルプラグは、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って、第２温度制御領域であってもよい、装置の検出領域内へ送られる。当業者は、ＤＮＡサンプルプラグのみが検出可能な増幅したＤＮＡ産物を含むことを理解し得る。

【００８０】

３．増幅したＤＮＡ産物の有無の検出

本発明のミクロ流体デバイスは、（１）ＤＮＡを、サンプル液滴としてミクロ流体デバイス内に吸引することを可能にし、（２）サンプル液滴を、増幅反応成分および／または検出成分を含むプライマープラグと混合することによって試薬アセンブリ領域でサンプルプラグを形成し、（３）ＤＮＡサンプルプラグをミクロ流体デバイス内に沿って増幅領域を通るように進むと、ＤＮＡの増幅を達成し、（４）ＤＮＡサンプルプラグが検出領域を通ると、増幅したＤＮＡ産物の検出を可能にするように設計されている。さらに、本発明のミクロ流体デバイスは、２つの技術革新のうち１つを用いて設計されている。

【００８１】

本発明のミクロ流体デバイスの１つの革新的な特徴は、検出領域を通るミクロ流体インライン流路を、第２温度制御領域内に設置することを含むことである。検出領域を通るミクロ流体インライン流路を、第２温度制御領域内に設置することによって、ミクロ流体インライン流路に沿って移動するサンプルプラグに、検出中、様々な温度を施すことが可能になる。当業者は、様々な温度を施すこと（例えば、ＤＮＡサンプルプラグの蛍光を、様々な温度で検出すること）によってサンプルプラグを検出することが、例えば増幅したＤＮＡ産物の融解温度を分析することが可能になることを理解し得る。従って、本発明は、少なくとも１つのシッパー（吸引部）と、試薬集合領域と、第１温度制御部内の増幅領域

と、第２温度制御部内の検出領域と、を通る、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、前記ミクロ流体のインライン反応流路を加熱するためのおよび／または流体を運動させるための少なくとも１つの金属トレースと、を備え、増幅したＤＮＡ産物の検出は、１つ以上の温度で行われることを特徴とするミクロ流体デバイスを提供する。

【００８２】

図２Ａは、本発明のミクロ流体デバイスの検出領域の例を提供する。増幅したＤＮＡを含まないサンプルプラグまたは増幅したＤＮＡを含むサンプルプラグを、ミクロ流体のインライン反応流路（５、図１と同様）に沿って吸引すると、検出領域（すなわち、例えば第２温度制御板（１６）であってもよい第２温度制御領域）に入る。ミクロ流体のインライン反応流路は、サンプルプラグが低温度領域（１８）および高温度領域（１９）の間を移動すると、サンプルプラグ中の増幅したＤＮＡが存在しないかまたは存在するかを検出する検出パス（１７）を含み得る。サンプルプラグが光学スキャニング領域（２０）を通ると、任意の検出可能な試薬（例えば、蛍光プローブ、挿入剤など）は（例えば、３色のレーザービームによって）光学的に励起され、得られる発光は測定し得る。

【００８３】

一般に、検出領域の低温度領域（１８）は約２５℃から約６５℃の間の温度に設定され得る。検出領域の高温度領域（１９）は、約５５℃から約９５℃の間の温度に設定され得る。ＰＣＲで増幅したＤＮＡを検出する場合、検出領域（１６）の低温度領域（１８）および高温度領域（１９）は、１つの温度（例えば、約２５℃から約５５℃の間）に設定され得る。

【００８４】

検出領域において温度を制御するために使用し、ＤＮＡサンプルプラグ内の検出可能な試薬を刺激し、発光または発光の変更を検出するために使用し得るさまざまな機器は当技術分野でよく知られている。例えば、本発明の一実施形態では、温度は、例えば、光学スキャニング領域（２０）あるいはより大きいまたは小さいスキャニング領域をカバーする赤外線電荷結合素子（ＣＣＤ）（図示せず）によって測定され得る。好ましい一実施形態では、赤外線ＣＣＤを較正するための正確な温度センサーの第２温度制御板への設置は、温度測定の正確さを向上させるために推奨される。

【００８５】

当業者は、サンプルプラグ（例えば、ＤＮＡサンプルプラグ）に、検出領域内でさまざまな温度を施すと、波形プロファイリング法（例えば、上述の方法）または本明細書中に記載されているＳＧＰ法などから生じる波形プロファイルを検出することが可能になることを理解し得る。言い換えれば、サンプルプラグが、温度を行き来すると、生じる任意の発光と、サンプルプラグの温度との間の相関性を測定し得る。さらに、ＤＮＡサンプルプラグは様々な温度にさらされるので、ＰＣＲによって増幅したＤＮＡは検出し得る。ただし、実際は、発光は１つの温度のみで検出すればよい。あるいは、低温度領域および高温度領域は、ＰＣＲで増幅したＤＮＡの検出のために１つの温度に設定し得る。

【００８６】

上述のとおり、増幅したＤＮＡにさまざまな温度を施しながら、検出段階（図２Ａに図示せず）の光学システムを、増幅したＤＮＡ（例えば、高次構造）からの発光の変更を検出するために使用し得る。言い換えれば、検出領域内の光学システムを、単離したＤＮＡの波形プロファイルの測定、検出、および決定に使用し得る。任意の波形プロファイルの検出は、スクリーニングしたサンプルが汚染されていることを示し、結果として得られた波形プロファイルを、既知のプライマーおよび既知の微生物から単離したＤＮＡによって設けられた波形プロファイルのデータベースと比較することによって、汚染微生物を同定し得る。さらに、単離したゲノム物質がサンプル液体中に濃縮されており、その濃度は知られている場合、汚染のレベルを、波形プロファイルが検出されたら定量化し得る。

【００８７】

当業者は、ゲノム物質の準備、単離したゲノム物質の波形プロファイリング法による増

幅、および発生した波形プロファイルの検出のために本発明の装置を使用することは、サンプルが汚染されているかおよび／またはどの微生物がサンプルを汚染しているかに関する情報が少ないまたは全くない場合、特に有用だということを理解し得る。当業者は、ゲノム物質を単離し、ＰＣＲにより単離したゲノム物質を増幅し、単数または複数のＰＣＲ産物を検出することで微生物の同定（例えば、波形プロファイルから得た情報）をさらに確実なものにできることをさらに理解し得る。本発明の一実施形態では、同じ微生物から幾つかのＤＮＡサンプル液滴を形成し、各ＤＮＡサンプルプラグを、微生物を同定するために特異的に選択した異なるプライマーと組み合わせ、各ＤＮＡサンプル液滴を異なるプライマー（またはプライマーのセット）でＰＣＲによって増幅し、増幅した産物が存在しないかまたは存在するかを検出することで、微生物の同定をさらに確実なものにする。増幅した産物の存在を特定の使用した単数または複数のプライマーと相関することによって、微生物を同定することができ得る。

【００８８】

上述のとおり、微生物の存在をスクリーニングし、微生物を同定し、サンプル中の微生物の濃度を定量化することは、本発明のミクロ流体デバイスを使用して波形プロファイリングおよび／またはＰＣＲを行うことで成し遂げられえる。本発明のミクロ流体デバイスは、少なくとも１つのシッパー（吸引部）と、試薬集合領域と、第１温度制御部内の増幅領域と、第２温度制御部内の検出領域と、を通り、検出領域の下流に設けられたバルブをさらに備える、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、増幅ＤＮＡ産物の検出が、２つ以上の温度でされ得る、前記ミクロ流体のインライン反応流路を加熱するためのおよび／または流体を運動させるための少なくとも１つの金属トレースと、を含むことを特徴とする。単離したゲノム物質のさらに詳細な検査が必要な場合は、本発明のミクロ流体デバイスは、興味のあるＤＮＡサンプルプラグをさらなる分析を目的として選択するために使用してもよい。

【００８９】

４．さらなる分析のためのＤＮＡサンプルプラグの選択

従来のＤＮＡチップは、多くのＤＮＡ分析方法（特に配列分析）に用いられているが、高い柔軟性および高い性能ゆえの高いコストは、例えば水供給の汚染の確率は低く、ゲノム物質を単離する確率も低いため、汚染微生物をスクリーニングおよび同定する方法への使用を妨害するものである。さらに、複数の汚染微生物がいる場合、またはＰＣＲによる指数関数的増幅の後の場合、このような定量化の正確さは十分ではないので、ＤＮＡチップはコスト効率が良くない。本発明の装置は、微生物による汚染の検出するためにスクリーニングし、（存在する場合）汚染微生物を同定し、汚染レベルを定量化すること（例えば、本発明のミクロ流体デバイスを使用する際、ＤＮＡサンプルプラグ内の増幅したＤＮＡの検出だけでも汚染微生物の存在が示される。増幅したＤＮＡの分析によって、汚染微生物を同定することができ得る。さらに、増幅したＤＮＡを含まないサンプルプラグの数と増幅したＤＮＡを含むＤＮＡサンプルプラグの数の比率を測定することで、サンプル中の汚染微生物の濃度を測ることができ得る）に使用し得る、コスト効率の良いミクロ流体デバイスを提供することによって、このような問題を解決する。当業者は、本発明の装置がデジタル定量化法を使用するため、装置の正確さはＤＮＡチップの数倍であることを理解し得る。

【００９０】

しかしながら、例えばＤＮＡチップのシークエンシングの性能は、本発明のミクロ流体デバイスが有する（例えば、波形プロファイルの検出を介した）シークエンシングの性能より正確であり得る。従って、本発明のミクロ流体デバイスを、興味のあるＤＮＡサンプルプラグをさらに検査（例えば、例えばＤＮＡチップを用いたシークエンシング分析）するために選択するようにさらに使用し得る。

【００９１】

一実施形態では、本発明の新しいミクロ流体デバイスは、検出領域の下流にバルブをさらに備え、ＤＮＡサンプルプラグがさらなる分析（例えば、シークエンシング分析）のた

めに選択された場合、バルブはミクロ流体のインライン反応流路内の流れを変更し、ＤＮＡサンプルプラグが、例えば廃棄物だめへではなく、例えばＤＮＡシークエンシングチップの方へ流れることが可能にする。従って、本発明は、少なくとも１つのシッパー（吸引部）と、試薬集合領域と、増幅領域と、検出領域と、を通り、検出領域の下流に設けられたバルブをさらに備える、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、前記ミクロ流体のインライン反応流路を加熱するためのおよび／または流体を運動させるための少なくとも１つの金属トレースと、を備えることを特徴とするミクロ流体デバイスを提供する。

【００９２】

図２Ｂは、サンプルプラグ（例えば、ＤＮＡサンプルプラグ）がどのようにさらなる分析のために選択されるかについて限定されない模式図を提供するものである。サンプルプラグ（２１）は、ミクロ流体のインライン反応流路に沿って、Ｔ型分岐合流点などの分岐合流点にある選択バルブ（２２）に達するまで動く。本発明のミクロ流体デバイスの検出領域から集めたデータまたは別のデータに基づいて、対象とするＤＮＡサンプルプラグ（２３）がさらなる分析のために、ＤＮＡチップ（２４）などを用いて選択される（図２Ａ）。

【００９３】

本発明の一実施形態では、（１）第２温度制御領域としての検出領域、および（２）検出領域の下流にバルブを備える少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路、の一方または両方をミクロ流体デバイスは備える。従って、本発明は、少なくとも１つのシッパー（吸引部）と、試薬集合領域と、第１温度制御部内の増幅領域と、本体構造の検出領域と、を通り、本体構造の検出領域の下流に設けられたバルブをさらに備える、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に接続された少なくとも１つの流体だめと、増幅ＤＮＡ産物の検出が、２つ以上の温度でされ得る、前記ミクロ流体のインライン反応流路を加熱するためのおよび／または流体を運動させるための少なくとも１つの金属トレースと、を備えることを特徴とするミクロ流体デバイスを提供する。

【００９４】

５．本発明のミクロ流体デバイスの製造

本発明のミクロ流体デバイスは、当技術分野でよく知られている方法で製造し得る（例えば、米国特許第６５００３２３号および第５８８２４６５号を参照）。簡潔に説明すると、本発明のミクロ流体デバイスを設計するにおいて、単数または複数の流体サンプルプラグ（例えば、単数または複数のＤＮＡサンプルプラグ）を、少なくとも１つのミクロ流体流路を通して動かす原動力を選択し、反応パラメータを決定し、流路のネットワークを設計すべきである。これらの工程をそれぞれ以下に概略的に説明する。

【００９５】

米国特許第６５００３２３号に記載されているように、本発明の自動インラインプラットフォームのようなミクロ流体システムの標準的な原動力は、圧力ベースの流体輸送システム、動電学的な材料輸送システム、またはこの２つのハイブリッドの中から選ばれる。圧力ベースの流体輸送システムは、例えば米国特許第６５００３２３号、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９８／２０１９５号、および米国特許出願第０９／２４５６２７号（１９９９年２月５日出願）にそれぞれ記載されている。流体を制御した形で移動させる動電学的な材料輸送システムを用いること、およびこのような移動を可能にするシステムは、例えば、米国特許第５８００６９０号および第５７７９８６８号にそれぞれ詳細に記載されている。ハイブリッドシステムの例は、例えば、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９８／２０１９５号に記載されている。この３つのシステムであれば、どれを本発明の装置に使用しても構わないが、ハイブリッドシステムによる流体の移動が好ましい。

【００９６】

米国特許第６５００３２３号に記載されているように、反応パラメータ（例えば、反応試薬、試薬濃度、試薬量、反応時間、および反応温度プロフィール）は、本発明のミクロ流体デバイスを設計する際の重要な考慮すべき点である。ＰＣＲおよび波形プロファイリ

ングはよく知られている方法であるため、反応パラメータ（例えば、反応試薬、試薬濃度、試薬量、反応時間、および反応温度プロフィールなど）は定着したものであり、従って、本発明のミクロ流体デバイスの流路ネットワークを設計する上で容易に考慮できる。例えば、ＰＣＲのみで使用されるべきミクロ流体デバイスは、米国特許第６６７０１５３号に詳細に記載されている。米国特許第６６７０１５３号に記載されている装置の設計は、ＰＣＲの反応工程、すなわち、変性、アニーリング、伸長、および「ホットスタート」を考慮する。このような工程は、波形プロファイリング法（例えば、上述の波形プロファイリング法）に含まれるＤＮＡ増幅プロセスにおいて明確であるため、当業者は、本発明のミクロ流体デバイスが、新しい点（すなわち、波形プロファイルの検出を可能にするように、任意のミクロ流体の反応流路を第２温度制御領域内の検出領域に設置するという点および／または、少なくとも１つのミクロ流体の反応流路に、検出領域の下流にあり、廃棄物だめの上流にあるバルブを組み込むという点）の一方または両方を除き、例えば米国特許第６６７０１５３号に記載されている装置に似ていることを理解し得る。さらに、当業者は、以下に記載のＳＧＰ法の反応パラメータに基づいて、本発明のミクロ流体デバイスを設計することができる。

