

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 12 月 2 日(02.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/137543 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/058710
- (22) 国際出願日: 2010 年 5 月 24 日(24.05.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-127907 2009 年 5 月 27 日(27.05.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立ハイテクノロジーズ (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 番 1 4 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 前川彰 (MAEKAWA Akira) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 坂井友幸 (SAKAI Tomoyuki) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP). 曽根原剛志 (SONEHARA Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒1858601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0

番地 株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP). 高橋智 (TAKAHASHI Satoshi) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP).

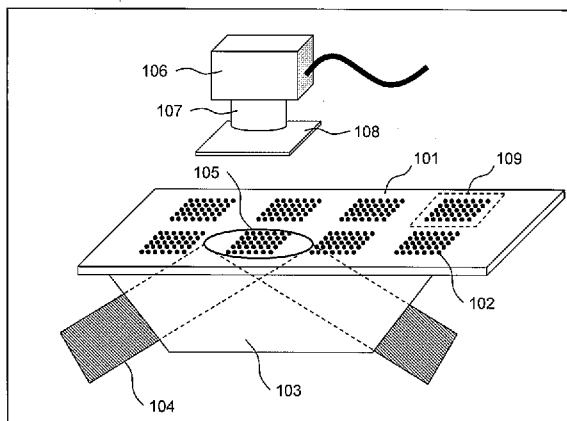
- (74) 代理人: 平木祐輔 (HIRAKI Yusuke); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町 M T ビル 1 9 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID ANALYSIS DEVICE, NUCLEIC ACID ANALYSIS APPARATUS, AND NUCLEIC ACID ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 核酸分析用デバイス、核酸分析装置、及び核酸分析方法

[図1]



(57) Abstract: Provided is a nucleic acid analysis device in a nucleic acid analysis apparatus, whereby waste of a reaction spot on the nucleic acid analysis device is eliminated and leakage of fluorescent excitation light onto unobserved nucleic acid measurement regions is minimized. Specifically, the nucleic acid measurement device has a plurality of nucleic acid measurement regions and is characterized in that one nucleic acid measurement region is sufficiently separated from other nucleic acid measurement regions such that said other nucleic acid measurement regions do not enter an illuminated region.

(57) 要約: 本発明は、核酸分析装置における核酸分析用デバイス上の反応スポットの無駄をなくし、且つ未観察の核酸計測領域への蛍光励起光の漏れを抑えた核酸分析用デバイス、具体的には、複数の核酸計測領域を有する核酸分析用デバイスであって、一つの核酸計測領域が、照射領域内に他の核酸計測領域が入らないように他の核酸計測領域と十分に離れて配置されていることを特徴とする、前記核酸分析用デバイスに関する。



BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, —
SN, TD, TG).

補正された請求の範囲及び説明書（条約第 19
条(1)）

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明 細 書

発明の名称：

核酸分析用デバイス、核酸分析装置、及び核酸分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、例えば、核酸分析用デバイス及び核酸分析装置に関する。

背景技術

[0002] 近年、核酸分析装置において、ガラス基板等で作製された反応デバイスに多数のDNAプローブ又はポリメラーゼを固定し、当該反応デバイス上で塩基伸長反応を行うことで配列を決定する方法が提案されている。当該固定及び反応を行う領域を、以下「反応スポット」と呼ぶ。

[0003] 反応スポットにおいては、単一分子を固定する場合(単分子方式)や同一種複数分子を固定する場合(複数分子方式)がある。また多数の反応スポットを配置し、各々の反応スポットで並列して塩基伸長及び配列決定を行う超並列方式核酸分析装置が開発されている。

[0004] 非特許文献1は、反応スポットに単一分子を固定した場合を説明する。非特許文献1では、全反射エバネッセント照射検出方式を用いた単分子レベルのDNA配列解読を行っている。具体的には、励起光として波長532nm及び635nmのレーザーを、それぞれ蛍光体Cy3及び蛍光体Cy5の蛍光励起のために用いる。まず、屈折率境界平面上の溶液層側に、単一のターゲットDNA分子をビオチン-アビジンのタンパク質結合を利用して固定化し、反応スポットを形成する。溶液中にCy3で標識されたプライマーを溶液交換によって導入すると、単一の蛍光標識プライマー分子がターゲットDNA分子にハイブリダイズする。ある一定時間、当該ハイブリダイゼーション反応を行った後に、未反応の余剰なプライマーを洗い流す。その後、励起光532nmを用いた全反射エバネッセント照射により、Cy3がエバネッセント場に存在するため、ターゲットDNA分子の結合位置を蛍光検出によって確認することができる。当該確認後、Cy3を高出力の励起光で照射することによって蛍光退色させ、以降の蛍光発光を抑制す

る。

[0005] 次に、溶液中に、ポリメラーゼ及びCy5で標識された一種類の塩基のdNTP(NはA、C、G、Tのいずれかである)を溶液交換によって導入すると、ターゲットDNA分子に対して相補関係にある場合に限り、当該蛍光標識dNTP分子がプライマー分子の伸長鎖に取り込まれることとなる。ある一定時間、当該伸長反応を行った後に、未反応の余剰なdNTPを洗い流す。その後、励起光635nmを用いた全反射エバネッセント照射により、Cy5がエバネッセント場に存在するため、ターゲットDNA分子の結合位置における蛍光検出によって相補関係を確認することができる。確認後、Cy5を高出力の励起光で照射することによって蛍光退色させ、以降の蛍光発光を抑制する。以上のdNTPの取り込み反応プロセスにおいて、塩基の種類を例えばA→C→G→T→Aのように順次段階的に繰り返すことによって(段階的伸長反応)、ターゲットDNA分子と相補関係にある塩基配列を決定することが可能である。

[0006] 蛍光計測に使用する検出器が一度に観察できる領域(以下、「計測視野」と呼ぶ)内に複数の反応スポットを形成し、また各反応スポットに異なるターゲットDNA分子が存在する状態で上記のdNTPの取り込み反応プロセスを並列処理することで、複数のターゲットDNA分子の同時DNAシーケンシングが可能となる。この際の同時並列処理数は、従来の電気泳動をベースにしたDNAシーケンシングと比較して飛躍的に大きくすることができると期待されている。

[0007] また、単一分子DNAシーケンサーは、その仕組み上、PCR法等による遺伝子増幅は必要ない。しかしながら、観察するターゲットDNA断片が希少であるか又は唯一のDNA断片である場合には、単一分子DNAシーケンサーは、当該DNA断片を無駄にすることなく読み取ることができることが理想である。

[0008] さらに、先端的な研究においては、一分子単位でのDNA塩基配列解読において、プラズモン共鳴等を発生させるための微細構造を有する半導体チップの組み合わせを使用する方法がある。例えば、特許文献1では、局在型表面プラズモンの数倍から数十倍程度の蛍光増強効果を利用している。蛍光増強の影響が及ぶ範囲は10nm~20nm程度である。ターゲットDNA分子を固定した金属

の微細構造体の表面で、局在型表面プラズモンが発生すると、ターゲットDNA分子に取り込まれた蛍光標識dNTPだけが蛍光増強の恩恵を受け、浮遊する蛍光標識dNTPとは数倍から数十倍以上の蛍光強度の差がもたらされる。この方式により、未反応の蛍光標識dNTPを除去しなくとも、塩基伸長反応を計測することが可能となる。

[0009] また、ターゲット分子を任意の形状や配置に整列する様々な方法が提案されている。非特許文献2では、始めに基板上に所望のパターンの電極を設け、PLL-g-PEG(Poly-L-Lysin-g-polyethylene glycol)を基板全面に塗布する。その後、前記電極に電圧を印加することで、前記電極部PLL-g-PEGを退ける。これにより、蛍光分子等を電極部のみに特異的に吸着する方法が提示されている。非特許文献3では、基板に光解離性の分子を塗布した後、近接場走査光によるリソグラフィー手法を用いてナノスケールのターゲット分子の固定領域パターンを作製している。これらの手法では、基板上に100nm以下のDNA又はタンパク質のパターンを作製する方法が示されている。

[0010] 一方、非特許文献4は、4種類のヌクレオチドに各々異なる蛍光色素を有するものを供給し、洗浄することなく、連続的な核酸伸長反応を起こすことによる、リアルタイムDNA配列決定分析を開示する。また、特許文献2は、局所的に塩基伸長反応の開始を制御する方法として、プローブの3'位置に光照射で切断可能な保護基を配置する方法を開示する。具体的には、保護基としてオリゴプローブ側の3'位置にケージド化合物を配置し、UV光照射により保護基を切断することでリアルタイム塩基伸長反応を開始する。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開2009-45057号公報

特許文献2：特開2010-48号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Ido Braslavskyら，「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」，2003年，Vol. 100, No. 7, pp. 3960-3964

非特許文献2：G. S. Tangら，「Analytical Chemistry」，2006年，Vol. 78，No. 3，pp. 711-717

非特許文献3：Yasuhiro Kobayashiら，「Analytical Sciences」，2008年，Vol. 24，No. 5，pp. 571-576

非特許文献4：John Eidら，「Science」，2009年1月2日，Vol. 323，No. 5910，pp. 133-138

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本願発明者が、超並列方式核酸分析装置のスループット向上について鋭意検討した結果、次の知見を得るに至った。
- [0014] 超並列方式核酸分析装置では、レンズや検出器で構成される一つの光学検出系で同時に計測できる範囲(すなわち、計測領域内の有効な反応スポットの数)に比例してスループットが向上する。また、反応デバイス上に反応スポットを高密度に配置することにより、同じ反応スポット数でも反応チャンバーの大きさが小さくなることで使用する試薬量が低減し、解析の低コスト化が可能となる。しかしながら、現実には光学検出系の分解能及び検出器の画素数に起因して、同時に計測可能な有効反応スポットの数及び反応デバイスにおける反応スポットの密度は制限される。
- [0015] 光学検出系の分解能は、光学検出系を構成する対物レンズの回折限界によって決定される。当該回折限界は、具体的には以下の式に従って決定される。
- [数1]

$$\text{回折限界} = 0.61 \frac{\lambda}{\text{NA}}$$

(式中、「 λ 」は計測する光の波長を表し、「NA」は対物レンズの開口数を表す。)

