

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3795540号
(P3795540)

(45) 発行日 平成18年7月12日(2006.7.12)

(24) 登録日 平成18年4月21日(2006.4.21)

(51) Int.C1.

F 1

C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q 1/68	A
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	A
C 12 M 1/00	(2006.01)	C 12 M 1/00	A

請求項の数 2 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平5-264813
 (22) 出願日 平成5年10月22日(1993.10.22)
 (65) 公開番号 特開平6-197797
 (43) 公開日 平成6年7月19日(1994.7.19)
 審査請求日 平成12年10月23日(2000.10.23)
 (31) 優先権主張番号 965683
 (32) 優先日 平成4年10月23日(1992.10.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 979569
 (32) 優先日 平成4年11月20日(1992.11.20)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 590000846
 イーストマン コダック カンパニー
 アメリカ合衆国、ニューヨーク14650
 , ロチェスター、ステイト ストリート3
 43
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敏
 (74) 代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
 (74) 代理人 100128495
 弁理士 出野 知
 (74) 代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也
 (74) 代理人 100081330
 弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸物質の增幅及び検出方法並びにそれに使用するデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鋳型として少なくとも1つの標的鎖を用いて核酸物質を增幅及び検出するためのデバイスであって、

増幅された核酸物質を検出するための検出部位並びに共同して検出可能なシグナルを発生するのに有効である標識及びシグナル発生性物質を含有する保存区画を含む複数の区画、並びに当該区画と当該検出部位とを流動的に連絡するための通路を含んでなり、

当該保存もしくは反応区画に使用される捕捉体、標識及びシグナル発生性試薬を含まない洗浄液を含有する洗浄区画を一切含まず、各区画を連続的に破裂せしめてそれぞれの区画の内容物を検出部位に連続的に進行させるために使用される外部加圧手段を有し、かつ、該検出部位の下流に廃棄物区画を有することを特徴とするデバイス。

【請求項 2】

増幅された核酸物質を検出部位にハイブリダイズせしめることにより該増幅された核酸物質を検出する方法であって、請求項1に記載のデバイスを用いることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、核酸物質を増幅及び検出するのに使用される、反応パウチもしくはデバイス、並びに方法に関する。

10

20

【0002】

【従来の技術】

極微量の核酸物質のPCR増幅及び増幅された物質の検出を、増幅された核酸が漏出しない単一パウチですべて実施できる方法を用いたDNA検出は、欧州特許出願381,501号明細書に記載されている。6つの一時的にシールされたプリスター（また区画（compartiment）と称される）は、検出区画の検出部位に対してそれらを連絡する通路に沿って提供される。プリスターは、順に、PCR反応区画；第一洗浄区画；例えば、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ（以下本明細書では、SA-HRPと称する）を含有する酵素標識区画；第二洗浄区画；酵素に応答するシグナル発生性物質を含有する区画；並びに停止溶液区画を提供する。これらの各々が言及した順序で空になって内容物が検出区画へ移動し、検出部位は、増幅された核酸物質を捕捉しそして検出可能なシグナルを発生するために使用される。

【0003】

2つの洗浄段階を提供するために2つの洗浄区画を使用することは、核酸物質を検出する従来の試みのすべてと一致する。例えば、J. Clin. Microbiol. 845~853（1992年4月）の第30巻は、Roche（846~847ページ）により使用された方法を記載する。その方法は、固体壁面に対してビオチニル化生成物をハイブリダイゼーションし、続いて、「プレートを4回洗浄緩衝剤Iで洗浄していざれかの未ハイブリダイゼーション生成物を除去した」と記載されている。これら4回の洗浄は、欧州特許出願381,501号明細書のパウチの第1洗浄プリスターの第1洗浄段階に対応するものであり、そしてまた、「ハイブリダイゼーションしていない」DNAもしくは核酸材料が検出部位へ洗い流される。その後、Roche方法では、「37で15分間アビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体と」インキュベーションせしめた。当然それは、ほとんど同じ目的で、EPAパウチの酵素プリスターを空にすることに対応する。その後、Roche方法では、「再びプレートを4回洗浄して」「未結合接合体を除去した」。勿論これは、EPA381,501のパウチ中の酵素プリスターとシグナル発生性物質プリスターとの間に配置された第2洗浄プリスターにより提供される第2洗浄段階に対応する。

【0004】

そのような方法は、すべて洗浄によって、十分実施できるとはいえ、時間を浪費し、従つて経費がかかる。更に、洗浄は、パウチの製造を複雑にする。しかしながら、それらは「非特異的シグナル」、即ち、標的ではない未結合核酸物質の存在、及び/又は標的核酸が存在しないために存在すべきではない未結合SA-HRPのどちらかによって発生するシグナルを排除するために必須であると考えられている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、信頼できないシグナルを発生することで検出中に多量のノイズを生じることなく、少なくとも1つの、好ましくは両方の、以前に必要とされた洗浄段階及び洗浄プリスターを排除する検出順序を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、EPA381,501に記載された方法に使用されたパウチのフォーマットが、1つもしくは両方の洗浄プリスターを排除することに役立ち、一方実質的に同じ結果を提供することを発見した。これは、洗浄が必須段階であることを指図してきた実際の歴史に著しい驚きを与えた。

【0007】

より詳細には、本発明の一態様に従えば、本発明の目的は、少なくとも1つの固定化プローブを含む検出部位に増幅された核酸物質をハイブリダイズせしめ、シグナル発生性物質であるか又はそれと相互作用してシグナルを生成する標識を該部位に持つることによりハイブリダイズして固定化せしめた核酸物質を標識し、その後にシグナル発生性物質を該部位に添加して検出可能なシグナルを生成することにより増幅された核酸物質を検出する。

10

20

30

40

50

る方法であって、

標識段階が、ハイブリダイゼーション段階の後に、間に洗浄段階を必要とすることなく直接用いられるか、又は添加段階が、標識段階の後に、間に洗浄段階を必要とすることなく直接用いられる方法により達成される。このような事情で使用される「又は」が、非限定的使用であることは明らかである。