【００９７】

上述のとおり、本発明のミクロ流体デバイスは、少なくとも１つのミクロ流体流路に少なくとも１つのバルブが組み込まれ得る（例えば、検出領域の下流および廃棄物だめの上流になるようにバルブを設置する）。このようなバルブは「Ｔ」形の交差点、十字形の交差点、複数の流路の「荷馬車の車輪」形の交差点、または、２つ以上の流路が例えば、流体連結中にある任意の他の流路形状として見ることができ得る。選択された原動力は、上述のとおり、交差点での他の流路からの拘束フローを提供することによって、単数または複数のサンプルプラグ（例えば、ＤＮＡサンプルプラグ）をバルブを通るように制御的に導くようになっている。例えば、図２Ｂでは、ＤＮＡサンプルプラグ（２３）がさらなる分析のために選択された場合、ＤＮＡサンプルプラグ（２３）が左から右へ（例えば、ＤＮＡチップ（２４）へ）、および廃棄物だめへつながる垂直流路を交差して向こう側へ移動することが望ましい。米国特許第５８７６６７５号に記載されているように、電圧勾配を水平流路の長さに印加し、交差点で材料の流れをピンチングすることによって、動電学的な原動力は、ＤＮＡサンプルプラグの流れを向けるために使用され得る。さらに、バルブがオフの状態の場合（すなわち、水平流路の長さに電圧勾配がない場合）、ＤＮＡサンプルプラグは、例えば電圧勾配を垂直流路に印加するおよび／または水平流路の末端に設置されている廃棄物だめを減圧にすることによって、左腕から底腕まで、交際点を通して移動する。

【００９８】

Ｂ．ミクロ流体デバイス内の流体運動と、ミクロ流体デバイスの加熱および冷却と、ミクロ流体デバイスからのデータ収集とを行う機器

上述のプロセスを達成するために、パンプ、バルブ、サンプルプラグ（またはＤＮＡサンプルプラグ）位置検出器、および制御コンピュータなどの制御装置（図１および図２に図示せず）を、各サンプルプラグおよび／またはＤＮＡサンプルプラグの移動およびタイミングを制御するために使用し得る。このような制御装置は、当業者によく知られている。

【００９９】

本発明の機器は、本発明のミクロ流体デバイスの検出領域内で（さまざまな温度を施すための）第２温度制御領域を設立、モニター、および制御する性能を含む。これらは、例えば、米国特許第６６７０１５３に記載の加熱領域と似ている温度制御領域（例えば、定温勾配）を、本発明のミクロ流体デバイスの検出領域に設置することによって達成できる。これにより、温度勾配を施されると増幅したＤＮＡ産物の検出が可能になり、このような検出を正のシグナル、ゼロ検出、または波形プロファイルにすることができる。この改良システムは、ＰＣＲ（例えばＴＡＱＭＡＮ（登録商標））および波形プロファイリング増幅法の一方または両方によって増幅したＤＮＡ産物を検出できる。ＴＡＱＭＡＮ（登録

商標）反応の間、検出領域内の温度勾配は（検出領域が一定温度であるように）ゼロに設定し得る。

【０１００】

当業者は、ミクロ流体デバイス内の流体運動と、ミクロ流体デバイスの加熱および冷却と、ミクロ流体デバイスからのデータ収集とを制御する周知の技術を理解し、過度の実験をせずにこのような機器を製造することが理解し得る。

【０１０１】

ＩＩ．単一ゲノム・プロファイリング

単一ゲノム・プロファイリングは、微生物が少数で存在する場合でも、波形プロファイリング法に対する改良を提供することによって、微生物由来のゲノムＤＮＡの分析およびプロファイリングを可能にする。これらの改良は、新規のプライマー（「ＳＧＰプライマー」）および改変型のポリメラーゼ連鎖反応（ｍＰＣＲ）を含む。ＳＧＰは、さらに、最後の「半分の時間での伸長工程」を提供する。これらの改良は、ＳＧＰ（すなわち、ＳＧＰプライマー、ｍＰＣＲ、および半分の時間での伸長工程を使用する方法）が、それぞれがＳＧＰプライマーの配列、次にゲノムＤＮＡ鋳型の幾つかの異なる領域の１つと相補的な配列を含む５’→３’ヌクレオチド配列を有する、異なる核酸ポリマー（「ＳＧＰ核酸ポリマー」）の生成をもたらすのを可能にする。特に、ＳＧＰは作製したＳＧＰ核酸ポリマー、ＳＧＰプライマー、およびｍＰＣＲを利用して、それぞれがＳＧＰプライマーの配列、ゲノムＤＮＡ鋳型の幾つかの異なる領域の１配列と同一である配列、次にＳＧＰプライマーの逆相補配列を含む５’→３’ヌクレオチド配列を有する、「ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー」を指数関数的に増幅させる。ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの指数関数的な増幅後、ＳＧＰは新規の半分の時間での伸長工程を導入して、高次構造を形成し得る縮小型のＳＧＰ核酸ポリマー、すなわち「縮小ＳＧＰ核酸ポリマー」を作製することができる。微生物のゲノムＤＮＡは最初の鋳型として使用されるので、ＳＧＰ核酸ポリマーおよびＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは、微生物に独特な配列を含み得る。同じ理由で、生成するＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは半分の時間での伸長工程中の縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの作製に使用されるので、一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは微生物に独特な配列を含み得る。このように、一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは、微生物に独特な配列に基づいて高次構造を形成する。従って、一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーによって形成される組の高次構造は、微生物に独特である。結果として、形成される異なる高次構造を検出することによって、微生物を検出および／または分類することができるが、この検出は例えば蛍光挿入剤を使用して実施することができる。

【０１０２】

当業者は、多くのＳＧＰ核酸ポリマー、および、従って、多くのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーおよび縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは、本発明の改変型ＰＣＲ（ｍＰＣＲ）を使用して作製することができることは理解し得る。これらのポリマーはそれぞれ、５’端のＳＧＰプライマーに由来する当該ＳＧＰプライマーを含むので、ＳＧＰプライマーの多くのコピーは、ＳＧＰ中のｍＰＣＲの最初のサイクル前に当該ゲノムＤＮＡを含む溶液に加えなければならない。当業者は、物質（例えば、増幅試薬）およびｍＰＣＲの条件は、よく知られているＰＣＲの増幅試薬および条件と類似していることを理解し得る。例えば、プライマー対およびＤＮＡ鋳型の多くのコピー以外に、ＰＣＲに加えるための増幅試薬、例えば、ポリメラーゼ、ｄＮＴＰ反応バッファーなどの適切な濃度は当業者によく知られており、挿入剤の適切な濃度も同様である。ｍＰＣＲの最初のサイクルの前に加えなければならない、増幅試薬、例えば、ＳＧＰプライマー、ヌクレオチド（すなわちｄＮＴＰ）、ＤＮＡポリメラーゼ、反応バッファーおよび／またはマグネシウムの濃度および量は、当業者により容易に決定することができる。

【０１０３】

ＳＧＰは非常に少量で存在する微生物のゲノムＤＮＡを分析することができる、何故ならＳＧＰは、ｍＰＣＲの工程を含むからである。本発明の一実施形態では、１種の微生物のゲノムＤＮＡは、検出用の充分な量の縮小一本鎖核酸ポリマーおよび関連高次構造の原

型鋳型を与えることができる。これはＳＧＰのｍＰＣＲ工程が、従来のＰＣＲとある程度類似した方法で幾つかのＳＧＰ核酸ポリマーと結合し増幅させるＳＧＰプライマーの能力によって、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの指数関数的増幅をもたらすためである。しかしながら、従来のＰＣＲと比較して２つの顕著な違いが存在する。第１にｍＰＣＲの工程は、正方向プライマーと逆方向プライマーの両方として作用することができる、１つのプライマー、すなわち、ＳＧＰプライマーのみを利用する。対照的に従来のＰＣＲは、２つの異なるプライマー（１）正方向プライマー、および（２）正方向プライマーの配列と異なる配列を有する逆方向プライマーを使用する。

【０１０４】

第２に、従来のＰＣＲでは、２つのプライマーを利用してゲノムＤＮＡの１つの領域を増幅させるのに対して、ｍＰＣＲでは１つのプライマーを使用してゲノムＤＮＡの幾つかの異なる領域を増幅させる、ここで、各１つのプライマーはＳＧＰプライマーと同一の配列およびＳＧＰプライマーと相補的な配列、すなわち「ＳＧＰプライマー結合部位」によって囲まれる。ゲノムＤＮＡの幾つかの異なる領域を増幅させるＳＧＰ中のｍＰＣＲの能力は、正方向プライマーおよび逆方向プライマーとして作用することができる、１つのＳＧＰプライマーを使用することによるものである。ＳＧＰプライマーのこの特徴は、その長さの関数であり、以下の２つの重要な事象を引き起こすことを可能にする、すなわち、（１）それぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上の幾つかの異なるＳＧＰプライマー結合部位とＳＧＰプライマーとを結合すること、および、（２）ＳＧＰプライマー配列およびその異なるヌクレオチド配列内のＳＧＰプライマーの逆相補配列を含む５’→３’ヌクレオチド配列を有する（ｍＰＣＲの少なくとも１つのサイクルによって作製される）ＳＧＰ核酸ポリマーと、ＳＧＰプライマーとを結合することを引き起こすことを可能にする。ＳＧＰ核酸ポリマー内の逆相補配列の存在およびＳＧＰプライマーの後の結合は、幾つかの異なる二本鎖ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーのＰＣＲ様（すなわちｍＰＣＲ）の指数関数的増幅、すなわちＳＧＰプライマー結合部位によって囲まれる二本鎖ゲノムＤＮＡの幾つかの異なる領域の指数関数的増幅を可能にする。

【０１０５】

以下で詳細に記載するＳＧＰプライマーは、波形プライマーと幾つかの類似した特徴を共有しており、波形プライマーは例えば、特開２００３－３３４０８２号公報および特開２００３－１８０３５１号公報中に詳細に記載されている。ＳＧＰプライマーはＳＧＰに必要不可欠であり、それらの長さによって特徴付けられる。ＳＧＰプライマーの長さは重要である。何故ならプライマーの短い長さは、プライマーがそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型の長さ部分に沿った幾つかの異なる部位と特異的に結合するのを可能にし、かつ短い長さは、その異なるヌクレオチド配列内のＳＧＰプライマー配列の逆相補配列を含む５’→３’配列をＳＧＰ核酸ポリマーが有する確率を高く与えるからである。

【０１０６】

ＳＧＰプライマーの特別な特徴は、最初のサイクル後のｍＰＣＲの各サイクル中であるＳＧＰ核酸ポリマーからのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの指数関数的、すなわち非直線的な増幅をもたらすＳＧＰ法において、ＳＧＰプライマーを使用することを可能にする。ＳＧＰ中のｍＰＣＲの最初のサイクルは、以下の工程からなる、すなわち、１）ゲノムＤＮＡの各コピーを２つの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型に変性させる工程と、２）ＳＧＰプライマーと、各一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上の幾つかの異なるＳＧＰプライマー結合部位をアニーリングさせる工程と、３）各一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上の異なるＳＧＰプライマー結合部位と結合した幾つかのＳＧＰプライマーのそれぞれからＳＧＰ核酸ポリマーを伸長させる工程であって、各ＳＧＰ核酸ポリマーが、そこからＳＧＰ核酸ポリマーが伸長している結合ＳＧＰプライマーを含む５’→３’ヌクレオチド配列、次に結合ＳＧＰプライマーの下流のゲノムＤＮＡ鋳型の配列と相補的な異なるヌクレオチド配列を有する工程と、からなる。

【０１０７】

当業者は、伸長工程の「全時間」の間がＳＧＰ核酸ポリマーの長さを決定し、従って、

１サイクル中に形成されるＳＧＰ核酸ポリマーは、異なるヌクレオチド配列を持ち得るが、ほぼ同じ長さであり得ることを理解し得る。例えば、それぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型に沿った１０３個の部位にアニーリングするようにＳＧＰプライマーが設計されていると仮定し、かつ伸長工程の時間を調節して約１ｋｂ長のＳＧＰ核酸ポリマーが生成すると仮定すると、ＳＧＰ増幅の１サイクルは、鋳型当たり１０３個の異なるＳＧＰ核酸ポリマーをもたらすと思われ、そのそれぞれは約１ｋｂ長であると思われる。当然ながら、プライマーがアニーリングするＳＧＰプライマー結合部位の１つが、ゲノムＤＮＡ鋳型の３’端から１ｋｂ未満に存在する場合、その部位と結合したＳＧＰプライマーからの伸長は、１ｋｂ未満のＳＧＰ核酸ポリマーを生み出すと思われる。さらに、ＳＧＰプライマー結合部位（例えば、部位「Ｂ」）が他のＳＧＰプライマー結合部位（例えば、部位「Ａ」）の１ｋｂ下流以内に存在する場合、１ｋｂ未満のＳＧＰ核酸ポリマーが部位Ａと結合したＳＧＰプライマーから生成すると思われる。