- [0016] 計測する蛍光の波長は、おおよそ500～800nm程度であり、一方、対物レン

ズのNAは1程度であるため、上記式によれば、対物レンズの回折限界は300～500nm程度となる。現実の光学検出系での分解能は、レンズの収差や位置精度等により、前記値よりさらに低くなり、およそ1 μ m程度となる。このことから、個々の反応スポット上の蛍光を確実に識別するためには、反応スポットの間隔はおよそ1 μ m以上離れていなければならない。一方、計測できる視野の範囲(有効視野サイズ)は、使用する対物レンズのNAに依存する。NAが1程度の場合、有効視野サイズは、およそ1mm²程度となる。そのため、計測領域内の反応スポット数を最大にするためには、1mm²の範囲に1 μ mピッチで形成する必要があり、反応スポットの最大数は 1×10^6 個程度となる。

[0017] より一層のスループット向上のためには、より多くの反応スポットを形成する必要がある。そこで、基板上に 1×10^6 個以上の反応スポットを形成し、スキャンしながら計測する方法が存在する。

[0018] 前記計測を行う際には、検出器のダイナミックレンジ内に信号強度を抑える必要があることから、計測領域内の励起光強度を極力均一にする必要がある。そのため、励起光の照射領域は、計測領域よりも大きくする必要があり、蛍光計測対象の計測領域に隣接する反応スポットにも励起光が漏れ、漏れ光が発生する。この場合、蛍光色素は励起光を照射することにより分解し、消光するため、蛍光計測対象の計測領域に隣接する反応スポット内の蛍光を消光させる可能性がある。当該隣接の反応スポットが未計測領域内のものである場合、複数分子方式では、当該反応スポット内の同一種複数分子に標識された蛍光体又は前記同一種複数分子に取り込まれる分子に標識された蛍光体の幾つかが漏れ光により消光され、十分な信号強度が得られない場合がある。これは、解読しようとする塩基配列に対するノイズ情報を増加させる原因となる。単分子方式では、反応スポット内に一分子しかターゲット分子は存在しないため、複数分子方式よりも漏れ光による消光の問題は一層深刻となる。

[0019] 当該漏れ光による蛍光の消光の問題を解決する手段として、個々の照射領域が重ならないように、計測領域同士を十分に離して計測することが考えら

れる。しかしながら、計測領域同士を十分に離れた構造を採用する場合には、計測領域間に存在する反応スポットのターゲット分子は計測されないため、当該領域に存在するターゲット分子の情報が得られないこととなる。

[0020] そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、核酸分析装置における核酸分析用デバイス上の反応スポットの無駄をなくし、且つ未観察の計測領域への蛍光励起光の漏れを抑えた核酸分析用デバイスを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0021] 上述した目的を達成するため鋭意検討した結果、核酸分析用デバイス上で、一つの核酸計測領域を、照射領域内に他の核酸計測領域が入らないように他の核酸計測領域と十分に離れて配置することで、目的の核酸計測領域以外への蛍光励起光の漏れを抑えることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0022] すなわち、本発明は、一つの核酸計測領域が、照射領域内に他の核酸計測領域が入らないように他の核酸計測領域と十分に離れて配置された、複数の核酸計測領域を有する核酸分析用デバイスである。また、本発明は、当該核酸分析用デバイスを備える核酸分析装置、及び当該核酸分析用デバイスを用いた核酸分析方法である。

[0023] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2009-127907号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0024] 本発明は、目的の核酸測定領域内に固定化した標的核酸からの蛍光シグナルを確実に取得できるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]核酸分析用デバイス及び検出光学系の一例を説明するための概略図。

[図2]塩基配列解読を行うための核酸分析用デバイスを備える装置の例を示す概略図。

[図3]核酸分析用デバイスにおける観察視野の変更後を示す概略図。

[図4]核酸分析用デバイスにおいて試薬流路を有する構造例を説明するための

概略図。

[図5]複数の試薬流路での並行処理ステップの例を示した図。

[図6]円形の核酸計測領域を配置した核酸分析用デバイスの例を示す概略図。

[図7]リアルタイム塩基伸長反応の一般的な手順を示すフローチャート。

[図8]反応開始抑制のために取り付けられた保護基を切断するための光照射が視野以外に漏れた場合、不要な塩基伸長反応を引き起こす例を示す図。

[図9]核酸分析用デバイスの一例を示す概略図。

[図10]溶液導入量の制御により、所定の視野までに限定して送液することで、リアルタイム塩基伸長反応を制御する例を示す図。

符号の説明

- [0026] 101…核酸分析用デバイス
- 102…金属構造体
- 103…全反射プリズム
- 104…励起光レーザー
- 105…励起光照射領域
- 106…検出器
- 107…結像レンズ
- 108…蛍光波長フィルター
- 109…核酸計測領域
- 201…温度制御ユニット
- 202…試薬保管ユニット
- 203…分注ユニット
- 204…送液チューブ
- 205…廃液チューブ
- 206…廃液容器
- 207…2次元センサーカメラ
- 208…解析用コンピュータ
- 209…装置制御用コンピュータ

- 210…励起光用レーザーユニット1
- 211…励起光用レーザーユニット2
- 212… $\lambda/4$ 波長版
- 213…ミラー
- 214…ダイクロイックミラー
- 215…計測光路
- 216…対物レンズ
- 217…フィルター
- 218…結像レンズ
- 219…カメラコントローラ
- 220…分析装置
- 301…新たな励起光照射領域
- 401…試薬流路付き核酸分析用デバイス
- 402…注入口
- 403…試薬流路1
- 404…核酸計測領域
- 405…吐出口
- 406…励起光
- 407…試薬流路2
- 408…試薬流路3
- 409…試薬流路4
- 601…核酸計測領域
- 602…励起光照射領域
- 603…試薬流路
- 604…注入口
- 711…テンプレートDNAの核酸分析用デバイスへの固定ステップ
- 712…核酸分析用デバイスの装置へのセットステップ
- 713…反応試薬供給ステップ

714…次観察視野への移動ステップ
715…反応開始及び塩基伸長反応観察ステップ
716…全視野完了？の判定ステップ
717…核酸分析用デバイス洗浄ステップ
718…核酸分析用デバイス取出しステップ
801…核酸分析用デバイス
802…流路
803…インレット
804…アウトレット
805…反応スポット群
806…照野
807…観察視野
901…反応スポット群
902…観察視野
903…照野
1001…試薬溶液流域
1002…観察視野
1003…照野
1004…反応スポット群

発明を実施するための形態

[0027] 実施形態に係る核酸分析用デバイスは、複数の核酸計測領域を有し、一つの核酸計測領域が、照射領域内に他の核酸計測領域が入らないように他の核酸計測領域と十分に離れて配置されている反応デバイスである。換言すれば、複数の核酸計測領域と該核酸計測領域間に反応スポットを有しない余白部分とを有し、光源によって一つの核酸計測領域を照明することを特徴とする核酸分析用デバイスといえることができる。実施形態に係る核酸分析用デバイスを用いた核酸分析によれば、原理的に未反応の核酸計測領域に励起光が照射されないことから、解読しようとする塩基配列に対するノイズ情報を低減

することができ、目的の核酸計測領域内の反応スポットに固定化した個々の標的核酸からの蛍光シグナルの観察を確実に行うことができる。また、実施形態に係る核酸分析用デバイスは、核酸分析装置等の解析装置に設置し、遺伝子診断等に使用できる。

[0028] ここで、「核酸計測領域」とは、ターゲットDNA分子等の標的核酸が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われる1又は複数の反応スポットを有する領域を意味する。

[0029] 実施形態に係る核酸分析用デバイスは、基板上に核酸計測領域を設けることにより作製される。基板としては、特に限定されるものではないが、例えば石英、シリコン等の材質から成るものが挙げられる。

[0030] 核酸計測領域は、励起光照射による照射領域内に一つの核酸計測領域のみが設けられ、且つその他の核酸計測領域が当該照射領域内に入らないように、互いに十分に離れた間隔で基板上に配置される。当該核酸計測領域間には、反応スポットを有しない余白部分が存在する。現在入手可能なCCD又はCMOS撮像素子の1/2インチ2次元イメージセンサーを用いた高感度カメラで、倍率40倍程度の対物レンズを使用し、画像収集した場合、およそ140 μm 角、すなわち、およそ20000 μm^2 の領域が観察可能である。このことから、1視野のサイズは、およそ140 μm 角であれば撮像素子の画素の無駄がない。実施形態に係る核酸分析用デバイスにおける核酸測定領域のサイズは、このような光学検出系の計測視野と実質的に同一にすることが好ましい。従って、基板上における核酸測定領域のサイズ(長辺又は最大径)は、例えば、50 μm 角~10mm角、特に好ましくは140 μm 角である。また、核酸計測領域の形状としては、例えば正方形、四角形、円形等が挙げられる。

[0031] 一方、上述のサイズ(すなわち、およそ140 μm 角)の計測視野に均一にレーザー光を照射し、且つ近隣する視野へ励起光の影響を与えないように核酸計測領域を配置するためには、レーザー光の照射分布を考慮し、隣接する核酸計測領域間の間隔を、例えば、1 μm ~10mm、好ましくは50 μm ~200 μm とする。特に、核酸計測領域間の間隔を1視野幅分(すなわち140 μm 程度)とすること

が望ましい。当該幅は、使用するレーザーの照射領域内の強度均一性及び得たい励起光強度に鑑み、設定される。例えば、照明光としてレーザーを使用し、単一の核酸計測領域を照明した際、レーザー径及び余白の寸法が、近隣の核酸計測領域に照明が漏洩して照射されない寸法に規定される。あるいは、光源によって所定数の核酸計測領域から成る核酸計測領域群を照射することもできる。

[0032] 一方、例えばレーザー等の照明光による核酸分析に必要な照明強度を与える照明光照射領域内に、観察対象核酸計測領域の全反応スポットが含まれるものとすることができる。あるいは、観察対象核酸計測領域内に、計測に必要な照明強度を与える照明光照射領域が全て含まれるものとすることができる。

[0033] 照明光にレーザーを用いる場合において、下記の実施形態4で説明するようにレーザーホモジナイザーにより所定の観察視野(計測視野)のみが照明されるようにすることができる。

[0034] 核酸測定領域は、例えば縦横にそれぞれ10個程度を基盤の目状に基板上に配置する。なお、基板上の当該核酸測定領域数は、反応観察のスループットや1回の核酸分析当たりの実施形態に係る核酸分析用デバイスの交換回数を考慮し、また核酸分析装置の特性や使い勝手を最も向上させる数とすることが好ましい。また、下記の実施形態2で説明するように、核酸計測領域を試薬流路上に配置してもよい。

