

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6925051号
(P6925051)

(45) 発行日 令和3年8月25日 (2021.8.25)

(24) 登録日 令和3年8月5日 (2021.8.5)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

GO 1 N 33/543 5 4 1

請求項の数 17 (全 90 頁)

(21) 出願番号	特願2019-504728 (P2019-504728)	(73) 特許権者	518118585
(86) (22) 出願日	平成29年7月28日 (2017.7.28)		セルマ・ダイアグノスティクス・アンパル
(65) 公表番号	特表2019-523419 (P2019-523419A)		トセルスカブ
(43) 公表日	令和1年8月22日 (2019.8.22)		SELMA DIAGNOSTICS A
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/069212		PS
(87) 国際公開番号	W02018/020024		デンマーク2200コペンハーゲン・エン
(87) 国際公開日	平成30年2月1日 (2018.2.1)		、オーレ・モールース・ヴァイ3番
審査請求日	令和2年7月9日 (2020.7.9)	(74) 代理人	100145403
(31) 優先権主張番号	62/368,564		弁理士 山尾 憲人
(32) 優先日	平成28年7月29日 (2016.7.29)	(74) 代理人	100112911
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 中野 晴夫
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2016/074045	(74) 代理人	100100479
(32) 優先日	平成28年10月7日 (2016.10.7)		弁理士 竹内 三喜夫
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デジタル計数のための方法の改良

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法であって、サンプルは、複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも1つの検体を捕獲可能であり、

該方法は、同じ検体が標識剤で標識化または再標識化される少なくとも2つの検出サイクルを含み、各検出サイクルは、

a) 捕獲され標識化または再標識化された検体からの信号を起動するステップと、

b) 捕獲され標識化または再標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップと、

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップと、を含み、該信号の非活性化ステップは、

i) 捕獲された検体から標識剤を分離して除去するステップ、

i i) 標識剤が信号を促進する能力を非活性化させるステップ、または

i i i) (i) および (i i) の組合せ、から選択される、方法。

【請求項2】

サンプルおよび複数の個別の捕獲部位を有する固相は、少なくとも1つの検体の捕獲前または捕獲中に区画化される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

捕獲された検体および標識剤は、少なくとも1つの検体の標識化の前または標識化の間

に区画化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

検体は、ステップ a) の前に各検出サイクルにおける標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって、標識化される、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

固相上の検体の捕獲前または捕獲中に標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって、捕獲された検体が標識化され、ステップ c) は、追加の検出サイクルが行われる前に行われ、続いて再標識化ステップが行われ、捕獲された検体は標識剤を添加することによって標識化される、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

捕獲され標識化された検体は、区画化され、少なくとも 1 つの検体を含む液体区画を生成する、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

サンプルは、ターゲット検体および非ターゲット化合物を含み、

該方法は、あるタイプの偽ポジティブ検出サイクルを含み、該偽ポジティブ検出サイクルにおいて標識化または再標識化ステップは、非ターゲット化合物に対して特異的な標識剤を用いて行われる、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

該方法は、あるタイプの偽ポジティブ検出サイクルを含み、該偽ポジティブ検出サイクルは、いずれの標識化ステップも含まない、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

該方法は、あるタイプの偽ポジティブ検出サイクルをさらに含み、該偽ポジティブ検出サイクルは、いずれの標識化ステップも含まない、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

サンプルから少なくとも 1 つの検体の捕獲は、検体に特異的な 1 つ以上の捕獲プローブを使用することによるものであり、捕獲プローブは固相に付着されている、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、洗浄によって除去される、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

捕獲した検体は、捕獲に続いて、捕獲プローブと共有結合する、請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

サンプルの単一分子デジタル計数分析において偽ポジティブ検出及び／又はバックグラウンドノイズの低減のための、請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の方法における、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用であって、各部位は、少なくとも 1 つの検体を捕獲可能である、使用。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の方法における、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用であって、各部位は、デジタル計数分析における計数誤差を減少させるために、少なくとも 1 つの検体を捕獲可能である、使用。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の方法における、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用であって、各部位は、偽ポジティブ検出のために、少なくとも 1 つの検体を捕獲可能である、使用。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の方法における、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用であって、各部位は、バックグラウンドノイズの低減のために、少なくとも 1 つの

10

20

30

40

50

検体を捕獲可能である、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル内の、1つ以上の検体(analyte)タイプなどの材料の存在を検査するための方法およびシステムに関し、詳細には、改善した単一酵素結合免疫吸着法(single enzyme-linked immunosorbent assay: s E L I S A)検査、そして単一酵素結合分子分析(single-enzyme linked molecular analysis: S E L M A)の他の変形のためのものである。本発明はさらに、偽ポジティブ検出及び／又はバックグラウンドノイズの低減など、単一分子デジタル計数分析における改良に関する。

10

【背景技術】

【0002】

単一分子を検出するための多くのアプローチが過去数十年間に科学者によって開発されてきており、単一オリゴヌクレオチド、単一タンパク質および単一ペプチドを含む種々のタイプの分子の高感度測定を可能にしている。単一分子測定は、単一(または少数)の検体分子が区画に閉じ込められ、該区画が単一の検体の存在を検出するための適切な環境を提供するデジタル検出またはデジタル診断検査のために使用される。例えば、単一酵素結合免疫吸着法(s E L I S A)の場合、捕獲抗体と酵素結合検出抗体との間に挟まれた検体分子を含む単一免疫複合体を個々の微小区画に入れ、そして最後に蛍光性または発色性酵素を基板に供給し、区画内で検出可能な光信号を生成する。他の例は、デジタルポリメ

20

【0003】

最新のデジタル検出の利点にもかかわらず、該分野での大きな課題は、不要なバックグラウンドノイズを抑制することである。バックグラウンドノイズは、典型的には分子の複雑な混合物からなるサンプルを分析する場合に生ずる。例えば、この場合、血液由来のサンプルをs E L I S Aで分析した場合、バックグラウンドノイズは、主に2つの機構によって発生する。

【0004】

30

機構1: サンプル処理中に、主としてターゲット検体は免疫複合体を形成するが、捕獲および検出抗体の両方とも、サンプル中に存在する、ターゲット検体と類似の非ターゲット分子(ここでは非ターゲット化合物とも称する)(タンパク質、ペプチドなど)とを完全に区別できず、その結果、非ターゲット分子のごく一部も免疫複合体を形成することが可能になるであろう。非ターゲット分子の濃度は、通常、ターゲット分子の濃度よりも数桁大きいいため、ごくわずかな「偽の」免疫複合体でも、ターゲット検体の免疫複合体の数を圧倒することがある。

【0005】

機構2: 抗体がターゲットと非ターゲットとを完全に区別できないことは、ターゲット検体が存在しない領域または区画への酵素結合検出抗体の非特異的結合／吸着を可能にする。この問題は、検出抗体がより少ない程度で非特異的に結合するように、検査における表面化学を改善することによって低減できる。しかしながら、非特異的結合の完全な否定は実験的に達成することは不可能であり、これにより単一の酵素結合検出抗体のみから生じる「偽の」信号を導く。

40

【0006】

これらの2つの機構は、単分子検出文献(例えば、D. M. Rissin et al entitled "Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations" published in Nature Biotechnology (2010), vol. 28, pp. 595-599 (DOI: 10.1038/nbt.1641))において議論されている。この研究論文では、R i s s i nらは、s E L I S Aへのアプローチを説明し、校正サンプルを分析する場合に22

50

0ゼプトモル (2.20×10^{-21} M、約15個の分子)の検出限界 (LOD)を報告している。しかしながら、較正サンプルを血清サンプルと交換した場合、LODは、200アトモル (2.00×10^{-18} Mまたは200 aM、約12000個の分子)まで約3桁増加した。この劇的な感度低下は、機構1, 2に記載されているように、血清中の非ターゲット化合物がターゲット検体と検出／捕獲抗体ペアの間の特異的相互作用を妨害する方法から理解できる。

【0007】

機構1は、タンパク質およびペプチド以外の検体分子の他の場合にも適用され得る。この顕著な例は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による一塩基対置換及び／又は単一ヌクレオチド多型 (SNP) の検出である。ここで、SNPに特異的なPCRプライマーは、SNP配列を含むオリゴヌクレオチド検体の特異的に増幅するために適用される。しかしながら、通常、サンプルは高濃度の野生型非ターゲットオリゴヌクレオチドを含むことがあるため、SNP検出は非常に困難であり、これはSNP特異的PCRプライマーを大幅に妨害する。高度に最適化されたプライマーの使用により、従来のPCR検出は、100個の野生型分子 (100:1の比) のバックグラウンドで1個のSNPオリゴヌクレオチド分子を確実に検出できる。野生型対ターゲットの比率がさらに増加すると、偽ポジティブの結果が生じる。dPCRの場合、単一 (または少数) のオリゴヌクレオチドが個々の区画に封入されているため、高い比率の野生型対ターゲットが許容され得る。従って、個々の区画では、野生型対ターゲット比が非常に有利であり、即ち、単一のSNP検体オリゴヌクレオチド、単一の野生型オリゴヌクレオチドおよびそれぞれ一つを含有する区画については、それぞれ0:1、1:0、または1:1である。それでも区画当たりの単一 (または少数) のオリゴヌクレオチドの信頼できる封入を達成するために、区画の大部分は空である必要がある (例えば、研究論文 (D. Pekin et al. entitled "Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics" published in Lab on a Chip (2011), vol. 11, pp. 2156-2166 (DOI: 10.1039/c1lc20128j)) を参照)。dPCRの一般的な規則は、サンプル中の野生型+ターゲット分子の予想される数よりも5~10倍多い区画を調製することであり、こうして調製された区画の大部分は基本的に分析から捨てられる。

【0008】

科学者は、生物学および化学システムでの変化を分析するための手法を開発しており、これらの変化は、しばしば2つ以上の状態間のスイッチングに関連している。例えば、文献 (Witters et al. in Digital Biology and Chemistry (DOI: 10.1039/C4LC00248B, (Frontier) Lab on a Chip, 2014, 14, pp. 3225-3232)) は、種々のデジタル生物学および化学技術の開発を議論している。デジタル技術が堅牢性、アッセイ (assay) 設計、簡潔性の意味で利点を提供し、定性的測定とともに定量的情報が得られるため、これらのデジタル技術はとても上手く機能する。しかしながら、デジタル技術は、単一分子を隔離し操作する際の技術的困難さに部分的に起因して、比較的複雑になることがある。例えば、幾つかの手法は、ミクロンサイズの磁気ビーズを使用して、フェムトリットル体積のサンプルを処理する。文献 (Rissin et al., in Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations (DOI:10.1038/nbt.1641, Nature Biotechnology 2010, 28, pp. 595-599)) を参照。他の手法は、さらにアトリットルのより小さい体積を使用する。これらの微量体積は、処理を困難にする典型的な研究室の温度および圧力で小さい体積の流体動力学が挙動を示すため、課題を作り出すことがある。

【0009】

例えば、大部分のデジタル検出手法は、液体含有検体および種々の検出プローブおよび捕獲プローブのマикро区画化に依拠している。検体および検出／捕獲プローブは、典型的にはピコリットルからアトリットル体積のマикроサイズの液滴内に搬送されまたは存在する。

【0010】

従って、サンプルをより小さい体積に区画化する方法は、デジタル検出プロセスの重要な部分である。最も容易に利用できるデバイスフォーマットは、サンプルが移送できるマイクロ区画(compartment)のアレイを形成する固体またはポリマーの基板に依拠する。これらのアレイは、主として2つの種類、即ち、(i) マイクロウェルアレイ、(ii) 毛細管(capillary)アレイという形式がある。マイクロウェルアレイでは、区画が基板内の凹部によって作成され、一方、毛細管アレイでは、区画が基板を通じて初めから終わりまで延びており、貫通孔を形成する。これらのアレイタイプの両方において固有の主要な課題は、これらがサンプルおよび付属試薬が装填される方法である。マイクロウェルアレイでは、凹部は、液体サンプルを容易に充填することができず、その理由はウェルの微視的寸法に起因して空気がウェルを去ることができないためである。この例として、研究論文 (Kim et al. entitled "Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules" published in Lab on a Chip, (2012) vol. 12, pp. 4986-4991 (DOI: 10.1039/c2lc40632b)) を参照。この問題は、毛細管アレイでは存在せず、その理由は、各区画は2つの開口を有し、もし液体サンプルが上部開口から追加されると、空気は下部開口を通して逃げるができるためである。しかしながら、マイクロウェルまたは毛細管区画内に保持された液体を他の液体と交換することになった場合、分子の遅い拡散によって生ずる追加の問題が起こる。マイクロウェルおよび毛細管の両方が追加される液相のフローに対して垂直に位置決めされるため、良好な混合が生じることができず、液体交換が、バルク液体から毛細管への分子拡散およびその逆も同様によって生じることができるだけである。その結果、適切な液体交換を確保するために、時間遅延(その長さは、マイクロウェル/毛細管の寸法および、追加される分子種のタイプに依存する)を適用する必要があることになる。

【0011】

これらの課題を克服するために、第3の種類のアレイが開発されており、これは表面張力アレイと称される。表面張力アレイは、平面的であり、疎水性基板の中または上にパターン化された親水性機構(feature)からなる。表面張力アレイが水性サンプルと接触した場合(例えば、水相の中への浸漬およびアレイの引き出しによって)、機構と周囲の基板との間の表面張力差に起因して、個別の液滴が親水性機構の上に形成できる。液滴は、平面的表面の上に静止するため、液体サンプルがアレイ上に導入された場合、液体装填および液体交換が瞬時に(または拡散律速の輸送とは少なくとも数桁のオーダーでより高速に)生じることができる。マイクロウェルアレイとは異なり、空気が液体および親水性機構の直ぐ下に捕獲されることがなく、アレイは、基板内の窪み/凹部/空洞に依存していないため、液滴とバルク液体との間の液体混合が分子拡散によって制限されない。しかしながら、全部で3つのタイプのマイクロ区画化フォーマット(マイクロウェル、毛細管および表面張力アレイ)は、デジタル計数(counting)を実行するために十分に長い時間に渡って多数の液体マイクロ液滴を保存するという課題に直面している。

【0012】

研究室での典型的な周囲温度および圧力において、これらのマイクロ液滴は数秒内で蒸発する。例えば、研究論文 (Birdi, K. S., Vu, D. T. and Winter, A. entitled "A study of the evaporation rates of small water drops placed on a solid surface" published in The Journal of Physical Chemistry, 1989, vol. 93, pp. 3702-3703 (DOI: 10.1021/j100346a065)) を参照。

【0013】

いったん蒸発すると、マイクロ液滴内の分子を処理する能力が失われ、デジタル手法は実行できない。

【0014】

従って、急速な蒸発を防止し、関心のある分子の存在を測定するのに十分な時間のマイクロ液滴を維持することが必要である。

【0015】

このために科学者および技術者は、マイクロ液滴を保持する区画を封止(seal)するある

手法を開発した。これらのシールは、マイクロ液滴が周囲環境と接触するを防止し、蒸発を防止する。

【0016】

一般に、区画を封止するために2つの手法があり、即ち、物理的シールおよび化学的シールがある。物理的シールは、区画が基板にマイクロ凹部またはマイクロ空洞として構造化された場合に使用される。区画を物理的に封止するには、気密蓋(lid)が区画の上部に装着される。こうして個別の区画の内容物は蒸発できず、隣接した区画はその内容物を交換できず、そうでなければ交差汚染をもたらすことになる。物理的シールを有する不都合は、いったん区画が密閉されると、分析が終了することであり、その理由は、マイクロ区画の完全性(integrity)を分断させることなく、蓋が容易に除去できないためである。さらに、物理的シールを適用するために、区画は、マイクロウェル／空洞／凹部として構造化する必要がある、これは、遅い分子拡散に起因して、初期の準備ステップの際に区画内で液体を交換することに伴う技術的困難さをもたらす。

【0017】

1つのタイプの化学的シールは、油（または無極性液体）相で区画を覆うことに依拠する。こうしてサンプルの蒸発が減少し、その理由は、サンプルからの水が油相の中にゆっくりとだけ分配するためである。化学的シールの利点は、それは界面張力に基づいており、よって区画は空洞として構造化される必要がなく、代わりに表面上に静止する液滴として形成できることである。この機構は、高速な試薬交換を可能にし、これは分子拡散によって制限されないが、代わりに新しい試薬が導入される流量(flowrate)によって決定される。さらに物理的シールと異なり、化学的シールは、サンプルから油相を吸引することによって容易に除去できることである。しかしながら、化学的シールの不都合の1つは、サンプルからの検体または他の生体分子が無極性相の中に分配することがあり、(i) サンプル損失、及び／又は(ii) 液滴間汚染をもたらすことがあることである。特に、タンパク質などの生体分子は、タンパク質中の疎水性アミノ酸が、疎水性界面への露出の際に自らを再配置することがあることに主に起因して、無極性液体に溶解性になる傾向がある。水から無極性相の中に分配する分子のこの性質は、分配係数、即ち、油－水分配係数、水－オクタノール分配係数などによって記述され、例えば、文献(Lien, E. J. and Ren, S. S. in Chapter 186 in Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition, 2006, ISBN: 9780849393990)。さらに、水でさえも、ゆっくりであるが周囲の油相に分配することが示され、例えば、文献(A. et al published in Lab on a Chip, 2009, vol. 9, pp. 692-698 (DOI: 10.1039/B813709A)を参照。さらに、バルク水相がバルク油相によって置換した場合、または逆も同様に、エマルジョン(emulsion)液滴を生成するリスク、即ち、即ち、油でのミクロンサイズの水の含有または逆も同様のリスクがある。エマルジョン液滴は、表面を汚染し、及び／又は、デバイスのフロー性能を劣化させることがあるため、実験的な邪魔者を構成することがある。