【０１０８】

ＳＧＰでは、ｍＰＣＲのサイクルは２回以上、例えば１５～１００回繰り返すことができる。それぞれのサイクルの変性工程中、ＳＧＰ核酸ポリマーは一本鎖になる、すなわちＳＧＰ核酸ポリマーはゲノムＤＮＡ鋳型とはもはや結合しないと思われる。ＳＧＰにおいて、ｍＰＣＲの後のサイクルのアニーリング工程中、その異なるヌクレオチド配列内のＳＧＰプライマーの逆相補配列を含む５’→３’ヌクレオチド配列を有する幾つかのＳＧＰ核酸ポリマーは、ＳＧＰプライマーによって結合可能な状態である、すなわちこれらの幾つかのＳＧＰ核酸ポリマーは、高次構造を形成しないことは重要である。高次構造の一部分としてあるいはＳＧＰプライマーとのＳＧＰ核酸ポリマーの結合は、幾つかの要因、例えばアニーリング温度、ＳＧＰ核酸ポリマーおよびＳＧＰプライマーの長さ、ならびに反応混合物中のＳＧＰ核酸ポリマーおよびＳＧＰプライマーの濃度に依存する。従って、例えばＳＧＰプライマーの濃度を増大させることによって、ｍＰＣＲのアニーリング工程を操作することは、ＳＧＰ核酸ポリマーを含む高次構造の形成の防止を助長し得る。しかしながら、これらのよく知られている要因の調節は本発明の実施を助長し得るが、このような調節が絶対に必要とされるわけではない、何故なら、ＳＧＰ核酸ポリマーの安定性の要因はＳＧＰプライマーの設計に示されるからである。以下に示すように、非特異的安定部分を含まないＳＧＰプライマーを設計し、従って、それぞれがその５’端にＳＧＰプライマーの配列を有するＳＧＰ核酸ポリマーは安定性がない、すなわち容易にプライマーと結合する傾向があると思われる。従って、ＳＧＰプライマー配列、次にその異なるヌクレオチド配列内のＳＧＰプライマーの逆相補配列を含む５’→３’配列を有する幾つかのＳＧＰ核酸ポリマーは、任意の高次構造の形成前にＳＧＰプライマーと優先的に結合し得る。

【０１０９】

ＳＧＰプライマー配列、次にその異なるヌクレオチド配列内のＳＧＰプライマーの逆相補配列を含む５’→３’配列を有する幾つかのＳＧＰ核酸ポリマーとのＳＧＰプライマーの結合は、最初のサイクル後にＳＧＰのｍＰＣＲ増幅サイクルを引き起こす。ＳＧＰ核酸ポリマー上のその相補配列と結合するＳＧＰプライマーは、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーをもたらすＰＣＲ様反応を助長し、ポリマーのそれぞれは、ＳＧＰプライマーと同一の５’→３’配列の５’端側面およびＳＧＰプライマーの逆相補配列である５’→３’配列の３’端側面に位置するゲノムＤＮＡ鋳型の幾つかの異なる領域の、１つの配列と同一の配列を含むヌクレオチド配列を有する。従って、それぞれのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーはその３’端にＳＧＰプライマーと相補的な５’→３’配列を有するので、それぞれのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは、後のｍＰＣＲサイクルのアニーリング工程中の高次構造の形成前に、ＳＧＰプライマーによっても結合すると思われる。従って、ｍＰＣＲの後のサイクルは、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの指数関数的増幅を含むと思われる。

【０１１０】

当業者は、全てのＳＧＰ核酸ポリマーは５’端にＳＧＰプライマー配列を含み得るが、わずか数パーセントのＳＧＰ核酸ポリマーが、その異なる５’→３’ヌクレオチド配列内のＳＧＰプライマー配列の逆相補配列をさらに含むことを理解し得る。ＳＧＰ－ＳＧＰ核

酸の増幅と関係がある幾つかのＳＧＰ核酸ポリマーの割合は、ｍＰＣＲの「全時間の伸長工程」に使用される「全時間」の長さ、およびＳＧＰプライマーの設計などの、幾つかの容易に測定される要因に依存する。例えば、考えられるＳＧＰ核酸ポリマーは、５’端から約７５０塩基（０．７５ｋｂ）下流にＳＧＰプライマー配列の逆相補配列を有する可能性がある。この例では、ｍＰＣＲの全時間の伸長工程が１ｋｂのＳＧＰ核酸ポリマーを生成するように設定されていると、前と同様に仮定すると、後のｍＰＣＲサイクルは、その７５０塩基（０．７５ｋｂ）領域、すなわち元の１ｋｂのＳＧＰ核酸ポリマーが由来した二本鎖ゲノムＤＮＡの領域の一部分の同じ配列を有する二本鎖ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの、ｍＰＣＲによる指数関数的増幅を開始し得る。この指数関数的増幅は、その５’端の１ｋｂ下流以内のＳＧＰプライマー配列の逆相補配列を含む５’→３’配列を有する任意の他の一本鎖ＳＧＰ核酸ポリマーのゲノム中の、他の位置でも起こり得る。従って、完全長の伸長時間を増大させることによって、ＳＧＰ核酸ポリマーがそのヌクレオチド配列内に１つまたは複数のＳＧＰプライマー結合部位を含む確率が増大し得る。逆もまた真実である、完全長の伸長時間を減らすことによって、ＳＧＰ核酸ポリマーがその下流配列内に１つまたは複数のＳＧＰプライマー結合部位を含む確率が低下し得る。

【０１１１】

それらの配列内にＳＧＰプライマー結合部位を含むＳＧＰ核酸ポリマーの割合は、例えば１００個のＳＧＰ核酸ポリマー中１個（すなわち10^{-2}）が配列内にＳＧＰプライマー結合部位を含むように、プライマーを設計することによって操作することもでき、その完全な開示は以下に与える。このような例において、ＳＧＰプライマーがそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型に沿った10^{3}個の部位にアニーリングする可能性があると、前と同様に仮定すると、それぞれの微生物に関して2×10^{3}個の異なるＳＧＰ核酸ポリマーが生成すると思われ（すなわち、鋳型当たり1×10^{3}個のＳＧＰ核酸ポリマー×微生物当たり２鋳型）、約２０の異なるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーが増幅され得る。当然ながら、プライマーが最初に結合する部位に対する逆相補配列の位置は、指数関数的に増幅されるそれぞれのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの長さを決定し得る。さらに、任意のＰＣＲ様手順と同様に、本発明のＳＧＰ－ＳＧＰ核酸の指数関数的増幅は、変性（ＳＧＰプライマーとのアニーリングに利用可能な一本鎖ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーをもたらす）、ＳＧＰプライマーのアニーリング（次サイクルの伸長を設定）、および伸長（次の増幅サイクルで増幅させる二本鎖ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーを生成する）を含むｍＰＣＲサイクルによって起こる。

【０１１２】

従って、ｍＰＣＲでは、最初のサイクルの始めに加えられた１つのＳＧＰプライマーの複数のコピーは、ＰＣＲを達成するために通常用いられる一対のプライマーとして機能する。言い換えれば、本発明の１つのＳＧＰプライマーは、幾つかの異なる二本鎖ゲノムＤＮＡ領域を囲み、異なる二本鎖ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーという形でこのような領域のｍＰＣＲ指数関数的増幅につながる。

【０１１３】

Ｂ．半分の時間での伸長工程

前に示したように、ＳＧＰの波形プロファイリング法の最終目的として働く波形分析は、ゲノムの独自性を表す幾つかの異なる一本鎖核酸ポリマーの存在を必要とし、これらの核酸ポリマーは挿入剤と組み合わせて、後に検出することができる高次構造を形成する。

【０１１４】

ＳＧＰでは、検出可能な高次構造は、１）ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの指数関数的増幅が全時間の伸長工程を使用する数サイクルのｍＰＣＲによって実施され、かつ、２）半分の時間の伸長工程の導入によるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーからの一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの生成の後まで形成されない。一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの生成前に、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは二本鎖になると思われ、従来手段、例えば臭化エチジウムで染色したゲルの電気泳動、融解温度分析などによって検出することができる。しかしながら、高次構造を生成させるために、本発明は、（充分なｍＰＣＲサイクルが指数関数的に

増幅したポリマーの充分なコピー、例えば１０６～１０７個のコピーを生成した後に）「半分の時間の」増幅サイクルをｍＰＣＲ手順に導入して、それぞれの縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの幾つかのコピーを生成することができる。言い換えると、このｍＰＣＲサイクルの伸長工程の時間の量を例えば４０～６０％減らすことによって、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー由来の核酸ポリマー、すなわち縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの部分集合は長さが減少する。縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは、ポリマーの３’端にプライマー配列の逆相補配列をもはや含まないと思われるので、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは指数関数的に増幅しない可能性がある、すなわちそれらは一本鎖状態であり、検出することができる高次構造を後に形成すると思われる。

【０１１５】

ＳＧＰプライマーの逆相補配列と同一の５’→３’配列を含まないＳＧＰ核酸ポリマー（すなわち、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーではない）は、ｍＰＣＲ増幅のいずれのサイクル中にもプライマーとは結合しないと思われ、従って、高次構造を形成する可能性もあることを記さなければならない。しかしながら、以下に説明するように、１つの半分の時間での伸長工程は、それぞれ異なる縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの数個のコピーを生成する（何故ならこれらは、指数関数的に増幅したＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーに由来するからである）。対照的に、ＳＧＰプライマー結合部位を含む配列を有さないＳＧＰ核酸ポリマーは、比較的少ない初期量のゲノムＤＮＡから単に直線的に増幅される。従って、高次構造の形成に対するこのようなＳＧＰ核酸ポリマーの貢献は、高次構造に対する縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの貢献と比較して無視できる程度のものである。

【０１１６】

ＳＧＰにおいて生成される高次構造は、半分の時間での伸長工程の導入によって作製される縮小ＳＧＰ核酸ポリマーを大部分が含み得る。例えばＳＧＰプライマーが、例えばそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上の約10^3個の部位にアニーリングすることができると、前と同様に仮定すると、最初のサイクル由来のＳＧＰ核酸ポリマーの合計数は、例えばゲノムＤＮＡのコピー当たり（すなわち、微生物当たり）約2×10^3個のＳＧＰ核酸ポリマーである可能性がある。さらに、１００個のＳＧＰ核酸ポリマー中の１個がその配列中にＳＧＰプライマー結合部位を含む配列を有するようにプライマーが設計されたと、前と同様に再度仮定すると、そのそれぞれがＳＧＰプライマー結合部位によって囲まれるゲノムＤＮＡ鋳型の幾つかの異なる領域の１個と同一である、約２０個のＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは、ｍＰＣＲによって指数関数的に増幅し、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの比較的多数のコピー（１個のゲノムＤＮＡで始めると２２～２４ｍＰＣＲサイクル後に約10^6～10^7個のコピー）をもたらすと思われる。指数関数的に増幅したＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの数、および従ってそれに由来する縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの数は、増幅サイクルが進行すると直線的増幅によって生成し続けるＳＧＰ核酸ポリマーの数より多いと思われる。

【０１１７】

当業者は、ＳＧＰによって生成されるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの考えられる合計数は、ゲノムの大きさおよびプライマーの長さと関係があることを理解し得る。従って、最初の増幅サイクル中に生成されるＳＧＰ核酸ポリマーの好ましい数は、半分の時間の伸長工程中に縮小ＳＧＰ核酸ポリマーを生成することができるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの望ましい数（すなわち、高次構造の形成に利用可能な縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの望ましい数）の関数として測定することができる。以下でさらに詳細に記載するように、本発明のＳＧＰプライマーを設計する際に、このような測定は有用であると思われる。

【０１１８】

高次構造の形成に利用可能な縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの望ましい数の測定において、当業者は、ｍＰＣＲによって指数関数的に増幅したＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの部分集合のみが、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの生成において使用され、このような部分集合は半分の時間の伸長工程中に完全に伸長し得ない長いＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーを含むことを、理解し得る。ｍＰＣＲによって指数関数的に増幅するＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの配列

は、３’端にプライマーの逆相補配列のヌクレオチド配列を含むので、全時間の伸長工程はＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーのこの部分集合の伸長を完了するために必要であり、半分の時間の伸長工程は縮小ＳＧＰ核酸ポリマー、すなわち３’端にプライマーの逆相補配列を含まない核酸ポリマーを生成すると思われる。他方で、ｍＰＣＲによって指数関数的に増幅するＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの幾つかは、これらの長いＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーより相当短い。半分の時間での伸長工程中に分配された時間内に完全に伸長するこのようなＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは、任意の後のｍＰＣＲサイクルにおいて指数関数的に増幅し続けると思われる；何故なら以下に記載するように、これらのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは一般に、高次構造の一部になるとは思われないからである。ｍＰＣＲによる指数関数的増幅を経るＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの長さ部分内のＳＧＰプライマーの逆相補配列のランダムな位置を考慮すると、半分の時間での伸長工程の導入は、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーを作製するために使用される約半分のＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーをもたらすと思われる。

【０１１９】

指数関数的に増幅するＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの約５０％は、半分の時間の伸長工程によって伸長した部分内にＳＧＰプライマー結合部位を含まないと思われ、従って縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの生成と関係があると思われる。縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは他のｍＰＣＲサイクル用のＳＧＰプライマーと結合することができる配列を含まないと思われるので、それらは高次構造を形成し得る。

【０１２０】

ｍＰＣＲによって指数関数的に増幅するＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの他の約５０％は、ＳＧＰプライマー結合部位を依然として含み得る。さらに、二本鎖ＳＧＰ－ＳＧＰポリマーを作製するためのＳＧＰ－ＳＧＰポリマーと逆相補配列のアニーリングは、安定性があり早急に起こる傾向があるので、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは一般に、高次構造の形成に利用されないと思われる。

【０１２１】

例えば、９塩基長のＳＧＰプライマーは７，０００の部位にアニーリングすることができ、生成するＳＧＰ核酸ポリマーは２，０００塩基長に伸長する可能性があると仮定すると、ゲノムＤＮＡの１．４×10^7個の塩基、すなわち、例えば２×10^9塩基長の一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型の１／１４２が、ＳＧＰ核酸ポリマーとしてコピーされ得る。ＳＧＰでは、これらの７，０００個のＳＧＰ核酸ポリマーの約５０～７０個が、ＳＧＰプライマー結合部位を含み得る（１００個のＳＧＰ核酸ポリマー中の約１個が１個のＳＧＰプライマー結合部位を含むようにＳＧＰプライマーが設計されたと、前と同様に仮定する）。これらの約５０～７０個のＳＧＰ核酸ポリマーは、ＳＧＰのｍＰＣＲ工程中に指数関数的に増幅するであろうＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーを有効に生成し得る。ｍＰＣＲの２２～２４サイクル後、および半分の時間の伸長工程後、（高次構造を形成し得る）約２５～３５の異なる縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの数個（例えば10^6～10^7個）のコピーが、指数関数的に増幅したＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーから生じると予想される。従って半分の時間の伸長工程は、高次構造の形成用の縮小ＳＧＰ核酸ポリマーを生成するだけでなく、さらに異なる長さのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーも識別する。