【0008】

本発明の別の態様に従えば、増幅された核酸物質を検出するための検出部位並びに共同して検出可能なシグナルを発生するのに有効である標識及びシグナル発生性物質を含有する保存区画を含む複数の区画、並びに当該区画と当該検出部位を流動的に連絡するための通路を含んでなる、鑄型として少なくとも1つの標的鎖を用いて核酸物質を増幅及び検出するためのデバイスにより目的が達成される。該デバイスは、更に、当該保存もしくは反応区画に使用される捕捉体、標識及びシグナル発生性試薬を実質的に含まない洗浄液を含有する洗浄区画が2以上含まれることはなく、また当該洗浄区画と当該検出部位とを連絡する通路も2以上含まれることはなく、そのため、当該区画の内容物を空にして当該検出部位へ移動せしめることを含む一連の段階に2以上の洗浄工程を用いることはないように改良されている。

【0009】

【具体的な態様】

以下の本明細書の説明は、本発明を、その好ましい態様について示すものであり、同一所有の許可された米国特許出願番号第 673,053号明細書（1991年3月21日に Schnipelsky 他により出願されたものであり、その内容は本明細書に特に組み入れられる）に教示された手段で、柔軟なパウチもしくはデバイスが提供され使用される。（幾つかの開示はEPA 38 1,501 に記載のものと同様である。）更に、本発明は、1つ以下の洗浄区画が、結果として1つ以下の介在する洗浄段階に含まれることを条件として、PCRが使用されるかどうかに無関係に有用であり、且つそのパウチのすべての特徴の存在に無関係に有用である。本明細書で用いられる「洗液」もしくは「洗浄溶液」なる語は、別の区画、即ち標識区画又はシグナル発生性物質区画のどちらかに使用される捕捉体、標識及びシグナル発生性試薬を実質的に含まない溶液を意味する。

【0010】

前記米国特許出願番号第 673,053号明細書の柔軟なパウチの、非特異的シグナルを著しく提供することなく洗浄段階を排除する能力は、完全に理解されているわけではない。しかしながら、「スラッグ」の前面が、その前の「スラッグ」により残存する結合していない試薬を洗い出すように作用するというような、各々の連続的な液体のスラッグを直線的に通過せしめるようなパウチの構成より得られると考えられる。このような「前面」で生じるいづれかの相互作用は、固定化部位で発生するシグナルに対してほとんど又は全く取るに足らないものである。更に、すべての各スラッグの液体が、検出部位を通過して効率を改良する。下記のように添加できる任意の剪断減粘性ゲルは、この能力を増強し、スラッグの前面の境界により除去される成分の後方移動を遅らせるより粘稠なスラッグを創造することは明らかである。

【0011】

図1は、反応区画と標識区画の間の洗浄区画及び洗浄段階を排除した、本発明の一様式を具体的に示すものである。反応キュベットもしくはデバイス10は、患者の試料液を注入するための入口22を含み、その入口は通路21を介してPCR反応区画26に連絡する。シール46は、区画26の流出を一時的に遮断する。シール46が破れると、液体は通路44を通過して、好ましくは適所に定着せしめられたビーズから成る部位41を有する検出室40に送られる。ビーズは、区画26から流れてきてそれらを通過するいづれかの標的分析物と複合体を形成し、次いで別の試薬区画から来る試薬と複合体を形成するであろう。それらの別の区画は区画30, 32, 34であり、これらの内容物は各々通路48及び50を介して検出室40に送られる。これらの各通路は56で一時的にシールされており、そしてこれらの区画は適当な試薬液を含有する。

10

20

30

40

50

【0012】

すべての区画及び部位 4 1 に有用な化学物質については、前記米国特許出願番号第 673,053号明細書により詳細に説明されている。好ましくは、洗浄区画が緩衝剤、界面活性剤、E D T A、NaCl及び別の塩類を含む。

【0013】

本発明に従えば、数多くの必須の区画が単一化されている。従って：
使用者により添加される患者試料に加えて、好ましくは P C R 増幅に必要なすべての伝統的な試薬を含む区画 2 6 は、場合によっては一時的にシール 2 5 により適所に維持される。 (試薬は、予めインキュベーションすることができ、又は患者試料を入れるときにそれと共に添加できる。) 試薬は、バインディングペアの 1 メンバーに結合したプライマーを含み、その別のメンバーは下記区画 3 0 に認められる。プライマーに付着したバインディングメンバーの有用な具体例はビオチンである。 (ここで、シール 2 5 は試料を注入することにより破裂する。)

10

【0014】

区画 3 0 は、好ましくは、複合剤、例えば、アビジン、即ち、バインディングペアの一方のメンバーに結合した酵素を初めとする標識を含み、そのペアのもう一方のメンバーは上記反応区画 2 6 で増幅中に標的分析物の一部となるプライマーに結合している。よって、区画 3 0 中の有用な試薬は、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ (以下本明細書では、S A - H R P) である。従って、そのバインディングペアのもう一方のメンバーはビオチンである。

20

【0015】

また酵素以外の標識も有用である。例えば、蛍光標識、放射性標識及び化学ルミネセンス標識もこのような用途について周知である。また好ましくは、化学ルミネセンス標識が、酵素標識について以下に検討されている、シグナル発生性試薬を含有する区画 3 4 に使用される。

好ましくは、区画 3 2 は試薬として洗浄溶液を含む。

【0016】

好ましくは、区画 3 4 は、シグナル発生性物質及び有用であるいずれかの色素安定剤を含む。従って、例えば、区画 3 4 中の有用な試薬溶液は、区画 3 0 の酵素の伝統的な基質であるロイコ色素の溶液である。また H₂O₂ 及びいずれかの剪断減粘性ゲルも含まれる。

30

区画 4 2 は、場合によって吸収体を含有する廃棄物収集区画である。

【0017】

ローラー 6 0 は、各区画を連続的に破裂せしめて、それぞれの区画の内容物を検出室 4 0 に連続的に進行させるために使用される外部加圧手段を例示するものである。処理中、すべての区画及び通路が封じられたままなので、デバイスから外部への漏出が生じることは全くなく、そして繰越汚染も防止される。入口 2 2 のシーリングは、折り曲げ線 7 2 でコーナー 7 0 を折り曲げて、孔 7 4 を入口 2 2 の上に嵌め、そして通路 2 1 を挟みつぶすことにより達成される。次いでクロージャーキャップを用いてコーナー 7 0 を折り曲げた状態に維持する。

【0018】

40

デバイス 1 0 を処理するのに有用な処理装置は、EPA 402,994 に示されている。そのような処理装置を用いて、支持体表面上にデバイス 1 0 をきちんと並べて置き、そして加圧メンバー、例えば、ローラーを、各キュベットを処理する位置に平行に乗せる。便宜上ローラーを数個から 1 つもしくは複数の車軸にジャーナルせしめる。これらの車軸はギアを付けることにより更に進歩する。好ましくは、支持体表面が水平であるか、又は水平より約 15° 上向きに傾斜している。更にヒーターは、所望により、固定状態であるか、あるいはローラーと共に運ぶことができる。