【0018】

国際公開第2009029073A1号は（名称"Methods for determining the concentration of an analyte in solution"）は、閉じ込められた反応容器中で単一分子デジタル計数を行う方法を記載する。国際公開第2015061362A1号（名称"Enrichment and detection of nucleic acids with ultrahigh sensitivity"）は、高速な蒸発レートを示す液滴の非封止表面張力アレイを調製する方法を記載する。国際公開第2013110146A2号（名称"Patterning device"）は、液滴表面張力アレイを調製する方法および化学的シールの下でのバイオアッセイ(bioassay)のためにそれを使用する方法を記載する。国際公開第2013063230A1（名称"Device and method for apportionment and manipulation of sample volumes"）は、デジタル計数測定を含むバイオアッセイのための化学的に封止した表面張力アレイを調製し使用する方法を記載する。日本公開第2014021025A号（名称"Apparatus and method for forming artificial lipid membrane"）は、脂質(lipid)膜を用いて化学的に封止した表面張力アレイを調製する方法を記載する。国際公開第2010039180A2（名称"High sensitivity det

termination of the concentration of analyte molecules or particles in a fluid sample") は、サンプルを物理的に封止したマイクロウェル区画の中に分割することによる、検体のデジタル計数を記載する。国際公開第 2 0 1 0 0 1 9 3 8 8 A 2 号 (名称 "Method and apparatus for discretization and manipulation of sample volumes") は、マイクロウェル区画を記載しており、これは、1 つ以上の非混合性液体で構成された化学的シールを付与することによって液体サンプルを捕獲し分割するために使用できる。国際公開第 2 0 1 2 0 2 2 4 8 2 A 1 号 (名称 "Microwell arrays for direct quantification of analytes on a flat sample") は、平坦な基板上に収容されたサンプルを分析するための物理的に封止したマイクロウェル区画の使用を記載する。米国公開第 2 0 1 0 0 0 7 5 4 0 7 A 1 号 (名称 "Ultrasensitive detection of molecules on single molecule arrays") は、物理的に封止したマイクロウェル区画で実行されるデジタル計数測定を記載する。国際公開第 2 0 1 2 1 0 0 1 9 8 A 2 号 (名称 "Methods and systems for performing digital measurements") は、液滴のアレイを調製し分析することによって実行されるデジタル計数測定を記載する。米国公開第 2 0 1 3 0 0 5 2 6 4 9 A 1 号 (名称 "Multilayer high density microwells") は、バイオ分析のためのマイクロウェル区画の化学的に封止したアレイを記載する。国際公開第 2 0 0 1 0 6 1 0 5 4 A 2 号 (名称 "Apparatus and methods for parallel processing of micro-volume liquid reactions") は、バイオアッセイを実行するための化学的に封止した毛細管アレイの使用を記載する。国際公開第 2 0 1 4 0 0 1 4 5 9 A 1 号 (名称 "A method of charging a test carrier and a test carrier") は、バイオアッセイを実行するための毛細管アレイの使用を記載する。国際公開第 1 9 9 8 0 4 7 0 0 3 A 1 号 (名称 "An analytical assembly for polymerase chain reaction") は、オリゴヌクレオチドのデジタル計数を記載する。国際公開第 2 0 1 1 0 9 7 0 2 8 A 1 号 (名称 "Systems and methods for manipulating a molecule in a nanopore") は、膜ナノ細孔中の単一分子を操作する方法を記載する。米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 2 6 3 7 9 A 1 号 (名称 "Nucleotide analogs") は、単一のオリゴヌクレオチド分子のシーケンス配列決定を記載する。米国特許出願公開第 2 0 0 9 1 4 2 7 5 5 A 1 号 (名称 "Assay for detecting genetic abnormalities in genomic nucleic acids") は、固体支持体上に捕獲することによる核酸の検出を記載する。米国特許第 2 0 1 2 1 9 0 0 3 0 A 1 号 (名称 "Detection of target nucleic acid sequences by cyclic exonucleolytic reactions") は、ポリメラーゼ連鎖反応を使用しない核酸の検出を記載する。国際公開第 2 0 1 7 0 3 4 9 7 0 A 1 号 (名称 "Combinatorial single molecule analysis of chromatin") は、固体支持体上のオリゴヌクレオチド／クロマチン複合体のシーケンス標識化および検出を記載する。欧州公開第 3 0 4 8 4 4 5 A 2 号 (名称 "Method and apparatus for the analysis and identification of molecules") は、ナノ細孔を用いて単一のオリゴヌクレオチドをどのように配列決定できるかを記載する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 9】

従って、分析される材料を含むマイクロ液滴を保持する区画を封止するための改善したシステムおよび方法について先行技術でのニーズがある。

【0 0 2 0】

これまで、多重化を達成するために単一分子デジタル計数に反復標識化が適用されており、即ち、標識化反応 1 において検体 1 に特異的な標識剤を用い、標識化反応 2 において検体 2 に特異的な標識剤を用いることなどによって、より多くのターゲット検体タイプが検出可能になる (例えば、国際公開第 2 0 0 9 0 2 9 0 7 3 A 1 号および国際公開第 2 0 1 7 0 3 4 9 7 0 A 1 号を参照)。

【0 0 2 1】

先行技術では、デジタル計数、例えば、単一分子検出または定量化を含む分析におけるノイズの低減のためのニーズがある。デジタル計数における計数誤差をもたらすノイズの低減または防止は、既存の単一分子検出アッセイの感度および特異性を大きく改善できる

。特に、アッセイが検体に結合する標識剤に基づく最新の単一分子検出分析法の感度および特異性の点での改善は、(i) 検体への標識剤の不完全な結合、(i i) 異なる検体タイプの交差標識化、および(i i i) 捕獲部位への標識剤の非特異的結合、という課題がある。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明者は、驚くべきことに、デジタル計数分析において、例えば、偽ポジティブ検出及び／又はバックグラウンドノイズなどの計数誤差が、(i) サンプルから検体を捕獲するために複数の個別の捕獲部位を用いること、および(i i) 捕獲された検体は1つ以上の検出サイクルに曝されことによって大きく低減できることを見出した。ここで各検出サイ

10

【0023】

空の捕獲部位または捕獲された非ターゲット分子への標識剤の非特異的結合相互作用は、捕獲された検体に対する標識剤の特異的結合相互作用と比較して、低い確率で起こり、そして、非ターゲット分子の反復標識化または空の捕獲部位への標識剤の反復非特異的結合は、検出サイクルが繰り返される毎にますます起こりにくくなると予想される。他方で

20

【0024】

第1態様において、少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法が開示され、サンプルは、複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも1つの検体を捕獲可能であり、この方法は、少なくとも2つの検出

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

30

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

【0025】

第2態様において、少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法が開示され、サンプルは複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも1つの検体を捕獲可能であり、この方法は、少なくとも2つの検出サイ

40

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

【0026】

第3態様において、少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法が開示され、サンプルは複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも1つの検体を捕獲可能であり、少なくとも1つの検体は、固相上の少なくとも1つの検体の捕獲前または捕獲中に、標識化ステップにおいて標識剤を添加する

50

ことによって標識化され、この方法は、少なくとも2つの検出サイクルを含み、少なくとも1つの捕獲され標識化された検体は、区画化され、少なくとも1つの検体を含む液体区画を生成し、そして、ステップa)～c)を含む。

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

ここで、追加の検出サイクルが行われる前にステップc)が行われ、続いて再標識化ステップが行われ、少なくとも1つの捕獲された検体は、標識剤を添加することによって標識化される。

10

【0027】

更なる態様において、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用が開示され、各部位は、ここに記載される方法で少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

【0028】

更なる態様において、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用が開示され、各部位は、デジタル計数分析における計数誤差を減少させるために、ここに記載される方法で少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

【0029】

更なる態様において、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用が開示され、各部位は、デジタル計数分析における計数誤差を減少させるために、ここに記載される少なくとも2つの検出サイクルを行うことによって、少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

20

【0030】

他の態様において、少なくとも1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のための方法がここでは開示され、該方法は、気相シールの下での複数のナノリットルからアトリットルの液滴に含まれる検体タイプを計数することを含む。

【0031】

他の態様において、少なくとも1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のために、気相シールの下での複数のナノリットルからアトリットルの液滴の使用がここでは開示される。

【図面の簡単な説明】

30

【0032】

本発明の前述のおよび他の目的および利点は、添付図面を参照して下記の更なる説明からより完全に理解されるであろう。

【0033】

【図1】複数のマイクロ液滴26を有するフロー区画18の一例を示す。略図は縮尺どおりに描いていない。

【0034】

【図2】図1中のフロー区画18の端部の一例を示す。略図は縮尺どおりに描いていない。

【0035】

40

【図3】気体シールを形成する気相を備えたフロー区画18の例示表現を示す。略図は縮尺どおりに描いていない。

【0036】

【図4】フロー区画から流体を引いて気相シールを生成するプロセスの例示表現を示す。描写は、フローシステムが動作しているときに獲得される明視野顕微鏡写真からの抜粋である(例1～5を参照)。明視野顕微鏡写真での縮尺バーは20 μmである。

【0037】

【図5】(i) 平面的機構、(i i) 疎水性基板16での窪みのような形状の機構、(i i i) 疎水性基板からの突起を備え、窪みは親水性ゾーンを含む機構、を含む親水性機構14の例示表現を示す。略図は縮尺どおりに描いていない。

50

【0038】

【図6】固体支持体と接触した液滴の例を示す。本例において、(i) ガス雰囲気中の疎水性基板上に静止する液滴の接触角 (γ)、(ii) 円形状平面的親水性機構の半径 (R_D)、(iii) 円形状平面的親水性機構上に静止する液滴の接触角 (α)、(iv) 円形状平面的親水性機構についての最大液滴体積の幾何学的定義の例を略図で示す。略図は縮尺どおりに描いていない。

【0039】

【図7】疎水性基板によって包囲された平面的親水性機構のパターンを調製するための2つの例示のフォトリソグラフィ式プロセスを示す。図示したステップは、下記を含む。

Aー親水性ウエハ基板を用意する。 B2ー感光性薄膜コーティングの堆積、または、B1ーウエハの均質な表面改質。 C2ーコーティングのUV露光および現像、または、C1ー感光性薄膜コーティングの堆積、続いて、C1'ーコーティングのUV露光および現像。 D2ーウエハの疎水性表面改質、またはD1ー疎水性層の選択エッチング。 Eー薄膜コーティングを除去し、Fー親水性機構の平面的パターンを達成する。

【0040】

【図8】一般のデジタル計数測定 of the example を概略的に示しており、サンプルからの検体の濃度は、ポジティブ信号を表示する区画の数の分析によって得られる。

【0041】

【図9】平面的親水性機構に基づいたSELMAプロセスの例示略図を示す。ステップ(A)において、サンプルからの検体は、単一ステップで結合され、親水性機構の上に位置するプローブを捕獲する。ステップ(B1)において、バルク液体中に存在する捕獲プローブ(捕獲プローブ部分2)がサンプルからの検体と結合し、こうしてステップ(B2)において、検体/捕獲プローブ部分2ー複合体(complex)の形成を導く。ステップ(B3)は、B2に続いて、固体支持体上に存在する捕獲プローブ(捕獲プローブ部分1)との検体/捕獲プローブ部分2ー複合体の結合を示す。捕獲プローブ部分1, 2は、互いに結合(recognize)させ、よって捕獲プローブ部分1/捕獲プローブ部分2/検体ー複合体を固体支持体上に形成し、こうして検体を親水性機構の上に固定する。ステップ(C)において、標識(labeling)剤が捕獲プローブ/検体ー複合体に追加され、例えば、捕獲プローブ/検体/標識剤ー複合体を形成する。ステップ(D)において、捕獲プローブ/検体ー複合体は、標識剤の第1部分(標識剤部分1)によって標識化される。ステップ(E)において、捕獲プローブ/検体/標識剤部分1ー複合体は、標識剤の第2部分(標識剤部分2)によって2次標識化される。ステップ(F)において、機能的捕獲プローブ/検体/標識剤ー複合体が形成された。ステップ(G)において、液滴が親水性機構の表面上に形成される。液滴は、検出剤を含み、気相シールによって蒸発から保護される。ステップ(H)において、検出剤は、標識剤の処理によって分子レポーター(reporter)に変換される。略図は縮尺どおりに描いていない。

【0042】

【図10】例示のフローシステムの略図を示す。フローシステムは、5つの機能的エレメントを備える矩形スラブ(slab)で構成される。各エレメントは、数字でマークされ、破線四角によって包囲される。エレメント1は、吸引を提供するために圧力源に接続された液体出口である。エレメント2は、フロー区画である。エレメント3は、フロー区画を液体装填パッドに接続する液体入口である。エレメント4は、液体試薬のためのレセプタクルとして成形された液体装填パッドである。エレメント5は、液滴領域であり、疎水性基板によって包囲された親水性機構のパターンを提示する。液滴領域は、フロー区画の下部の上に位置する。略図は縮尺どおりに描いていない。

【0043】

【図11】蒸発とフローチャネル/液滴/アレイー幾何形状との間の理論的関係の一例を示す。(A) 2.5 μm の液滴半径および $N=4$ および $\phi=2$ のスケーリング係数を備えたアレイについての式(Eqn.) (17)のプロットであり、温度が増加するとともに、そしてフローチャネル高さが100 μm から1500 μm に増加した場合、蒸発割合が増加す

る。(B) 35℃での最大許容蒸発割合(θ_{MAX})の関数として、そして種々のアレイ／液滴幾何形状について、最大高さ(h_{MAX})についての式(18)のプロットである。(C) 100 μm の高さ、 $\phi=2$ のスケーリング係数を表示し、35℃の温度に保持されたフローチャネルについての式(17)のプロットである。隣接液滴間のより大きい間隔(より大きいN値)は、より高い蒸発割合をもたらし、一方、より大きい液滴サイズは蒸発を減少させる。

【0044】

【図12】気相シールの下での蒸発耐性マイクロ液滴の例および種々のフローチャネル幾何形状および温度についての液滴安定性を示す。明視野顕微鏡写真は、(A) 2000 μm 、(B) 800 μm 、(C) 150 μm の高さを示すフローチャネルに形成される液滴を示す。アレイパラメータは、A～Cで同一であり、即ち、液滴半径 $R_D=2.5 \mu\text{m}$ 、余剰部(excess)対アレイ長さ比率 $\phi=1$ 、アレイピッチ $N=4$ である。3つのアレイを同じ方法で調製した。即ち、水溶液を注入し、フローチャネルから引き出し、温度を25℃に調整した。30分の平衡時間の後、顕微鏡写真を撮り、温度を35℃に上昇した。30分の平衡後に再び顕微鏡写真を撮った。この手順を45℃で繰り返した。パネルAにおいて、液滴は25℃でだけ明確に識別可能である。より高い温度では、液滴は蒸発する。パネルBにおいて、液滴は25℃および35℃で識別可能になるが、蒸発に起因して液滴直径が収縮したように見える。45℃において、アレイは、蒸発および水-蒸気の再凝縮に起因して大きく分裂され、フローチャネル／アレイが、顕微鏡写真を撮った時に熱平衡に到達していないことを示す。パネルCにおいて、液滴は、全ての温度で明確に識別可能であり、液滴半径は大きく変化していないように見える。縮尺バーは20 μm である。

【0045】

【図13】(A)例示のフローチャネル28、および(B)フローチャネルに組み込まれた例示のマイクロ液滴アレイ30を定義するパラメータの例示略図を示す。略図は縮尺どおりに描いていない。

【0046】

【図14】1 pMのDNAターゲットを含む校正サンプルについての明視野(i)および蛍光(ii)顕微鏡写真の対応するペアを示す。蛍光信号は、例4に説明したように識別され、白丸でマークした。蛍光信号の位置は、明視野顕微鏡写真に付与し、黒丸でマークした。蛍光信号の位置は、液滴の位置に対応することが明らかである。縮尺バーは10 μm である。

【0047】

【図15】DNAターゲットの下記濃度、(A) 100 aM、(B) 1 fM (1フェモトル／lまたは $1 \times 10^{-15} \text{M}$)、および(C) 10 fMを含むサンプルからの3つの代表的な蛍光顕微鏡写真を示す。蛍光液滴の数は、各サンプルについて計数し、アレイ上に存在する液滴の合計数に正規化され、例えば、蛍光液滴の百分率割合、即ちポジティブ割合を提供する。ポジティブ割合は、100 aMのDNAターゲット、1 fMのDNAターゲット、10 fMのDNAターゲット、そしてDNAターゲット無しのコントロール(control)サンプル(D)を含むサンプルについてプロットした。棒グラフ上の値は、各サンプルについて5つの検出実験から収集した平均値を表す。エラーバーは、5つの同じように行った実験についてポジティブ割合の標準偏差を表す。

【0048】

【図16】例5に概説したように100 aMのターゲットDNAを含むサンプルについて蛍光顕微鏡写真のシリーズを示す。シリーズの第1顕微鏡写真(i)は、第1検出ステップの後に撮ったもので、シリーズの第2顕微鏡写真(ii)は、第2検出ステップの後に同じ位置で撮ったもので、シリーズの第3顕微鏡写真(iii)は、第3検出ステップの後に同じ位置で撮ったものである。