【０１２２】

他の例として、ＳＧＰ中の全時間ｍＰＣＲサイクル中に指数関数的に増幅するＳＧＰ－ＳＧＰポリマー中の数個が１ｋｂ、０．８ｋｂ、０．６ｋｂ、０．４ｋｂ、および０．２ｋｂのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーであると仮定し、これらの反復ｍＰＣＲサイクル中の伸長工程の時間が、１ｋｂのポリマーを伸長させるのにちょうど充分であるとさらに仮定する。後の「半分の時間の」伸長工程中、生じる生成ポリマーはそれぞれ約０．５ｋｂ、０．５ｋｂ、０．５ｋｂ、０．４ｋｂおよび０．２ｋｂであり得る。このｍＰＣＲサイクルが進行し、ＤＮＡの新たに伸長したポリマーがその個々の相補的鋳型鎖から変性すると、最初の３つの列挙したポリマー（すなわち、０．５ｋｂ長のポリマー、元来より長い長さ（１ｋｂ、０．８ｋｂ；および０．６ｋｂ）であった個々の鋳型鎖からコピーされたポ

リマー）は、それらの３’端にプライマー配列の逆相補配列を有していないと思われ、それらは全てほぼ同じ長さ（すなわち０．５ｋｂ）であり得る。これらの一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは、波形プロファイルの作製に必要な高次構造を形成するために利用可能であり得る。しかしながら、０．４ｋｂおよび０．２ｋｂ長の個々の鋳型鎖から伸長したポリマーは完全長であり得る、すなわちプライマー配列の逆相補配列はこれらのコピーの３’端に存在すると思われ、ＰＣＲ増幅の後のサイクルは、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーを、それらが高次構造の形成と関係可能でないように生成し続けると思われる。

【０１２３】

Ｃ．単一ゲノム・プロファイルの検出

指数関数的増幅、すなわちｍＰＣＲがＳＧＰ法において使用されるので、当該ゲノムＤＮＡの多数のコピーで開始する必要はない。例えば、（非ＳＧＰ）波形プライマーがそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型に沿った10^3個の部位と結合することができると仮定すると、（他の波形プロファイリング法は一般に、前に記載したように少なくとも10^6の微生物で手順を開始することを必要とするので）、直線的増幅のサイクル当たりに生成される核酸ポリマーの合計数は、約2×10^9である（ゲノムＤＮＡ鋳型当たり10^3個の核酸ポリマー×微生物当たり２ゲノムＤＮＡ鋳型×10^6の微生物）。他の波形プロファイリング法では、直線的増幅のサイクルは例えば２２～２４回反復され得る（すなわち、２２～２４組の2×10^3個の異なる一本鎖を生成する）。対照的に、本発明の一実施形態は、ゲノム配列の１つのコピーが増幅プロセスの開始時にサンプル中に存在する（有効な抽出を仮定する）場合のみ、ＳＧＰ法による波形プロファイリングはおそらく実施することができるという事実と関係がある。数サイクル（例えば２２～２４サイクル）のｍＰＣＲ増幅の後、ゲノムの１つのコピーで開始すると、ＳＧＰプライマー結合部位によって囲まれるゲノムＤＮＡのそれぞれの異なる領域、すなわちそれぞれの異なるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸が、約10^6～10^7倍コピーされると思われる（すなわち、約10^6～10^7のコピーが存在すると思われる）。他の波形プロファイリング法を上回るこの改良は、例えばＳＧＰ法を使用するサンプル中の細菌の存在の検出および分類において、一層高い感受性を与える。

【０１２４】

縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは、ＳＧＰプライマー結合部位によって囲まれるゲノムＤＮＡの領域と同一であるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーに由来するので、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーは、検出する微生物の独特な配列差異を含み得る。ＳＧＰでは、半分の時間の伸長工程中に生成される幾つかの一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーのそれぞれのコピーは、互いに相互作用して高次構造、すなわち幾つかの縮小ＳＧＰ核酸ポリマーを含む複合体を形成し得る。高次構造は、縮小一本鎖の塩基配列に応じて、すなわち微生物の独特なゲノム情報に基づいて、異なる安定性を有し異なる融解温度（Ｔｍ）で解離し得る。微生物由来の高次構造のＴｍを測定および記録することができ、これは高次ＤＮＡ構造に挿入される蛍光剤、すなわち挿入剤を使用することによって実施される。従って、ＳＧＰを使用して、波形プロファイリング分析、すなわち高次構造の解離の検出および記録により、異なる微生物のゲノムＤＮＡを検出、比較および区別することができる。

【０１２５】

個々のサンプルの高次構造は、サンプルの温度を上昇させることによって解離させる。高次ＤＮＡ構造が解離すると、これらの高次構造中に挿入された蛍光剤も解離する。上昇する温度の関数として、これらの高次構造の解離によって得られる蛍光強度の変化率をプロットすることによって、微生物のゲノムＤＮＡに独特な波形が生成する、すなわち異なる融解温度（Ｔｍ）において高次ＤＮＡ構造が観察および記録されて、特徴的な波形プロファイルが生成する。サンプル中の微生物の存在を示す波形プロファイルを正の波形プロファイルと呼び、またサンプル中に微生物が存在しない場合は、負の波形プロファイルが生成する。

【０１２６】

本発明の幾つかの実施形態では、適切な（正の）波形プロファイルの存在は、サンプル

中の微生物の存在を示す。他の実施形態では、特徴的な波形プロファイルは特定の種（または菌株）の微生物、例えば細菌の種または菌株を示す。従ってＳＧＰ法は、挿入剤を使用して第１の微生物由来のゲノムＤＮＡと第２の微生物由来のゲノムＤＮＡを区別して、波形プロファイリング法を使用してそれぞれの微生物の独特な波形プロファイルを得ることができる。

【０１２７】

前に記載したように、ＳＧＰのｍＰＣＲ工程は多サイクルの増幅、すなわち多サイクルの以下の工程：１）それぞれのゲノムＤＮＡをゲノムＤＮＡ鋳型に変性させる工程、２）それぞれのゲノムＤＮＡ鋳型および任意の前に生成したＳＧＰ核酸ポリマーおよびＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーに沿った幾つかの異なるＳＧＰプライマー結合部位に、ＳＧＰプライマーをアニーリングさせる工程、および３）ＳＧＰプライマー結合部位にアニーリングしたそれぞれのプライマーからＳＧＰおよびＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーを伸長させる工程を含む。詳細には増幅の１サイクル中に、サンプルの温度を（例えば９５～９８℃に）上昇させて、任意の二本鎖核酸ポリマー（ゲノムＤＮＡ含む）を変性させる。その後温度を（例えば２５℃に）低下させて、ＳＧＰプライマーをいずれかの利用可能なＳＧＰプライマー結合部位にアニーリングさせる。サイクル中の最終工程、プライマーからのＳＧＰおよびＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの伸長は、例えばＴａｑポリメラーゼを使用して～７２℃で実施する。最後に、増幅の最終サイクルの１つでは、伸長工程の時間の長さを例えば４０～６０％（例えば５０％）減らして、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーを生成させる。追加的な半分の時間の伸長工程を組み込んだ他のサイクルを本発明に含めて、より正確および／または確固たる波形プロファイルを生成することができ、これらのサイクルは生成物（例えば、本発明のＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー）を増幅させるために含めた追加的な全時間の伸長工程を組み込んだ追加的サイクルを伴う可能性がある。

【０１２８】

当業者は、増幅手順に固有の変性、アニーリング、および伸長工程に必要な温度の変更を含む反復サイクル工程が可能である装置または機器を利用することを熟知していると思われ；このような機器には、非制限的に、当技術分野で知られているＰＣＲ機器、および「Ｇｅｎｏｐａｔｔｅｒｎ Ａｎａｌｙｚｅｒ ＧＰ１０００」機器（Ａｄｇｅｎｅ）がある。本発明において必要なｍＰＣＲサイクル工程が可能であるデバイスを製造している他の会社には、非制限的に、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ（Ｗｅｌｌｅｓｌｅｙ、ＭＡ）、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）、またはＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）がある。このような機器は、温度が変更およびリセットされるさまざまな工程のタイミングおよび時間を変えることができ、従って、このような機器は、本発明の全時間の伸長工程および実質的に半分の時間の伸長工程を生み出す際に有用であり得る。さらに当業者は、抽出用試薬キット（その中で幾つかが当技術分野で知られている、例えばＸｔｒａｎａ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、などＸｔｒａ Ａｍｐ（登録商標）抽出システム（Ｘｔｒａｎａ Ｉｎｃ．、Ｂｒｏｏｍｆｉｅｌｄ、ＣＯ））、波形プロファイリングによって生じた結果を解釈するための分析用ソフトウェア（例えば、ＡｄｇｅｎｅによるＧｅｎｏＭａｓｔｅｒ）、およびプライマー設計支援ツール（例えば、いずれもＡｄｇｅｎｅによる、他の波形プロファイリング法において使用される「Ｄｅｓｉｇｎ Ｓｕｐｐｏｒｔ Ｔｏｏｌ ｆｏｒ Ｇｅｎｏｐａｔｔｅｒｎ Ｐｒｉｍｅｒ」、およびＧｅｎｏＳｅｑｕｅｎｃｅＡｎａｌｙｚｅｒソフトウェアなど）だけには限られないが、これらを含めた他の物質を利用して、微生物のゲノムＤＮＡを検出するためにＳＧＰを使用する、さまざまな態様を手助けすることができると思われる。当業者はＳＧＰに有用であるように、このようなソフトウェアおよび／またはツールのパラメータおよび／またはプロトコルを調節し得る。

【０１２９】

Ｄ．単一ゲノム・プロファイリング用プライマー

ＳＧＰプライマーは、それがそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型に沿った幾つかの異なる部位と結合するように、当技術分野でよく知られている方法を使用して設計する。本発

明の一実施形態では、ＳＧＰプライマーを使用して、微生物、例えば細菌およびウイルス由来の任意のゲノムＤＮＡの存在を検出する。本発明の他の実施形態では、特定の微生物、例えば特定の種または菌株の細菌の検出において使用するためにＳＧＰプライマーを調整する。当業者は、ゲノムＤＮＡの長さおよび配列を考慮することによって細菌、一般に特定の種または菌株の細菌のゲノムＤＮＡを検出するために使用する、ＳＧＰプライマーの長さおよび配列を決定することができる。当業者は、数種の細菌をそれらのゲノムＤＮＡの配列に関して調査して、大部分または全てのこれらの種を検出することができるプライマーの配列を推定すると思われ、この型のプライマーは時々「共通」プライマーと呼ばれる。共通ＳＧＰプライマー、および特定の種または菌株に特異的なＳＧＰプライマーは、当業者によって実施される簡単な実験的試験後に決定される。

【０１３０】

当業者は、ＳＧＰプライマーの長さと、ゲノムＤＮＡ鋳型に沿った幾つかのＳＧＰプライマー結合部位、すなわち相補配列と結合するその能力は逆関係にある、すなわちプライマーが短くなると、プライマーが結合するゲノムＤＮＡ鋳型沿いの異なるＳＧＰ結合部位の数が多くなることを理解し得る。逆にプライマーが長くなると、プライマーが結合するゲノムＤＮＡ鋳型沿いの異なるＳＧＰ結合部位の数は少なくなる。さらに、プライマー長に関する同じ分析は、ＳＧＰプライマーの相補配列およびＳＧＰプライマーの逆相補配列が、ゲノムＤＮＡ鋳型の長さ部分に沿って予め設定した距離（すなわち、予め設定したＳＧＰ核酸ポリマーの最大長）内に存在する確率に当てはまる。従って、プライマーが短くなるほど、ＳＧＰプライマー結合部位の逆相補配列が、ＳＧＰプライマー結合部位から下流の予め設定した距離内に存在する可能性は高くなる。予め設定する距離は全時間の伸長工程を含む時間の長さによって決定し、プライマー結合部位の逆相補配列が予め設定した距離内に存在するとき、指数関数的増幅が起こり得る。ＳＧＰプライマーの短い長さに加えて、プライマーの配列内容によって影響を受けるおよび／またはそれと関係があるパラメータ、例えばプライマーの融解温度、プライマーのＧ／Ｃ含量、ＧＣ塊、プライマーの自己相補性などが、プライマーの設計において役割を果たす。これらのパラメータを有するプライマーを考慮して設計することは、当技術分野の一般的な方法となっている（例えば、「Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」課程の教材、スタンフォード大学において入手可能なＢｕｒｐｏ（２００１）「Ａ ｃｒｉｔｉｃａｌ ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ ＰＣＲ ｐｒｉｍｅｒ ｄｅｓｉｇｎ ａｌｇｏｒｉｔｈｍｓ ａｎｄ ｃｒｏｓｓ－ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｃａｓｅ ｓｔｕｄｙ」（ｅｍｇｍ．ｓｔａｎｆｏｒｄ．ｅｄｕ／ｂｉｏｃｈｅｍ２１８／Ｐｒｏｊｅｃｔｓ％２０２００１／Ｂｕｒｐｏ．ｐｄｆ）を概略的に参照のこと）。

【０１３１】

従って、当業者は、ゲノムＤＮＡの長さおよび配列、ならびにプライマーの望ましい長さおよび特異性を考慮することによって、適切なＳＧＰプライマーを設計し得る。本発明の一実施形態では、ＳＧＰプライマーを、それが所定の頻度でそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型と結合するように設計する。本発明の他の実施形態では、所定の頻度でＳＧＰ核酸ポリマーの指数関数的増幅において、プライマーが正方向および逆方向プライマーとしても働くことができるように、ＳＧＰプライマーを設計する。

【０１３２】

当業者は、ＳＧＰ用のプライマー（「共通」プライマー、ならびに特定の種および菌株の、例えば細菌の検出用プライマーを含む）を設計する際の手助けとして、他の波形プロファイリング法および（例えばＡｄｇｅｎｅから入手可能な）波形プライマーの作製と関係がある、物質およびソフトウェア・プログラムにも目を通し得る。しかしながら当業者は、プライマーを設計するため、ＳＧＰにおいて正しく機能するプライマーを生成するために、他の波形プロファイリング法と関係がある技法およびパラメータを精製することが必要であることを理解し得る。例えば、他の波形プロファイリング法は、特異的部分と非特異的安定部分の両方を含むプライマーを利用し、本発明のＳＧＰプライマーは非特異的安定部分を含まない。さらに当業者は、（他の波形プロファイリング法中のプライマーと