【0019】

従って、区画 4 0 の部位 4 1 で S A - H R P をインキュベーションした後に洗浄段階を提供して、いずれの未結合 S A - H R P も除去するために、唯一の洗浄区画 3 2 が使用され

50

る。検出部位に向けられた各試薬がそのステーションに入る次の試薬によりほとんど洗い流されるので、増幅された核酸物質及び S A - H R P の、部位 4 1 へのそれぞれの連続的な移動の間に洗浄段階もしくは洗浄液は全く必要とされないと考えられる。各区画の少量の内容物がこれを行うのに十分であることは、驚くべきことである。

【 0 0 2 0 】

あるいは(図示せず)、洗浄液が区画 3 0 にのみ配置されており、 S A - H R P がここで区画 3 2 に配置されているが、図 1 と全く同じ構造のものが有用である。この配置では、方法は、部位 4 1 で S A - H R P をインキュベーションした直後に、洗浄段階を間に入れることなく、区画 3 4 のシグナル発生性物質を部位 4 1 と直接相互作用するように進行させる。これが実施できる理由は、先の態様について記載の通りである。 10

【 0 0 2 1 】

どちらの態様においても、所望であれば更なる洗浄液を備えた洗浄区画を補充できる。これを行う便利な方法(図 2)は、始めに第 1 洗浄区画を空にして検出部位へ流し、次いで第 2 洗浄区画を空にして検出部位へ流すために、第 1 洗浄区画に隣接した洗浄区画を加えることである。これらの前記と同様の部分には、同様の参照数字を付与し、区別するためにそれの末尾に「 A 」を付ける。

【 0 0 2 2 】

従って、パウチ 1 0 A は、更に一時的にシールした洗浄液の区画 3 6 を区画 3 2 A と 3 4 A の間に置いたことを除いて、図 1 の態様におけるものと全く同じ特徴を含む。通路 5 2 は、区画 3 6 のシール 5 6 A が破裂した後に、それを区画 4 0 A に連絡するものである。 20 あるいは、大量の洗液を備えた単一洗浄区画が使用できる。

図 3 に示すように、結果としていかなる洗浄区画又はいかなる洗浄段階の存在も必要ではない。これらの前記と同様の部分には、同様の参照数字を付与し、区別するためにそれの末尾に「 B 」を付ける。

【 0 0 2 3 】

従って、図 3 のパウチ 1 0 B は、全く洗浄区画が存在しないことを除いて、前記態様のすべての特徴を含む。存在する区画は、サーマルサイクリング反応区画 2 6 B 、標識含有区画 3 0 B (例えば、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼを含む) 、並びにシグナル発生性物質、 例えば、 H₂O₂ を含有し、すぐ後に記載する剪断減粘性ゲル及び標識酵素と反応して色素を生成するロイコ色素を任意に含有する区画 3 4 B のみである。シール 4 6 B 及び 5 6 B は、ローラー 6 0 B により連続的に破裂せしめられ、内容物はそれぞれ通路 4 4 B 及び 4 8 B を介して検出部位 4 0 B に流れ、次いで廃棄物区画 4 2 B に流れる。 30

【 0 0 2 4 】

すべての態様において、シグナル発生性物質と共に含まれる任意の成分は、検出区画中の検出部位での色生成を安定化するための約 0.5% のアガロース溶液である。アガロースは、約 40 で測定した場合、この濃度付近での粘度が剪断速度 $1 \sim 10^2 \text{ sec}^{-1}$ の間で約 2.7 P a · s (約 27 ポアズ) 低下する (その低下量の 60% を越える) が、 10^2 を越える速度ではさらに 0.3 P a · s (3 ポアズ) しか低下しないという剪断減粘性挙動を示す。同様の粘度挙動を示しそして低いパーセンテージ濃度を示す別の剪断減粘性ゲルが使用できる。 40

【 0 0 2 5 】

以前は洗浄段階が検出部位への増幅された物質もしくは標識のどちらかの添加と次の試薬の添加の間に必須であると考えられていたので、上記のように、驚くべきことにどのようにしてパウチを用いて洗浄段階を排除することが許容されるのか、完全に理解されているわけではない。図 4 A ~ 4 C は、 例えば、図 3 の態様を用いて仮定したメカニズムを具体的に説明する際の補助として含めた。しかしながら、同様の原理がすべての態様に作用していると信じられている。

【 0 0 2 6 】

示されているものは、前記 EPA 381,051 に記載のような固定化ビーズを含む、拡大した検 50

出部位 4 1 B である。図 4 A に示される段階では、ビオチン尾部を有する増幅された標的核酸物質を「～～～B」と示す。そのような物質は既にビーズにハイブリダイズせしめられている。更に、標識 S A - H R P を含有する区画が空になりその部位へ流れてくる。(S A - H R P は、標識アビジンとして「A*」と示す。) その S A - H R P の幾つかは、既に標的のビオチンに結合しているが、しかし幾つかはビーズ上に及び区画 4 0 B の表面上に結合していないもの又は「遊離しているもの」として示す。

【0027】

シグナル発生性物質、例えば、ロイコ色素（「L.D.」と示す）を含有する次の区画が破裂すると、ロイコ色素は「スラッグ」100, 図 4 B, として前進する。その先導メニスカス 102 は、それが移動することにより（矢印 104）、部位 4 1 B に接近する。「スラッグ」100 が図 4 C の部位 4 1 B を通過するとき、それはメニスカス 102 で結合していない前の試薬（A*）を運び去り、結合した標識のみを残してスラッグ 100 の後ろに引きずる部分で反応し、部位 4 1 B で色素を生成する。それは読み取られるか又は検出される領域 110 であるので、下流（メニスカス 102）で生成されたいずれかの余分な色素は無関係である。このような検出部位への余分な色素の後方への移動は、所望により前記剪断減粘性ゲルを使用することにより更に遅くなる。