【0049】

【図17】親水性機構(14)のパターンを表示する支持体(12)を備えた、サンプル中の1つ以上の検体のデジタル計数のための例示のフローシステム(10)の断面の略図

を示す。パターンは、疎水性基板（１６）に組み込まれ、その上に配置され、またはそれによって包囲され、そして開口（２０）を示すフロー区画（１８）に組み込まれる。各親水性機構は、表面に付着された捕獲プローブ（２２）を有する。支持体は、２つの領域（２４）に分割され、各領域は特異タイプの捕獲プローブを表す。略図は縮尺どおりに描いていない。

【００５０】

【図１８】適用された検出サイクル数の関数として、単一分子計数分析において信号を示す捕獲部位の数の間の理論的関係の例を示す。グラフは式（２５）～（２８）に従ってプロットされ、下記パラメータを適用する。（Ａ） $N_{TA}=10$ 、 $N_{NM}=10.000$ 、 $N_C=100.000$ 、 $P_{TA}=0.9$ 、 $P_{NM}=0.05$ 、および $f_{NSR}=0$ 、（Ｂ） $N_{TA}=10$ 、 $N_{NM}=100.000$ 、 $N_C=100.000$ 、 $P_{TA}=0.9$ 、 $P_{NM}=0.05$ 、および $f_{NSR}=0.05$ 、（Ｃ） $N_{TA}=10$ 、 $N_{NM}=1.000$ 、 $N_C=100.000$ 、 $P_{TA}=0.9$ 、 $P_{NM}=0.05$ 、および $f_{NSR}=0$ 、（Ｄ） $N_{TA}=10$ 、 $N_{NM}=1.000$ 、 $N_C=1.000$ 、 $P_{TA}=0.9$ 、 $P_{NM}=0.05$ 、および $f_{NSR}=0.05$ 。パネルＡ～Ｄにおいて、 $C_T(x)$ 、 $L_{TA}(x)$ 、 $L_{NM}(x)$ および $L_{NSR}(x)$ は、信号ポジティブ捕獲部位の総数、信号が（ i ）ターゲット検体に由来する信号ポジティブ捕獲部位の数、（ ii ）非ターゲット分子、および（ iii ）非特異的に保持された標識剤をそれぞれ表し、ここで x は検出サイクル数を示す。

【発明を実施するための形態】

【００５１】

（定義）

本文脈において、用語「デジタル計数(counting)」、「デジタル計数分析」、「単一分子デジタル計数」、または「単一分子デジタル計数分析」は、サンプルの特異成分が区画の中に限界濃度で分配される任意の検体を参照し、区画の数は特異サンプル成分の数より大きい。こうして２値／デジタル値が、それが空（値０）または装填（値１）であるかに応じて各区画に割当てできる。本文脈において、装填とは、特異サンプル成分の少なくとも１つを含む区画を参照し、一方、空とは、特異サンプル成分を含まない区画を参照する。デジタル計数は、装填および空の区画の数が、特異サンプル成分から、または特異サンプル成分の存在に結合した付属検出試薬から由来する特異信号に基づいて評価される場合に行う。

【００５２】

本文脈において、用語「デジタル計数測定」は、上述したようなデジタル計数プロセスを参照するが、例えば、全ての区画に存在する特異サンプル成分の絶対数を推測するために、デジタル計数結果の任意の数学的処置または校正をさらに含む。これは、（ i ）装填区画が、同じサンプル成分の１つ、２つ、３つなどのコピーを含むことがあるという事実を説明すること、または（ ii ）信号発生プロセスでの欠陥に起因して、装填区画が、空として誤って分類されることがあり、また逆も同様であるという事実を説明すること、を含んでもよい。デジタル計数測定の例は、デジタルポリメラーゼ連鎖反応（ $dPCR$ ）、単一酵素結合免疫吸着法（ $sELISA$ ）またはデジタル単一酵素結合免疫吸着法（ $dELISA$ ）を含む。デジタル計数測定の略図が図８に概説されている。

【００５３】

本文脈において、用語「 $SELMA$ 」は、single-enzyme linked molecular analysis の略称として使用され、デジタル計数測定の特定の種類を参照する。 $SELMA$ において、デジタル計数測定はフローシステムにおいて行われ、液滴区画があるパターンに編成され、特異サンプル成分が区画の内部に固定／捕獲された状態になる。こうしてサンプル成分は、失われることなく、幾つかの反応ステップに曝すことができ、各ステップは、フローシステムからの溶液または試薬の浸漬および引き出しによって構成される。例示の $SELMA$ プロセスの略図が図９において示される。

【００５４】

本文脈において、「親水性機構」は、他のセットの材料特性を有する固体基板によって包囲または支持された、第1セットの材料特性を有する構造を参照する。構造および固体基板の材料特性は、構造が固体基板より濡れ性が高いように調整すべきである。換言すると、構造を構成する材料は、固体基板よりも水とのより小さい接触角を示すべきである。構造は、化学的及び／又は物理的手段によって定義できる。可能性のある構造の非限定セットは、(i) 周囲基板より親水性の高い材料で構成された閉じた平面的領域、(ii) 周囲基板に形成された窪み、突起またはその組合せであり、1つ以上の側面(side)が周囲基板より親水性の高い材料で構成される、を含む。例示の親水性機構の略図が図5に示される。S E L M Aの文脈において、親水性機構は、例えば、検体捕獲のために区別できる化学官能性を設けることによって、そして信号発生および検出のために液滴パターンを設けることによって、デジタル計数測定にとって適切な反応区画を提示するように操作してもよい。

10

【0055】

本文脈において、用語「平面的親水性機構」は、疎水性基板が平面的であり、疎水性基板に組み込まれた親水性機構が平面的である設計を参照する。平面性の理想的ケースを図5に示しているが、実用的応用では、平面性は、表面粗さの観点で定義する必要がある。例えば、疎水性基板および親水性機構は異なる材料で形成できるため、疎水性領域と親水性領域との間で高さに微細な差が存在するであろう。一実施形態において、平面的と考えられる親水性機構のための適切な基準は、疎水性領域と親水性領域との間の高さの差（代替的には表面粗さ）(Δh)は、特性機構サイズと比較して無視できるものにすべきであることであろう。半径 R_D を有する円形親水性機構の場合、基準は $R_D \gg \Delta h$ にできる。一実施形態において、20 nmより小さい Δh 値を示す機構は、平面的であると考えられる。

20

【0056】

本文脈において、用語「接触角」は、液体／蒸気／固体の界面で測定される特性角を参照する。液滴が固体表面の上に気相中に堆積される文脈において、接触角は、ライン上のポイントにある液体を介して測定され、液体／蒸気の界面は固体表面に出会う。文献(W. C. Bigelow, D.L. Pickett and W.A.J. Zisman in "Oleophobic monolayers I: Films adsorbed from solution in non-polar liquids" published in Journal of Colloid Science, vol. 1, pp. 513-538 (1946) (DOI: 10.1016/0095-8522(46)90059-1))で定義されるように、角度は、固体表面と液体界面の接線との間で測定される。例示の接触角の略図が図6において示される。

30

【0057】

本文脈において、用語「RH」は、「液体の気体成分の相対蒸気飽和」を意味し、用語「相対湿度」の一般化である。相対湿度は、水の部分蒸気圧(P_W)と大気中の水の飽和圧力(P_{SAT})との比率、即ち、 $RH = P_W / P_{SAT}$ として定義される。飽和圧力は、ここでは液体水と熱平衡にある水蒸気によって作用される部分圧力として定義される。RH値は、水以外の液体を含むように一般化できる。この場合、RHは、 P_W / P_{SAT} に等しいが、ここで P_W は、所定の液体の気体成分によって作用される部分圧力として理解することになり、 P_{SAT} は、所定の液体と熱平衡にある気体成分によって作用される部分圧力として理解することになる。部分圧力は、気相が幾つかの気体種によって構成される場合を参照する。こうしてRHは、対応する気相の蒸気飽和レベルの指標として考えられる。即ち、 $RH = 0$ では、気相は液体の気体成分を含んでおらず、一方、 $RH = 1$ では、気相は液体の気体成分の最大可能含有量を取り上げている。

40

【0058】

本文脈において、用語「RHI」は、「液体の気体成分の初期の相対蒸気飽和」を意味する。用語「液体の気体成分の初期の相対蒸気飽和」が適用される場合、それは、変化が起こりそうであり、熱平衡がまだ確立されていない状況を示す。例えば、もし P_{SAT} の特性飽和圧力を有する液体1が気相を含む閉じた環境に配置され、液体1の気体成分の部分圧力が P_1 である場合、 $P_1 < P_{SAT}$ であれば、液体は蒸発するようになる。こうし

50

て液体の気体成分の初期の相対蒸気飽和は、 $RHI = P_1 / P_{SAT}$ であり、その理由は、何れかの変化が起きる前にそれが計算されるためである。しかしながら、いったん液体1の蒸発が開始すると、RH値は、(i) 気相を飽和させる $RH = 1$ まで、または (ii) 全ての液体が蒸発するまで、RHI 値から徐々に増加するようになる。

【0059】

本文脈において、用語「最大液滴体積」は、最適な条件で調製した場合、単一の親水性機構が支持できる最大液体堆積を参照する。液滴からの液体の蒸発の文脈において、蒸発した液体の体積割合は、最大液滴体積に対して計算される。平面的円形親水性機構についての例示の最大液滴体積の略図が図6において示される。

【0060】

10

本文脈において、用語「凝集(aggregate)最大液滴体積」は、複数の液滴を含むパターンの最大液滴体積を一緒に加算することによって得られる体積の合計を参照する。パターンからの液体の蒸発の文脈において、蒸発した液体の体積割合は、凝集最大液滴体積に対して計算される。

【0061】

本文脈において、用語「サンプル」は、生物学的または化学的材料の収集物を参照し、これは研究室処理の対象であっても、そうでなくてもよい。サンプルは、液体または固体の形態を想定してもよく、デジタル計数のための入力として機能する特定の成分を含んでもよい。

【0062】

20

本文脈において、「少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプル」は、1つ以上の特異検体タイプを含有することが疑われるか、または1つ以上の特異検体タイプをサンプル中に1つ以上の特定の濃度で含有することが疑われる生物サンプルを参照する。

【0063】

本文脈において、用語「検体(analyte)」は、特異サンプル成分を参照し、これはデジタル計数測定で利用されることになる。検体は、生物学的または分子の性質のものであり、(i) 残りのサンプル材料から分離されることになり、及び/又は (ii) デジタル計数プロセスの際に明確に操作されることになる。

【0064】

本文脈において、用語「検体タイプ」は、特定のクラスまたは種の検体を参照する。例えば、2つの異なる検体タイプは、それぞれオリゴヌクレオチドおよびタンパク質でもよい。2つの異なる検体タイプの他の例は、タンパク質および細胞でもよいが、検体タイプはまた、例えば、2つの異なるタンパク質、2つの異なるオリゴヌクレオチドまたは2つの異なる細胞を参照してもよい。

30

【0065】

本文脈において、用語「捕獲プローブ」は、例えば、検体を反応区画に保持し及び/又は閉じ込めるために、検体の特異領域を認識し結合することが可能な分子性質の化学的または生物学的物質(agent)である。

【0066】

本文脈において、用語「標識(labeling)剤」は、検体の特異領域を認識し結合することが可能な分子性質の化学的または生物学的物質である。標識剤の結合領域は、捕獲プローブの結合領域とは異なり、そのためデジタル計数測定の際、捕獲プローブ/検体/標識剤/一複合体が確立できる。さらに、1つ以上の検体-結合様式(modalities)とは別に、標識剤は、1つ以上の検出様式を含む。用語「標識剤」はさらに、1つ以上の物質を参照し、これは、共に結合した場合、検体-結合様式および検出様式を提供する。

40

【0067】

本文脈において、用語「検出様式」は、検出器によって検出可能な信号の発生を介することが可能な生化学的、化学的、生物学的または物理的な部位(moiety)を参照する。信号は、性質が光学的、電気的または磁気的なものでもよい。さらに、検出様式は、信号発生を達成するために、検出剤に依拠してもよい。

50

【0068】

本文脈において、用語「検出剤」は、通常は分子性質の化合物を参照し、これは、適合した検出様式によって接触した場合、化学的または物理的状态を変化できる。検出剤の状態の変化は、適切な検出器によって記録され信号に転換できる。さらに、状態の変化を受けた検出剤は、レポータ分子または分子レポータと称してもよい。

【0069】

本文脈において、用語「検出可能濃度」または「最小検出可能濃度」は、反応区画に閉じ込められた分子レポータの最低濃度を参照し、これは適切な検出器によって検出可能にできる。濃度が検出可能になるために、分子レポータから得られる信号は、検出器のノイズレベルを超えることが必要である。一般に、分子レポータのより高い濃度は、検出器によって記録されるように、相応のより高い信号を生成する傾向がある。

10

【0070】

本文脈において、用語「個別の捕獲部位」は、検体を捕獲または付着できる固相上の特定の領域を参照する。捕獲部位領域は、検体タイプに特異的な捕獲プローブで機能化してもよい。固相は、個々の捕獲部位の領域が交差しないように、複数の個別の捕獲部位を表示する連続的な表面または基板でもよい。さらに、固相は、1つ以上のコロイド状ビーズで構成してもよく、ビーズの表面は捕獲プローブを用いて機能化されている。この場合、単一のビーズが単一の捕獲部位を構成し、例えば、液体中に浮遊したビーズの集合が複数の個別の捕獲部位を構成するであろう。

【0071】

20

本文脈において、用語「液体区画」は、個々の液体区画が、存在する他の液体区画から流体的に隔離されている液体の体積（典型的にはナノリットルからアトリットルの範囲）を参照する。

【0072】

本文脈において、用語「流体的に隔離された」は、1つの個々の区画からの液体内容物が、存在する他のどの区画にも容易に漏れることができないように調製された液体区画を参照する。液体区画は、例えば、バルク液体を、(i) ウェル／キャビティ／キャピラリーに、(i i) 各液体体積が表面張力によって所定場所に保持されるように、親水性機構を含む疎水性基板の上により小さな液体体積に、または、(i i i) エマルジョン液滴に、区分することによって流体的に隔離するようにしてもよい。

30

【0073】

本文脈において、用語「区画化」は、各体積が液体区画を形成するように、バルク液体およびその内容物をより小さな体積に区分するプロセスを参照する。

【0074】

本文脈において、用語「信号の起動」は、検出可能な信号を生成するために液体区画に閉じ込められた標識剤を誘発するプロセスを参照する。検出可能な信号は、標識剤の検出様式を適切な検出剤と接触させることによって誘発してもよい。そして検出様式は、検出剤を分子レポータに変換することができ、これは、液体区画の流体隔離性に起因して、検出可能な最小濃度の分子レポータが区画内に確立されるまで区画内に蓄積する。

【0075】

40

本文脈において、用語「信号の非活性化」は、それが閉じ込められている液体区画内で信号を起動する標識剤の能力を永久に無効にするプロセスを参照する。液体区画内で標識剤が信号を起動することを不可能にする1つの方法は、区画から標識剤を除去することでもよい。標識剤が液体区画内で信号を起動するのを不可能にする他の方法は、化学的、生化学的または物理的手段によって、検出剤を分子レポータに変換することができないように標識剤の検出様式を不可能にすることでもよい。

【0076】

本文脈において、用語「非特異的に結合した」は、例えば、空の捕獲部位に直接付着しており、よって捕獲された検体に直接付着していない標識剤を参照する。標識剤が、もし捕獲された検体の代わりに、捕獲された非ターゲット分子に付着している場合、標識剤は

50

非特異的に結合していると考えてもよい。非特異的に結合した標識剤を収容する液体区画が検体を捕獲しなかったが、依然として検出可能な信号を生成することができるため、非特異的に結合した標識剤は、誤りまたは偽ポジティブの信号を生成する。

【0077】

本文脈において、用語「計数誤差」または「デジタル計数誤差」は、例えば、非特異的に結合した標識剤から生じる偽ポジティブ信号を参照する。非特異的に結合した標識剤を収容し、捕獲された検体を収容していない液体区画は、それらが検体からの真の信号を表さないため、デジタル計数分析においてノイズと考えられる。例えば、標識剤は、(i) 検体／標識剤－複合体を形成することなく、捕獲部位に物理吸着または化学吸着されている場合、または (i i) 標識剤と、捕獲部位に存在する他の非ターゲット化合物／分子との間に複合体が形成されている場合、非特異的に結合すると考えられる。

10

【0078】

本文脈において、用語「偽ポジティブ検出サイクル」は、例えば、複数の捕獲部位を標識剤と接触させることなく、標識化または再標識化ステップが実行される検出サイクルを参照する。これにより偽ポジティブ信号（非特異的に結合した標識剤の形態）を検出することが可能になる。例えば、先行する検出サイクルにおいて、捕獲された検体に結合した標識剤が特異的に除去されるように信号非活性化ステップが実行された場合、非特異的に結合した標識剤は捕獲部位に残るであろう。標識化または再標識化ステップにおいて複数の捕獲部位に新しい標識剤が供給されないため、信号起動ステップは、非特異的に結合された標識剤を収容する液体区画からの検出可能な信号を生じさせるだけであり、こうして液体区画の検出を可能して、偽ポジティブ信号を提供する。偽ポジティブ検出サイクルの他の例は、検出サイクルを適用することによってサンプル中の非ターゲット化合物／分子の数の識別および定量化を可能にする。ここで標識化または再標識化ステップは、非ターゲット化合物／分子に対して特異的な標識剤を用いて行われる。