[0035] 核酸計測領域には、反応スポットが存在する。1個の核酸計測領域における反応スポットの数は、例えば、 $100 \sim 10^8$ 、好ましくは $10^4 \sim 10^6$ である。

[0036] 核酸計測領域においては、反応スポット上に標的核酸が固定化される。標的核酸としては、例えばDNA、RNA、PNA(ペプチド核酸)等が挙げられる。反応スポット上への標的核酸の固定化方法としては、例えば抗原と抗体との結合、His-Tag(ヒスチジンタグ)/ニトリロトリ酢酸(NTA)又はイミノジ酢酸(IDA)、GST-Tag(グルタチオンSトランスフェラーゼタグ)/グルタチオン等のタグとタグに結合する物質との結合、アビジンとビオチンとの結合等を用いた方法

が挙げられる。例えばビオチン-アビジン結合(反応スポットと標的核酸のうち、一方にビオチンを連結し、他方にアビジンを連結する)を利用して、特異的に標的核酸を反応スポット上に固定化する。また、基板上の当該核酸測定領域外の領域は、吸着防止分子を固定化し、不要な標的核酸が付着しないように処理することができる。吸着防止分子としては、特に限定されるものではないが、例えば非特許文献2に記載のPLL-g-PEGが挙げられる。例えば非特許文献2に記載の方法に準じて、基板上に所望のパターンの電極を設け、PLL-g-PEGを基板全面に塗布した後、前記電極に電圧を印加することで前記電極部PLL-g-PEGを退け、退けた領域に標的核酸を固定化する。あるいは、例えば非特許文献3に記載の近接場走査光によるリソグラフィー手法を用いた方法に準じて、反応スポット上に標的核酸を固定化することができる。

[0037] さらに、特許文献1に記載のように金属構造体を用いる場合には、核酸計測領域内のみに金属構造体を形成する。具体的には、例えば、金においては金-チオール結合によって、金属構造体上に標的核酸を固定化することができる。このように、金属構造体上に標的核酸を固定化することで、核酸分析の際に検出すべき標的核酸に取り込まれた蛍光分子からの蛍光を増強することができる。また、当該金属構造体が希少金属から成る場合には、実施形態に係る核酸分析用デバイスにおいて反応スポットを無駄なく使用できることから、従来の核酸分析用デバイスに比較して当該希少金属の消費量を低減できる。

[0038] また、例えば、核酸分析用デバイスは、核酸伸長反応を阻害する光分解性物質を有する核酸プローブと、該核酸プローブが複数配置された反応場領域(核酸計測領域)を有するものとすることができる。下記実施形態4で説明するように、光分解性物質(光照射で切断可能な保護基)を核酸プローブに連結し、UV光照射により当該物質を切断することで塩基伸長反応を開始する。この方法を用いることで、UV光照射が行われない段階では塩基伸長反応が抑止され、UV光照射により反応を開始することができる。光分解性物質としては、例えば2-ニトロベンジル型、デシル・フェナシル型、又はクマリニルメチル

型等のケージド化合物が挙げられる(特許文献2)。ケージド化合物とは、生理活性分子を光分解性保護基で修飾して一時的にその活性を失わせたものの総称である。生理活性を檻(cage)に入れて眠らせた分子という意味でケージド化合物(caged compounds)という名称が付いている。

[0039] 核酸分析を行うために、上記のように作製した核酸分析用デバイスを核酸分析装置に備える。当該装置は、核酸分析用デバイスの他に、例えば、核酸分析用デバイスに対して、蛍光標識したプライマーやdNTP(NはA、C、G、Tのいずれかである)等を供給する手段、核酸分析用デバイスに光を照射する手段、核酸分析用デバイス上での標的核酸へのハイブリダイゼーションや核酸伸長反応に起因したプライマーやdNTPに標識した蛍光分子の蛍光を測定する発光検出手段等を備えることができる。さらに、当該装置は、反応液流路と、核酸分析用デバイスの所定の核酸計測領域に送液可能な送液機構とを有することができる。

[0040] 実施形態に係る核酸分析装置によれば、標的核酸上の塩基配列情報を取得できる。例えば、核酸分析用デバイス上の核酸計測領域に対して、蛍光分子で標識したプライマーを含む溶液を供する。次いで、標的核酸と当該プライマーとのハイブリダイゼーションにより標的核酸に蛍光分子が取り込まれることとなる。当該核酸計測領域に対してプライマーに標識した蛍光分子に準じた励起光を照射し、蛍光を検出することで、当該ハイブリダイゼーションを確認することができる。さらに、ポリメラーゼ(例えば、DNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)、RNAポリメラーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼ等)及びプライマーに標識した蛍光分子とは異なる蛍光特性(蛍光波長や励起波長)を有する蛍光分子で標識したdNTPを含む溶液を核酸計測領域に供することで、塩基伸長反応が生じることとなる。次いで、当該核酸計測領域に対してdNTPに標識した蛍光分子に準じた励起光を照射し、蛍光を検出する。当該蛍光に基づき、標的核酸の塩基情報を取得できる。

[0041] また、実施形態に係る核酸分析用デバイスによれば、反応スポット上における塩基伸長反応をもれなく観察でき、実施形態に係る核酸分析用デバイス

を希少な又は唯一のDNA断片を標的核酸とする単分子DNAシーケンシングに適用することができる。さらに、実施形態に係る核酸分析用デバイスによれば、リアルタイム方式で標的核酸の塩基伸長反応を行い、塩基配列情報を取得することもできる。

[0042] 以下、本発明を実施するための好適な実施形態について、添付図面を参照しながら説明する。なお、各実施形態は、本発明に関わる物や方法の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

[0043] 〔実施形態1〕

本実施形態では、プラズモン共鳴を応用した単分子核酸分析装置における核酸分析用デバイス及び検出光学系の一例を説明する。

[0044] 図1に、実施形態の一例を示す。核酸分析用デバイス101は、石英、シリコン等の材質を基板として用いることで作製される。当該材質から成る基板上に、金属構造体102が複数の核酸計測領域に分割され、生成される。当該構造体には、金、銀、アルミニウムや合金等の材質が用いられる。また、当該構造体の形状は、様々な形状であって良く、例えばビーズ形、コーン形等が挙げられる。金属構造体の高さは、例えばおよそ数十～数百nm程度である。また、金属構造体上に塩基伸長反応を行う際のターゲットDNA分子(標的核酸)をタンパク質結合その他の方法で固定化する。

[0045] また、塩基配列解読を行うための核酸分析用デバイスを備える装置の例を図2に示す。図2に示す装置は、単分子DNAシーケンサーの一例であり、分析装置220と解析用コンピュータ208とから成る。分析装置220では、核酸分析用デバイス101における反応を2次元センサーカメラ207で観測する。核酸分析用デバイス101への試薬の供給は、試薬保管ユニット202内の各容器に格納された試薬を分注ユニット203によって分注し、送液チューブ204によって行う。また供給した試薬は、反応を進行させるのに最適な温度となるように、温度制御ユニット201により適切に温度調整される。反応が完了した後の廃液は、廃液チューブ205を経由し、廃液容器206へ廃棄される。

- [0046] 図2に示す装置において、例えばエバネッセント光による計測が行われる場合には、全反射プリズム103に光学的に結合され、且つ励起光レーザー104による全反射照明により核酸分析用デバイスを照明に供する。励起光レーザー104は、計測する一瞬のみ1つの核酸計測領域のみを照明する。励起光照射領域105では、基板上面側の屈折率境界平面上で全反射が起こり、この際、およそ入射光の1波長程度までの高さだけ低媒質側の内部に電磁波が浸透する。これにより、金属構造体102を含めた極々限られた領域のみが照明される。当該領域を「エバネッセント場」と呼ぶ。
- [0047] また、核酸分析用デバイス上で塩基伸長反応を進行させると、金属構造体102上に固定化したターゲットDNA分子により取り込まれた蛍光を計測できる。当該蛍光を、蛍光波長のみを透過する光学フィルターである蛍光波長フィルター108及び結像レンズ107並びに検出器106から成る光学検出系により2次元画像として捉える。
- [0048] 本実施形態は、金属構造体102の配置が核酸計測領域109毎に分割されている点を最も特徴とする。当該核酸計測領域109は、励起光照射領域105で特定の核酸計測領域を照明した際に、他の核酸計測領域へ影響を与えない程度の間隔をもって配置されている。本実施形態では、レーザー照射方向については $300\mu\text{m}$ 、レーザー照射と直角方向では $100\mu\text{m}$ の間隔をもって核酸計測領域を配置する。なお、当該距離は、使用するレーザーの照射強度分布が観察しようとする蛍光色素を励起するのに十分で、且つ近隣の計測視野に影響を及ぼさない間隔を保つように設定する。
- [0049] 以上に説明する構成を有する図2に示す装置において、核酸分析用デバイス101上へ蛍光分子で標識されたプライマーを溶液交換によって一定濃度になるように導入すると、単一の当該蛍光標識プライマー分子は、金属構造体102に固定化した相補関係にあるターゲットDNA分子のみにハイブリダイズする。この際、蛍光分子はエバネッセント場に存在するため、エバネッセント光により励起され蛍光を発する。当該蛍光は、金属構造体102により増強され、蛍光波長フィルター108及び結像レンズ107を通じて、検出器106により2次元画

像として捉えられる。

[0050] 次に、核酸分析用デバイスにおける他の核酸計測領域を計測する様子を図3に示す。図3は、図1と比較し、検出器106が次の核酸計測領域を捉えるように、核酸分析用デバイス101を移動した後の様子を示す。核酸分析用デバイス101の移動は、当該デバイスをX-Y電動ステージ等により保持し、自動制御可能とすることが望ましい。核酸分析用デバイスを移動することで、新たな励起光照射領域301へ視野が切り替えられ、当該デバイスを取り外すことなく、計測する核酸計測領域を移動することができる。

[0051] 以上に説明するように、核酸分析用デバイスを用いて、各核酸計測領域を順次計測する方式を用いることにより、計測不可能な領域にある金属構造体を排除し、且つ計測時のみ照明光が照射される方式とすることができる。