【0028】

【実施例】

以下の例示的な実施例は、本発明を説明する際に役立つであろう。

すべての実施例及び比較例は、特に断らない限り、以下のように調製された試薬を用いた。
。

【0029】

A. 評価するための HUT / HIV 分析物の調製

細胞 1 つ当たり HIV のコピーを 1 つ含有する HUT / AAV / 78 細胞を標準フェノール・クロロホルム抽出方法で処理して DNA を単離し、そして得られた DNA の量を分光光度計で定量した。以下に同定される各プライマー（各々 1 マイクロモル（ μM ））、緩衝剤〔塩化マグネシウム 10 mM、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS）50 mM、塩化カリウム 50 mM、及びゼラチン 0.1 mg/mL〕、dATP、dCTP、dGTP 及び dTTP デオキシヌクレオチド三リン酸 各々 1.5 mM、並びにサーマス・アクアティクス（*Thermus aquaticus*）より得られる DNA ポリメラーゼ 40 単位、を含有するカクテル中で、回収した DNA（HIV 100,000 コピー）をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅した。

【0030】

二組のプライマーを使用した。一組は ENV 領域に相補的であり、そしてもう一組は HUT / HIV DNA の GAG 領域に相補的であり、それらは多重に使用されることが知られている。各組の 1 つのプライマーが検出を促進するためにビオチニル化された。米国特許第 4,914,210 号明細書の教示に従って、2 つのテトラエチレングリコールスペーサー基をオリゴヌクレオチドに付着させた。

【0031】

PCR プロトコールを、P. N. Schnipelsky 他, EPA 381,051 及び 1991 年 3 月 21 日に出願された（現在は許可された）米国特許出願番号第 673,053 号明細書に記載のタイプの PCR 分析要素の PCR 反応プリスター中で前記カクテル 250 μL を用いて実施した。より詳細には、図 7 のパウチ 10 C を使用した。これらの前記と同様の部分には、同様の参照数字を付与し、区別するためにその末尾に「C」を付ける。従って、配置又は以下本明細書に記載することを除いて、区画 26 C、30 C、32 C、36 C 及び 34 C；通路 44 C、48 C、50 C 及び 52 C；検出部位 40 C 並びに廃棄物区画 42 C を前記のように使用した。1 つは、PCR 増幅を試験パウチ 10 C とは別個のパウチで行ったことあり、すべての反復試験、例えば、実施例 1 では 32 回における結果が矛盾しないように、増幅した物質をプールし、次いで区画 26 C に注入した。

【0032】

10

20

30

40

50

EPA 402,994 に記載のタイプのサーマルサイクリング処理装置を使用した。

標的DNAを予め90°で10秒間加熱し、次いで96°で30秒間変性し、そして70°まで60秒間かけて冷却してプライマーをアニールし、そしてプライマー伸長生成物を生成した。後者の2つの段階(96°で加熱し、次いで70°にする)は、計40サイクル繰り返した。このPCRプロセスを64回反復し、そして新たに生成したPCR生成物を含有する流体を64個のPCRプリスターから共通の容器に写してPCR生成物のプールを調製した。このプール由来の試料を前記PCR緩衝剤で1:20に希釈して、以下本明細書に記載される試験に使用した。

【0033】

B. 洗浄溶液の調製(使用した場合)

リン酸ナトリウム10ミリモル、塩化ナトリウム 150ミリモル及びエチレンジアミン四酢酸1ミリモルを含有するリン酸緩衝塩化ナトリウム溶液中にデシル硫酸ナトリウム1%を含み、pH 7.4となるように洗浄溶液を調製した。

【0034】

C. ストレプトアビシン/西洋ワサビペルオキシダーゼ(SA-HRP)接合体溶液の調製

Zymed Labs (San Francisco, CA)より入手したストレプトアビシン及び西洋ワサビペルオキシダーゼの接合体を、チメロサール防腐剤(0.01%)を含有するリン酸緩衝溶液(pH 7.3)中にカゼイン(0.5%)を含む溶液で1:8000に希釈した。

【0035】

D. ロイコ色素組成物の調製

水100mL中にポリビニルピロリドン25gを含む溶液を、N,N-ジメチルホルムアミド1mL中に4,5-ビス(4-ジメチルアミノフェニル)-2-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)イミダゾールブルー生成性ロイコ色素0.20gを含む溶液と混合し、そして1時間攪拌した。次いでこれを、水1900mLに溶解したリン酸一ナトリウム-水和物2.76g、ジエチレントリアミン五酢酸溶液(0.1M)0.2mL及び4-ヒドロキシアセトアニリド1.51gを混合し、そして50%水酸化ナトリウム溶液でpH6.82に調整することにより調製した溶液に添加した。次いで30%過酸化水素2mLを添加し、そして混合物を攪拌して色素分散物を生成せしめた。最終的に、得られた色素分散物24.75mLを水性25μMジメドン0.25mL及びアガロース0.125gと混合して0.5%アガロースを含有する色素生成性組成物を生成した。アガロースが溶解するまで組成物全体を80°で加熱攪拌し、次いで室温まで冷却した。

【0036】

E. プローブ試薬の調製

米国特許出願番号第654,112号明細書(Ponticello他により1991年2月12日出願)及びSutton他によるEPA 462,644に記載の方法を用いて、ポリ[スチレン-コ-3-(p-ビニルベンジルチオ)プロピオン酸](モル比97.6:2.4、重量比95:5、平均直径1μm)水性ポリマー粒子分散物を調製し、そして以下本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドをポリマー粒子の一部分に共有結合せしめ、そして別のオリゴヌクレオチドをポリマー粒子の別の部分に共有結合せしめた。オリゴヌクレオチドを2つのテトラエチレングリコールスペーサー、3-アミノ-1,2-プロパンジオール部分及びチミン塩基を介してポリマー粒子に連結させた。米国特許第4,962,029号明細書の方法により、各オリゴヌクレオチドを3-アミノ-1,2-プロパンジオール部分のアミノ基を介してポリマー粒子に付着せしめて試薬を生成した。

【0037】

ポリマー/オリゴヌクレオチド粒子プローブを、ポリ(メチルアクリレート-コ-ナトリウム-2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホネート-コ-2-アセトアセトキシエチルメタクリレート)(重量比90:4:6)のラテックス接着剤と、粒子対接着ポリマーの乾燥重量比約4/0.1(接着剤2.5%)で混合した。水性分散物は固体含有量約4%であった。

10

20

30

40

50

【0038】

これらの試薬製剤を用いて、HUT/HIVについてのアッセイ用に捕捉プローブとして試薬を含有する一連の分析デバイスを製造した。対照試薬オリゴヌクレオチド配列は、HIVゲノム由来の配列であり、そしてナンセンス配列として使用した。このナンセンスプローブはいかなるHUT/HIV分析物配列も捕捉すべきではなく、従って、対照試薬では色素の出現が全く起こらないはずである。別のプローブ試薬配列は、HUT/HIV DNAのENV領域の配列に相補的であった。