20

【0079】

本文脈において、用語「断続的な信号パターン」は、2つ以上の検出サイクルに曝された液体区画を参照し、液体区画はすべての検出サイクルにおいて信号を生成しなかった。例えば、もし4つの検出サイクルが実行され、液体区画が第2および第4の検出サイクルにおいてのみ信号を生成した場合、それは断続的な信号パターンを生じさせると考えられる。他方では、もし他の液体区画が4つの検出サイクルに曝され、そして全てのサイクルにおいて信号を生成した場合、それは断続的な信号パターンを生じさせるとは考えられず、その代わり信号を繰り返し生成すると考えられる。

30

【0080】

本文脈において、用語「フロー区画」は、ある区画を参照しており、これは、チャンネル形状でもよく、液体が複数の個別の捕獲部位と接触するように液体のフローを案内するように機能する。フロー区画は、液体がフロー区画に入ることができる入口と、液体がフロー区画から出ることができる出口とを有してもよい。入口と出口の間には、複数の個別の捕獲部位を配置してもよい。

【0081】

本文脈において、用語「フローシステム」は、1つ以上のフロー区画のアセンブリを参照し、これはさらに、液体を収容する1つ以上の貯留部(reservoir)と、液体を貯留部からフロー区画に分配するため、またはフロー区画への液体アクセスを許可または防止するための1つ以上のバルブまたはスイッチング機構とを含んでもよい。さらに、フローシステムはまた、フロー区画への液体フローを可能にするために、液体駆動ユニットを含んでもよく、またはそれに接続されてもよい。

40

【0082】

本文脈において、用語「気相シール」は、気相シールを確立するプロセスの結果を参照し、気相シールの目的は、液体区画からの蒸発を防止または低減することである。一実施形態において、プロセスは、フローシステム内に複数のナノリットルからアトリットルの液体区画を配置することによって開始され、フローシステムの寸法および複数の液体区画

50

の空間構成は、個々の液体区画の液体体積のほんの僅かな量だけが、フローシステムのフロー区画内の気相が液体の気体成分で飽和する前に蒸発してもよいように構成される。こうして蒸発した液体は、気相シールを確立し、これは、ナノリットルからアトリットルの液体区画が、蒸発することなく、フロー区画内で長期間に渡って安定に維持されることを確保できる。

【0083】

本文脈において、用語「固定化」は、例えば、検体などのサンプルからの可動(mobile)成分を固相に固定するプロセスを参照し、例えば、いったん固定されると、それがサンプル中に逆に拡散するのを防止している。

【0084】

ここで開示した本発明は、単一分子測定において、偽ポジティブ検出及び／又はノイズの低減／除去などの計数誤差を低減するための方法を提供するものであり、こうして改善した定量化、改善した感度および改善した特異性を可能にする。

【0085】

第1実施形態において、少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法が開示され、サンプルは、複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも1つの検体を捕獲可能であり、この方法は、少なくとも2つの検出サイクルを含み、各検出サイクルは、下記ステップを含む。

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

【0086】

ここで開示する実施形態において、捕獲部位は、信号起動プロセス中に液体区画によって包囲される。

【0087】

第1実施形態において、デジタル計数分析は、あるフォーマットで実行されるのに適しており、捕獲部位は基板に空洞、窪み／またはスルーホールとして設けられ、検出サイクルの個々のステップが、試薬溶液の複数の捕獲部位への吸引および分配によって、あるいは試薬溶液からの基板の完全な浸漬および引上げによって行われる。

【0088】

個別の捕獲部位は、固体基板、例えば、固体チップの表面の化学的パターニング、または、基板の地形学的パターニング、例えば、マイクロタイタープレート中のウェルによって提供できる。そして化学的パターンまたは地形学的パターンの機構は、表面を捕獲プローブで誘導体化することによってサンプルからの検体に結合する能力を示すことができる。個別の捕獲部位は、コロイドビーズの収集物または懸濁物としても提供してもよい。その場合、ビーズの表面が捕獲プローブで誘導体化されていれば、各ビーズは、単一の捕獲部位を構成する。

【0089】

更なる実施形態において、デジタル計数分析はまた、ここで説明するようなフロー区画において実行されるのに特に適しており、親水性機構は、複数の液体ナノリットルからアトリットル液滴を支持するように構成され、フロー区画はさらに、各ナノリットルからアトリットル液滴の蒸発を低減する気相シールを支持するように構成される。

【0090】

第2実施形態において、少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法が開示され、サンプルは複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも1つの検体を捕獲可能であり、この方法は、少なくとも2つの検出サイクルを含み、各検出サイクルは、標識剤を添加することによって少なくとも1つの検体を標識化し、そして、少なくとも1つの捕獲され標識化された検体を区画化して、少なくとも1つの検体を含む液体区画を生成するステップを含み、そして、ステップa) ~

10

20

30

40

50

c)を含む。

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

【0091】

第2実施形態において、デジタル計数分析は、あるフォーマットで実行されるのに適しており、検出サイクルの全てのステップおよび捕獲に至る全てのステップが、複数の捕獲部位を含む固体基板の上またはそれに隣接して起こり得る。基板は、例えば、親水性捕獲部位のパターンを備えた疎水性でもよく、その結果、基板からの試薬溶液の浸漬および引上げの際に捕獲区画上に液体区画が形成できる。

10

【0092】

第3実施形態において、少なくとも1つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法が開示され、サンプルは複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも1つの検体を捕獲可能であり、少なくとも1つの検体は、固相上の少なくとも1つの検体の捕獲前または捕獲中に、標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって標識化され、この方法は、少なくとも2つの検出サイクルを含み、少なくとも1つの捕獲され標識化された検体は、区画化され、少なくとも1つの検体を含む液体区画を生成し、そして、ステップa)～c)を含む。

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

20

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

追加の検出サイクルが行われる前に、ステップc)後に再標識化ステップが行われ、少なくとも1つの検体は、標識剤を添加することによって標識化される。

【0093】

第3実施形態において、デジタル計数分析は、あるフォーマットで実行されるのに適しており、初期の捕獲および標識化がバルク溶液中で行われ、検出サイクルおよび再標識化は検体及び／又は標識剤の区画化を含む。例えば、初期の捕獲および標識化は、コロイドビーズの収集物を複数の捕獲部位として使用し、コロイドビーズの収集物をサンプルおよび標識剤を含有する溶液中に浮遊させることによってすることによって実行してもよく、その結果、ビーズは、捕獲され標識化された検体を抱えることができる。次に、ビーズの収集物は、例えば、エマルジョン液滴中にカプセル化されることによって、または固体基材上の空洞、窪みまたはスルーホールに分散されることによって区画化してもよい。他の例は、検体を含有するサンプルが標識剤と混合され、複数の個別の捕獲部位を有する固体基板上に導入して、その結果、捕獲され標識化された検体は単一ステップで形成できるようにできる。

30

【0094】

一実施形態において、方法は、ターゲット検体が分析の第1ステップの1つにおいて固定化できるように、捕獲エレメントによるターゲット検体の捕獲を可能にするステップ(捕獲ステップ)を含む。捕獲エレメントは、必ずしもターゲットのみに特異的である必要はなく、非ターゲット化合物に対してある程度の交差反応性を示してもよい。

40

【0095】

固定化は、バルク溶液中で生じてもよいが、単一または少数のターゲット検体だけが液体区画内に閉じ込められた液体区画内で生じてもよい。一実施形態において、離散した捕獲部位の数はサンプル中の検体の数よりも多く、そのため各液体区画が、空(即ち、捕獲された検体がない)であるか、または装填(即ち、1つ以上の捕獲された検体)されている。未知の量の検体を備えたサンプルでは、この分布は、さらに希釈されたサンプルに対してここで開示する方法を実行することによって確保できる。液体区画当たりの捕獲検体の占有はランダムであり、ポアソン分布によって近似してもよい。

50

【0096】

捕獲エレメントは、例えば、タンパク質、ポリペプチドを含む非常に多様な化合物に結合可能である抗体、抗体フラグメントまたはアプタマーで構成してもよい。捕獲エレメントはまた、一本鎖もしくは二本鎖オリゴヌクレオチドまたはそれらの合成変異体でもよく、これらは配列相補性および／または鎖侵入(strand invasion)を介して他のオリゴヌクレオチドを捕獲してもよい。さらに、捕獲エレメントはまた、分子の全クラスに対して反応性のある化学種でもよく、例えば、タンパク質、アミノ酸、オリゴヌクレオチドなどでもよく、検体が捕獲部位に共有結合できるようにする。

【0097】

さらに一実施形態において、方法は、1つ以上の標識剤によってターゲット検体の標識化を達成する他のステップ（標識化ステップ）を含み、捕獲されたターゲット検体と1つ以上の標識剤との間に複合体(complex)が形成される。標識剤は、ターゲット検体と特異的に相互作用できるが、非ターゲット化合物ともより少ない程度で相互作用し得る。標識化反応は、バルク溶液中で生じてもよいが、液体区画中で生じてもよく、単一または少数のターゲット検体のみが液体区画内に固定化される。

10

【0098】

標識剤は、例えば、抗体、抗体フラグメントまたはアプタマーで構成してもよいが、一本鎖もしくは二本鎖オリゴヌクレオチドまたはそれらの合成変異体でもよい。標識剤は、検体に結合するための領域、および信号を提供または促進するための他の領域を含んでもよい。あるタイプの標識剤は、酵素または任意の他の（生物）化学触媒に結合した結合領域によって構成でき、酵素または触媒は信号生成を促進できる。

20

【0099】

バルク内で進行する標識化反応は、例えば、複数の捕獲部位を含有する固体基板を、標識剤を含有する溶液中に浸漬することによって、またはコロイドビーズの収集物（各ビーズは単一の捕獲部位を構成する）を標識剤の溶液中に浮遊させることによって生じてもよい。液体区画内で進行する標識化反応は、複数の液体区画を形成することによって生じてもよく、そこでは単一の液体区画は単一の捕獲要素を占有し、そして液体区画の液体が標識剤の溶液である。これは、（i）ウェルが捕獲部位を構成するマイクロタイタープレートのウェルに標識剤の溶液を分配することによって、（ii）コロイドビーズをカプセル封入する油中水型エマルジョン液滴を調製することによって（単一のビーズが単一の捕獲部位であり、ビーズは標識剤と共にカプセル封入される）、または（iii）複数の個別の親水性捕獲部位を含有する固体疎水性基板を標識剤の水溶液に浸漬し、続いて溶液から基板を引き上げ、その結果、親水性捕獲部位の上／中に液滴が形成されることによって、達成される。

30

【0100】

さらに一実施形態における方法は、単一または少数の固定化され標識化されたターゲット検体を収容する液体区画を生成し、1つ以上の標識剤を起動して検出可能な信号を生成するさらに他のステップ（検出ステップ）を含む。しかしながら、捕獲エレメントおよび標識剤の両方が非ターゲット化合物に対して親和性を示すことがあるため、（i）捕獲され標識化された非ターゲット化合物の複合体、および（ii）非特異的に結合した標識剤を収容する区画も起動されて、検出可能な信号を生成することがある。

40

【0101】

さらにまた、一実施形態における方法は、検出可能な信号を示す液体区画の数および空間位置を記録するさらに他のステップ（記録ステップ）を含む。

【0102】

さらにまた、一実施形態における方法は、捕獲され標識化されたターゲット検体から、そして捕獲され標識化された非ターゲット化合物から1つ以上の標識剤を除去するさらに他のステップ（非活性化ステップ）を含む。さらに、この方法は、以前に信号を生成した全ての標識剤の信号を生成する能力を非活性化することを含む。

【0103】

50

さらにまた、一実施形態における方法は、1つ以上のステップを1回以上繰り返すことを含む。第2のステップは、前回ステップと同じ標識剤を適用してもよく、あるいは異なる特異性を示す他のタイプの標識剤も適用してもよい。

【0104】

一実施形態において、本方法は、記録ステップの各繰り返しの間に信号ポジティブ液体区画の空間位置を比較することによって終了する。こうしてターゲット検体は、非ターゲット化合物および非特異的に結合した標識剤と区別でき、理由は、標識剤は、ターゲット検体を好ましく標識化するように選択されているためである。よってターゲット検体を収容する液体区画は、信号を一貫して繰り返し発生する傾向が高くなり、一方、非ターゲット化合物および非特異的に結合した標識剤を収容する液体区画は、信号を繰り返す傾向が低くなる。

10

【0105】

一実施形態において、サンプルおよび複数の個別の捕獲部位を有する固相は、少なくとも1つの検体の捕獲前または捕獲中に区画化される。

【0106】

捕獲部位上の検体の捕獲前または捕獲中での区画化は、例えば、(i) 検体を含む溶液をマイクロタイタープレートのウェル（単一ウェルが捕獲部位である）に分配すること、(ii) 油中水型エマルジョン液滴（各液滴は、検体を含む溶液およびコロイドビーズをカプセル封入する（ビーズは捕獲部位））を調製すること、または、(iii) 複数の個別の親水性捕獲部位を含む固体疎水性基板を、検体を含有する水溶液に浸漬し、続いて溶液から基板の引上げを行い、検体を含有する液滴が親水性捕獲部位の上／中に形成されること、によって達成してもよい。

20

【0107】

一実施形態において、捕獲された検体および標識剤は、少なくとも1つの検体の標識化の前または標識化の間に区画化される。

【0108】

捕獲された検体の標識化の前または標識化の間の区画化は、例えば、(i) 標識剤を含有する溶液をマイクロタイタープレートのウェル（単一ウェルが捕獲部位であり、ウェルのいくつかは捕獲された検体を含む）に分配すること、(ii) 油中水型エマルジョン液滴（各液滴は、コロイドビーズをカプセル封入し、ビーズは捕獲部位である）を調製すること、または、(iii) 複数の個別の親水性捕獲部位を含む固体疎水性基板を、標識剤の水溶液に浸漬し、続いて溶液から基板の引上げを行い、標識剤を含有する液滴が親水性捕獲部位の上／中に形成され、捕獲部位のいくつかは捕獲された検体を含むこと、によって達成してもよい。

30

【0109】

一実施形態において、捕獲され標識化された検体は、区画化され、少なくとも1つの検体を含む液体区画を生成する。

【0110】

捕獲され標識化された検体は、例えば、(i) 疎水性基板上にある複数の親水性捕獲部位を浸漬して引上げること（捕獲部位のいくつかは液体中に捕獲され標識化された検体を含有し、液体区画は、親水性捕獲部位の表面上に形成できる）、(ii) 捕獲され標識化された検体をカプセル封入する油中水型エマルジョン液滴を生成すること、または (iii) 捕獲され標識化された検体を基板上のウェルに分配することによって、区画化でき、液体区画を生成してもよい。

40

【0111】

一実施形態において、検体は、ステップ a) の前に各検出サイクルにおける標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって、標識化される。

【0112】

一実施形態において、固相上の検体の捕獲前または捕獲中に標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって、捕獲された検体が標識化され、ステップ c) は、追加の検

50

出サイクルが行われる前に行われ、続いて再標識化ステップが行われ、捕獲された検体は標識剤を添加することによって標識化される。

【0113】

いくつかの実施形態において、検体の標識化は、検体の捕獲前または捕獲と同時に実行してもよい。例えば、コロイドビーズ形態の捕獲部位は、(i) 検体が捕獲され、そして標識化される、または、(ii) 検体が標識化され、そして捕獲されるように、標識剤および検体を含有する溶液と混合してもよい。他の例は、標識剤および検体を含有する溶液を、複数の個別の捕獲部位を収容する固体基板に注入して、標識化および捕獲が同時に生ずるようにしてもよい。

【0114】

ここに開示する実施形態において、液体区画のせいぜい99%、例えば、せいぜい95%、せいぜい90%、せいぜい85%、せいぜい80%、せいぜい最大75%、せいぜい70%、せいぜい65%が、捕獲され標識化された検体を含む。

【0115】

定量的デジタル計数分析では、全ての捕獲部位が、捕獲され標識された検体を含まないことが好ましく、理由は、このことが全ての捕獲部位の飽和を導いて、全ての検体の正確な計数を阻害することがあるためである。正確な計数を達成するために、捕獲部位の少量は空にすべきであり、即ち、捕獲され標識化された検体を含まないようにすべきである。占有されおよび空の捕獲部位の最適分布に到達するために、関連したサンプルをいくつかの希釈で提供でき、それによって許容されまたは最適な分布を提供する希釈サンプルに対して計数を実行できる。空の捕獲部位の数を計数し、それを占有された捕獲部位の数と比較することによって、捕獲部位上の検体の総数は、統計的分析、例えば、ポアソン統計を用いることによって推定することが可能である。

【0116】

ここで開示する実施形態において、サンプルは、ターゲット検体および非ターゲット化合物を含み、または潜在的に含み、ターゲット検体は、捕獲部位によって捕獲効率 C_1 で捕獲され、非ターゲット化合物は、捕獲部位によって捕獲効率 C_2 ($C_1 \geq C_2$) で捕獲され、ターゲット検体は、第1標識剤によって標識効率 L_1 で標識化され、非ターゲット化合物は、第1標識剤によって標識効率 L_2 ($L_1 \geq L_2$) で標識化され、検出サイクル数 N_c は、下記の式で示す比 α が、

【0117】

【数1】

$$\alpha = \frac{C_1 L_1^{N_c}}{C_2 L_2^{N_c}}$$

1~10の間、好ましくは10~100の間、好ましくは100~1000の間、好ましくは1000~10000の間、好ましくは10000~100000の間、好ましくは100000~1000000の間、好ましくは1000000より大きいように調整され、そして各検出サイクルは、標識化ステップにおいて第1標識剤を適用する。