比較して）それぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型に沿った多数の結合部位と結合することがＳＧＰプライマーにとって必要であり、それは少なくとも部分的には、わずかな割合のＳＧＰ核酸ポリマーがプライマー結合部位から下流の予め設定した距離内にプライマーの逆相補配列を含む配列を有する、すなわち、わずかな割合のＳＧＰ核酸ポリマーが指数関数的増幅を経て、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーをもたらすためであることを、理解し得る。さらに、指数関数的増幅を経るわずかな割合（例えば約５０％）のＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーが、半分の時間での伸長工程中に縮小ＳＧＰ核酸ポリマーをもたらし得る。

【０１３３】

ＳＧＰ用プライマーは、他の波形プロファイリング法（または標準的なＰＣＲにおいて使用される方法）において使用されるプライマーより短い（塩基が少ない）ように設計する、何故ならＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーが生成する確率は、プライマー長が短くなると増大するからである。この理由のため当業者は、他の波形プロファイリング法に関して提案／推奨されるプライマーより、短い長さのプライマーを設計し得る。例えばＡｄｇｅｎｅは、「Ａ Ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ａｎｄ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ＤＮＡｓ ａｎｄ ＲＮＡｓ ｂｙ Ｐａｔｔｅｒｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ｇｅｎｏｐａｔｔｅｒｎ Ｍｅｔｈｏｄ」（Ａｄｇｅｎｅから入手可能）の図４中に波形プライマーの一例を示す。この波形プライマーは、１１塩基の非特異的安定部分および８塩基の特異的部分を含む。当業者は非特異的部分を除外することによってＳＧＰ用プライマーを設計すると思われ、さらにＡｄｇｅｎｅの波形プライマーの特異的部分中の塩基数より少ない数に、全ＳＧＰプライマー中の塩基数を減らすことができる。例えば、ＳＧＰ中で使用するための６または７塩基長のプライマーを設計することができると思われる。個々の波形プライマーの特異的部分がより多くの塩基を含む他の実施形態では、対応するＳＧＰプライマーに関する設計も、従ってより多くの塩基を含み得る。

【０１３４】

ＳＧＰ法によって検出することができる細菌は、それ用の共通波形プライマーが既に設計されている細菌であり、このようなプライマーは当技術分野で知られており、腸炎ビブリオ、緑膿菌、サルモネラ・チフィムリウム、肺炎かん菌、カンピロバクター・ジェジュニ、シゲラ・ソンネイ、エンテロコッカス・フェカーリス、インフルエンザ菌、ヘリコバクター・ピロリ、化膿連鎖球菌、ウシ型結核菌、大腸菌、バシラス・セレウス、黄色ブドウ球菌、およびバシラス・サチリスを検出する際に有用である。個々の種および菌株の細菌を区別するためにそのうちの幾つかを使用することができる他のプライマーも、他の波形プロファイリング法において使用するためにＡｄｇｅｎｅから入手可能である。前述のように、当業者はプライマーの設計を変えて、またはプライマーを設計する方法を変更して、知られている波形プライマーに基づくＳＧＰにおいて有用なプライマーを生成し得る。さらに当業者は、当該微生物のゲノム物質を分析することによって、および一連の簡単な実験的試験を実施することによって、それ用の波形プライマーが設計されていない微生物用（例えば、他の細菌およびウイルス用）の適切なＳＧＰプライマーを設計し得る。

【０１３５】

当業者は、サンプル、例えば水サンプルを試験する際のＳＧＰの適用性を理解し得る。微生物、および従って微生物のゲノムを単離するための方法はサンプルに依存すると思われ、それらは当技術分野でよく知られている。ひとたび可能性のあるゲノムＤＮＡを単離した後、ＳＧＰ法を使用してゲノムＤＮＡの存在、従って微生物の存在を検出することができる。幾つかの状況では、例えばサンプル、例えば水サンプルが滅菌または比較的汚染がない状態でなければならないとき、このような検出は微生物による汚染を検出するのに充分である。微生物の分類が必要とされる場合、他のより特異的なＳＧＰプライマーを使用することができる。

【０１３６】

ＩＩＩ．本発明の自動インラインプラットフォームを使用する方法

本発明はさらに、サンプル中の微生物の存在を検出し、それに続く、任意の、汚染微生物を分類するための本発明の装置を使用する方法を提供する。すなわち、微生物のゲノム

物質の準備（例えば、単離、処理、反応試薬と混合など）、（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリングなどによる）増幅、検出（スクリーニング、同定、定量）、および、任意には、さらなる分析（例えば、シークエンシング）のために、本発明のミクロ流体デバイスおよび機器を使用する方法を提供する。一般に、本発明の方法は、（１）少なくとも一滴のＤＮＡサンプルを本発明のミクロ流体デバイスのミクロ流体の反応流路に吸引する工程と、（２）前記少なくとも一滴のＤＮＡサンプル液滴をプライマープラグと混合させることによって、少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを形成する工程と、（３）前記少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを、前記ミクロ流体の反応流路に沿って、前記ＤＮＡサンプルプラグを、変性、アニーリング、および伸長を含む増幅サイクルに少なくとも一回かけるミクロ流体デバイスの第１温度制御領域に動かす工程と、（４）増幅したＤＮＡ産物を、前記ＤＮＡサンプルプラグに第１温度および第２温度の間の温度を付与することで、第２温度制御領域内で検出する工程と、（５）任意には、さらなる分析（例えばシークエンシング）のために選択する工程と、を含む。本明細書中に記載の方法は、当業者が、サンプル中に汚染微生物が少数しか存在しない場合でも、このような汚染のレベルを定量化するためにおよび／または汚染微生物を道程するためにそのサンプル連続的にモニターすることを可能にする。

【０１３７】

Ａ．ＤＮＡサンプルの増幅

上述のとおり、増幅プロセスは増幅領域内、すなわち本発明のミクロ流体デバイスの第１温度制御領域で行われる。第１温度制御領域では、（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリング、ＳＧＰなどの）ＤＮＡ増幅方法の変性、アニーリング、および伸長の工程が、ミクロ流体の反応流路の長さに沿って移動するサンプルプラグにおいて成し遂げられるように、ミクロ流体デバイスはそれぞれ繰り返し、急速に、局所的に加熱および冷却される。当業者は、少なくとも１個のＤＮＡ分子（すなわち、ＤＮＡサンプルプラグ）を含むサンプルプラグのみが増幅したＤＮＡ産物を提供することができる。本発明の一実施形態では、ＰＣＲが増幅プロセスとして選択される。他の実施形態では、波形プロファイリング法が本明細書中に記載された自動インラインプラットフォームで行われる。他の実施形態では、波形プロファイリング法は（ＳＧＰプライマーの導入、ｍＰＣＲサイクリング、高次構造の形成、および増幅した短いＳＧＰ核酸ポリマーの検出および分析を限定されずに含む）ＳＧＰ法であり、ＳＧＰ波形プロファイリング法は、本明細書中に記載された自動インライン波形プロファイリング装置で行われる。

【０１３８】

従って、本発明は、サンプル中に微生物が存在しないか存在するかを検出するための方法を提供するものであり、この方法は、順番に、（ａ）前記サンプルを取得し、（ｂ）前記微生物がサンプル中に存在する場合は、前記微生物のゲノムＤＮＡの少なくとも１コピーを単離し、（ｃ）少なくとも一滴のサンプルをミクロ流体の反応流路に吸引し、（ｄ）少なくとも一滴のサンプルをプライマープラグと混合させることによって、少なくとも１つのサンプルプラグを形成し、前記プライマープラグは、少なくとも１つのプライマー、ヌクレオチド、ＤＮＡポリメラーゼ、および挿入剤を含む増幅試薬を有し、（ｅ）存在する場合は、前記ゲノムＤＮＡの各コピーが第１および第２のゲノムテンプレートＤＮＡに変性するように少なくとも１つのサンプルプラグを第１温度に加熱し、（ｆ）少なくとも１つのサンプルプラグを、前記プライマーが各ゲノムテンプレートＤＮＡにアニールするように第２温度に冷却し、（ｇ）前記少なくとも１つのサンプルプラグを、（１）ゲノムＤＮＡにプライマーがアニールされ続けるようにと、（２）アニールされたプライマーから生じる核酸ポリマーを伸長することを可能にするために前記第１および第２温度の間である第３温度に再度加熱し、（ｈ）前記第３温度を第１時間だけ維持し、（ｉ）工程（ｅ）～（ｈ）を少なくとも１回繰り返し、（ｊ）結果的に増幅した産物を検出し、少なくとも工程（ｃ）～（ｊ）は、請求項６に記載の装置内で起こることを特徴とする方法である。当業者は、この実施形態が、どの単数または複数のプライマーを選択したか次第でＰＣＲおよび波形増幅法の両方を達成することを理解し得る。ＳＧＰ法の「半分の時間での伸

長工程」を達成するために、上述の方法は、工程（ｉ）の後および工程（ｊ）の前に、（１）工程（ｅ）～（ｇ）を繰り返し行い、（２）前記第３温度を第１時間の約４０～６０％（好ましくは約５０％）の長さである第２時間だけ維持し、（３）挿入剤を含む高次構造が形成されるように、前記第２混合物を、前記第２温度以下の第４温度まで再度冷却するようにさらに変更され得る。当業者は、増幅プロセスがＰＣＲであった場合、工程（ｊ）の検出工程が１つの温度で行われることを理解し得る。その一方、波形プロファイリングが増幅プロセスとして選択された場合、工程（ｊ）の検出工程がある範囲ないの温度で行われるはずである。以下に記載のように、サンプルプラグがそれぞれ受ける増幅サイクル数は、１）金属トレーサーに印加される電圧のタイミング、および２）サンプルの流速の一方または両方を変更することによって制御され得る。各サイクルのタイミング、および各サンプルプラグがかけられる増幅サイクル数は、最終的には、選択された増幅プロセス（例えば、ＰＣＲ、波形プロファイリング法（例えば、ＳＧＰ法））、ＤＮＡサンプルプラグ１つあたりのＤＮＡ分子の数および／または、ＰＣＲが選択された場合に増幅するＤＮＡ領域の長さに依存する。各サイクルのタイミング、およびテストされたサンプルプラグ１つあたりのサイクル数は、当業者が過度の負担をすることなく決定し得る。当業者は、本明細書中に記載されている検出工程が、汚染微生物のスクリーニング、サンプルの汚染度の定量化および／または汚染微生物の道程のために使用し得ることを理解し得る。このような検出方法は、以下でより詳細に説明する。

【０１３９】

Ｂ．ＤＮＡサンプルの検出

本発明のミクロ流体デバイスの検出領域は、増幅したＤＮＡ産物からのシグナルをモニターすることを許可する。検出は、増幅したＤＮＡ産物の光学的、化学的、電気化学的、熱的、または他の特性に基づいて行われる。一実施形態では、増幅したＤＮＡ産物からのシグナルは、光学的な検出システムによって達成される。例えば、増幅したＤＮＡ産物が蛍光性である場合、検出器は、蛍光産物を活性化するのに適切な波長の光を生産する光源、光源をミクロ流体の反応流路内のＤＮＡサンプルプラグの産物へ、検出領域を通して誘導するオプティックスを含む。

【０１４０】

当業者は、増幅したＤＮＡ産物を検出するために必要な光源を、例えば蛍光性の増幅したＤＮＡ産物を励起するための適切な波長を考慮することによって決定することができる。レーザー、半導体レーザー、およびＬＥＤを含むがこれらに限定されない適切な波長を提供する任意の光源が使用され得る。

【０１４１】

蛍光の検出は、適切な検出器（例えば、光電子増倍管）を用いて達成する。発明の方法によって生成した増幅したＤＮＡ産物は、検出器を通ることで検出され得る（例えば、増幅したＤＮＡ産物（例えばＰＣＲによって増幅したＤＮＡ産物）が１つの温度のみで検出される必要があるとき）。あるいは、検出器は固定され得る、または（例えば、増幅したＤＮＡ産物に（例えば、波形プロファイリング法（例えば、ＳＧＰ法））によって増幅したＤＮＡ産物にＴｍ分析を行うために）異なる融解温度が付与されている間、蛍光を検出するために）増幅したＤＮＡ産物と動かされ得る。

【０１４２】

増幅したＤＮＡ産物を検出するために、検出可能なエージェントは、少なくともＤＮＡを含むサンプルプラグに加えられる必要がある。さまざまな形態（例えば、光学的、化学的、電気化学的、および熱的）の検出のための検出可能なエージェントは当技術分野でよく知られている。好ましい検出可能なエージェントとして、増幅したＤＮＡ産物が存在する場合のみ検出可能なものがある。このような検出可能なエージェントは、当技術分野でよく知られてより、蛍光性の挿入剤をこれに限定されずに含む。本発明の方法によると、検出可能なエージェントが検出領域の上流にあるサンプルプラグに加えられる場合、検出可能なエージェントは、ＤＮＡの増幅時やサンプルプラグが増幅サイクルにかけられた直後などに検出領域の上流にある各サンプルプラグに（例えば、サンプルの準備における反

応試薬として）加えられ得る。本発明の方法では、検出エージェントを含むサンプルプラグが第２温度制御領域に移動され際、増幅したＤＮＡ産物（例えば、ＰＣＲで増幅した産物、例えばＳＧＰ法の波形プロファイリング法によって生成された高次ＤＮＡ構造が解離される）が検出され得る。当業者は、ＰＣＲで増幅した産物の検出が、１つの温度で起こり得るのに対して、（ＳＧＰ法を含む）波形プロファイリング法によって生成した高次構造の解離の検出が、少なくとも２つの異なる温度が必要とされることを理解し得る。ＰＣＲで増幅した産物を検出し得る温度（例えば、室温）は、使用された検出可能なエージェントに依存する。さらに、波形プロファイリング法（例えば、ＳＧＰ、すなわち溶融曲線分析）によって生成した高次構造の解離の検出は、多くの場合、（例えば、温度コントロール板にわたって適用される）温度勾配としての形で、一連の温度（例えば、６５℃～９５℃）で起こる。