【0039】

上記試薬を用いて、各々試薬区画（それらの1つは、試料分析物を最初に入れるPCR反応ブリスターである）、検出区画及び廃棄物貯蔵室を有する一連の分析要素（パウチ）を生成した。分析デバイス（もしくは要素）は、ポリ（エチレンテレフタレート）/ポリエチレンラミネート（SCOTCHPAK（商標）241, 3M Co.）のシートを成形ステーション（もしくは型）で加熱してシートの一方の側にきちんと配列された窪み（ブリスター）を形成し、そしてシートのもう一方の側の末端の近くに、主溝が最終的に導かれる大きな窪みを形成し、第1ブリスターから最後までの主溝を形成し、そして後でカバーシートに積層する際に、得られたパウチが、Schnipelsky他による前記米国特許出願番号第673,053号明細書に記載のデバイスに類似の窪みから主溝へ導く狭い溝を有するように、各ブリスターから主溝までの支流溝を形成した。各々主溝の末端の1つを除いて、各窪みを適当な試薬組成物で満たした。カバーシートを積層して窪み及び溝の上にカバーを形成し、そしてシールして各窪みの間に破裂性シールを作り（最後の1つを除く）、そしてそこから主溝へ導く溝を作った。しかしながら、最初にカバーシートをコロナ放電で全体的に処理した。次いで上記プローブ試薬製剤（Invention & Control）を、各スポットが以下本明細書に記載されるように製剤0.9~1.1 μLを有するように、直ちに処理表面上に4つおきにスポットした。支持体の反対側を約95%のアイロンで加熱しながら、配置した製剤を約30秒間室温の気流中で乾燥した。

【0040】

実施例1：標識区画とシグナル発生性物質区画の間にのみ存在せしめた洗浄区画図2の様を具体的に説明するために、16個の反復試験片を製造した。上記の如く製造した16個の反復試験片の各々のシートのブリスターを、以下のような実施例の試験における試薬で満たした。

【0041】

【表1】

ブリスター（図9）試薬

26°C	分析物注入のため確保しておく（～190~210 μL）
30°C	SA-HRP接合体（～350 μL）
32°C	洗浄溶液（～235 μL）
36°C	洗浄溶液（～350 μL）
34°C	ロイコ色素（～235 μL）

【0042】

（従って、余分な洗浄物質を供給したが、ブリスター2からブリスター5を分離することのみに有効であり、ブリスター1からブリスター2を分離することには有効ではなかった。）

EPA 381,501に示されるものに類似する比較例として（「停止溶液」区画が省略されてい

10

20

30

40

50

る、正確に読み取るためとしては、その段階は明らかに不必要である)別の1組の16個の反復試験パウチを、第1洗浄液並びにプリスター2及び3中のSA-HRP接合体の位置、そして各々の量を逆にしたこと、即ち、350μLの洗浄溶液及び235μLのSA-HRP溶液を使用したことを除いて実施例1と同様に製造した。

【0043】

次いでカバーシートを積層し、そして3段階でシールした。最初に、サンドウイッチを、試薬溶液を含有するプリスターの周囲及び廃棄物プリスターの周囲のみ加圧して約149で加熱することによりシールした。破裂性シールを包含する試料受容PCRプリスター及び溝の成形は、約163で適当な造形加熱ジョーの間で試験パックを加熱することにより完成した。第3段階は、試験パックの周囲のシールの形成であり、そして上部取付板の温度199で、一方下部取付板の温度は周囲温度のままですべてのプリスター周囲シールを再シールした。完成した試験パック(もしくは要素)中に成形された溝及びプリスターは、試薬プリスターを含有する要素の部分を横切ってローラーが通過すると、プリスターのシールが連続的に破裂し、そして各プリスターから出口の溝へ試薬が押し出され、それに沿って主溝へ進み、捕捉プローブを含有する領域に導かれるように配置した。捕捉プローブスポット(被覆物)を含有するカバーシートが、主溝に適当に整列したプローブ被覆物を有する完成した要素の底となるように、完成した要素を逆にして、検出ステーションを形成した。4つのプローブスポットを、幾つかの試料で主溝の異なる部位に配置した。

【0044】

実施例1及び比較例の両方とも、主溝の末端に配置した最終洗浄区画は別のものよりも大きいものであり、且つ吸収剤と合わせて洗浄液用の貯蔵室とした。

実施例1及び比較例の完成パウチを用いて、以下の試薬製剤を評価した。

各試験デバイス中のプリスターを前記PCR生成物の20倍(×)希釈物(190~210μL)で満たして以下のように処理した。

【0045】

実施例1

分析物を予め95で120秒間加熱し、そしてそのプリスターをローラーにかけてシールを破裂させ、溶液を検出ステーション(プローブ被覆物)に向けて前進させた。分析物及びプローブ試薬を検出ステーションで42で5分間ハイブリダイズせしめ、一方第2プリスター中のSA-HRP接合体を予め65に加熱した。接合体プリスターをローラーにかけ、シールを破裂させ、そして溶液を検出領域に向けて分析物と置き換わるようにした。5分後、予め55に加熱した第1洗浄溶液を含有する第3のプリスターを破裂させ、そして洗浄液を検出ステーションに向け、そしてそこに5分間維持し、一方第2洗浄溶液を予め55

に加熱した。次いで第2洗浄溶液を含有するプリスターを破裂せしめ、そして洗浄液を検出ステーションに向けた。最終的に、予め加熱することなく色素シグナル発生性組成物を含有するプリスターをローラーにかけ、そしてシールを破裂せしめ、そして組成物を検出ステーションに向け、そこで5分間インキュベーションした後に以下本明細書に記載する色チャートを用いて色スコアを読み取った。色スコアを第I表に記録し、そして図5にグラフで示す。

【0046】

比較例

各要素中に分析物を含有するプリスターを予め約95で120秒間加熱し、次いでそのプリスターをローラーにかけてシールを破裂させ、4つのプローブ試薬の固定化被覆物を含有する領域、即ち、接着剤で付着せしめた2つの対照プローブ及び2つのHUT/HIVプローブに向けて溶液を前進させた。分析物及びプローブ試薬を検出ステーションで42で5分間ハイブリダイズせしめ、一方洗浄溶液を含有するプリスターを予め55に加熱した。次いで洗浄溶液プリスターをローラーにかけ、シールを破裂させ、そして洗浄溶液を検出領域に向けて主溝を一掃して未結合分析物を検出領域から除去した。次いで、予め加熱することなく、ストレプトアビジン/西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体プリスターをローラーにかけ、シールを破裂させ、そして溶液を検出領域に向け、ここで5分間に亘って