【0118】

ここに開示する実施形態において、該方法は、偽ポジティブ検出サイクルを含み、標識化ステップにおいて第1標識剤の代わりに第2標識剤が適用され、非ターゲット化合物は、標識効率 L_1 で第2標識剤によって標識化され、ターゲット検体は、第2標識剤によって標識効率 L_2 ($L_1 \geq L_2$) で標識化される。ここに開示する実施形態において、サンプル中に存在する非ターゲット化合物の数は、偽ポジティブ検出サイクルにおいて信号を示す捕獲部位の数から推定される。ここに開示する更なる実施形態において、サンプル中に存在するターゲット検体の数は、偽ポジティブ検出サイクルの前の全ての検出サイクルにおいて、信号を繰り返し示す捕獲部位の数から、およびサンプル中に存在する非ターゲット化合物の推定された数から推定される。

【0119】

ここに開示する実施形態において、該方法は、偽ポジティブ検出サイクルを含み、該方法は、いずれの標識化ステップを含まない。

【0120】

偽ポジティブ検出サイクルは、非特異的に結合した標識剤に由来する偽ポジティブ信号を識別し、分析から廃棄することを可能にしてもよい。例えば、一実施形態において、偽ポジティブ検出サイクルの前に、捕獲された検体からの特異的な除去によって、特異的に結合した標識剤を非活性化してもよい。偽ポジティブ検出サイクルの間は、捕獲された検体に新たな標識剤が導入されることはなく、よって非活性化ステップ後に残留した非特異的に結合した標識剤のみが起動されて、信号を生成できる。

【0121】

ここに開示する実施形態において、標識剤は検出様式(modality)を含み、信号を起動するステップは、検出剤を検出様式に配給することによる。

【0122】

一実施形態において、検出様式は、検出剤を分子レポータに連続的に変換することが可能な酵素または(生物)化学触媒によって構成してもよい。分子レポータは、光信号、電気信号、磁気信号、または撮像検出器を使用して検出可能な任意の他の信号を生成してもよい。分子レポータが液体区画内の検出様式によって連続的に生成される場合、分子レポータの濃度は、区画内の検出可能な濃度に急速に達成できる。

【0123】

ここに開示する実施形態において、検出サイクルは、少なくとも1つの捕獲され標識化された検体からの信号を起動する前に、検体を標識化しなかった標識剤を続いて除去するステップを含む。

【0124】

標識剤は、例えば、迅速な結合動態を可能にするためになど、高濃度で捕獲された検体に添加してもよい。その結果、過剰の標識剤は、標識化または再標識化ステップに続いて洗浄(flushing)することによって除去してもよい。

【0125】

ここに開示する実施形態において、結合していないサンプル成分は、捕獲された検体または捕獲され標識化された検体から除去される。

【0126】

サンプルは、化学材料または生物学的材料の複雑な混合物で構成されもよいが、検体のみがデジタル計数分析にとって興味があってもよい。よって、結合していないサンプル成分は、例えば、洗浄またはリンス処理によって、捕獲された検体または捕獲され標識化された検体から除去してもよい。

【0127】

ここに開示する実施形態において、信号の非活性化ステップは、下記から選択される。

- a) 捕獲された検体から標識剤を分離するステップ。
- b) 標識剤が信号を促進する能力を非活性化させるステップ。または、
- c) a) および b) の組合せ。

ここで、信号の非活性化ステップの後、必要に応じてリンスステップが行われる。

【0128】

捕獲された検体からの標識剤の分離は、捕獲された検体に対する標識剤の結合能力を分裂することによって達成できる。分離は、例えば、温度を上昇させたり、捕獲され標識化された検体を収容する液体の化学的組成を変化させたり、または捕獲された検体から標識剤を生化学的もしくは化学的に切除することによって実行してもよい。分離プロセスが実行可能であるためには、捕獲部位への捕獲された検体の結合を分裂させるべきではない。分離に寄与する有用な化学物質は、種々のカオトロピック(chaotropic)物質(即ち、その存在がエントロピーの増加をもたらす物質)である。有用なカオトロピック剤は、例えば、*n*-ブタノール、エタノール、塩化グアニジン、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、塩化マグネシウム、フェノール、2-プロパノール、ドデシル硫酸ナトリウム、チオ尿素、

10

20

30

40

50

および尿素からなるグループから選択される。

【0129】

信号を介在する標識剤の能力の非活性化は、標識剤の検出様式を分裂することによって達成してもよい。例えば、検出様式が酵素で構成される場合、検出剤を分子レポータに変換する酵素の能力は分裂されるべきである。これは、通常、酵素の分子機構の知識を必要とするが、当業者に知られているいくつかの方法が存在する。例えば、アルカリホスファターゼ酵素をエチレンジアミン四酢酸（EDTA）で処理することにより非活性化でき、あるいは西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素をフェノール溶液で処理することにより非活性化できる。

【0130】

標識剤の分離は、特異的に結合した標識剤の選択的除去にとって有用となり得るが、標識剤の信号介在能力の非活性化は、非特異的に結合した標識剤から信号を除去するために有用となり得る。非特異的に結合した標識剤は、例えば、捕獲された検体ではなく、捕獲部位の表面に付着してもよく、こうして潜在的に標識剤を特定の分離手順に対して耐性に行うことができる。その結果、非特異的に結合した標識剤の信号介在能力を非活性化することによって、標識剤は、後続の検出サイクルにおいて偽ポジティブ信号を生成しなくなる。

【0131】

ここに開示する実施形態において、該方法は、サンプルからの少なくとも1つの検体の捕獲は、固相への固定化による。

【0132】

ここに開示する実施形態において、該方法は、サンプルから少なくとも1つの検体の捕獲は、検体に特異的な1つ以上の捕獲プローブを使用することによるものであり、捕獲プローブは固相に付着されている。

【0133】

ここに開示する実施形態において、第1の数の検出サイクルおよび第2の数の検出サイクルが使用され、第1の数の検出サイクルは、第2の数の検出サイクルとは異なる標識剤を使用する。

【0134】

異なるタイプの捕獲された検体を標識化し、または同じタイプの捕獲された検体を異なる標識剤で標識化するためなど、異なる検出サイクルで異なるタイプの標識剤が使用できる。第1プロセスは、多数の異なる検体タイプの検出に有用になり、一方、前者のプロセスは、(i) 特定の検体の同一性を確認するため、または(ii) 捕獲部位上の非ターゲット化合物の存在を定量化するために、有用になり得る。

【0135】

ここに開示する実施形態において、1つ以上の異なる検体タイプ用の1つ以上の異なる捕獲プローブが固相に付着している。

【0136】

複数の捕獲部位は、捕獲部位の領域または集合に分割してもよく、各領域または集合は、それに付着している捕獲プローブのタイプによって他のものと区別される。こうして非極めて多数の異なる検体タイプが捕獲され編成可能になり、デジタル計数分析が、同じ測定においていくつかの異なる検体タイプの定量化を可能にできる。

【0137】

ここに開示する実施形態において、1つ以上の異なる標識剤を使用して、1つ以上の異なる検体タイプを標識化する。

【0138】

一実施形態において、複数の捕獲部位が、異なる捕獲プローブを備えたいくつかの領域を示し、いくつかの検体タイプがいくつかの領域に捕獲されている場合、標識化または再標識化ステップの際、複数の捕獲部位を異なるタイプの標識剤の集合で補足することが有用となり得る。これは、複数の捕獲部位に存在する全ての異なる検体タイプの同時標識化を可能にし、よってデジタル計数分析の多重化能力を改善する。

10

20

30

40

50

【0139】

ここに開示する実施形態において、検出サイクルの数は、少なくとも3サイクル、少なくとも4サイクル、少なくとも5サイクル、少なくとも6サイクル、少なくとも7サイクル、少なくとも8サイクル、少なくとも9サイクル、または少なくとも10サイクルである。

【0140】

ここに開示する実施形態において、検出サイクル数は、3～20サイクル、3～15サイクル、3～10サイクル、3～9サイクル、3～8サイクル、3～7サイクル、3～6サイクル、または3～5サイクルである。

【0141】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、洗浄によって除去される。

【0142】

ここに開示する実施形態において、信号を非活性化するステップは、複数の液体区画において実施される。

【0143】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、分離は、酵素的開裂によるものである。

【0144】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、分離は、pHを調整したり、イオン強度を調整したり、変性塩を添加し、または界面活性剤を添加することによって、化学的開裂または脱着によるものである。

【0145】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、分離は加熱によるものである。

【0146】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、その化学的状態または物理的状态を変化させることによって非活性化される。

【0147】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、酵素を含み、酵素の状態は、活性部位の化学的修飾または生化学的修飾によって変化する。

【0148】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、酵素を含み、酵素の状態は、酵素の三次構造の化学的分裂または物理的分裂によって変化する。

【0149】

ここに開示する実施形態において、捕獲され標識化された検体は、親水性液体を複数の個別の捕獲部位に導入して引き出すことによって区画化されて、捕獲され標識化された検体を収容する液体区画を生成し、各個別の捕獲部位は親水性にされており、複数の個別の捕獲部位が疎水性基板上に配置され、そのため親水性液体を引き出す際、複数の液滴が形成され、各液滴が1つの個別の捕獲部位を占有する。

【0150】

ここに開示する実施形態において、捕獲され標識化された検体は、複数の個別の捕獲部位に第1親水性液体を導入し、続いて第1親水性液体を第2液体と置換することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、2つの液体は非混和性であり、第2液体は第1液体よりも軽く、各個別の捕獲部位が親水性にされており、複数の個別の捕獲部位が疎水性基板上に配置され、そのため第1親水性液体を第2液体と置換する際、第1親水性液体を含む複数の液滴が形成され、各液滴は1つの個別の捕獲部位を占有する。

【0151】

ここに開示する実施形態において、捕獲され標識化された検体は、第1液体を複数の個別の捕獲部位に導入することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、

10

20

30

40

50

各個別の捕獲部位はウェル形状または毛細管形状であり、第1液体は第2液体と置換され、2つの液体は非混和性であり、第2液体は第1液体よりも軽く、そのため第1液体の置換の際、第1液体を含む複数の液滴が形成され、各液滴は1つの個別の捕獲部位を占有する。

【0152】

ここに開示する実施形態において、捕獲され標識化された検体は、液体を複数の個別の捕獲部位に導入することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、各個別の捕獲部位はウェル形状または毛細管形状であり、液体は個別の捕獲部位に分配され、そのため各液体区画は1つの個別の捕獲部位を占有する。

【0153】

ここに開示する実施形態において、捕獲され標識化された検体は、液体を複数の個別の捕獲部位に導入することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、各個別の捕獲部位はウェル形状であり、液体は、蓋を複数の捕獲部位の上に付与することによって置換され、そのため複数の捕獲部位が形成され、各液滴は、蓋によって境界設定された1つのウェル形状の捕獲部位を占有する。

【0154】

ここに開示する実施形態において、捕獲され標識化された検体は、複数の個別の捕獲部位および捕獲され標識化された検体を含む第1液体を第2液体に導入することによって区画化されて、捕獲され標識化された検体を収容する液体区画を生成し、第2液体は第1液体と非混和性であり、そのため第1液体で構成され、第2液体によって包囲された複数のエマルジョン液滴が形成され、各エマルジョン液滴は、少なくとも1つの個別の捕獲部位および少なくとも1つの捕獲され標識化された検体を含む。

【0155】

ここに開示する実施形態において、各検出サイクルにおいて信号を示す液体区画の位置は、他の検出サイクルにおいて信号を示す液体区画の位置と比較され、その結果、液体区画が信号を示す連続的な検出サイクルの数が計数され、液体区画は、少なくとも2つのカテゴリーに分類され、液体区画の第1カテゴリーは第2カテゴリーよりも多い計数を示す。

【0156】

液体区画が信号を示す回数は、区画内での捕獲された化合物の同一性に関連している。例えば、検体が捕獲された捕獲部位および非ターゲット化合物が捕獲された別の捕獲部位を考える。検体はオリゴヌクレオチドでもよく、その配列は、単一ヌクレオチド多型など、一塩基対変化を含み、そして非ターゲット化合物は、検体と同じ配列を有するが、単一ヌクレオチド多型を有さず、即ち、野生型配列を有するオリゴヌクレオチドでもよい。本実施形態において、両方の捕獲部位が検体に特異的な標識剤を受容した場合、検体は優先的に標識化される。しかしながら、非ターゲット化合物もまた標識化されてもよいが、効率は低い。このようにターゲット検体を収容する液体区画は、検出サイクルの全てまたは大部分において信号を示すことがあり、そして非ターゲット化合物を収容する液体区画は、検出サイクルの全てまたは大部分において信号を示さない。各液体区画が信号を示した検出サイクル数を比較することによって、検体を収容する区画は、非ターゲット化合物を収容する区画から区別可能になる。

【0157】

ここに開示する実施形態において、連続検出サイクルにおいて信号を繰り返し示す液体区画の数は、サンプル中のターゲット検体の濃度を計算するために適用される。

【0158】

ここに開示する実施形態において、個別の捕獲部位の数は、少なくとも1000個、好ましくは少なくとも10000個、好ましくは少なくとも100000個、好ましくは少なくとも1000000個、好ましくは少なくとも10000000個である。

【0159】

ここに開示する実施形態において、個別の捕獲部位は、円形または球状であり、個々の

10

20

30

40

50

個別の部位の直径は、1 mm未満、好ましくは100 μm未満、好ましくは10 μm未満、好ましくは1 μm未満である。

【0160】

円形の捕獲部位は、固体基板の化学的パターニングまたは地形学的パターニングによって形成してもよく、一方、球状の捕獲部位は、コロイドビーズの集合体によって構成してもよい。

【0161】

ここに開示する実施形態において、個別の捕獲部位は、円形または球状であり、個別の部位の直径は、0.5~5 μm、0.5~10 μm、0.5~50 μm、0.5~100 μm、10~1000 μm、50~1000 μm、100~1000 μmの間である。

10

【0162】

ここに開示する実施形態において、個別の捕獲部位は、正方形(quadratic)であり、個別の部位の長さは、1 mm未満、好ましくは100 μm未満、好ましくは10 μm未満、好ましくは1 μm未満である。

【0163】

ここに開示する実施形態において、個別の捕獲部位は、正方形(quadratic)であり、個別の部位の長さは、0.5~5 μm、0.5~10 μm、0.5~50 μm、0.5~100 μm、10~1000 μm、50~1000 μm、100~1000 μmの間である。

【0164】

ここに開示する実施形態において、固相は、下記のものである。

- a) 固体基板、
- b) コロイドビーズ、または、
- c) コロイドビーズの集合体。

20

【0165】

ここに開示する実施形態において、液体区画は、気相シール下の複数の液体ナノリットルからアトリットル液滴の形態である。

【0166】

ここに開示する実施形態において、液体区画は、ウェル形状の捕獲部位、空洞形状の捕獲部位、または毛細管形状の捕獲部位を占有する。

30

【0167】

ここに開示する実施形態において、液体区画は、複数の油中水型エマルジョン液滴の形態である。

【0168】

ここに開示する実施形態において、液体区画は、水非混和性の液相の下で複数の水性ナノリットルからアトリットル液滴の形態である。

【0169】

ここに開示する実施形態において、デジタル計数は、サンプル中の1つ以上の検体タイプのデジタル計数のためのフローシステムにおいて行われ、フローシステムは、疎水性基板の内または上に親水性機構のパターンを有する支持体を備え、疎水性基板は、少なくとも1つの開口を含むフロー区画内に埋め込まれ、親水性機構は、最大液滴体積をそれぞれ有する複数の液体ナノリットルからアトリットル液滴を支持するように構成され、そしてフロー区画は、各ナノリットルからアトリットル液滴の蒸発を低減する気相シールを支持するように構成される。

40

【0170】

ここに開示する実施形態において、気相シールは、マイクロ液滴の蒸発を低減できるフローシステム内の蒸気圧を確立する。

【0171】

ここに開示する実施形態において、気相シールは、各ナノリットルからアトリットル液滴の蒸発を最大液滴体積の50パーセント未満まで減少させる。

50

【0172】

一実施形態において、ここに開示する方法は、(i)疎水性基板の内または上にある親水性機構のパターンを、1つ以上の検体タイプを含むサンプルと接触させるステップを含む。

【0173】

一実施形態において、ここに開示する方法は、(ii)親水性機構の上に1つ以上の検体タイプを捕獲するステップを含む。

【0174】

一実施形態において、ここに開示する方法は、(iii)少なくとも1つの捕獲された検体タイプを、検出対象の検体タイプに特異的な標識剤で標識化するステップを含む。

10

【0175】

ここに開示する実施形態において、捕獲され標識化された検体は、検出剤を、パターンを横断するように流し、パターンから引き出して、個々の液滴をナノリットルからアトリットル液滴の形態に生成するステップ(iv)によって、区画化されて、少なくとも1つの検体を収容する液体区画を生成する。

【0176】

ここに開示する実施形態において、該方法は、標識剤と検出剤の両方を収容する液滴の数を計数するステップ(v)を含む。

【0177】

ここに開示する実施形態において、該方法は、ステップ(iii)、(iv)および(v)を1回以上繰り返すことを含む。

20

【0178】

ここに開示する実施形態において、該方法は、第1標識剤の代わりに、検出対象の第2検体タイプに特異的な第2標識剤を使用することによって、ステップ(iii)、(iv)および(v)を繰り返すことを含む。

【0179】

ここに開示する実施形態において、該方法は、ステップ(iii)、(iv)および(v)を繰り返す前に、前回のステップに存在する標識剤を非活性化させるステップを含む。

【0180】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、そしてフローシステムの洗浄によって除去される。

30

【0181】

ここに開示する実施形態において、標識剤は、酵素および特定の検体認識部位(moiety)を含み、検体認識部位は、下記の分子グループ、即ち、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、アプタマー、抗体、それらの複合体またはそれらの合成変異体から選択される。