[0052] さらに、移動と計測とを繰り返すことで、核酸分析用デバイス101上の全ての核酸計測領域を計測する。全ての計測が完了した段階で、1塩基伸長に対する計測が完了する。以降、プライマー内のdNTP種をA、C、G、Tと順番に換え、当該プライマーを含む溶液を核酸分析用デバイスに供し、その都度、全ての核酸計測領域の計測と移動とを繰り返すことで、塩基伸長反応を進め、ターゲットDNA分子の塩基配列の解読を進める。

[0053] 〔実施形態2〕

本実施形態では、複数種類の試料を測定する実施形態を説明する。

[0054] 図4は、核酸分析用デバイスにおいて試薬流路を有する構造例を示す。

[0055] 図4に示す試薬流路付き核酸分析用デバイス401は、注入口402及び吐出口405を両端に有する試薬流路403を有する。また、当該試薬流路の両端の間に核酸計測領域404を配置する。

[0056] 試薬流路403内の核酸計測領域404の領域を、上述の非特許文献2あるいは非特許文献3に示されるような特異的吸着を促す方法(すなわち、PLL-g-PEGを用いた方法)に準じて、ターゲットDNA分子が吸着する表面処理に供する。あるいは、核酸計測領域404以外の領域に対し、ターゲットDNA分子が吸着しないように化学的、光化学的若しくは電磁気的非特異吸着防止処理又は物理

的な基板表面改変処理を施す手法を用いても良い。

- [0057] 本実施形態では、核酸分析用デバイス401に対し、注入口402より特異的吸着のためのリンカーを有するターゲットDNA分子を含む試薬を注入する。ターゲットDNA分子は前記表面処理により核酸計測領域404にのみ特異的に吸着する。十分な量のターゲットDNA分子が固定化された後、注入口402より洗浄液を注入し、試薬を排出する。さらに、蛍光分子で標識されたプライマーを、溶液交換によって一定濃度になるように注入口402より導入すると、単一の当該蛍光標識プライマー分子は相補関係にあるターゲットDNA分子のみにハイブリダイズする。十分なハイブリダイゼーションが行われた後、注入口402より洗浄液を注入し、プライマーを排出する。
- [0058] 次に、励起光406を各核酸計測領域に対して照射し、蛍光を計測する。計測が完了した後、蛍光が十分に退色する程度の励起光を照射し、計測領域内の蛍光を消光させる。全ての計測領域の計測が完了した段階で、1塩基伸長に対する計測が完了する。以降、プライマー内のdNTP種をA、C、G、Tと順番に違い、当該プライマーを含む溶液を核酸分析用デバイスに供し、その都度、全ての核酸計測領域の計測と移動とを繰り返すことで、塩基伸長反応を進め、ターゲットDNA分子の塩基配列の解読を進める。
- [0059] 本実施形態のように、核酸分析用デバイスが試薬流路を有することで、当該デバイス全体を交換することなく、例えば、図4に示すように試薬流路403/試薬流路407/試薬流路408/試薬流路409等の試薬流路別に異なった試料を複数分析することが可能となる。あるいは、これらの試薬流路のうち任意の試薬流路を用いて反応及び観察を行った後、一時使用を中断し、後に未使用の試薬流路を使用して、計測を再開することが可能である。この場合、使用済みの試薬流路を判別できるように非可逆なマーキングを施しておき、再開の際には未使用の領域を区別できるような仕組みを有することが望ましい。
- [0060] さらに、本実施形態の特徴としては、前処理・後処理が必要となる反応を行う場合に、観察を行っていない試薬流路を利用し、当該処理を進めることが可能である点が挙げられる。当該態様として、複数の試薬流路での並行処

理ステップの例を図5に示す。

[0061] 図5は、塩基伸長反応の繰り返し処理の際に、図4に示す試薬流路403及び407を利用し、且つ各試薬流路に含まれる6つの計測視野(核酸測定領域404)を順次計測する例を示す。

[0062] 先ず、ステップ1では、試薬流路403において、プライマー導入を行う。プライマー導入処理中、計測や退色を行うことができない。プライマー導入が完了すると、次にステップ2として計測視野1における計測を開始する。一方、試薬流路407では、計測や退色の処理を行っていないため、試薬流路403と独立してプライマー導入処理を行うことができる。

[0063] さらに、ステップ3では、試薬流路403において、計測視野2を計測に供しつつ、計測視野1において、退色を行う。この間も、試薬流路407では、プライマー導入処理を継続することができる。このようにして、試薬流路403においてステップ2～7の処理を進め、これと並行して試薬流路407ではプライマー導入処理を行うことができる。試薬流路403における計測視野6の計測が完了した後には、ステップ8として、引き続いて試薬流路407の計測視野1における計測と同時に試薬流路403の計測視野6における退色とを行う。これにより、試薬流路403の一塩基伸長分の計測視野全ての計測が完了する。

[0064] ステップ9からは、次のdNTP種を含むプライマーの導入を開始する。この間も、ステップ9～12として試薬流路407における計測と退色を進めることができる。

[0065] 以上のようなステップにより、プライマー導入のための時間を短縮することができ、より高スループットに塩基配列解読を進めることができる。

[0066] 〔実施形態3〕

本実施形態では、核酸分析用デバイスにおける核酸計測領域の配置の他の例を説明する。

[0067] 図6は、円形の核酸計測領域を配置した核酸分析用デバイスの例を示す。

[0068] 正方形又は長方形の核酸計測領域において反応を計測する光学系では、光学系の性能によっては周辺部の分解能が十分でない場合がある。このような

場合においては、核酸計測領域を円形とし、性能が低下する周辺部位を除外して観察することにより、より高品質な観察結果を得ることができる場合がある。

[0069] 本実施形態では、図6に示すように、核酸計測領域601を円形とし、また核酸計測領域の各列が段違いに交互に配置されている。このような配置によれば、視野配置の際の密度を向上させることができる。

[0070] 図6に示す核酸分析用デバイスによれば、レーザー光を照射した際の励起光照射領域602は、前後の核酸計測領域と重ならない。また、核酸計測領域を縦横に整列した場合と比較して、より高密度に核酸計測領域を配置することができる。本実施形態における核酸分析用デバイスは、試薬流路603及び注入口604を有し、実施形態1と同様の使用方法により塩基伸長反応の計測が可能である。

[0071] 〔実施形態4〕

本実施形態は、実施形態1に示す単分子核酸分析装置において、連続的にdNTP分子がプライマー分子の伸長鎖に取り込まれ続ける、リアルタイム伸長反応系の実施形態を示す。非特許文献4に記載のリアルタイムDNA配列決定分析では、4種類のヌクレオチドに各々異なる蛍光色素を有するものを供給し、洗浄することなく、連続的な核酸伸長反応を起こす。蛍光色素がリン酸部位に付いたヌクレオチドを用いると、伸長反応後リン酸部位が切断されるため、消光することなく連続的に蛍光測定できる。これを連続的に蛍光観察することで、いわゆるリアルタイム反応方式を実現することができる。また、本出願人が出願した特願2009-266920において、リアルタイム単一分子シーケンズ反応プロトコルを、より具体的に述べている。これらの方法では、必要な試薬の導入と同時に塩基伸長反応が進むため、視野ごとに送液を制御するか、あるいは1回の測定が終わったら、次の基板をセットする必要がある。

[0072] このようなケースにおいては、局所的に塩基伸長反応の開始を制御する方法として、例えば特許文献2に示すような、プローブの3'位置に光照射で切断可能な保護基を配置する方法がある。特許文献2では、保護基としてオリ

ゴプローブ側の3'位置にケージド化合物を配置し、UV光照射により保護基を切断することでリアルタイム塩基伸長反応を開始する。この方法を用いることで、UV光照射が行われない段階では塩基伸長反応が抑止され、UV光照射により反応を開始することができる。

[0073] 光照射により塩基伸長が開始する反応系では、観察視野(計測視野)範囲にのみ照明を照射し、それ以外の部分への漏れ光を抑制する必要がある。このような目的に対し、実施形態に係る核酸分析用デバイスが有効である。

[0074] 図7に、リアルタイム塩基伸長反応の一般的な手順を示す。図7は、非特許文献4で示されているリアルタイム塩基伸長反応に、前述した光照射で切断可能な保護基を配置した場合の手順である。以下、図7の各ステップを説明する。

[0075] テンプレートDNAの核酸分析用デバイスへの固定ステップ711では、鋳型DNA、プライマー及び酵素を核酸分析用デバイス上へ固定する。固定方法については、ビオチン-アビジン結合やチオール-金の化学結合等が利用できる。また、ビーズ、あるいは金属構造体等を予め基板上に規則的に配置し、そこへ鋳型DNAを固定する技術が実用化されているのは背景技術で述べた通りである。

[0076] 核酸分析用デバイスの装置へのセットステップ712では、前記処理を行った核酸分析用デバイスを、例えば実施形態1で示したようなエバネッセント光を励起光として蛍光観察できる装置へセットする。この時点で送液系の接続や観察光学系の焦点調整等を済ませておく。

[0077] 反応試薬供給ステップ713は、核酸分析用デバイスの流路へ反応試薬を送液するステップである。このステップにより、蛍光標識されたdNTPを流して、塩基の伸長反応を開始する。ここで用いるdNTPは、末端のリン酸にホスホリンクヌクレオチドをつけることで、酵素が塩基を取り込む過程で蛍光色素を切り離す構造となっている。光照射により、反応開始抑制のために取り付けられた保護基が切断されれば、連続的に塩基伸長反応が行われ、塩基が取り込まれる毎に当該ヌクレオチドを標識する蛍光が検出される。