10

20

30

40

50

それを固定化ビオチニル化分析物と結合せしめた。この期間中に、第2洗浄溶液を予め55に加熱し、次いでローラーを用いてプリスターのシールを破裂せしめ、そして洗浄液を検出ステーションに向か、そこでそれを未結合標識と置き換えた。最終的に、ローラーを用いて最終プリスター中の色素シグナル発生性組成物のシールを破裂せしめ、そして流体を検出ステーションに向か、そこでそれを第2洗浄溶液と置き換えた。5分間プローブ被覆物上で色素生成を行ってから、色濃度スコアを読み取った。各プローブ被覆物の色を、0が濃度なしであり且つ10が最高濃度である色チャートを用いて湿潤色素濃度の比較により評価した。色スコアを第II表に記録し、そして図6のグラフに図示する。（第I表及び第II表の「LTR」及び「ENV」の語は、それぞれ、対照ナンセンスプローブ被覆物及び分析物中のHIVゲノムのENV領域に相補的なプローブ被覆物を表す。これらは、検出区画中の各々4つのビーズ部位を表す。左から右へ、以下の液体が出会う最初のビーズは「LTR」である。第2のビーズは「ENV」であり、第3のビーズは「LTR」であり、そして最後は右手側の縦欄中の「ENV」である。）

【0047】

【表2】

第 I 表
実施例 1 -HIV

反復試験	LTR	ENV	LTR	ENV	
1	0.5	7	0.5	6.5	10
2	0	6.5	0	4	
3	0.5	6.5	0.5	6.5	
4	1	6.5	1	6.5	
5	1	6.5	1	6.5	
6	0.5	6.5	0.5	6	
7	0.5	5	0.5	5.5	
8	0.5	6.5	0.5	6	
9	1	5	1	4	
10	0.5	5	0.5	5	
11	0.5	7	0.5	6.5	20
12	0.5	6	0.5	6	
13	0.5	7	0.5	6.5	
14	0.5	6	0.5	7	
15	0.5	2	0	2	
16	0.5	<u>7</u>	0.5	<u>6.5</u>	
平均		6.0		5.69	

【0048】

【表3】

40

第Ⅱ表
比較例-HIV

反復試験	LTR	ENV	LTR	ENV	
1	0.5	5	0.5	5.5	10
2	0.5	2	0.5	6	
3	0.5	6.5	0.5	5.5	
4	1	6	1	6	
5	0.5	2	0.5	2	
6	1	7	1	6	
7	1	7	1	5	
8	1	7	1	6	
9	1	3	1	7	
10	1	7	1	6	
11	0.5	1	0.5	4	20
12	1	7	0.5	6	
13	1	7	1	6.5	
14	0.5	6	1	4	
15	1	6.5	1	6	
16	1	<u>7</u>	1	<u>5.5</u>	
平均		5.44		5.44	

【0049】

容易に認められるように、特に図5及び図6の比較から、検出部位へ増幅された核酸物質をハイブリダイズした後の、及び標識試薬を添加する前の洗浄段階の排除は、結果に害を及ぼさない。実際に、良い結果が生じた。定量的には、これもまた、16個の反復試験片すべてについての実施例1の第2及び第4のビーズ「ENV」を平均して比較例のものと比較することにより認めることができる。実施例1については、平均が6.0及び5.69であり、それに対して比較例については平均が両方の場合について5.44であった。

【0050】

上記結果は、特定のアッセイに限られる訳ではない - またそれらは、例えば、CMV(サイトメガロウイルス)についてアッセイするときにも起こる。どのようなアッセイが1つ又は両方の洗浄段階を排除できることを示すために使用されるかということは重要ではないと信じられているので、オリゴヌクレオチド配列は特に同定していない。

【0051】

図1に示したパウチを製造して、実施例1のものと比較可能な結果が、第2洗浄区画を省略する場合にも得られることを示している。即ち、そのようなパウチでは、洗浄区画及び洗浄段階は、標識区画及び段階（S A - H R P を用いる）とシグナル発生性物質区画及び段階（ロイコ色素及びH₂O₂を用いる）との間にのみ存在する。

【0052】

同様に、そのような、唯一の洗浄区画を有するがそれが核酸物質を增幅するために使用される反応区画と標識区画との間に配置されている4-区画パウチが、各反応区画（ハイブリダイゼーション段階）及び標識区画（標識段階）の後に洗浄区画（及び段階）を有する従来の構造と比較可能である結果を生じることが認められている。

10

【0053】

実施例2：実施例1のパウチと洗浄溶液を全く含有しないパウチとの比較

以下のことを除いて実施例1の方法により二組のPCR分析パウチを製造した。

1. 第3プローブ組成物を、HUT/HIV DNAのGAG領域由来の配列に相補的な配列を含めて実施例1の方法により調製した。

【0054】

2. 各々3つのプローブの唯一のスポット（被覆物）を、（1）上記GAG領域由来の新規プローブ、（2）実施例1の対照プローブ、そして（3）実施例1の試薬プローブ、の順序で各要素に取り入れた。

3. 一組のパウチが、実施例1の逆洗浄フォーマットの5-プリスター-パウチであり（第2プリスター中にS A - H R P 接合体があり、且つ第3プリスター中に洗浄液がある）、そしてその組のパウチを実施例1に記載のように処理した。

20

【0055】

4. 第2組のパウチは、図3に示されるように、3つの試薬区画のみを使用し、全く洗浄区画を使用しなかった。それらは、プール由来の分析物組成物を包含する同様の組成物、及び実施例1の第1組（従来の洗浄フォーマットの組）の要素中の対応する組成物と同じ量を含み、そしてプリスターは以下の順序であった。