【０１４３】

当業者は、本明細書中に記載されている方法の検出工程が、汚染のスクリーニング、汚染する微生物の同定および／または、このような汚染のレベルを定量化するために使用され得ることを理解し得る。このような特定の実施形態はそれぞれ以下に詳細に記載する。さらに、上述のとおり、本発明の装置を、さらなら分析（例えば、シークエンシング分析）を目的に、検出されたＤＮＡ産物を選択するために使用し得る。

【０１４４】

１．スクリーニング

本発明の目的は、サンプルにおける汚染微生物の連続的なスクリーニングのための安価な方法を提供することである。汚染微生物が存在しないかまたは存在するかを知るためにサンプルをスクリーニングすること（例えば、増幅したＤＮＡ産物が存在しないかまたは存在するかを検出すること）、すなわち公衆のサンプル（例えば、水および空気）を、１日２４時間、週７日間、年３６５日、モニターし、汚染微生物および／またはテロ攻撃から保管することは、本発明の装置の重要な機能であり得る。従って、本発明は、サンプル中の汚染をスクリーニングするために本発明の装置を使用する方法を提供する。この方法では、少なくとも１つのミクロ流体の反応流路に、サンプル液滴を前記供給サンプルから連続的に取得し、各サンプル液滴を、増幅試薬を含むプライマープラグと混合することによってサンプルプラグを形成し、ゲノム材料を含むサンプルプラグ中でＤＮＡを増幅し、増幅産物が存在しないか存在するかを検出し、これらの工程は、装置内で起こる。本発明のこの実施形態では、増幅したＤＮＡ産物が存在しないこと（すなわち、検出がゼロであること）は、汚染のない供給サンプル（例えば、水供給）を示す。その一方、増幅した産物の存在は、汚染された供給サンプルを示し得る。本発明の装置を使用してサンプルをスクリーニングすることは、従来のスクリーニング法およびモニタリング方法でかかる莫大な時間と金の消費を避けながらも多くの検査が可能であるため、比較的安価である。さらに、絶えず続くゼロ検出は不必要に思えるが、この増幅した産物が存在しないことは、供給サンプルが安全であることを示す。これは、供給サンプル内の汚染を即時検出することと同様、重要かつ肝心な目的である。最後に、本明細書中に記載された方法を用いたスクリーニング、同定、おろび汚染微生物のレベルの定量化は、同時に行われ得る。

【０１４５】

２．定量化

本発明の他の実施形態では、装置を汚染のレベル（すなわち、サンプル中のゲノム物質の濃度）を定量化することに用いられ得る。本発明の装置を使用して本発明の定量化を行うプロセスは、（ａ）前記ゲノム材料の前記濃度が最大であってもサンプル１滴につき約１分子（例えば、１０００個のサンプル液滴につき３個の分子）であるように、希釈係数を用いて前記サンプルを希釈し、（ｂ）少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路にサンプル液滴を取得し、（ｃ）各サンプル液滴を増幅試薬を含むプライマープラグと混合することによって、１つより多くのサンプルプラグを形成し、（ｄ）検出可能な増幅したＤＮＡ産物を有する各サンプルプラグと、ＤＮＡ分子を含まない各サンプルプラグとにおいては増幅したＤＮＡ産物が全く検出されないように各サンプルプラグを増幅サイク

ルにかけ、（ｅ）各サンプルプラグにおいて、増幅ＤＮＡ産物の存在の有無を検出し、（ｆ）検出可能な増幅したＤＮＡ産物を含むサンプルプラグと、全く検出されないという結果をもたらすサンプルプラグとの比率を測定し、（ｇ）ゲノム材料の前記初期濃度を前記希釈係数を用いて計算する工程を含む。この方法を用いての定量化は、１つのゲノムＤＮＡ分子に由来する増幅したＤＮＡ産物を含むサンプルプラグの、ゼロ検出になったサンプルプラグに対する比に基づいくものであり、この方法は、増幅した産物の蛍光強度に基づくものではない。従って、ＰＣＲに基づいた定量化方法に内在の問題が解決される。

【０１４６】

３．同定

ここで記載する同定方法は、供給サンプル（例えば、水供給）が、本発明のスクリーニングおよび／または定量化方法で検出されるゲノム物質によって汚染されているときのみ必須である。従って、本発明の他の目的は、サンプル中の微生物を同定する安価な方法を提供することである。この方法は、（ａ）前記微生物から分離したＤＮＡ分子を含む少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを準備し、（ｂ）前記少なくとも１滴のＤＮＡサンプルを、少なくとも１つのミクロ流体のインライン反応流路に取得し、（ｃ）少なくとも１滴のＤＮＡサンプルをプライマープラグと混合することによって、少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを形成し、前記プライマープラグは、少なくとも１つの第１のプライマーを含む増幅試薬を含み、（ｄ）少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグを少なくとも１回の増幅サイクルにかけ、前記少なくとも１つのＤＮＡサンプルプラグが検出できる増幅したＤＮＡ産物を有し、（ｅ）増幅したＤＮＡ産物を検出し、（ｆ）前記微生物を前記増幅した産物の検出に基づいて同定し、（ｇ）前記微生物の同定の正確さを上げるために、前記第１プライマーとは異なる既知のプライマーを含む増幅試薬を用いてステップ（a）～（f）を任意に繰り返し行う工程を含む。本発明の一実施形態では、プライマーはある微生物を同定するために選ばれる（例えば、上述の方法を用いて増幅した産物が検出されたことが、微生物の同定を意味するように、特定の微生物のゲノムＤＮＡに特異的に結合する特定のＴＡＱＭＡＮ（登録商標）を選び得る）ため、増幅したＤＮＡ産物の検出は、ＤＮＡを単離した微生物の同定を意味する。別の実施形態では、本発明の波形プライマーまたはＳＧＰプライマーが使用され、検出された波形プロファイルが微生物の同定を意味する。

【０１４７】

増幅した産物の検出が、汚染サンプル中の汚染微生物の特定の種（または株）を同定しない場合（例えば、本発明のスクリーニング法または定量化法）、（例えば、本発明のスクリーニング法および／または定量化法で）初期検出で生成された増幅したＤＮＡ産物は、サンプル中に存在する可能性が高い微生物のタイプの予備表示／示唆として使用し得る。すなわち、スクリーニング法または定量化法は、同定する方法の任意の工程（上記の工程（ｇ））に用いられる単数または複数のプライマーの選択を狭くすることができ得る。この任意の工程には、プライマーのライブラリーがある。初期検出で示唆された微生物のタイプに基づいて、１つ（または２つ以上）のプライマーが、元のサンプルを汚染する微生物の種または株を同定するために用いうる２次的に増幅したＤＮＡ産物を生成するために使用し得る。

【０１４８】

２つ以上のゲノム物質のソースが、同時に供給（例えば、水供給）を汚染している状況では、定量化（上述）に用いられる希釈法に変化を持たせたものを用い得る。従って、ゲノム物質の汚染源が２つである場合、サンプルを十分に希釈することで、ほとんどのサンプル液滴がゲノム物質を含まなく、幾つかのサンプル液滴は１つまたはもう一方のサンプル液滴を含む複数のサンプル液滴を生成すると、各サンプル液滴内に含まれ得る成分のアレイは、０（ＤＮＡがない）、Ｘ（１つ目のゲノムＤＮＡソース）、およびＹ（２つ目のゲノムＤＮＡソース）である。当業者は、このような希釈案が、サンプル液滴一滴あたり０個または１個のゲノム物質の分子を単離することになることを理解し得る。しかしながら、２つの異なるＤＮＡ分子が１つのサンプルプラグ中に存在（例えば、ＸＹ）する稀なケースの場合でも、この方法は有用である。例えば、両方の微生物の存在を示す波形プロ

ファイル（すなわち、ＸＹ）は、任意の１つの細菌源に対して普通の波形プロファイルを示さない。

【０１４９】

当業者は、複数のサンプルプラグ（例えば、１０００個のサンプルプラグ）をモニターすれば、異なる各ソースゲノム物質からのゲノム物質を含むサンプルプラグの検出および同定を達成し得ることを理解し得る。例えば、ＳＧＰ法では、ＳＧＰプライマーの使用は、（１）微生物Ｘのゲノムｄｎａ、および（２）微生物Ｙのゲノムｄｎａを含むサンプルプラグの波形プロファイルの検出につながる。微生物ＸおよびＹをさらに同定するためには、一実施形態では、これらの微生物に対応するサンプルプラグが単離され、さらなる分析のために選択される（例えば、本発明のバルブ装置によって、ＤＮＡシークエンシングチップによる分析のために選択される）。当業者は、３つ以上のゲノム物質汚染が存在する場合でも本発明の装置に関連する方法に拡大、外挿できることを知り得る。当業者はさらに、これらの、複数のソースからのゲノム物質を同定する方法が、害のない、または害が比較的少ない供給（例えば、水供給）中の汚染源を背景に、危険な汚染源を検出および判別するのに有用だということを理解し得る。

【０１５０】

３．選択

本発明の装置を使用することで、ゲノム物質の分析において他の利益が提供される。本発明の装置は、さらなる分析（例えば、シークエンシング分析）のための増幅したＤＮＡ産物の選択を許可する。シークエンシング分析は、ＤＮＡ分析の最終的および確定的な方法である。従って、本発明の別の目的は、上述された任意の方法を用いて分析されたＤＮＡについて詳細な情報（例えば、配列情報）を提供するための、本発明の装置を使用する方法を提供することである。従って、本発明は、本発明のミクロ流体デバイス内のミクロインライン流体反応流路の長さを移動したＤＮＡサンプルプラグがさらなる分析のために任意に選択される方法を提供する。選択プロセスは、本発明のミクロ流体デバイスの「バルブ」で起こる。選択後、本発明のミクロ流体デバイスのバルブはさらに、選択した単数または複数のＤＮＡサンプルプラグが他の装置（例えば、ＤＮＡシークエンシングチップ）へ（例えば、シークエンシングのために）進むことを可能にする。このようなチップは当技術分野において知られている（例えば、米国特許公開公報第２００５／０００９０２２号を参照）。

【０１５１】

本願中に引用された参照文献、特許、および特許出願の全内容は、それら全体で参照として本明細書中に組み込まれるものとする。

【実施例】

【０１５２】

本発明の幾つかの実施形態を本明細書で論じる。本発明の一実施形態の基盤、すなわちサンプル中に汚染生物が存在しないまたは存在することを検出するための系の基盤は、実施例１中で見られる。当業者は、さまざまなサンプルに関する品質保証を与える際の、例えば、供給水中に細菌が存在しないことまたは存在することを検出するための、これらの系の有用性を理解し得る。さらに、本発明を使用して異なるサンプル中の遺伝子が存在しないことまたは存在することおよび他のヌクレオチドの長さを分析することができることは、当業者によって理解され得る。例えば、当業者は本発明を使用して、供給空気から濾過したサンプル中または血液のサンプル中の炭そ菌を検出し分類することができ、あるいはさまざまな食品にコーティングされたウイルスを検出し分類することができる。本発明は、以下に記載する特定の実施例の範囲に限られると解釈すべきでない。

【０１５３】

［実施例１］

改変型ＰＣＲ（ｍＰＣＲ）および半分の時間での伸長工程を含む単一ゲノムプロファイル（ＳＧＰ）法

改変型ＰＣＲ（ｍＰＣＲ）および半分の時間での伸長工程を含む単一ゲノム・プロファ

イル（ＳＧＰ）法以下に与えた実施例および図は、当業者が本発明を理解するのを手助けし、ならびに本明細書に記載した改良を示すために与える理論構成である。図３は、ＳＧＰ法を含めた波形プロファイリング法の最初のサイクルを示し（図３Ａ）、ＳＧＰ法（図３Ｂ）および他の波形プロファイリング法（図３Ｃ）の後のサイクルの結果を比較する流れ図である。この流れ図は検出するゲノムＤＮＡの１コピーの使用を表すことを、記さなければならない。しかしながら、前に論じたように、ＳＧＰ法に関してのみ、この量のゲノムＤＮＡが検出可能な高次構造を形成するのに充分であり得る。

【０１５４】

本発明をさらに実証するために、理論上のプライマー配列と理論上のゲノム配列の両方を、それぞれ実施例１．１および実施例１．２に与えて、どのようにして充分短い長さのプライマーが、それぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型の長さに沿った幾つかの異なるプライマー結合部位と結合することができるかを実証する。次いで実施例１．３は、本明細書に記載したＳＧＰ法によって当業者を手引きし、ＳＧＰ法の各工程後に予想されるそれぞれの核酸ポリマーの配列を与え、本発明の改良を示すのを手助けする。本明細書に示した実施例は、本発明の範囲を制限するものとして解釈または理解すべきではない。

【０１５５】

［実施例１．１：理論上のプライマー配列］

本明細書で与えたモデルでは、プライマーは５’－ＡＧＣ－３’である。

【０１５６】

［実施例１．２：理論上のゲノム配列］

４つのＤＮＡヌクレオチド塩基（アデニン「Ａ」、グアニン「Ｇ」、チミン「Ｔ」、およびシトシン「Ｃ」）をランダムな順序および頻度で含む、１００１ｂｐのゲノム配列（その中で２つの鎖を、それぞれ配列番号１および配列番号２として述べる）を、コンピュータ・プログラムを使用することによって作製した。この理論上のランダムに作製した配列の数個の塩基を変えて、ＳＧＰ法をさらに明確に実証する配列を得た。二本鎖ゲノムＤＮＡの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型のそれぞれの配列を、図４中に示す。一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型の１つの配列は５’→３’で示し、ヌクレオチド塩基に対応する大文字によって表し、配列番号１として述べる；相補的な一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型は３’～５’で示し、ヌクレオチド塩基に対応する小文字によって表し、配列番号２として述べる。それぞれのゲノムＤＮＡ鋳型上の太字は、実施例１．１の理論上のプライマーがアニーリングすると予想される部位、すなわちプライマー結合部位を示す。図４中の括弧付けした領域は、プライマー結合部位によって囲まれる理論上のゲノムＤＮＡの幾つかの異なる領域を示し、そのそれぞれはＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの形で指数関数的に増幅し得る（例えば、図７参照）。