【0182】

ここに開示する実施形態において、個別の捕獲部位は、親水性機構である。

【0183】

ここに開示する実施形態において、1つ以上の異なる検体タイプのための1つ以上の捕獲プローブが、親水性機構に付着している。

40

【0184】

ここに開示する実施形態において、該方法は、親水性機構に付着した2つ以上のタイプの捕獲プローブを含み、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域内に配置される。

【0185】

ここに開示する実施形態において、捕獲プローブは、下記のプローブグループ、即ち、オリゴヌクレオチド、アプタマー、タンパク質、抗体、ペプチドまたはそれらの合成変異体から選択される。

【0186】

50

ここに開示する実施形態において、液体中に1つ以上のタイプの検体を含有するサンプルは、完全浸漬によって親水性機構を含む基板と接触する。

【0187】

ここに開示する実施形態において、標識化は、検体のための標識剤を含有する溶液を、捕獲された検体と完全浸漬によって接触させることによって行われる。

【0188】

ここに開示する実施形態において、検体は、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドの配列は、例えば、単一ヌクレオチドの多型、挿入または欠失など、1つ以上の塩基対変化を有するゲノム配列または転写ゲノム配列である。

【0189】

ここに開示する実施形態において、検体は、下記の検体グループ、即ち、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質、タンパク質／オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質／脂質複合体、ペプチド、エキソソーム、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、ナノ粒子、細胞断片または細胞から選択される。

【0190】

ここに開示する実施形態において、サンプルは、全血、血漿または血清に由来する。

【0191】

ここに開示する実施形態において、サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または組織から選択される。

【0192】

ここに開示する実施形態において、サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または組織、の研究室処理サンプルから選択される。

【0193】

ここに開示する実施形態において、デジタル計数分析は、単一分子の検出と定量化の両方を含む。

【0194】

ここに開示する実施形態において、捕獲された検体は、捕獲の後に捕獲プローブと共有結合するようになる。

【0195】

捕獲された検体と固相との間の共有結合は、信号を非活性化するステップの際に捕獲された検体が固相から分離しないことを確保する。一実施形態において、非活性化ステップは、捕獲された検体から標識剤を除去するように機能するが、捕獲された検体を固相上に保存するような方法で実施されるべきである。共有結合は、大部分の条件下で捕獲された検体を固相上に保持するのに十分に強いため、標識剤を分離するために適用される条件に関してより高い柔軟性を提供できる。

【0196】

ここに開示する実施形態において、捕獲プローブは、オリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドであり、検体は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む分子複合体であり、検体は、捕獲プローブ配列に対して相補的な配列を介して捕獲プローブと結合され、共有結合架橋は、鎖間架橋剤、例えば、白金錯体、マイトマイシンC、ナイトロジェンマスタード、ソラレンまたはアルデヒドなどを使用することによって実行される。

【0197】

ここに開示する実施形態において、捕獲プローブは、タンパク質、アプタマー、ペプチドまたはその合成変異体であり、検体は、タンパク質、ペプチドまたは、タンパク質もしくはペプチドを含む複合体であり、検体は、検体の特異領域の構造的認識によって捕獲プローブに結合され、共有結合架橋は、化学固定剤、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウム、メチルグリオキサールまたは酢酸ウラニルなどを使用することによって実行される。

10

20

30

40

50

【0198】

ここに開示する実施形態において、捕獲プローブは、合成オリゴヌクレオチドであり、合成修飾は、捕獲の後に検体と捕獲プローブとの間に共有結合が確立できるように検体に対して反応性の化学基を組み込む。ここに開示する実施形態において、検体と捕獲プローブとの間の共有結合は、検体／捕獲プローブ複合体を化学物質と接触させることによって起動される。ここに開示する実施形態において、検体と捕獲プローブとの間の共有結合は、検体／捕獲プローブ複合体を電磁放射線と接触させることによって起動される。

【0199】

ここに開示する実施形態において、分析は、単一分子デジタル計数分析である。ここに開示する更なる実施形態において、デジタル計数測定は、単一酵素結合分子分析（S E L M A）、デジタルポリメラーゼ連鎖反応（d P C R）、単一酵素結合免疫吸着法（s E L I S A）またはデジタル単一酵素結合免疫吸着法（d E L I S A）を含む。

10

【0200】

ここに開示する実施形態において、少なくとも1つの検体は、オリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドの配列は、例えば、単一ヌクレオチドの多型、挿入または欠失など、1つ以上の塩基対変化を有するゲノム配列または転写ゲノム配列であり、サンプルは、潜在的に、2つ以上の非ターゲットオリゴヌクレオチドを含み、非ターゲットオリゴヌクレオチドは、ターゲットと同じゲノム配列または転写されたゲノム配列を有するが、1つ以上の塩基対変化を伴わない。

20

【0201】

ここに開示する実施形態において、サンプルは、第1および第2検体タイプを含み、第1検体タイプはサンプル中に第1配列および第1濃度を有し、第2検体タイプはサンプル中に第2配列および第2濃度を有し、第1配列および第2配列は異なり、第1および第2配列はゲノム配列または転写されたゲノム配列であり、ここに開示するように、第1および第2濃度は測定され、互いに比較してコピー数の変動を識別する。

【0202】

ここに開示する実施形態において、気相は、大気によって提供され、捕獲プローブは一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択され、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置され、検体は、処理した血液サンプルから抽出された一本鎖DNAであり、標識剤は、検出様式(modality)および認識部位を備え、検出様式は酵素であり、認識部位は、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択される。

30

【0203】

デジタル計数測定は、単一検体分子が直接に検出可能であり、よってサンプル中のその濃度を決定するように計数可能にする。デジタル計数測定は、デジタルポリメラーゼ連鎖反応（d P C R）、デジタル酵素結合免疫吸着法（d E L I S A）、およびその変形において適用される。d P C Rでは、単一ヌクレオチド検体が反応区画に隔離され、ポリメラーゼ支援ヌクレオチド増幅およびアンプリコン(amplicon)の蛍光標識化に曝される。d E L I S Aでは、単一タンパク質／ペプチド検体がマイクロコロイド粒子の表面に捕獲され、酵素標識抗体(enzyme-conjugated antibody)を用いて標識化され、顕微鏡的反応区画に隔離され、検出試薬が供給される。検出試薬は、酵素によって処理された場合、光学信号（例えば、蛍光、化学発光、吸光度）を発生し、これは、反応区画の顕微鏡的体積に起因して検出可能濃度に迅速に到達する。デジタル計数測定の原理は、図8において概説している。

40

【0204】

ここで開示する実施形態において、ここで説明するようなフローシステムを用いて所定の検体のデジタル計数測定を実行するには、少なくとも下記の3つの一般ステップが必要であり、即ち、（1）検体捕獲、（2）検体標識化、（3）検体計数、例えば、図9の略図を参照。ステップ1において、サンプルからの検体は、親水性機構の上に特異的に捕獲される状態になる。ステップ2において、捕獲された検体は、適切な薬剤、例えば、酵素

50

複合体(enzyme-conjugate)を用いて特異的に標識化される状態になる。ステップ3において、マイクロ液滴のアレイは、液体が検出剤を含むように形成される。標識剤が酵素である場合、検出剤は、酵素のための蛍光性／発色性／化学発光性の基板にできる。基板の処理時に、検出可能な光学信号が液滴中に生成され、これは、標識剤および検出試薬の両方を初期に抱えていた。次に、信号を生成する液滴が、アレイの光学イメージングによって計数できる。

【0205】

一実施形態において、フローシステムは、1つ以上の区別できる検体タイプのための1つ以上の捕獲プローブを備え、捕獲プローブは、親水性機構に付着される。更なる実施形態において、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置される。

10

【0206】

dPCRおよびマイクロコロイド支援dELISAに対する本発明の利点が、検体が親水性機構の上に特異的に捕獲、編成される状態になれることである。これは、(i)単一測定でのいくつかの異なる検体タイプを測定する場合、および(ii)繰り返し測定が要望される場合に評価される。

【0207】

第1のケースでは、異なる捕獲プローブがフロー区画内の異なる領域に配置でき、そのため一方の検体タイプに特異的な捕獲プローブが第1領域に局所化され、他の検体タイプに特異的な他の捕獲プローブが第2領域に局所化され、以下同様である。これは、数百のターゲット検体が単一測定で検出できるDNAおよびタンパク質のマイクロアレイ研究の分野において周知の戦略であり、例えば、文献(Weinrich, D. et al entitled "Applications of Protein Biochips in Biomedical and Biotechnological Research" published in Angewandte Chemie International Edition (2009), vol. 48, pp. 7744-7751. (DOI: 10.1002/anie.200901480))を参照。

20

【0208】

第2のケースでは、標識剤および検出剤を除去し、これらをフローシステムに再導入することによって、デジタル計数を繰り返すことが可能である。捕獲した検体は、親水性機構の上に固定された状態で残留し、例えば、信号対ノイズ比を改善するために、デジタル計数測定を繰り返すことができ、例5を参照。これは、dPCRまたはdELISAでは可能ではなく、その理由は、検体を除去することなく、標識剤および検出剤が除去できないためである。

30

【0209】

一実施形態において、1つ以上の区別できる検体タイプのための1つ以上の捕獲プローブは、リンカー(linker)部位によって親水性機構に付着される。リンカー分子は、多くの場合、親水性機構の硬い無機表面を柔軟な有機捕獲プローブに接続するように機能する。こうしてリンカー分子は、捕獲プローブを表面に接続するために、二重化学官能性を含むことができる。リンカー分子は、ポリ(エチレングリコール)ポリマーであるように選択でき、これは柔軟かつ不活性で親水性である。これらはまた、直線アルカン鎖であるように選択できる。ポリ(エチレングリコール)リンカーは、異なるサイズ／長さに調製でき、よって表面と捕獲プローブとの間により大きい分離を提供し、一方、アルカン鎖は一般的により短い。他のリンカー分子は、これに限定されないが、ポリペプチドまたはオリゴヌクレオチドを含む。リンカー分子に存在する化学官能性は、反応性化学基、例えば、アルデヒド、アルキン、アミン、アジド、ビオチン、Boc/Fmoc保護アミン、カルボン酸、エポキシド、ヒドラジド、ヒドロキシル、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド、チオール、ビニルスルホンおよびその変異体などの大きな選択から選択できる。

40

【0210】

一実施形態において、2つ以上のタイプの捕獲プローブが親水性機構に付着され、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置される。一実施形態において、捕獲プローブは、下記のプローブグループ、即ち、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、またはその合成変異体から選択される。

50

【0211】

捕獲プローブがオリゴヌクレオチドである場合、プローブは、他のオリゴヌクレオチドを捕獲することができ、これは、相補配列を捕獲プローブのそれに提示する。合成オリゴヌクレオチド変異体、例えば、ロックド(locked)核酸(LNA)またはペプチド核酸(PNA)などは、ストランド侵入特性を示し、一本鎖または二本鎖のDNAを捕獲するためにも利用できる。アプタマー(aptamer)も、タンパク質またはペプチドの捕獲を可能にする捕獲プローブとして利用できる。さらに、抗体または抗体の断片が、タンパク質、ペプチドまたは小分子の特異的捕獲に介在するために、捕獲プローブとして使用できる。

【0212】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、(i)疎水性基板の中または上にある親水性機構のパターンを、1つ以上の検体タイプを含むサンプルに接触させるステップを含む。

10

【0213】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、(ii)親水性機構の上で少なくとも1つの検体タイプを捕獲するステップを含む。

【0214】

多数の検体タイプが、親水性機構の上で捕獲することができ、これらは、より詳細に前述したように、(生)化学的機能化が施されている。例えば、オリゴヌクレオチド系検体、例えば、RNA、mRNA、ウイルスRNA、DNA、ウイルスDNA、バクテリアDNA、DNA/RNA複合体またはタンパク質/DNA/RNA複合体などを特異的に捕獲するためには、相補オリゴヌクレオチド配列を提示するオリゴヌクレオチド系捕獲プローブを検体のものに付与することが必要であろう。タンパク質系またはペプチド系の検体またはその複合体を特異的に捕獲するためには、抗体系またはアプタマー系の捕獲プローブを付与することが必要であり、これは検体の三次構造、即ち、抗原/抗体会合を特異的に認識する。全体の生物学的実体またはマクロ分子集合体、例えば、細胞、バクテリア、ウイルス、ウイルス様粒子、ナノ粒子、または細胞断片などを含む検体は、検体によって提示された抗原を特異的にターゲットにする抗体を使用することによって、同じ方法で捕獲できる。代替として、上述した検体タイプは、捕獲プローブの支援なしで捕獲できるが、代わりにマイクロ液滴のサイズ(即ち、 V_D 値)を検体のサイズに整合させることによって捕獲でき、そのため1つの検体だけが液滴の中に存在できるようになる。

20

30

【0215】

さらに、捕獲プローブは、捕獲に介在するヘルパープローブを用いて補完でき、そのためヘルパープローブは、最初に検体に特異的に結合し、次に表面で捕獲プローブに特異的に結合し、こうして繫留網(tether)として機能する。例えば、図9の略図を参照。

【0216】

さらに、上述した検体タイプの全ては、ヘテロ二機能性化学架橋結合剤を用いて親水性機構の上で非特異的に捕獲でき、そのため架橋結合剤の一端が検体に結合し、他端が表面に結合する。

【0217】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、(iii)少なくとも1つの捕獲された検体タイプを、検出される検体タイプに特異的な標識剤を用いて標識化するステップを含む。

40

【0218】

標識剤は、検体の特異的標識化に介在するために、捕獲プローブと同じ方法で選択することができる。例えば、検体がオリゴヌクレオチドである場合、捕獲プローブおよび標識剤の両方が、オリゴヌクレオチドまたはその合成変異体でもよい。この場合、捕獲プローブは、検体上の一方の特異配列を認識でき、標識剤は、他方の特異配列を認識できる。標識剤は、検体の特異認識のための一方のモジュールおよび検体の後続検出のための他方のモジュールを含んでもよい。標識剤の少なくとも3つのクラスがこれらの基準、即ち、酵素共役オリゴヌクレオチド、酵素共役タンパク質/ペプチドまたは酵素共役アプタマーを

50

成就する。検体認識モジュールは、オリゴヌクレオチド、タンパク質／ペプチドまたは Aptamer によってそれぞれ提供され、一方、検出モジュールは、酵素によって提供される。

【0219】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、(iv) 検出剤を、パターンを横断して流し、パターンから引き出して、個々の液滴をナノリットルからアトリットルの液滴の形態に生成するステップを含む。

【0220】

検出剤を含む水性マイクロ液滴の形成とともに、標識剤および検出剤の両方を提示する液滴のサブセットにおいて信号発生を起動することが可能である。標識剤が酵素を含む場合、適切な検出試薬が、酵素的処理に応答して光学信号を発生できる任意の適合した酵素基板でもよい。例えば、酵素がペルオキシダーゼのクラスに属する場合、適切な検出剤は、ABTS (2, 2'-アジノビス [3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸] -ニアンモニウム塩)、OPD (o-フェニレンジアミン二塩酸塩)、TMB (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン)、そして下記の商標名製品 Quantablu、Quantaread、Amplex UltraRed または SuperSignal ELISA pico/femto を含む。酵素がホスファターゼのクラスに属する場合、適切な検出剤は、PNPP (p-ニトロフェノールりん酸)、4-MUP (りん酸 4-メチルウンベリフェリル)、BCIP/NBT (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルりん酸/ニトロブルーテトラゾリウム)、そして下記の商標名製品 CSPD、CPD Star または Dynalight を含む。酵素がガラクトシダーゼのクラスに属する場合、適切な検出剤は、FDG (フルオレセイン-β-D-ガラクトピラノシド)、DDAO ガラクトシド (9H-(1, 3-ジクロロ-9, 9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル) β-D-ガラクトピラノシド)、MUG (4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド)、ONPG (o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド)、レスルフィン β-D-ガラクトピラノシド、X-Gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル β-D-ガラクトピラノシド)、そして下記の商標名製品 Galacton-Star または Bluogal を含む。さらに、任意の ELISA 適合酵素/基板のペアが適用できる。

【0221】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、(v) 標識剤および検出剤の両方を収容する液滴の数を計数するステップを含む。

【0222】

光学信号を示す液滴の計数は、例えば、光学顕微鏡などのイメージングデバイスの支援で最も便利に実行される。顕微鏡を用いて、個々の液滴が画像化でき、その信号レベルが顕微鏡写真の相対強度単位から評価される。信号が実際に化学発光または蛍光である場合、撮影した顕微鏡写真は、蛍光フィルタセットを用いて記録できる。さらに、例 4 に示すように、蛍光顕微鏡写真は、同じ位置で撮影した明視野顕微鏡写真を用いて補完でき、例えば、液滴の位置および外観を確認して、それを蛍光信号の位置と相関させる。

【0223】

信号が実際に比色分析的である場合、撮影した顕微鏡写真は、明視野顕微鏡イメージングによって記録でき、例えば、個々の液滴の吸光度、反射率または透過率を評価する。

【0224】

液滴アレイが大きなエリアをカバーし、単一の顕微鏡写真の視野がそれを含むことができない場合、いくつかの顕微鏡写真がいくつかの位置で記録して、アレイ全体を表示するより大きい顕微鏡写真を再構成できる。イメージング再構成 (例えば、顕微鏡写真繋ぎ合わせ (stitching)) を案内するために、容易に認識可能なマイクロパターンをアレイ上に組み込んでもよい。

【0225】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、ステップ (iii)、(iv)、(

10

20

30

40

50

v) を1回以上繰り返すことを含む。

【0226】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、ステップ(iii)、(iv)、(v) を1回以上繰り返すことを含む。