【0056】

【表4】

30

<u>プリスター（図9）</u>	<u>内容物</u>
26C	PCR分析物
30C	SA-HRP
32C	色素生成性検出組成物

40

残りのプリスターもしくは区画は空のままであった。

【0057】

第2組のパウチを以下のように処理した。

PCRプリスター中の分析物を予め95°で120秒間加熱し、そしてそのプリスターをローラーにかけてシールを破裂させ、分析物を検出ステーション中の3つのプローブ被覆物に向けて前進させた。42°で5分間ハイブリダイゼーションを行い、一方第2プリスター中のS A - H R P 溶液を予め65°に加熱した。次いで第2プリスターをローラーにかけてシールを破裂させ、そして溝を介して溶液を検出ステーションに向けた。接合体を5分間検出ステーションでインキュベーションし、次いで、予め加熱することなく、色素生成検

50

出分散物を含有するプリスターをローラーにかけ、シールを破裂させ、そして分散物を検出ステーションに向けて S A - H R P と置き換えた。検出ステーション中の色素分散物を 5 分間インキュベーションした後、実施例 1 のように色チャートを用いて色スコアを読み取った。両組の要素の色スコアを第 II A 表及び第 II B 表に記録し、そして図 7 及び図 8 にそれぞれグラフで示す。

【0058】

データは、3 - プリスター/パウチ配置が 5 - プリスター（実施例 1 の洗浄パウチフォーマット）のものと比較可能な陽性シグナルを与えるが、しかしながら、ナンセンス（対照）ビーズでわずかに高いシグナルを与えることを示す。これは、大量の色素生成性検出分散物を用いることにより 3 - プリスター配置で低減又は排除できる。3 - プリスター配置は少量の試薬の使用、より低い単位製造経費、狭いパウチ保存スペース、短い処理時間、並びにより小さくあまり複雑ではない処理装置を許容する。 10

【0059】

【表 5】

第 II A 表
実施例 1 で用いた 5 - プリスター

反復試験	GAG	ENV	LTR
1	7	7	0.5
2	7	7	1
3	7.5	7	1
4	7.5	7	0.5
5	7	7	1

20

30

第 II B 表
3 - プリスターデータ

反復試験	GAG	ENV	LTR
1	7	7	2
2	7.5	7	2
3	7	7	2.5
4	7.5	7	2.5

40

【0060】

【発明の効果】

以前は所望の結果を得るために必要であると考えられていた少なくとも 1 つの洗浄段階を回避する、核酸物質を增幅及び検出するための方法及びデバイスを提供することが、本発

50

明の優れた技術効果である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、本発明に従って構成された反応デバイスの平面図である。

【図 2】図 2 は、図 1 のものと同様の平面図であるが、本発明の別の様式を示すものである。

【図 3】図 3 は、図 1 のものと同様の平面図であるが、本発明の別の様式を示すものである。

【図 4】図 4 は、本発明について仮定されたメカニズムを具体的に説明する部分断面図である。

【図 5】図 5 は、本発明の実施中に達成された反復色スコアを示すグラフである。 10

【図 6】図 6 は、比較例の実施中に達成された反復色スコアを示すグラフである。

【図 7】図 7 は、本発明の実施中に達成された反復色スコアを示すグラフである。

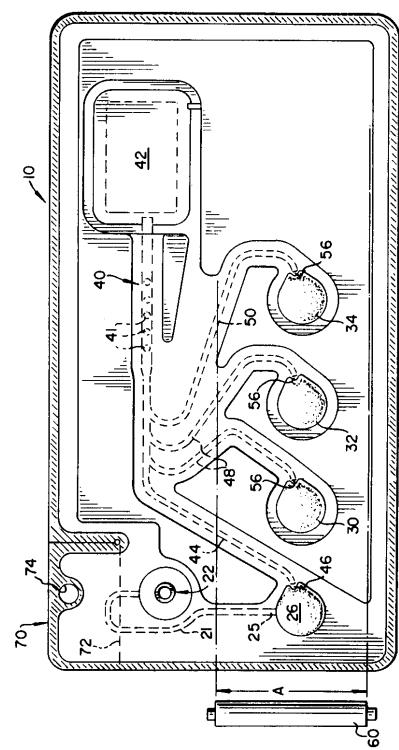
【図 8】図 8 は、本発明の実施中に達成された反復色スコアを示すグラフである。

【図 9】図 9 は、図 2 のものと同様の平面図であるが、実施例に使用した変形ハウチを示すものである。

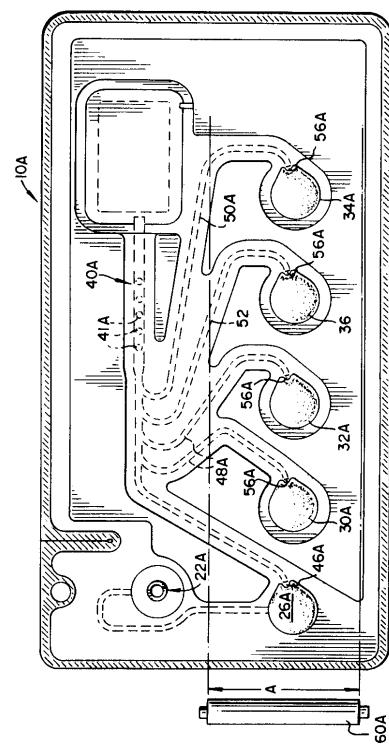
【符号の説明】

1 0	... デバイス	
2 1	... 通路	
2 2	... 入口	
2 5	... シール	20
2 6	... P C R 反応区画	
3 0	... 区画	
3 2	... 区画	
3 4	... 区画	
3 6	... 区画	
4 0	... 検出室	
4 1	... 検出部位	
4 2	... 廃棄物収集区画	
4 4	... 通路	
4 8	... 通路	30
5 0	... 通路	
5 2	... 通路	
5 6	... シール	
6 0	... ポーラー	
7 0	... コーナー	
7 2	... 折り曲げ線	
7 4	... 孔	
1 0 0	... スラッグ	
1 0 2	... メニスカス	
1 0 4	... 矢印	40
1 1 0	... 読み取り領域又は検出領域	