- [0078] 次観察視野(計測視野)への移動ステップ714は、複数の観察視野を有する核酸分析用デバイス上の観察視野を順次移動していく手順である。視野の移動には、核酸分析用デバイスをXYステージで移動する方法、又は観察光学系を移動する方法がある。視野の移動に伴い、光学系焦点の再調整が必要となる場合がある。
- [0079] 次いで、反応開始及び塩基伸長反応観察ステップ715を行う。保護基切断のための光を照射すると、リアルタイム塩基伸長反応が開始する。リアルタイム塩基伸長反応の蛍光信号を連続的に観察し、塩基配列情報を収集する。1回のリアルタイム塩基伸長シーケンスが終了するまでは視野を固定する必要がある。1回あたりに要するシーケンス時間は、酵素活性が失われるまでの時間から0～60分程度と想定される。
- [0080] 酵素活性が失われ、伸長反応の観察が困難となれば、全視野完了?の判定ステップ716を行う。全ての視野の観察が完了するまで、次観察視野への移動ステップ714から、全視野完了?の判定ステップ716を繰り返し、リアルタイム塩基伸長反応と観察を繰り返す。
- [0081] 全視野の観察が完了した後、核酸分析用デバイス洗浄ステップ717を行い、核酸分析用デバイス内に残存する試薬等を排出する。処理完了後、核酸分析用デバイス取出しステップ718を行う。
- [0082] 図8に示すような、一連の反応スポット群805を有する核酸分析用デバイスで図7の手順を行った場合、反応開始抑制のために取り付けられた保護基を切断するための光照射が視野以外に漏れた場合、不要な塩基伸長反応を引き起こす。この様子を図8に示す。反応スポット群805を配置した核酸分析用デバイス801に、太実線で示した流路802を配置した例を示している。試薬はインレット803から送液し、矢印方向に流れ、アウトレット804から吐出される。図7に示す反応開始及び塩基伸長反応観察ステップ715では、例えば図8に示す円形状の照野806により照明された領域のうち、破線で示した観察視野807を観察する。観察視野807からはみ出した照野は、観察外の領域のリアルタイム塩基伸長反応を進める。この後、全視野完了?の判定ステップ716を経て

、次観察視野への移動ステップ714で隣接する領域へ移動した場合、はみ出した照野により既に反応済みの反応スポットでは、リアルタイム塩基伸長反応が観察されないこととなる。

[0083] 図9は、実施形態に係る核酸分析用デバイスである。反応スポット群901は、破線で示した観察視野902と同一か、やや広い寸法に区分されている。また円形で示した照野903は少なくとも観察対象の反応スポット群901を全て照明する寸法である。反応スポット群の互いの間隔は、照野903がある反応スポット群901を照明したとき、他の反応スポット群を照明しない距離に規定されている。このため照野903は反応スポット群901の領域から一部はみ出すが、反応スポット群901が視野毎に分割されているため、他の反応スポット群に影響を与えない。

[0084] なお、照明光にレーザーを用いる場合において、レーザーホモジナイザー技術により、レーザー光照野を長方形あるいは正方形とすることが可能である。この場合には、照野が近隣の視野に影響を与えない範囲で反応スポット群901の間隔を狭めることが可能である。

[0085] 〔実施形態5〕

実施形態4におけるリアルタイム塩基伸長反応では、光照射で切断可能な保護基を配置することで、反応開始を制御する例を示した。一方で、当該保護基を使用しない反応系では、蛍光分子で標識したプライマーを含む溶液を導入すると同時に反応が開始する。このような反応系では、観察していない反応スポット上でもリアルタイム塩基伸長反応が進行するため、実施形態4に示す流路で使うことができない。溶液導入と同時に反応が進行する反応系では、送液方法の工夫により反応開始を制御する必要がある。このような場合においても、実施形態に係る核酸分析用デバイスが有効である。

[0086] 図10は、溶液導入量の制御により、所定の視野までに限定して送液することで、リアルタイム塩基伸長反応を制御するように、実施形態4を改良した例である。核酸分析用デバイスは、初期状態では乾燥状態、あるいはバッファー液を充填した状態である。導入した試薬溶液は、その導入量を制御す

ることにより、所定の反応スポット群1004まで送液される。試薬溶液流域1001は、核酸分析用デバイス上が乾燥状態である場合は、流路内の濡れ性等により、凹型又は凸型に流路内を進行する。またバッファー液が充填されている場合には、試薬溶液がバッファー液と混合しないよう、若干の空気層を配置した後試薬溶液を導入する。図10では凸型に流路内を進行した例である。流路内を試薬溶液が進行し、反応スポット群1004に到達した場合、直ちにリアルタイム反応が開始する。このため、予め照野1003の範囲に蛍光励起光を照射し、観察視野1002の領域の観察を開始した後、試薬溶液を送液し反応スポット群1004に液端を進行させるのが望ましい。図8に示したような、反応スポット群が一連となっている核酸分析用デバイスで、溶液導入量の制御による反応制御を行った場合、観察視野807以外の反応スポットでもリアルタイム伸長反応が進行し、導入した試薬のdNTPを消費する。これに対し、図10に示した核酸分析用デバイスでは、反応スポット群1004以外では試薬溶液が到達せずリアルタイム伸長反応が起こらないため、反応スポット群を試薬溶液湿潤のバラつきを考慮し十分な間隔をもち配置することで、意図しないリアルタイム伸長反応を抑止することができる。この場合、反応スポット群の互いの間隔は、照野1003が反応スポット群1004を照明したとき、他の反応スポット群を照明しない距離で、且つ試薬溶液湿潤のバラつきにより、近隣の反応スポット群に試薬溶液が接触しない距離に規定される。

[0087] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 複数の核酸計測領域を有する核酸分析用デバイスであって、一つの核酸計測領域が、照射領域内に他の核酸計測領域が入らないように他の核酸計測領域と十分に離れて配置されていることを特徴とする、前記核酸分析用デバイス。
- [請求項2] 複数の核酸計測領域と、該核酸計測領域間に反応スポットを有しない余白部分とを有する核酸分析用デバイスであって、光源によって一つの核酸計測領域を照明することを特徴とする、前記核酸分析用デバイス。
- [請求項3] 前記核酸計測領域のサイズが光学検出系の計測視野と実質的に同一である、請求項1又は2記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項4] 照明光としてレーザーを使用し、単一の核酸計測領域を照明した際、レーザー径及び余白の寸法が、近隣の核酸計測領域に照明が漏洩して照射されない寸法に規定されている、請求項1又は2記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項5] 核酸分析に必要な照明強度を与える照明光照射領域内に、観察対象核酸計測領域の全反応スポットが含まれる、請求項1又は2記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項6] 観察対象核酸計測領域内に、計測に必要な照明強度を与える照明光照射領域が全て含まれる、請求項1又は2記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項7] 照明光としてレーザーを使用し、核酸分析に必要な強度の照明が照射される範囲内に観察対象核酸計測領域の全反応スポットが含まれる、請求項1又は2記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項8] 核酸計測領域の長辺又は最大径が $50\mu\text{m}$ 角 $\sim 10\text{mm}$ 角であることを特徴とする、請求項1又は2記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項9] 隣接する核酸計測領域の間隔が $1\mu\text{m}\sim 10\text{mm}$ であることを特徴とする、請求項1又は2記載の核酸分析用デバイス。

- [請求項10] 核酸伸長反応を阻害する光分解性物質を有する核酸プローブと、該核酸プローブが複数配置された反応場領域を有する、請求項 1 又は 2 記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項11] レーザーホモジナイザーにより所定の観察視野のみが照明されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項12] 前記核酸計測領域が試薬流路上に配置されていることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の核酸分析用デバイス。
- [請求項13] 複数の核酸計測領域と、該核酸計測領域間に反応スポットを有しない余白部分とを有する核酸分析用デバイスであって、光源によって所定数の核酸計測領域から成る核酸計測領域群を照射することを特徴とする、前記核酸分析用デバイス。
- [請求項14] 請求項 1 又は 2 記載の核酸分析用デバイスを備える核酸分析装置。
- [請求項15] 反応液流路と、核酸分析用デバイスの所定の核酸計測領域に送液可能な送液機構とを有することを特徴とする、請求項 1 4 記載の核酸分析装置。
- [請求項16] 前記核酸計測領域に標的核酸を固定化した請求項 1 又は 2 記載の核酸分析用デバイスを核酸分析に供する工程を含む、核酸分析方法。
- [請求項17] 各前記核酸計測領域における核酸分析を並行して行うことを特徴とする、請求項 1 6 記載の核酸分析方法。

補正された請求の範囲

[2010年10月27日(27.10.2010)国際事務局受理]

[1] (削除)

[2] (削除)

[3] (削除)

[4] (削除)

[5] (削除)

[6] (削除)

[7] (削除)

[8] (削除)

[9] (削除)

[1 0] (削除)

[1 1] (削除)

[1 2] (削除)

[1 3] (削除)

[1 4] (削除)

[1 5] (削除)

[1 6] (削除)

[1 7] (削除)

[1 8] (追加) 標的核酸が固定化された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出するための核酸分析用デバイスであって、

標的核酸が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われ、個々に識別し計測されうる反応スポット領域が複数設けられた核酸計測領域と、

反応スポット領域を有しない余白部分とを有し、

複数の核酸計測領域と複数の余白部分が交互に配置され、

核酸計測領域毎に蛍光検出されることを特徴とする、前記核酸分析用デバイス。

[1 9] (追加) 標的核酸が固定化された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出するための核酸分析用デバイスであって、

標的核酸が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われ、個々に識別し計測されうる反応スポット領域が複数設けられた核酸計測領域と、

反応スポット領域を有しない余白部分とを有し、

試薬流路上に複数の核酸計測領域と複数の余白部分が交互に配置され、

核酸計測領域毎に蛍光検出されることを特徴とする、前記核酸分析用デバイス。
[20] (追加) 標的核酸が固定化された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出するための核酸分析用デバイスであって、

標的核酸が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われ、個々に識別し計測されうる反応スポット領域が複数設けられた核酸計測領域と、

反応スポット領域を有しない余白部分とを有し、

該個々の反応スポット領域において単一標的核酸分子が固定化され、

複数の核酸計測領域と複数の余白部分が交互に配置され、

核酸計測領域毎に蛍光検出されることを特徴とする、前記核酸分析用デバイス。

[21] (追加) 前記個々の反応スポット領域において単一標的核酸分子が固定化されることを特徴とする、請求項18又は19記載の核酸分析用デバイス。

[22] (追加) 前記個々の反応スポット領域において同一種の複数の標的核酸分子が固定化されることを特徴とする、請求項18又は19記載の核酸分析用デバイス。

[23] (追加) 核酸計測領域の大きさが2次元検出器の計測視野と実質的に同一であることを特徴とする、請求項18～20のいずれか1項記載の核酸分析用デバイス。

[24] (追加) 任意の1つの核酸計測領域を照明する光が、近隣の核酸計測領域を実質的に照明しないことを特徴とする、請求項18～20のいずれか1項記載の核酸分析用デバイス。

[25] (追加) 核酸分析に必要な照明強度を与える照明光照射領域の大きさが、核酸計測領域より大きいことを特徴とする、請求項18～20のいずれか1項記載の核酸分析用デバイス。