【0227】

ここで開示する実施形態において、方法はさらに、ステップ(iii)、(iv)、(v) を繰り返す前に、前回ステップに存在する標識剤を不活性化するステップを含む。

【0228】

標識化し、検出試薬を追加し、信号ポジティブ液滴を計数するステップを繰り返す能力は、SELMA測定の特有の特性であり、これは少なくとも2つの利点を提示する。

10

【0229】

第1に、前回測定から標識剤および検出剤を除去し、続いてこれらを再導入することによって、信号対ノイズ比が増加できる。これは、標識剤が、存在する検体なしで、親水性機構の表面に非特異的に結合できるという事実に起因する。非特異的に結合した標識剤は、計数測定においてバックグラウンドノイズを含み、潜在的に低い信号対ノイズ比をもたらす。しかしながら、非特異的な結合は、アレイ上のランダム位置で起こり、一方、検体への特異的結合は、存在する検体を有するアレイ機構の上で起こるため、2つの結合モードは、繰り返し測定によって区別できる。繰り返し測定において、非特異的な結合を示すだけの液滴が、測定が繰り返されるたびにポジティブ信号を提供できず、一方、特異的結合を示す液滴が、ポジティブ信号を毎回提供できる。こうしてバックグラウンドノイズは、著

20

【0230】

第2に、前回測定から第1検体タイプに特異的な標識剤および検出剤を除去し、続いて他の検体タイプに特異的な標識剤および検出剤を導入することによって、より高い多重化容量を提供できる。この場合、測定は繰り返されるごとに、検体タイプの新しいセットが計数される。例えば、アレイが、10個の異なる検体タイプに特異的な捕獲プローブを用いて機能化された場合、測定を10回繰り返すことによって（各回ごとに新しい標識剤および検出剤を導入する）、全部で10個の検体が定量化できる。

【0231】

ここで開示する実施形態において、標識剤は、表面結合した検体からの脱離によって不活性化され、フローシステムの洗浄(flushing)によって除去される。

30

【0232】

当業者に知られているように、分子プローブを不活性化する多数の手法が存在する。SELMA測定の場合、最も便利な手法は、検体から標識剤を解放しつつ、捕獲プローブに結合した検体を保持することに依拠する。いったん標識剤が脱離すると、それは、リンス溶液を用いてフローチャネルを洗浄することによって除去できる。検出剤は、アレイ表面に結合することを意図していないため、より容易に除去され、よって脱離ステップを必要としない。

【0233】

ここで開示する実施形態において、標識剤は、酵素的切断によって脱離される。

40

【0234】

捕獲プローブ、検体および標識剤がオリゴヌクレオチドである場合、エクソヌクレアーゼ処置によって標識剤を特異的に除去することが可能である。エクソヌクレアーゼは酵素であり、二本鎖DNA、例えば、検体と標識剤との間の相補配列を分解する。捕獲プローブを、エクソヌクレアーゼ処置に対して不活性にすることによって（例えば、ペプチド核酸、ロックド核酸または化学的に修飾された一本鎖DNAを捕獲プローブとして選択することによって）、検体と標識剤との間の結合だけが分断できる。

【0235】

一実施形態において、標識剤は、例えば、pH、イオン強度を追加または調整し、塩または洗浄剤を変性させることによって、化学的切断または脱着によって脱離される。

50

【0236】

一実施形態において、標識剤は、フローシステムの温度を上昇させることによって脱離される。

【0237】

一実施形態において、標識剤は、その化学的または物理的な状態を変化させることによって不活性化される。

【0238】

実施形態において、検体および標識剤が両方ともオリゴヌクレオチドであり、塩基対配列相補性によって互いに結合している場合、溶液のpHまたはイオン強度を変化させることによって、標識剤を特異的に除去することが可能である。例えば、pHが上昇した場合、DNAの二本鎖構造は、核酸塩基の脱プロトン化に起因して分断される。さらに、二本鎖DNAの脱離はまた、溶液のイオン強度を減少させることによって達成でき、こうしてDNA骨格で帯電したリン酸基の間の静電反発力を増強する。さらに、温度を二本鎖DNAの融解転移より上に増加させることによって、検体からの標識剤の分離をもたらすことができる。

10

【0239】

実施形態において、検体および標識剤がタンパク質系またはペプチド系である場合、標識剤は、洗浄剤を使用し、塩を変性させ、または温度を増加させることによって、三次構造を分断／変性させることによって脱離できる。

【0240】

20

一実施形態において、標識剤は酵素を含み、標識剤は、活性部位の化学的または生化学的修飾によって酵素の状態を変化させることによって不活性化できる。

【0241】

酵素は、活性部位を分断することによって不活性化でき、そのため更なる酵素的処理は可能ではない。例えば、酵素がペルオキシダーゼ酵素のクラスに属する場合、活性部位は、フェノール溶液に曝された場合、不可逆的に分断された状態になる。例えば、文献(Mao, L., Luo, S., Huang, Q. and Lu, J. in "Horseradish peroxidase inactivation: Heme destruction and influence of polyethylene glycol" published in Scientific Reports, vol. 3, article number 3126 (2013) (DOI: 10.1038/srep03126))を参照。さらに、酵素がホスファターゼ酵素のクラスに属する場合、活性部位は、機能する亜鉛およびマグネシウムイオン複合体を必要とする。その結果、キレート剤、例えば、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を用いてこれらのイオンの除去によって、酵素の不可逆的不活性化、即ち、酵素活性の終止をもたらす。例えば、文献(Ackermann, B. P. and Ahlers, J. in "Kinetics of alkaline phosphatase from pig kidney. Influence of complexing agents on stability and activity" published in Biochemical Journal, vol. 153, pp. 151-157 (1976) (DOI: 10.1042/bj1530151))を参照。

30

【0242】

一実施形態において、標識剤は酵素を含み、酵素の状態は、酵素の三次構造の化学的または物理的分断によって変化する。

【0243】

40

例えば、酵素の構造は、溶液の温度を増加させることによって、pHを増加または減少させることによって、溶液のイオン強度を増加または減少させることによって、洗浄剤を追加することによって、または化学架橋結合剤を使用して酵素を共有結合的に修飾することによって変化する。

【0244】

一実施形態において、標識剤は、酵素および特異検体認識部位を含み、検体認識部位は、下記の分子グループ、即ち、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、アダマー、抗体、その複合体またはその合成変異体から選択される。

【0245】

一実施形態において、液体中に1つ以上の検体タイプを含むサンプルは、完全浸漬によ

50

って親水性機構を含む基板と接触させられる。

【0246】

一実施形態において、方法はさらに、液体を除去し、基板を洗浄することを含む。

【0247】

一実施形態において、標識化は、完全浸漬によって、検体用の標識剤を含む溶液を、捕獲した検体と接触させることによって実施される。

【0248】

一実施形態において、方法はさらに、残りの標識剤を含む溶液を除去し、基板を洗浄することを含む。

【0249】

ここで開示する実施形態において、親水性機構を収容する基板はフロー区画の内側に位置し、こうして入口から出口への液体プラグの圧力駆動の作動によって液体接触を可能にする。異なる試薬を含む異なる溶液（標識剤、検出剤、不活性化剤、リンス溶液）は、液体装填パッドに装填でき、フロー区画の中に駆動される。液体接触モードは、（i）フロー経由接触として、または（i i）注入－停止－引き出し接触として分類できる。フロー経由接触モードでは、プラグの全体体積が通過するまで、液体プラグがフロー区画を横断して駆動される。注入－停止－引き出し接触モードでは、フロー区画の全体体積を充填し、そして停止するまで、液体プラグが駆動される。一定の待機期間に続いて、プラグはフローチャネルから押し出され、液体出口に入る。

【0250】

フロー経由接触モードは、典型的には試薬が過剰である反応ステップに適している。こうしたステップの持続期間は、フローレート（体積／時間）および液体プラグの体積によって決定でき、必要な処理時間を達成するように調整できる。例えば、リンスステップ、標識化ステップ、不活性化ステップおよび検出ステップなどのステップは、典型的にはフロー経由接触モードで実施できる。

【0251】

注入－停止－引き出し接触は、より長い培養時間を必要とし、試薬が低濃度で存在するステップに適している。例えば、低濃度の検体を含むサンプルが親水性機構の表面で捕獲プローブに結合される捕獲ステップ。捕獲ステップでは、サンプルからの全ての検体の完全な捕獲を確保するために、即ち、検体がフロー区画の上部から下部に拡散するのに十分な培養時間、そして表面で成功した捕獲を可能にするのに十分な時間に、ステップの持続期間を長くすることが好都合である。注入－停止－引き出し接触は、ある溶液中の親水性パターンの完全浸漬に等価である。

【0252】

一実施形態において、検体は、下記の検体グループ、即ち、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質、タンパク質／オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質／脂質複合体、ペプチド、エキソソーム(exosome)、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、ナノ粒子、細胞断片または細胞から選択される。

【0253】

一実施形態において、サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または組織から選択される。

【0254】

一実施形態において、サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または、血液などの組織、の研究室処理サンプルから選択される。

【0255】

サンプルのタイプに依存して、異なる種類の検体タイプが存在でき、異なる研究室手順が測定用の検体を調製するために必要になる。例えば、サンプルが血液サンプルである場合、凝固を防止するために、抗凝固剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、クエン酸またはシュウ酸）を用いて血液を処理する必要があるであろう。血液サンプルの

10

20

30

40

50

研究室処理の他の例が、サンプルから細胞を除去するために、血液を遠心分離またはフィルタ処理にかけることであろう。血液サンプルの研究室処理のさらに他の例が、血液を希釈し、または活性成分を追加して、関心あるバイオマーカーの特殊抽出を容易にすることであろう。例えば、DNA検体が、固相可逆的固定化を用いて液体サンプルから精製でき、血液はクラウディング剤およびカルボン酸コート常磁性マイクロ粒子と混合される。これらの反応条件は、マイクロ粒子の表面へのDNAの選択吸着を有利にでき、これは磁界の印加によって抽出できる。他の用途では、希釈され、または他の方法で処理されたサンプルを、(i)電気泳動ステップ、または(ii)透析ステップにかけて、その電荷、サイズおよび分子量に基づいてサンプルから分子を選択することが好都合であろう。

【0256】

10

一実施形態において、1つ以上の捕獲した検体は、捕獲に続いて、捕獲プローブと共有結合的に架橋または結合できる。

【0257】

検体と捕獲プローブとの間の共有結合を確立することが好都合であり、その理由は、表面への検体の本質的に不可逆的の固定化を提供するためである。こうして標識剤の脱離がより容易に達成でき、その理由は、検体と標識剤との間の結合は非共有結合性であり、より弱いためである。例えば、捕獲プローブおよび検体の両方がオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対合によって共に結合され、さらに1つ以上の共有結合を介して共に結合される場合、そして標識剤もオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対合によって検体に結合するだけである場合、標識剤は、複合体をアルカリ性pHに曝すことによって、検体から容易に解離できる。アルカリ性pHは、捕獲プローブ／検体の間の強い共有結合に対して、検体／標識剤の間のより弱い塩基対合結合と同じ程度に影響を及ぼすことがない。

20

【0258】

他の例として、捕獲プローブが抗体であり、検体がタンパク質またはペプチドであり、共有結合が両者間で確立されていることを検討する。標識剤が抗体系であり、抗体／抗原－相互作用を介して検体に結合される場合、それは、洗浄剤を追加し、または変性剤を追加することによって、容易に除去できるとともに、捕獲プローブと検体との間の共有結合を保持する。

【0259】

一実施形態において、捕獲プローブは、オリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドであり、検体は、捕獲プローブ配列との塩基対合を介して捕獲プローブと結合されたオリゴヌクレオチドであり、共有結合架橋は、鎖間架橋剤、例えば、白金錯体、マイトマイシンC、ナイトロジェンマスタード、ソラレンまたはアルデヒドなどを使用することによって実行される。上述したものなどの鎖間架橋剤は、二本鎖DNA、二本鎖DNA／RNAまたは、核酸塩基を含むその合成変異体での対向する鎖の上の核酸塩基間の共有結合を形成できる。鎖間共有結合が、非共有結合鎖間塩基対合結合と比較して増強された安定性を提供し、捕獲プローブへの検体の実質的に不可逆的な固定化を提供し、よって親水性機構を提供する。

30

【0260】

一実施形態において、捕獲プローブは、タンパク質、ペプチドまたはその合成変異体であり、検体は、タンパク質、ペプチドまたは、タンパク質もしくはペプチドを含む複合体であり、検体は、検体の特異領域の構造的認識によって捕獲プローブに結合され、共有結合架橋は、化学固定(fixation)剤、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウムまたは酢酸ウラニルなどを使用することによって実行される。上述したものなどの化学固定剤は、アミノ酸を架橋することが可能であり、検体と捕獲プローブとの間の接触ゾーンにおいて共有結合架橋を提供する。これは、捕獲プローブへの検体の実質的に不可逆的な固定化をもたらす、よって親水性機構をもたらす。

40

【0261】

ここで説明する方法およびフローシステムの実施形態において、気相は、大気によって提供され、及び／又は、捕獲プローブは、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリ

50

ゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択され、及び／又は、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置され、及び／又は、検体は、処理した血液サンプルから抽出された一本鎖DNAであり、標識剤は、検出様式(modality)および認識部位を備え、及び／又は、検出様式は酵素であり、及び／又は、認識部位は、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択される。

【0262】

ここで説明する方法およびフローシステムの実施形態において、気相は、大気によって提供され、及び／又は、捕獲プローブは、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択され、及び／又は、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置され、及び／又は、検体は、処理した血液サンプルから抽出された一本鎖DNAであり、標識剤は、検出様式(modality)および認識部位を備え、及び／又は、検出様式は酵素であり、及び／又は、認識部位は、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択される。

10

【0263】

下記において、用途のいくつかの非限定的例を説明する。

【0264】

実施形態において、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用が開示され、各部位は、ここに記載される方法で少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

【0265】

実施形態において、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用が開示され、各部位は、デジタル計数分析における計数誤差を減少させるために、ここに記載される方法で少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

20

【0266】

実施形態において、複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用が開示され、各部位は、デジタル計数分析における計数誤差を減少させるために、ここに記載される少なくとも2つの検出サイクルを行うことによって、少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

【0267】

単一酵素結合免疫吸着法(SELISA)では、タンパク質またはペプチドの検体が表面結合抗体プローブによって捕獲され、後で標識化され、単一酵素標識検出プローブによって検出される。

30

【0268】

単一オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションアッセイでは、オリゴヌクレオチド検体が表面結合相補オリゴヌクレオチドプローブによって捕獲され、後で標識化され、単一酵素標識検出プローブによって検出される。

【0269】

他のクラスの用途は、単一の生物学的実体、例えば、細胞、細胞断片／オルガネラ、バクテリア、ウイルスカプシドなどの操作および定量化を扱う。これらの場合、アッセイは、表面結合捕獲プローブを使用して、上述した生物学的実体のいずれかを固定化し、後で特異検出プローブを付与して、これらの数および種類を定量化できる。代替として、生物学的実体を捕獲した後、これらは破裂されてもよく、タンパク質、ペプチド、脂質またはオリゴヌクレオチドのその含量が他のセットの表面結合捕獲プローブによって捕獲され、後で標識化され、単一酵素標識検出プローブによって検出される。

40

【0270】

さらに、本発明は、デジタルポリメラーゼ連鎖反応(dPCR)またはその変形を実行するのに適している。本発明の一実施形態において、dPCRアッセイは、単一液滴内にターゲット配列そして増幅試薬および検出プローブを含むことによって、特定のオリゴヌクレオチド配列を検出する。PCRが起こると、ターゲット配列は増幅でき、検出プローブによって検出可能にする。本発明の他の実施形態において、ターゲットオリゴヌクレオチドは、最初に表面結合プローブによって特異的に捕獲され、次に増幅試薬および検出プローブが個々の液滴に供給されて、PCRおよび検出反応が生じるようする。

50

【0271】

一実施形態において、ここで説明するシステムおよび方法は、複数のマイクロ液滴を支持するための表面を有するチャンネル形状のフロー区画を含む。実施形態において、ここで開示するように、チャンネル形状のフロー区画はまた、マイクロ液滴を支持する表面の上に延びる表面を有し、チャンネル形状のフロー区画が2つの開口を有し、1つがフロー区画の各側にあるようにした壁を含む。一実施形態において、チャンネルは、四角形(square)断面を備えた矩形状であり、各開口が四角形である。他の実施形態において、フロー区画は、円柱形状であり、各開口は円形である。これらの実施形態の両方において、マイクロ液滴は、例えば、アレイ状に互いに離隔しており、フロー区画内の中央に配置される。実施形態において、中央に配置されたマイクロ液滴は、開口の各々から長さ(L_E)だけ離隔している。一実施形態において、フロー区画の高さ(h)は、マイクロ液滴に含まれる流体の凝集体積に部分的に基づいて選択され、周囲環境の温度および圧力は、フロー区画および長さ L_E に接触する。一実施形態において、高さ h は、マイクロ液滴が蒸発するレートを低減するフロー区画内の蒸気圧を生成するように選択される。理論によって縛られないが、マイクロ液滴が蒸発すると、蒸発からの蒸気が、周囲環境に全体的に露出した場合にマイクロ液滴が経験するレートと比較して、蒸発が生ずるレートを低減する気相シールを生成する。一実践では、水溶液では、特定の割合の水が気相に蒸発することが理解される。しかしながら、蒸発の程度は、(i)正しいフローチャンネル深さおよび幾何形状、(i i)正しい液滴体積、(i i i)正しい液滴アレイ幾何形状を選択することによって予測でき、合理的に制御できる。パラメータを適正に選択することによって、マイクロ液滴は、蒸気圧に起因して蒸発しなくなり、こうしてフローチャンネルでの湿度が増加する。これは、化学的シールに類似した気相シールを提供するが、フロー区画を液相で覆う代わりに、マイクロ液滴が気相、例えば、空気の中に維持される。気相の利点は、液相と比較して、多くの大きな生体分子(タンパク質、DNA、脂質など)は、その沸点が水より著しく高いため、空気中に分配しないことである。化学的シールとは異なり、気相シールは、油相を除去する必要なしで、試薬をアレイ上に容易に導入できる。