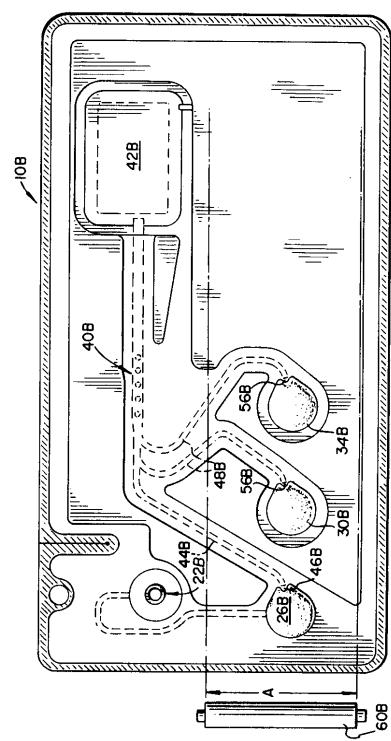
【図1】



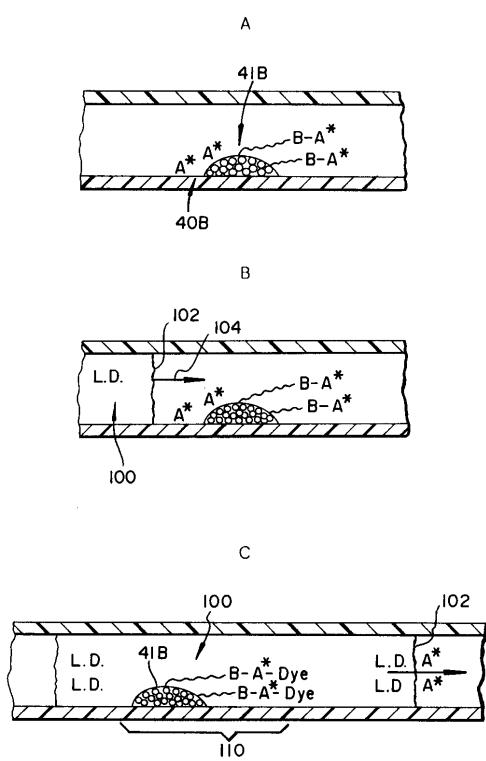
【図2】



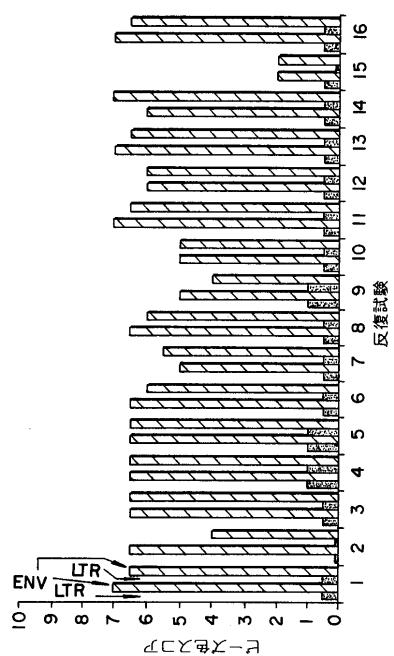
【図3】



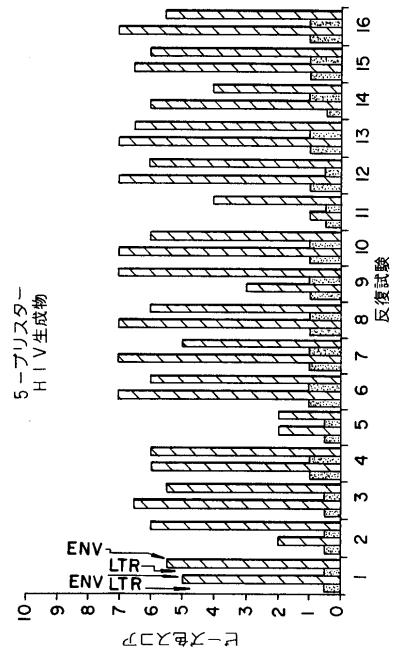
【図4】



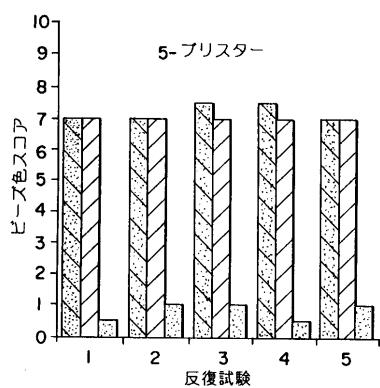
【図5】



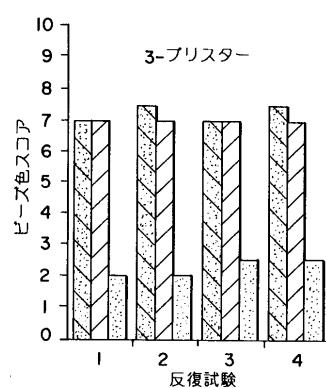
【図6】



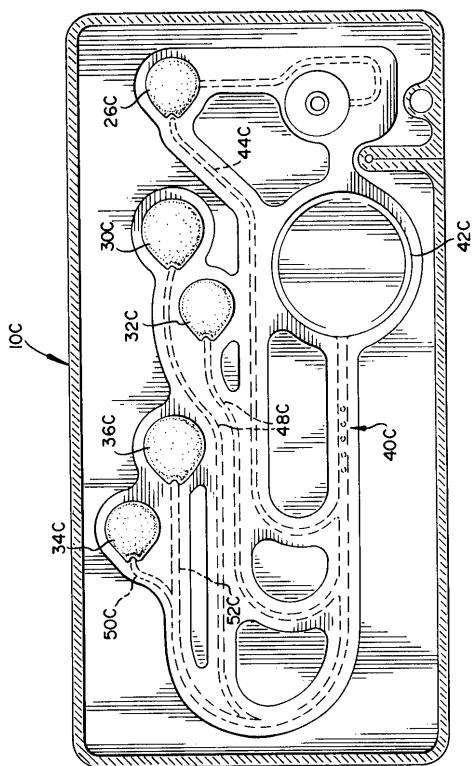
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

- (72)発明者 ポール ホン - ゼ チェン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02115, ボストン, ポックス 166, バンダービルト
ホール, アベニュ ルイス パスチュール 107
- (72)発明者 ジョン ブルース フィンドレイ
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14612, ロチェスター, クロスローズ レーン 148
- (72)発明者 スーザン メリッサ アトウッド
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14543, ラッシュ, ホネオイ フォールズ シックス ロー
ド 365
- (72)発明者 リン バーグメイヤー¹
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14616, ローチェスター, ロングリッジ アベニュ 187
- (72)発明者 ジョン ベンジャミン チメリ
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14580, ウェブスター, ジョイレーン ドライブ 922

審査官 伏見 邦彦

- (56)参考文献 国際公開第92/016659 (WO, A1)
特開平03-007571 (JP, A)
特表平03-502167 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q1/68
C12N15/00-15/90
C12M1/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)