[26] (追加) 照明する光がレーザ光であることを特徴とする、請求項18～20のいずれか1項記載の核酸分析用デバイス。

[27] (追加) 照明する光がレーザ光であり、ホモジナイザにより、照明光の形状が核酸計測領域とほぼ同じに整形することを特徴とする、請求項18～20のいずれか1項記載の核酸分析用デバイス。

[28] (追加) 核酸計測領域の長辺又は最大径が $50\mu\text{m}$ ～ 10mm であることを特徴とする、請求項18～20のいずれか1項記載の核酸分析用デバイス。

[29] (追加) 隣り合う核酸計測領域の間が $1\mu\text{m}$ ～ 10mm であることを特徴とする、請求項18～20のいずれか1項記載の核酸分析用デバイス。

[30] (追加) 核酸計測領域の幅と余白部分の幅が実質的に同じであること

を特徴とする、請求項 18～20 のいずれか 1 項記載の核酸分析用デバイス。

〔31〕（追加） 反応スポット領域に核酸伸長反応を阻害する光分解性物質を有する核酸プローブが配置されることを特徴とする、請求項 18～20 のいずれか 1 項記載の核酸分析用デバイス。

〔32〕（追加） 標的核酸が固定化された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2 次元検出器に結像させ、2 次元検出器にて蛍光検出するための核酸分析装置であって、

標的核酸が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われ、個々に識別し計測されうる反応スポット領域が複数設けられた核酸計測領域と、反応スポット領域を有しない余白部分とを有し、複数の核酸計測領域と複数の余白部分が交互に配置されている核酸分析用デバイスと、

光励起用の光源と、

核酸計測領域毎に光照射し、蛍光を検出する光学検出系と、

結像された光を各々検出するための複数の検出画素を備えた検出器、
を具備する、前記核酸分析装置。

〔33〕（追加） 標的核酸が固定化された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2 次元検出器に結像させ、2 次元検出器にて蛍光検出するための核酸分析装置であって、

標的核酸が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われ、個々に識別し計測されうる反応スポット領域が複数設けられた核酸計測領域と、反応スポット領域を有しない余白部分とを有し、少なくとも 1 本の試薬流路上に複数の核酸計測領域と複数の余白部分が交互に配置されている核酸分析用デバイスと、

光励起用の光源と、

核酸計測領域毎に光照射し、蛍光を検出する光学検出系と、

結像された光を各々検出するための複数の検出画素を備えた検出器、
を具備する、前記核酸分析装置。

〔34〕（追加） 標的核酸が固定化された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2 次元検出器に結像させ、2 次元検出器にて蛍光検出するための核酸分析装置であって、

単一標的核酸分子が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われ、個々に識別し計測されうる反応スポット領域が複数設けられた核酸計測領域と、反応スポット領域を有しない余白部分とを有し、複数の核酸計測領域と複数の余白部分が交互に配置されている核酸分析用デバイスと、

光励起用の光源と、

核酸計測領域毎に光照射し、蛍光を検出する光学検出系と、
結像された光を各々検出するための複数の検出画素を備えた検出器、
を具備する、前記核酸分析装置。

〔35〕（追加） 標的核酸が固定化された基板に蛍光測定用の光を照射し、
生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出するた
めの核酸分析装置であって、

標的核酸が固定化され、且つ核酸分析のための反応が行われ、個々に識別し計
測されうる反応スポット領域が複数設けられた核酸計測領域と、反応スポット領
域を有しない余白部分とを有し、少なくとも1本の試薬流路上に複数の核酸計測
領域と複数の余白部分が交互に配置されている核酸分析用デバイスと、

前記流路に反応液を給する送液機構部と、

光励起用の光源と、

核酸計測領域毎に光照射し、蛍光を検出する光学検出系と、

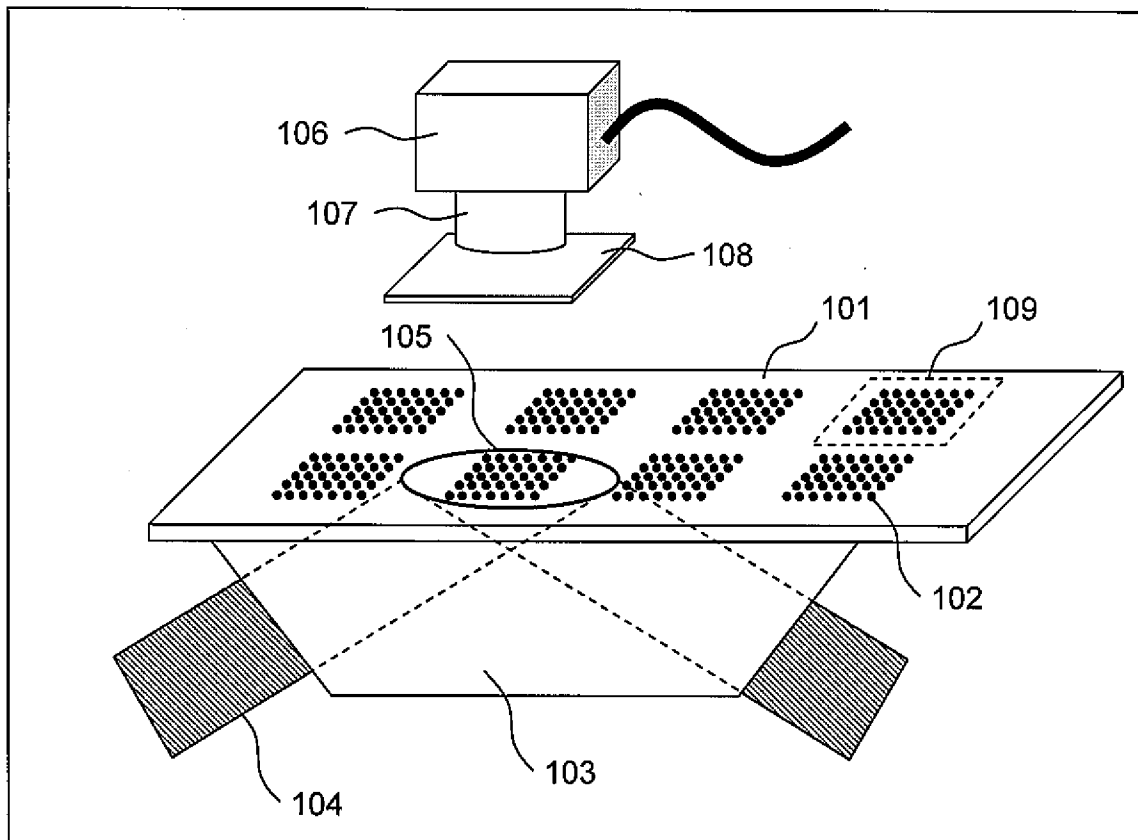
結像された光を各々検出するための複数の検出画素を備えた検出器、
を具備する、前記核酸分析装置。

条約第 19 条（1）に基づく説明書

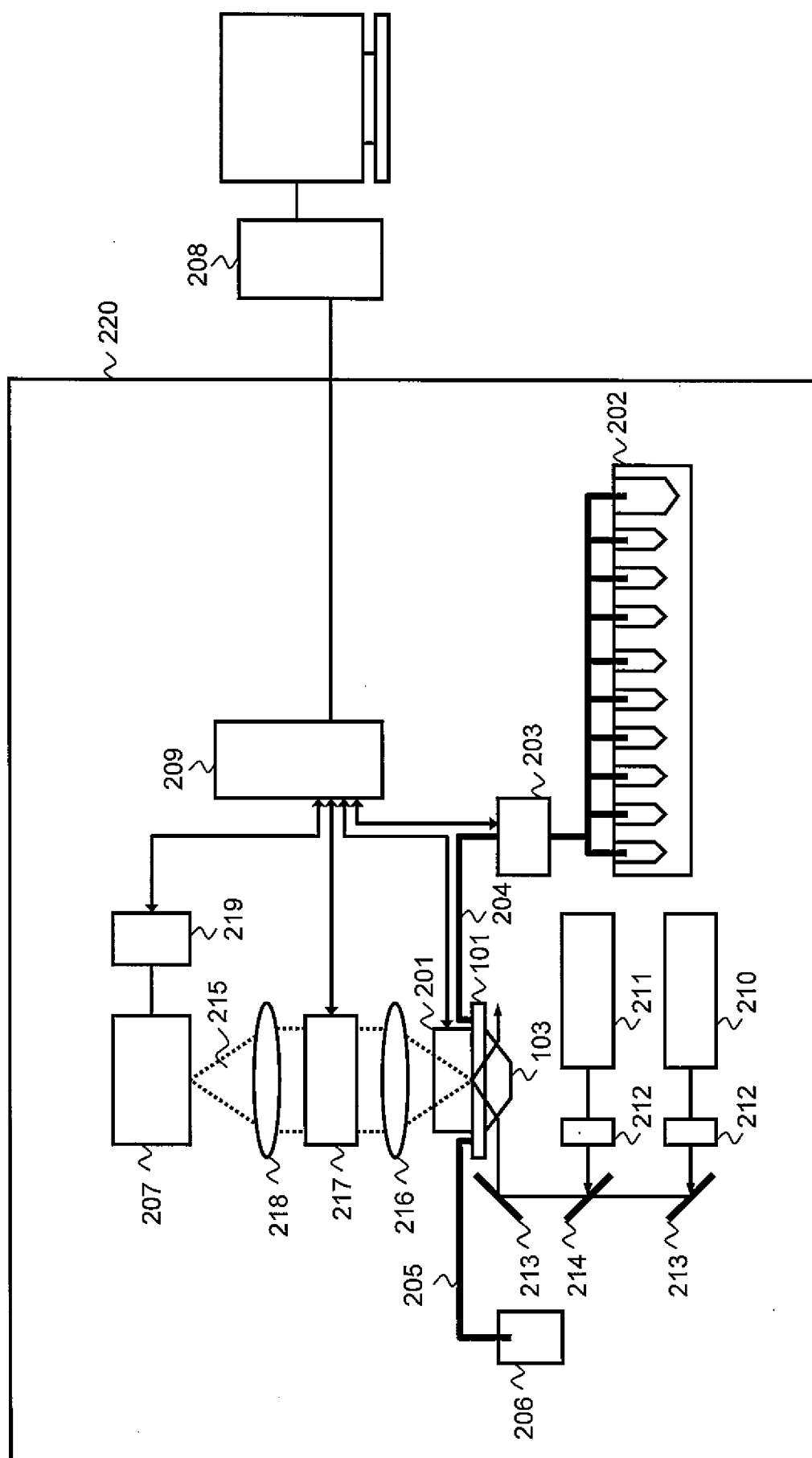
- （1）請求項 1 ～ 17 を削除する。
- （2）請求項 18 ～ 35 を追加する。
- （3）請求項 18 ～ 35 に係る本願発明は、国際調査報告で関連すると認められる文献として引用された引例に開示がなく、当該引例に記載の発明と十分に区別されるものと思料する。