【０１５７】

［実施例１．３：改良型ＰＣＲおよび半分の時間の伸長工程を含むＳＧＰ法］

実施例１．１のプライマーは、実施例１．２のゲノムＤＮＡに沿ったそれぞれのプライマー結合部位にアニーリングすると予想される。ｍＰＣＲの最初のサイクルはゲノムＤＮＡを２つのゲノムＤＮＡ鋳型に変性させることで始め、これは～９５～９８℃で約２分間実施する。プライマーとそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上の幾つかの異なる相補部位、すなわちプライマー結合部位のアニーリング後、変性を続ける。アニーリングは～２５℃で約２分間起こる。プライマーがそれぞれの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上の幾つかの異なる相補部位にアニーリングした後、ポリメラーゼ、例えばＴａｑポリメラーゼは、プライマーの３’端で始まり５’→３’方向に延長し、異なる核酸ポリマー、すなわちＳＧＰ核酸ポリマーを伸長させる。伸長は～７２℃で約２分間起こり、このように、このｍＰＣＲの理論上の最初のサイクルでは、２１塩基以下のＳＧＰ核酸ポリマーが生成する。

【０１５８】

実施例１．１および１．２の理論上のプライマーおよびゲノムＤＮＡ配列を用いるｍＰＣＲの最初のサイクルの説明は、図５および６中に表す。図５は、２つの変性した一本鎖ＤＮＡ鋳型として（図４中にも示した）理論上のゲノムＤＮＡ配列を示す。一本鎖ＤＮＡ

鋳型の１つの配列は図５Ａ中に５’→３’および大文字によって示し（配列番号１）、相補的一本鎖ＤＮＡ鋳型の配列は図５Ｂ中に３’～５’および小文字によって示す（配列番号２）。さらに太字は、予想されるプライマーのアニーリング部位を示す。ＳＧＰ核酸ポリマーが増幅の最初のサイクル中に由来すると予想されるゲノムＤＮＡの領域は、１）プライマーとプライマー結合部位の結合を示すための、それぞれのプライマー結合部位の下の理論上のプライマー配列に対応する文字、２）ＳＧＰ核酸ポリマーの伸長の方向を示す矢印、および３）伸長したＳＧＰ核酸ポリマーの予想される長さを示す陰影によってそれぞれのゲノムＤＮＡ鋳型の下に表す。増幅の最初のサイクル後にそれぞれのゲノムＤＮＡ鋳型から生じると予想されるＳＧＰ核酸ポリマーの配列は、図６に挙げる（配列番号３－３４）。示したように、幾つかのＳＧＰ核酸ポリマーの配列は、（太字配列によって表される）ＳＧＰプライマー結合部位を含む。

【０１５９】

増幅の第２およびその後のサイクルの変性工程中、（図６中に示すような）ＳＧＰプライマー結合部位を含む配列を有するＳＧＰ核酸ポリマーは、それぞれのゲノムＤＮＡ鋳型から分離すると思われ、後のアニーリングおよび伸長工程に関与する、すなわちそれらは高次構造を形成しないと思われる。従って、第２およびその後の増幅サイクルでは、図６中に述べるＳＧＰ拡散ポリマー以外に、図７中に述べる一組のＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーが合成および増幅される。

【０１６０】

当業者は、図７中に述べるそれぞれの配列、すなわちそれぞれのＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー配列は、（図４中の括弧で示すように）プライマー結合部位によって囲まれる、すなわちＳＧＰプライマー配列およびＳＧＰプライマー配列の逆相補配列によって囲まれる、ゲノムＤＮＡ鋳型の幾つかの領域の１つと同一であることを容易に理解し得る。当業者は、増幅の後のサイクルが図７中に挙げた配列の指数関数的倍増をもたらすことも理解し得る。２２～２４サイクル後に、図７中に挙げたそれぞれの異なるＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの、約１０６～１０７のコピーがゲノムの１コピーから生じると見積もられる。

【０１６１】

図７中に挙げたＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーの幾つかの３’端が、伸長時間が減少するためにコピーされないように、全時間の伸長工程を含む数回、例えば２２～２４回のｍＰＣＲサイクル後に「半分の時間」での伸長工程を含める。「半分の時間」での伸長工程は、前の全時間の伸長工程で使用した時間の長さの約４０～６０％、例えば前に使用した伸長工程の時間の長さの５０％であり得る。

【０１６２】

この実施例では、半分の時間の工程中の伸長は～７２℃で約１分間起こる。このような伸長時間は、１０塩基対までの重合を可能にする。このように、（図７中に挙げた）以下の配列の１つを有するＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー由来の核酸ポリマーのみが、それがプライマー結合部位：３’－ｔｃｇａ－５’（配列番号３６として述べる）、３’－ｔｃｇｃｃｃｃｃｇａ－５’（配列番号３７として述べる）、５’－ＡＧＣＴ－３’（配列番号４０として述べる）、または５’－ＡＧＣＧＧＧＧＧＣＴ－３’（配列番号４１として述べる）を含むように完全に伸長すると思われる。このようなＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは、高次構造の形成に関与しないと思われる。

【０１６３】

対照的に、（図７中に挙げた）以下の配列の１つを有するＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーから半分の時間の伸長工程中にコピーされる核酸ポリマーは、縮小ＳＧＰ核酸ポリマーであると思われる、すなわちそれはプライマー結合部位：３’－ｔｃｇｇｇｔｔｔｃｃｃｇｇａａｇｃｃｇａ－５’（配列番号３５として述べる）、３’－ｔｃｇｇｃｔａｃｔａｃｇｇａａｃｇａ－５’（配列番号３８として述べる）、５’－ＡＧＣＣＣＡＡＡＧＧＧＣＣＴＴＣＧＧＣＴ－３’（配列番号３９として述べる）、または５’－ＡＧＣＣＧＡＴＧＡＴＧＣＣＴＴＧＣＴ－３’（配列番号４２として述べる）を含む配列を有さないと思われる。半分の時間の伸長工程後の図７中に挙げたＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーに由来する

と予想される、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーおよび縮小ＳＧＰ核酸ポリマーの配列は、図８中に挙げる。縮小ＳＧＰ核酸ポリマー、すなわちＳＧＰプライマー結合部位を有さず高次構造の形成に関与すると思われるポリマーは図８中で下線を引き、以下のような配列：５’－ＡＧＣＣＣＡＡＡＧＧ－３’（配列番号４３として述べる）、５’－ＡＧＣＣＧＡＴＧＡＴ－３’（配列番号４６として述べる）、３’－ｃｇｇａａｇｃｃｇａ－５’（配列番号４７として述べる）および３’－ｔａｃｇｇａａｃｇａ－５’（配列番号５０として述べる）を有する。

【０１６４】

全時間の伸長工程の代わりに半分の時間での伸長工程を含む後のｍＰＣＲサイクルは、相補鎖を有しておらず、従って高次構造を形成すると思われる、一本鎖縮小ＳＧＰ核酸ポリマーを生成する。これらの高次構造は、Ｔｍ分析（波形プロファイリング）を実施することによって検出することができる。対照的に、縮小ＳＧＰ核酸ポリマー、例えば５’－ＡＧＣＴ－３’は、半分の時間の伸長工程を含むｍＰＣＲ中に完全に伸長すると思われる。従って、完全な相補的ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーは半分の時間の伸長工程中に常に形成すると思われるので、これらの縮小ＳＧＰ核酸ポリマーはそれらの相補的核酸ポリマーと結合し、高次構造の形成に関与しないと思われる。

【図面の簡単な説明】

【０１６５】

【図１Ａ】、

【図１Ｂ】サンプル液滴が、（Ａ）準備（例えば、ろ過、抽出、希釈など）され、本発明のミクロ流体デバイスのミクロ流体のインライン反応流路に吸引され、装置の試薬アセンブリ領域内でサンプルプラグを形成するように増幅試薬と混合され、続いて（Ｂ）ミクロ流体デバイスの増幅領域内（すなわち、第１温度制御領域）で増幅される際の、そのサンプル液滴の進路を示す図である。

【図２Ａ】、

【図２Ｂ】ミクロ流体のインライン反応流路内のサンプルプラグが、本発明のミクロ流体デバイスの第１温度制御領域を通った（図１Ｂ）後で、（Ａ）本発明の装置の検出領域（すなわち、第２温度制御領域）を通り、少なくとも第１および第２温度を受け、続いて（Ｂ）廃棄またはさらなる分析に選択される際の、そのサンプルプラグの進路を示す図である。

【図３Ａ】波形プロファイリング法および単一ゲノム・プロファイリング法の工程、およびそこから生じる核酸ポリマーを示す流れ図である。

【図３Ｂ】図３Ａの続きの図であり、波形プロファイリング法および単一ゲノム・プロファイリング法の工程、およびそこから生じる核酸ポリマーを示す流れ図である。

【図３Ｃ】図３Ａの別の続きの図であり、波形プロファイリング法および単一ゲノム・プロファイリング法の工程、およびそこから生じる核酸ポリマーを示す流れ図である。

【図４】理論上のゲノムＤＮＡのヌクレオチド配列の図である。

【図５Ａ】２つの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型への変性を示す図４のゲノムＤＮＡ、およびそれぞれの変性一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上のプライマー結合部位にアニーリングした理論上のプライマーを示す図（ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．１）であり、矢印はＳＧＰ核酸ポリマーが由来するそれぞれのゲノムＤＮＡの領域中のＳＧＰプライマー配列の伸長を示す図である。

【図５Ｂ】２つの一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型への変性を示す図４のゲノムＤＮＡ、およびそれぞれの変性一本鎖ゲノムＤＮＡ鋳型上のプライマー結合部位にアニーリングした理論上のプライマーを示す図（ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．２）であり、矢印はＳＧＰ核酸ポリマーが由来するそれぞれのゲノムＤＮＡの領域中のＳＧＰプライマー配列の伸長を示す図である。

【図６】図５Ａ、５Ｂのゲノムおよびプライマーを使用して作製した、それぞれのＳＧＰ核酸ポリマーの配列の図である。

【図７】図６のＳＧＰ核酸ポリマーのｍＰＣＲ増幅後に作製した、それぞれのＳＧＰ－Ｓ

ＧＰ核酸ポリマーの配列の図である。

【図８】図７のＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマーに半分の時間の伸長工程を施した後に作製した、ＳＧＰ－ＳＧＰ核酸ポリマー（下線なし）および縮小ＳＧＰ核酸ポリマー（下線あり）の配列の図である。

【図１Ａ】

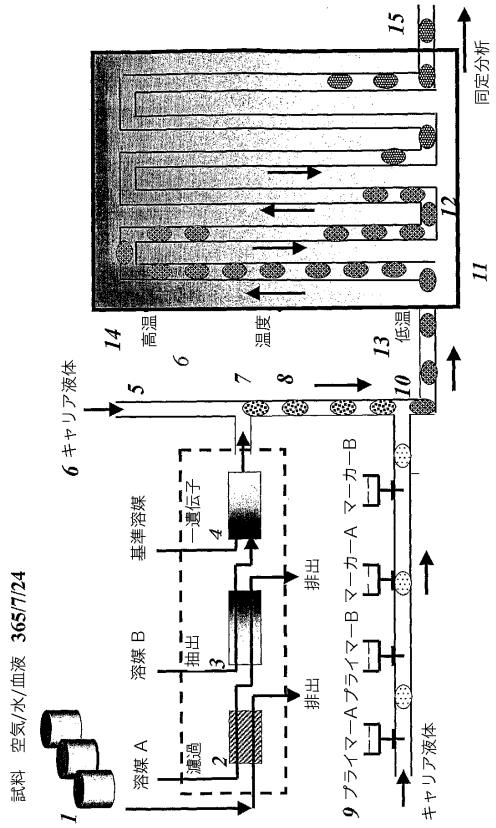


FIGURE 1A

【図１Ｂ】

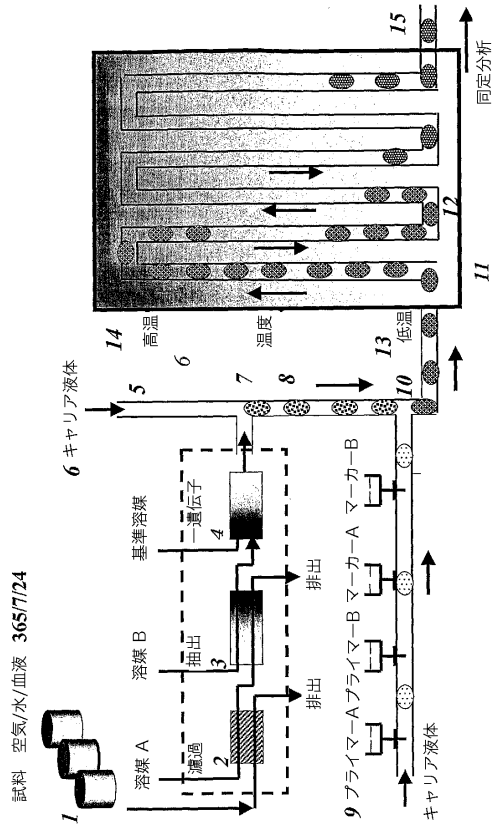
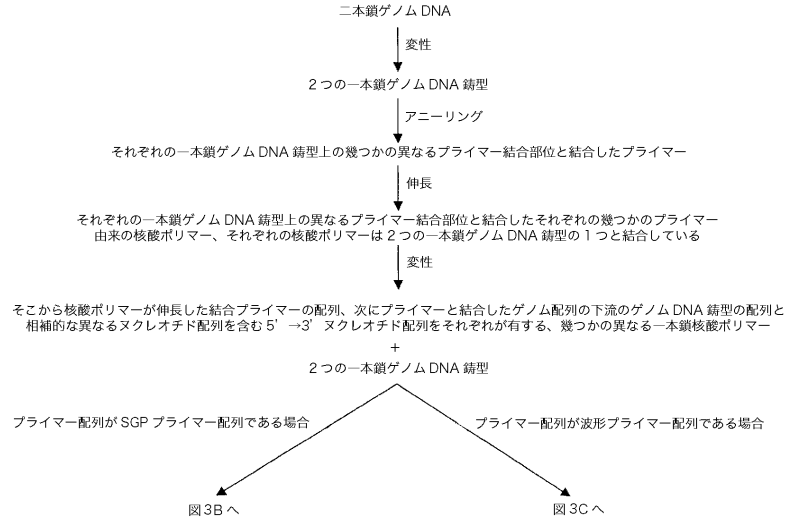