[図1]

図 1



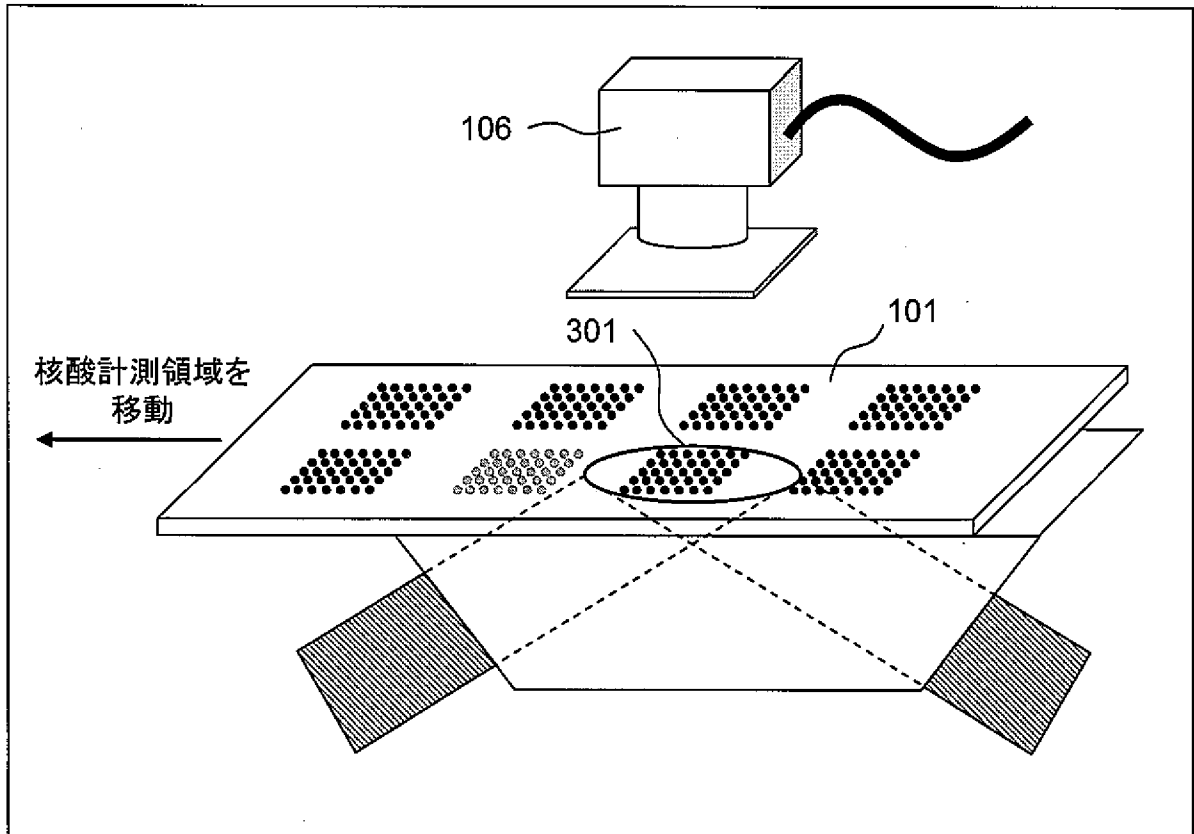
[図2]



2
✕

[図3]

図 3



[図4]

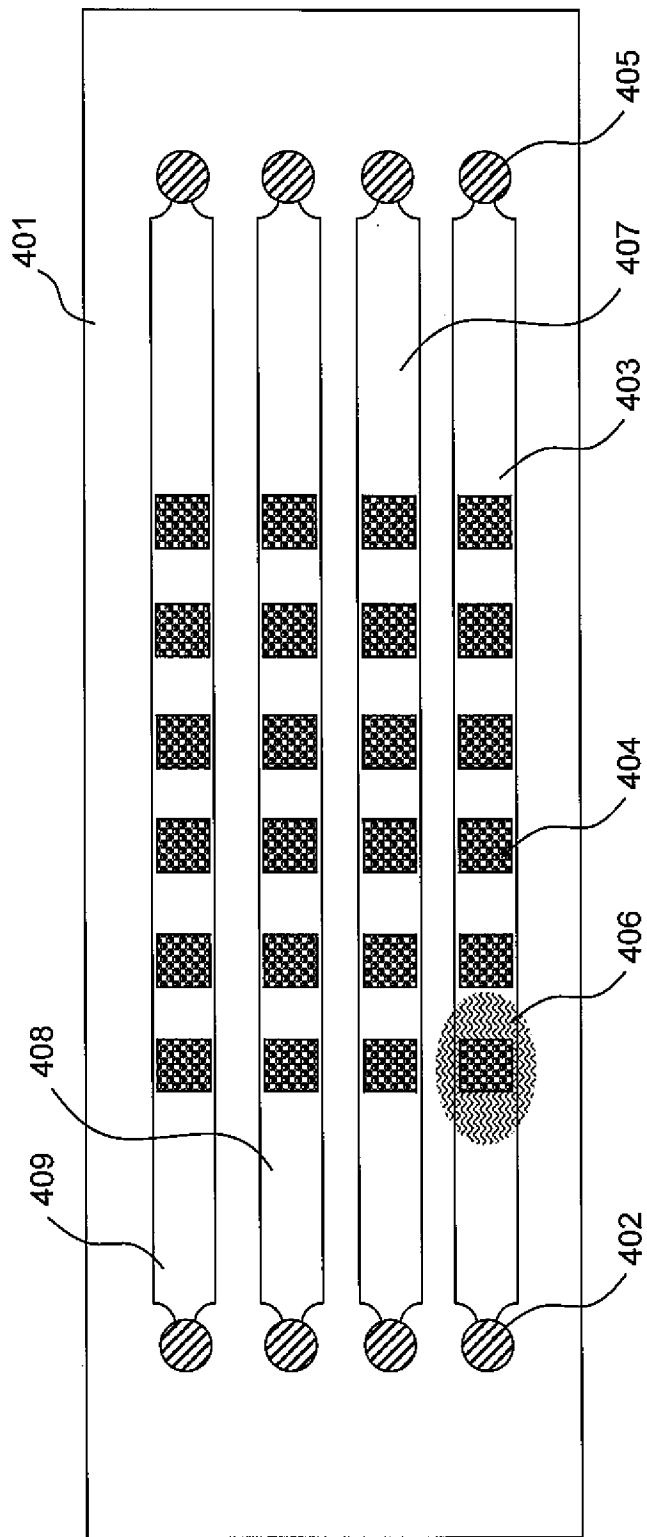


図 4

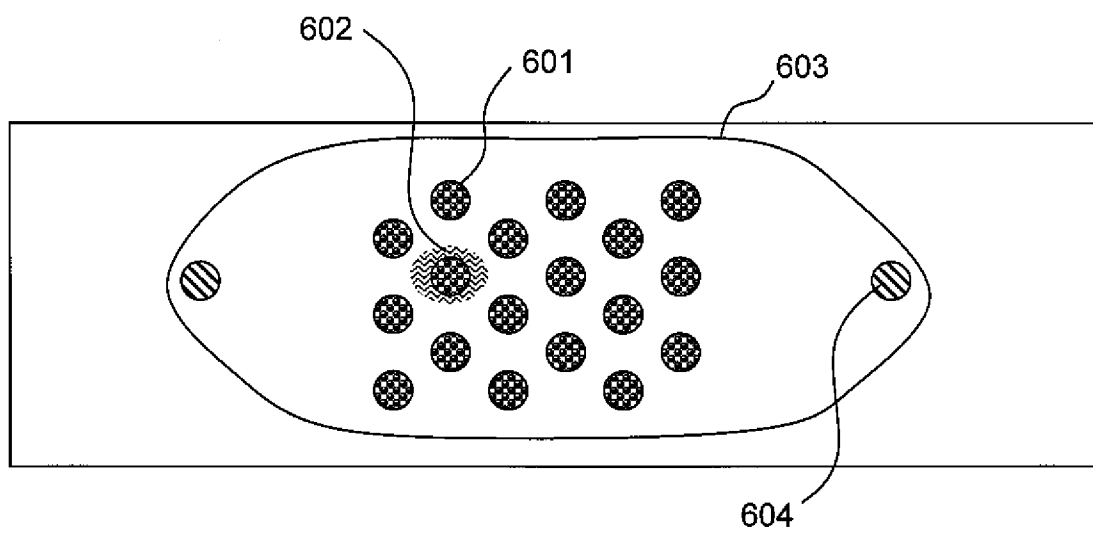



[図5]

	ステップ 1	ステップ 2	ステップ 3	ステップ 4	ステップ 5	ステップ 6	ステップ 7	ステップ 8	ステップ 9	ステップ 10	ステップ 11	ステップ 12	ステップ 13	ステップ 14	ステップ 15	ステップ 16	…
試薬 流路 403	計測視野1	計測	退色										計測	退色			
	計測視野2		計測	退色										計測	退色		
	計測視野3			計測	退色										計測	退色	
	計測視野4				計測	退色										計測	
	計測視野5						退色										
	計測視野6						計測	退色									
試薬 流路 407	計測視野1							退色									
	計測視野2								計測	退色							
	計測視野3									計測	退色						
	計測視野4										計測	退色					
	計測視野5											計測	退色				
	計測視野6												計測	退色			

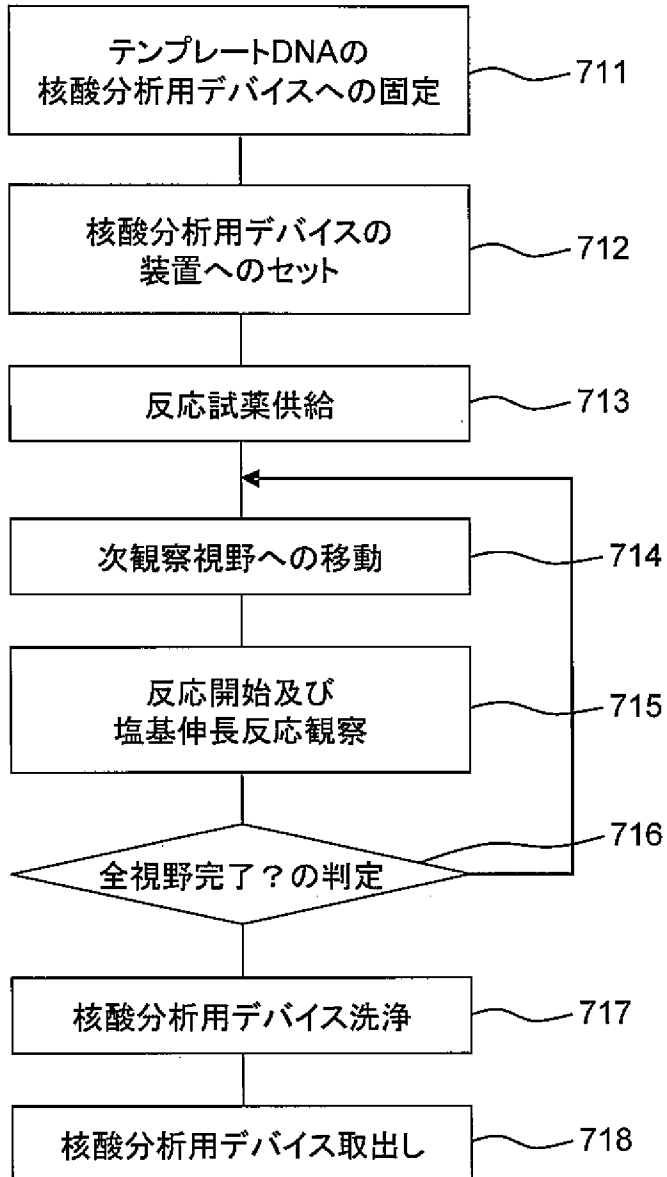
[図6]

図 6



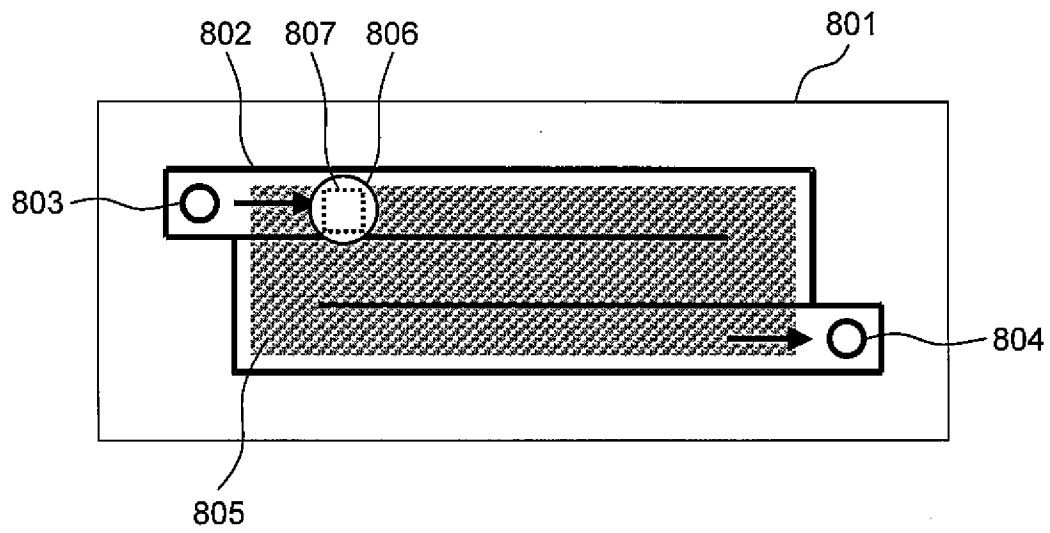
[図7]

図 7



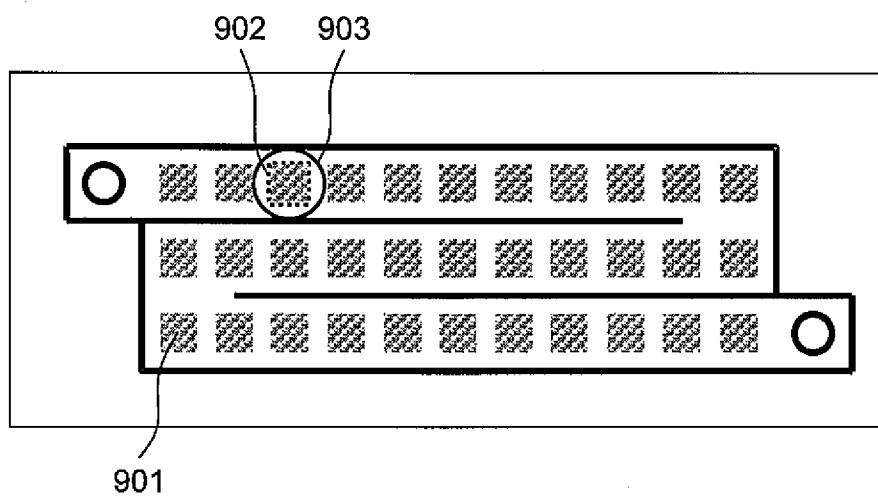
[図8]

図 8



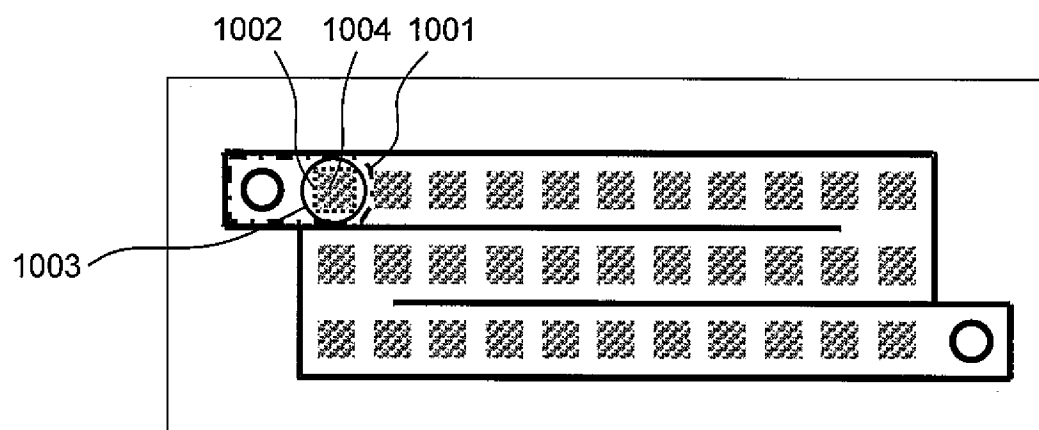
[図9]

図 9



[図10]

図 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058710

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/123744 A2 (SOLEXA, INC.), 01 November 2007 (01.11.2007), entire text (particularly, claims 1, 3, 9; paragraphs [0145], [0192], [0196] to [0198]) & EP 2018622 A2 & JP 2009-532031 A	1-17
X	JP 2000-131237 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 12 May 2000 (12.05.2000), entire text (claims 4 to 6) (Family: none)	1-7, 9, 11, 13, 14, 16, 17
X	JP 2002-98639 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 05 April 2002 (05.04.2002), entire text (paragraphs [0031] to [0032]) & US 2002/0062202 A1	1-9, 11, 13, 14, 16, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 August, 2010 (17.08.10)

Date of mailing of the international search report
31 August, 2010 (31.08.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058710

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-333333 A (Ryoichi IMANAKA), 25 November 2004 (25.11.2004), entire text (particularly, paragraph [0016]) (Family: none)	1-17
A	JP 2003-98087 A (Hitachi, Ltd.), 03 April 2003 (03.04.2003), entire text (particularly, claim 1) & US 2003/0087282 A1	1-17
A	JP 2002-543847 A (Cornell Research Foundation, Inc.), 24 December 2002 (24.12.2002), entire text & WO 2000/070073 A1 & EP 1179085 A & US 2003/0044781 A1	1-17
A	SEO, T.S. et al., "Four-color DNA sequencing by synthesis on a chip using photocleavable fluorescent nucleotides", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2005), Vol.102, No.17, pp.5926- 5931, entire text	1-17
A	SEO, T.S. et al., "Photocleavable fluorescent nucleotides for DNA sequencing on a chip constructed by site-specific coupling chemistry", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2004), Vol.101, No.15, pp.5488-5493, entire text	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M1/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2007/123744 A2 (SOLEXA, INC.) 2007.11.01, 全文(特に請求項 1,3,9, 段落[0145], [0192], [0196]-[0198]参照) & EP 2018622 A2 & JP 2009-532031 A	1-17
X	JP 2000-131237 A (富士写真フイルム株式会社) 2000.05.12, 全文(請求項 4-6 参照) (ファミリーなし)	1-7,9,11,13,14, 16,17

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

3 1 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐藤 巖

4 B

3 3 3 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2002-98639 A (オリンパス光学工業株式会社) 2002.04.05, 全文(段落【0031】 - 【0032】) & US 2002/0062202 A1	1-9,11,13,14, 16,17
A	JP 2004-333333 A (今中良一) 2004.11.25, 全文(特に段落【0016】参照) (ファミリーなし)	1-17
A	JP 2003-98087 A (株式会社日立製作所) 2003.04.03, 全文(特に請求項 1 参照) & US 2003/0087282 A1	1-17
A	JP 2002-543847 A (コーネル リサーチ ファンデーション インク.) 2002.12.24, 全文 & WO 2000/070073 A1 & EP 1179085 A & US 2003/0044781 A1	1-17
A	SEO, T.S. et al., "Four-color DNA sequencing by synthesis on a chip using photocleavable fluorescent nucleotides", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2005), Vol.102, No.17, pp.5926-5931, 全文	1-17
A	SEO, T.S. et al., "Photocleavable fluorescent nucleotides for DNA sequencing on a chip constructed by site-specific coupling chemistry", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2004), Vol.101, No.15, pp.5488-5493, 全文	1-17