FIGURE 1B

【図３Ａ】

FIGURE 3A



【図３Ｂ】

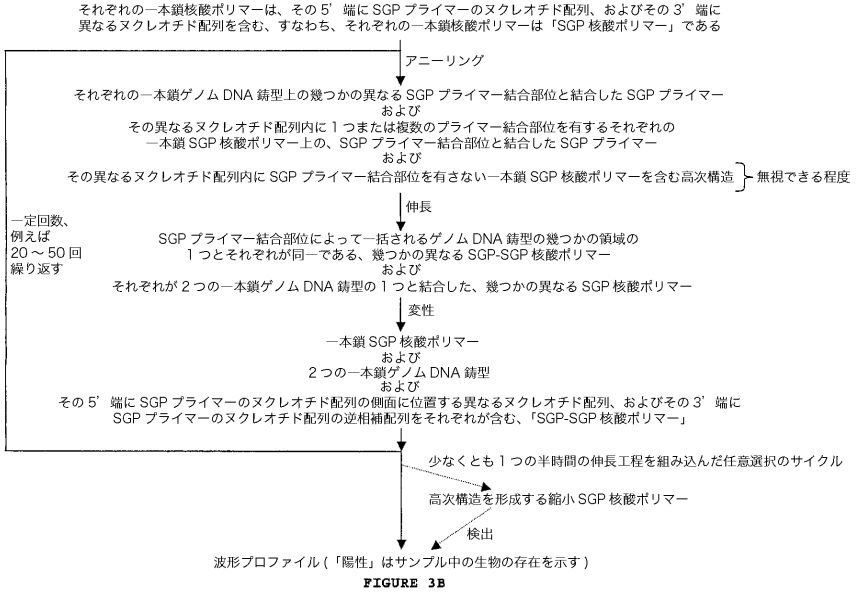


FIGURE 3B

【図２Ａ】

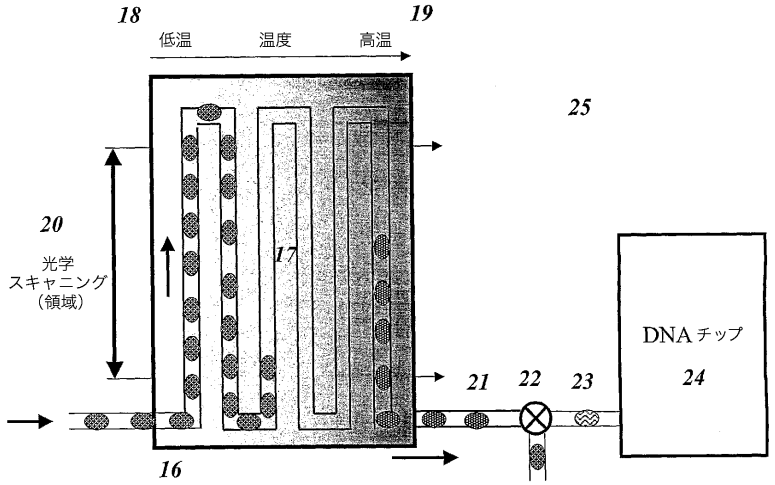


FIGURE 2A

FIGURE 2B

【図２Ｂ】

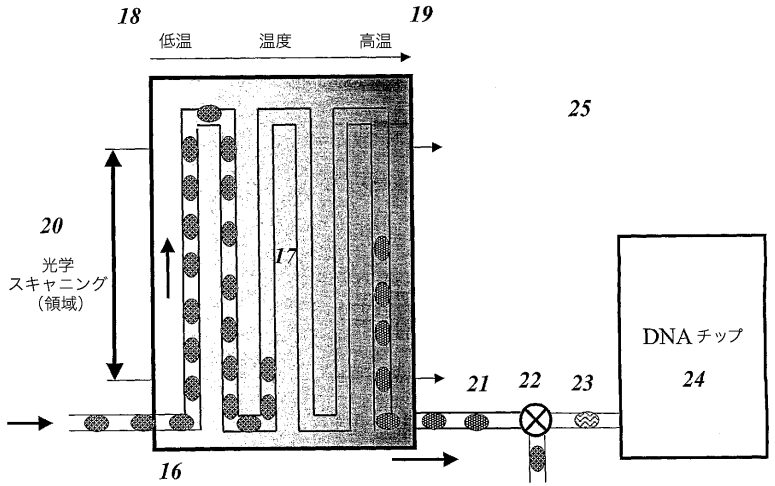
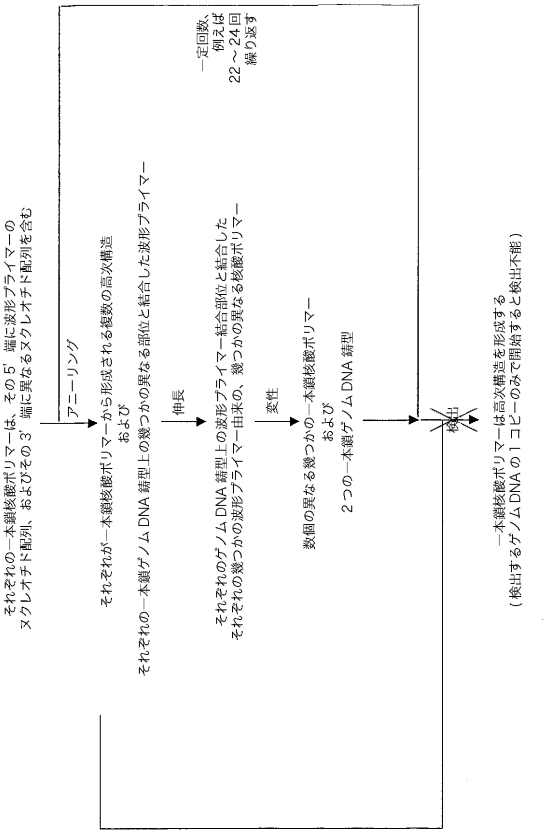


FIGURE 2A

FIGURE 2B

【図３Ｃ】



【図４】

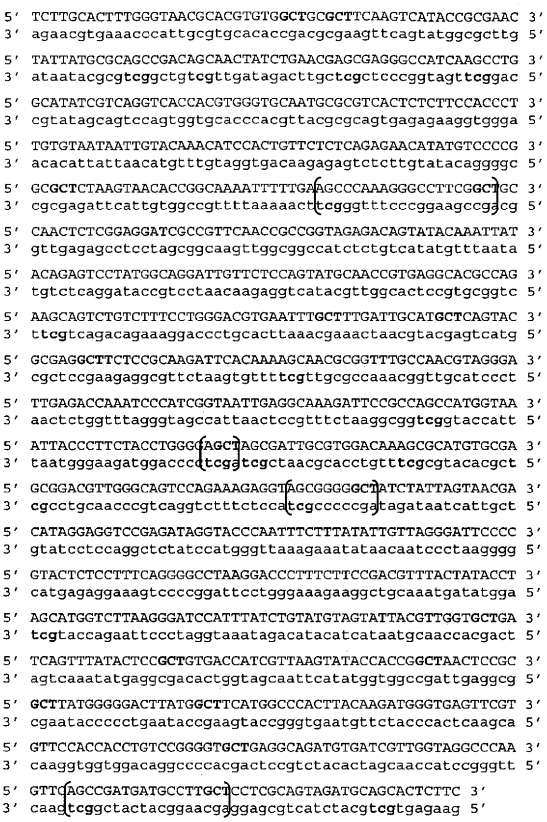


FIGURE 3C

FIGURE 4

【図５Ａ】

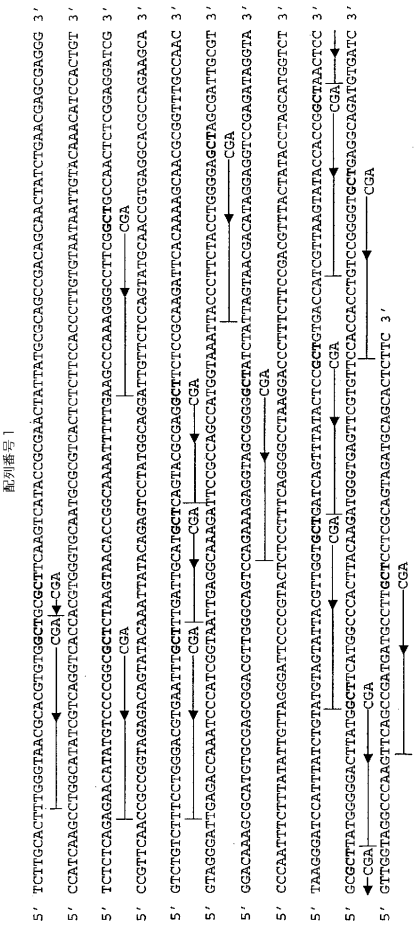


FIGURE 5A

【図５Ｂ】

FIGURE 5B

【図６】

FIGURE 6

配列番号２として述べるゲノム DNA 鋳型由来の SGP 核酸ポリマー	配列番号１として述べるゲノム DNA 鋳型由来の SGP 核酸ポリマー
5'-AGCCGAC-3' (配列番号 3)	3'-aacccattgcgtgcacaccga-5' (配列番号 19)
5'-AGCAACTATCTGAACG-3' (配列番号 4)	3'-cgcga-5' (配列番号 20)
5'-AGCGAGGGCCATCA-3' (配列番号 5)	3'-tcttgtatacaggggccgcga-5' (配列番号 21)
5'-AGCCTGGCATATCGTCAGGTC-3' (配列番号 6)	3'-**ttcgggt**ttcccggaagccga-5' (配列番号 22)
5'-AGCCCAAAGGGCCTTCG**GCTG**-3' (配列番号 7)	3'-aaggaccctgcacttaaacga-5' (配列番号 23)
5'-AGCAGTCTGTCTTTCCTGGGA-3' (配列番号 8)	3'-aactaacgtacga-5' (配列番号 24)
5'-AGCAACGCGGTTTGCCAACGT-3' (配列番号 9)	3'-**g**tcatgcgc**t**ccga-5' (配列番号 25)
5'-AGCCATGGTAAATTACCCTTC-3' (配列番号 10)	3'-atgggaagatggacccc**t**cga-5' (配列番号 26)
5'-**AGCT**-3' (配列番号 11)	3'-gtctttctcca**t**cgccccga-5' (配列番号 27)
5'-AGCGATTGCGTGGACAA-3' (配列番号 12)	3'-tacatcataatgcaaccacga-5' (配列番号 28)
5'-AGCGCATGTGCG-3' (配列番号 13)	3'-ctagtcaaatatgaggcga-5' (配列番号 29)
5'-AGCGGACGTTGGGCAGTCCAG-3' (配列番号 14)	3'-agcaattcatatggtggccga-5' (配列番号 30)
5'-AGCGGGG**GCT**ATCTATTAGTA-3' (配列番号 15)	3'-ttgaggcgcga-5' (配列番号 31)
5'-AGCATGGTCTTAAGGGATCCA-3' (配列番号 16)	3'-atacccccctgaataccga-5' (配列番号 32)
5'-AGCCGATGATGCCTT**GCT**CCT-3' (配列番号 17)	3'-ggtggtggacaggccccacga-5' (配列番号 33)
5'-AGCACTCTTC-3' (配列番号 18)	3'-aag**t**cg**g**ctactacggaacga-5' (配列番号 34)

【図７】

FIGURE 7

配列番号２として述べるゲノム DNA 鋳型由来の SGP 核酸ポリマーから増幅させた SGP-SGP 核酸ポリマー	配列番号１として述べるゲノム DNA 鋳型由来の SGP 核酸ポリマーから増幅させた SGP-SGP 核酸ポリマー
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	5'-AGCCCAAAGGGCCTTCG**GCT**-3' (配列番号 39)
3'-**tcgggt**ttcccggaagccga-5' (配列番号 35)	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	5'-A**GCT**-3' (配列番号 40)
3'-**t**cga-5' (配列番号 36)	5'-AGCGGGG**GCT**-3' (配列番号 41)
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
3'-**t**cgccccga-5' (配列番号 37)	適用なし
適用なし	適用なし
3'-**t**cg**g**ctactacggaacga-5' (配列番号 38)	適用なし
適用なし	5'-AGCCGATGATGCCTT**GCT**-3' (配列番号 42)

【図８】

FIGURE 8

配列番号２として述べるゲノム DNA 鋳型由来の SGP 核酸ポリマーから増幅させた SGP-SGP 核酸ポリマーから伸長した、縮小 SGP 核酸ポリマー（下線）	配列番号１として述べるゲノム DNA 鋳型由来の SGP 核酸ポリマーから増幅させた SGP-SGP 核酸ポリマーから伸長した、縮小 SGP 核酸ポリマー（下線）
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	3'-cggaagccga-5' (配列番号 47)
5'-AGCCCAAAGG-3' (配列番号 43)	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	3'-**t**cga-5' (配列番号 48)
5'-**AGCT**-3' (配列番号 44)	3'-**t**cgccccga-5' (配列番号 49)
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
適用なし	適用なし
5'-AGCGGGG**GCT**-3' (配列番号 45)	適用なし
適用なし	適用なし
5'-AGCCGATGAT-3' (配列番号 46)	適用なし
適用なし	3'-tacggaacga-5' (配列番号 50)

【配列表】
0004982387000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100064447
弁理士 岡部 正夫
(74)代理人 100085176
弁理士 加藤 伸晃
(74)代理人 100096943
弁理士 臼井 伸一
(74)代理人 100091889
弁理士 藤野 育男
(74)代理人 100101498
弁理士 越智 隆夫
(74)代理人 100102808
弁理士 高梨 憲通
(74)代理人 100128646
弁理士 小林 恒夫
(74)代理人 100128668
弁理士 齋藤 正巳
(74)代理人 100134393
弁理士 木村 克彦
(72)発明者 高橋 通
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２０８５０, ロックビル, スイート Ａ－１００, メディカル センター ドライブ ９８００ キヤノン ユー. エス. ライフ サイエンシズ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 井上 裕司
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２０８５０, ロックビル, スイート Ａ－１００, メディカル センター ドライブ ９８００ キヤノン ユー. エス. ライフ サイエンシズ, インコーポレイテッド内

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 国際公開第０２／０８３９５２（WO, Ａ１）
特表２００１－５２１６２２（ＪＰ, Ａ）
米国特許出願公開第２００４／００８９５４８（ＵＳ, Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/04
C12Q 1/68
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)