10

20

【0272】

フロー区画が、表面張力によって所定場所に保持され、フローチャンネルの中に集積される、平面基板上に静止するマイクロ液滴を保存する実施形態では、気相シールが、液体引き出しに続いてアレイを液体と接触させることによって確立できる。液体引き出しの際、アレイは、マイクロ液滴を保持し、フローチャンネルは、例えば、空気で充填され、こうして気相シールを確立する。こうしてここで説明するシステムおよび方法は、とりわけフローチャンネルに組み込まれた表面張力式マイクロ液滴アレイを提供し、フローチャンネルの幾何形状は、アレイの幾何形状に整合し、例えば、蒸発を特定の割合以下、例えば、5%未満に低減する。

30

【0273】

ここで、複数のナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成された親水性機構の特徴は、親水性機構は、第2親水特性を有する材料によつて包囲された第1親水特性を有する材料のパターンを形成し、第1親水特性は第2親水特性よりも親水性であることを特に意味しており、接触角は、第1親水特性を備えた材料の上での液滴ではより低いことを意味する。一例では、第2親水特性を備えた材料は疎水性であると考えられ、液滴は、第1親水特性を有する材料に本質的に専ら配置される。

40

【0274】

蒸発を低減する気相シールを支持するように構成されたフロー区画の特徴は、液滴の体積に対するフロー区画の体積を参照する。下記式によって設定される境界内にある体積 V_c を有するフロー区画が、

【0275】

【数 2】

$$V_{DA} < V_C < V_{MAX} = V_{DA} \frac{\rho_L RT}{(1 - RH) M_W P_0} \exp \left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right)$$

【0276】

蒸発を低減する気相シールを支持するように構成された区画の定義内であると考えられる。

【0277】

蒸発を低減する気相の例が、本質的にその飽和温度および圧力にあり、相対湿度を増加できない、即ち、ほぼ100%湿度、または少なくとも90～100%の範囲、例えば、95～100%湿度の範囲のような蒸気とすることができる。用語「開口」は、サンプルが疎水性基板上の親水性機構に入るための入り口を意味する。開口は、外部から区画内への同じまたは異なるサイズの1つ以上の入口によって形成できる。

10

【0278】

フロー区画は、サンプルが流れることができ、疎水性基板上に親水性機構を収容する区画である。フロー区画は、1つ以上の区別できるチャンバ(chamber)によって形成できる。2つ以上のチャンバによって画定される場合、チャンバは流体接続される。

【0279】

捕獲プローブが、特定の構成物質を捕獲できる機構である。捕獲プローブは、例えば、PNAまたはDNA、例えば、一本鎖PNAオリゴをベースにできる。

20

【0280】

一実施形態において、親水性機構のための支持体は、フロー区画内に中央に設置される。一例において、親水性機構のための支持体は、親水性機構のための支持体の周りに境界を形成する疎水性材料によってフロー区画内で包囲される。

【0281】

(本発明の特定の実施形態)

フロー区画を使用したデジタルカウント用フローシステム

【0282】

疎水性基板の中または上に親水性機構のパターンを有する支持体を備えた、ここに記載した方法および使用などのサンプル中の1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のために有用なフローシステムがここでは開示され、疎水性基板は、少なくとも1つの開口を含むフロー区画の中に組み込まれ、親水性機構は、複数のナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成される。実施形態において、フロー区画は、各ナノリットルからアトリットルの液滴の蒸発を低減する気相シールを支持するように構成される。実施形態において、各ナノリットルからアトリットルの液滴の蒸発を最大液滴体積の50%未満に低減する。

30

【0283】

ここで開示する実施形態において、フローシステムは、疎水性基板の中または上に親水性機構のパターンを提供する液滴領域を備え、蒸発耐性気相封止のナノリットルからアトリットルの液滴の形成を可能にする。

40

【0284】

ここで開示する実施形態において、フローシステムは、親水性／疎水性パターンとの液体接触を可能にするために、液滴領域を覆う1つ以上のフロー区画、例えば、フローチャネルを備える。

【0285】

ここで開示する実施形態において、フローシステムは、フロー区画および液滴領域に液体および試薬を供給するための液体装填パッドを備える。

【0286】

ここで開示する実施形態において、フローシステムは、フロー区画を液体装填パッドに接続する液体入口を備える。

50

【0287】

ここで開示する実施形態において、フローシステムは、吸引を提供し、そしてフロー区画を介して液体駆動に介在する圧力源にフロー区画を接続する液体出口を備える。

【0288】

ここで開示する実施形態において、フローシステムは、単一分子デジタル計数デバイスとして機能するために、少なくとも5つの区別できるエレメントを備える。図10も参照。

【0289】

これらは下記に示す。

- ・疎水性基板によって包囲された親水性機構のパターンを提示する液滴領域であり、蒸発耐性気相封止のナノリットルからアトリットルの液滴の形成を可能にする。

- ・液滴領域を覆う1つ以上のフロー区画であり、親水性／疎水性パターンとの液体接触を可能にする。

- ・フロー区画に液体および試薬を供給するための液体装填パッド。

- ・フロー区画を液体装填パッドに接続する液体入口。

- ・吸引を提供し、そしてフロー区画を介して液体駆動に介在する圧力源にフロー区画を接続する液体出口。

【0290】

上述した5つの機構は、例示のフローシステムを画定し、液体は、入口から出口への圧力降下を用いてフロー区画を横断して駆動される。吸引を印加する代わりに、装填パッド中の液体試薬をフローチャネルを介して押し込んでもよい。これは、装填パッドが、一方の側で圧力源に接続され、他方の側で液体入口に接続されることが必要である。この場合、液体出口は、圧力源に接続される必要がない。液体フローを駆動する代替手段は、重力によるものでもよく、この場合、圧力源は必要ではなく、あるいは、誘電泳動駆動によるものでもよく、これは電極をフローチャネルに組み込む必要がある。ここで開示する一実施形態において、液体駆動は吸引駆動される。

【0291】

当業者に知られているように、類似の機能的フローシステムが多くの異なる手法によって製造できる。これらは下記の手法を含むが、これに限定されない。

1. コンピュータ数値制御（CNC）フライス加工、射出成形、熱エンボス加工、または3次元印刷を用いて、固体基板にフロー区画を製造する。

2. CNCフライス加工、射出成形、熱エンボス加工、または3次元印刷に適合した任意の固体基板を適用する。

3. 1つ以上のコンポーネントからフローシステムを作成し、続いてコンポーネントを共に接合して、所望の幾何形状または機能性を達成する。接合する手法は、感圧接着フィルム、液体接着剤のスプレーコーティング、熱接合、超音波溶接またはレーザ溶接を含む。接合する代わりに、個々のコンポーネントは、例えば、最終アセンブリを生産するために、機械的、電気機械的または磁氣的にクランプしてもよい。マイクロ流体用途のために利用される接合および製造プロセスの概要は、文献（Temiz, Y., Lovchik, R., Kaigala, G. V. and Delamarche, E. in "Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab" published in Microelectronics Engineering, vol. 132, pp. 156-175 (2015) (DOI: 10.1016/j.mee.2014.10.013))を参照。

【0292】

ここで開示するように、基板上の親水性機構は、それぞれ最大液滴体積を有する複数のナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成される。親水性表面は、該最大液滴体積を有する液滴を保持できる任意の種類でもよい。即ち、該最大液滴体積の液滴が親水性機構の上に残留するようになる限り、親水性機構は、こうした液滴を支持するように構成される。

【0293】

ここで開示する実施形態において、液滴領域は、疎水性媒体によって包囲された親水性

10

20

30

40

50

機構のパターンからなる。この実施形態において、親水性機構の幾何形状、液体および疎水性基板の物理的／化学的特性は、最大液滴体積を決定し、単一機構がこれを保持することが可能であり、そのため液体は周囲の疎水性媒体と接触しない。最大液滴体積を実験的に決定する1つの方法は、増加する量の液体を初期乾燥親水性機構の上に堆積することである。液体堆積は、自動化マイクロディスペンサを用いて実施でき、あるいは、ミクロンサイズの機構の場合は、圧電駆動マイクロマニピュレータを用いて実施できるが、蒸発が起きないように加湿チャンバ内で行う必要がある。さらに、顕微鏡を用いて、堆積した液滴の設置面積が測定できる。その結果、測定した設置面積が親水性機構によって画定される外周をいったん超えると、最大液滴体積に到達し、そして上回る。

【0294】

10

実験的手法とは別に、最大液滴体積はまた、簡単な理論モデルから推定できる。この場合、親水性機構が R_D の半径を有する円形であり、疎水性媒体と接触した場合、液体が γ の接触角を示し、液滴が平面的表面の上に静止する（図5と図6を参照）ものと仮定する。さらに液滴は、重力が液滴の形状に著しく影響しないように十分に小さいものと仮定する。液体が親水性機構の上に堆積した場合、それは外周まで広がり、液体は接触角 α を形成する。接触角 α は、液滴表面への接線が外周において平面的親水性表面と形成する角度として定義される。液滴の体積が増加すると、 α も増加するが、特定のポイントまでだけである。もし α が γ を超えた場合、液滴が疎水性媒体の上に広がるのがエネルギー的に有利になり、こうして疎水性外周を超える。その結果、最大液滴体積において α は γ と等しく、体積(V_D)は、下記式(1)のように、キャップ付球体の幾何学的記述から

20

【0295】

【数3】

$$V_D = \pi R_D^3 G(\gamma)$$

Eqn. 1

$$G(\gamma) = \frac{2 - 3 \sin\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right) + \sin^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}{3 \cos^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}$$

【0296】

30

90°に十分に近い γ 値では、式(1)は、液滴を半球形状のキャップであると仮定することによってさらに簡略化でき、下記の V_D 値を示す

【0297】

【数4】

$$2\pi R_D^3 / 3$$

【0298】

さらに他の場合、親水性機構が、半径 R_D および深さ d を備えた円形空洞として形状を有する場合、最大体積は、 $\pi d R_D^2$ の空洞体積を式(1)に追加することによって見出される。

40

【0299】

一実施形態において、親水性機構は、ナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成され、液滴は、少なくとも90度、多くても150度の、疎水性基板での接触角を示す。一実施形態において、親水性機構は、少なくとも0.1 μm 、多くても100 μm の半径(R_D)を有するナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成される。

【0300】

疎水性媒体によって包囲された親水性機構のアレイを製造するために多くの手法が採用できるが、最も容易に適用可能なものはフォトリソグラフィを含む。フォトリソグラフィ

50

は、ミクロンサイズの化学的及び／又は物理的構造を正確に生産することが可能であり、感光性薄膜を用いた平坦なウエハ基板のコーティングに依拠する。次のステップにおいて、薄膜は、意図したパターンを提供するフォトマスクを介して高強度の紫外光への露光によって選択的に除去される。例示の製造プロセスの略図が図7において示される。しかしながら、UVフォトリソグラフィの光学分解能に起因して、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以下の機構を正確に生産することは技術的に困難である。パターン化された親水性機構が平面的円形であり、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ の R_D 値を示す場合、対応する最大液滴体積は、式(1)に従って、 90° の γ 値では $V_D = 2.9$ アトリットルであり、 150° の γ 値では $V_D = 33.1$ アトリットルである。

【0301】

$0.1\text{ }\mu\text{m}$ まで下がる R_D 値を示す親水性機構は高密度のアレイを許容し、これは、単一分子デジタル計数の文脈において、(i) 拡張したダイナミックレンジ、および(ii) より高速な検出時間につながる。

【0302】

拡張したダイナミックレンジは、デジタル計数では、測定に存在する液滴区画の数は信号線形性を決定するという事実に起因する。信号は、全ての液滴区画が信号を生成し、即ち、アレイが飽和するまで、線形であると考えられる。例えば、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ の R_D 値および $0.4\text{ }\mu\text{m}$ の機構間間隔を有する $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ をカバーする規則的な矩形アレイが、 6250000 個の液滴を収容し、約8桁に及ぶ線形ダイナミックレンジを示す。

【0303】

より高速な検出時間は、デジタル計数では、分子レポータは、通常、酵素または酵素的に結合したシステムによって生成されるという事実に依拠する。本実施形態において、単一酵素は、非-蛍光性／-化学発光性／-比色分析性の分子の蛍光し／発光し／吸収するもの(分子レポータ)への繰り返し変換によって信号を生成する。レポータ分子の最小検出可能濃度は、液滴体積に依存し、一定の酵素ターンオーバーレートを仮定すると、体積が小さいほど、より高速に濃度に到達する。

【0304】

他方において、ナノリットル範囲のより大きい体積を示す液滴(例えば、 $100\text{ }\mu\text{m}$ の R_D 値を備えた円形平面的親水性機構は、 90° の γ 値では 2.1 ナノリットルの最大体積を有し、 150° の γ 値では 33.1 ナノリットルの最大体積を有する)は、(i) 大きいダイナミックレンジが必要でない、例えば、検体濃度がアレイを飽和させるには低すぎると予想される状況、または(ii) サブナノリットル液滴が撮像センサによって解像できない状況において、好都合であろう。

【0305】

代替として、ナノリットル体積液滴は、測定前に、より大きい生物学的実体、例えば、細胞、細胞片、ウイルス粒子、ベシクル(vesicle)、オルガネラ(organelle)などをアレイ化して編成するために使用できる。

【0306】

一実施形態において、親水性基板は、ガラス、親水性ポリマーまたは金属酸化物化合物である。

【0307】

親水性基板についての主要な要件は、液体がその上に接触角を形成する必要がある、それが疎水性基板より小さいことである。さらに、基板は、好ましくは、マイクロ製造手法、例えば、フォトリソグラフィ、ソフトリソグラフィ、マイクロインプリンティングなどによって従順であることが必要である。二酸化シリコンおよびその純粋およびドーブした異形は、この目的に適した選択肢であり、その理由は、フォトリソグラフィのために良好に特徴付けられた基板として機能するだけでなく、多数の化学的および生化学的な表面機能化手順が利用可能であるためである。例えば、広範囲のシラン化合物が市販されており(例えば、ゲレスト(Gelest)社によって発表されている"Silane coupling agents, versi

10

20

30

40

50

on 3.0"を参照)、これは二酸化シリコン表面の直接的誘導体化のために使用できる。シラン化(silanization)が、その表面、例えば、二酸化シリコンでシラノール基を提示する材料にとって最も効率的であるが、多くの他の材料がこのプロセスにとって従順にできる。これらは、これに限定されないが、アルミニウム、アルミノケイ酸、シリコン、銅、錫、タルク(talc)、無機酸化物(例えば、鉄酸化物、チタン酸化物、クロム酸化物)、銅、鉄、ニッケル、亜鉛を含む。

【0308】

基板のシラン誘導体化の際、新しい化学官能性が材料に導入され、液体は、機能化の後に基板上で変更された接触角を示すことができる。この理由のため、初期の親水性基板、例えば、ガラスは、疎水性シラン部位、例えば、フッ化炭素シランを用いた機能化によって疎水性にできる。代替として、初期の僅かに親水性の基板が、高い親水性のシラン部位、例えば、ポリ(エチレングリコール)シランを用いた機能化によってより親水性にできる。これは、当業者によく知られており、液体／固体接触角は、本文書で参照されており、任意の初期基板材料の表面改質に続いて得られた液体／固体接触角に関連しているだけである。

10

【0309】

無機基板のシラン誘導体化は、新しい化学的機能を基板に導入する多くの手順の中から1つだけを構成する。他の手法は、例えば、自己組織化単分子層を生成するために、金基板へのモノチオール化合物の吸着を含む。さらに他の手法は、柔軟な有機基板、例えば、プラスチックにとって従順である、プラズマ重合であり、所望の化学ポリマーの薄い層が、対応するモノマーのプラズマからプラスチック表面に堆積される。

20

【0310】

親水性機構の構成は、下記の少なくとも1つと関連できる。

- ・親水性機構を構成する材料の親水性
- ・疎水性基板を構成する材料の疎水性
- ・機構のエリア
- ・機構の厚さ

【0311】

一実施形態において、最大液滴体積は、式(1)によって計算されるような V_D である。従って、親水性機構は、この体積の液滴が親水性機構の各々に保持できるように提供できる。

30

【0312】

最大液滴体積から個々の親水性機構の特定の構成に至る方法の例として、下記ステップが実行できる。

1. 最初に、目前の応用のために適切な液滴体積を選択する。液滴体積についての前述した議論を参照。

2. 次に、この応用で適用される液体について固体／液体接触角 γ を取得する。

3. 親水性機構の所望の幾何形状、即ち、円形、四角、六角形などについて決定する。形状は、パターンを生成するために適用される製造手順に依拠することになる。

4. ステップ3からの特定形状の外周長と対応する最大液滴体積との間の関係を計算する。円形形状の場合、関係は式(1)で提供される。他の幾何形状については、関係は、式(1)の誘導について記述したのと同様な方法で誘導する必要があるであろう。

40

5. ステップ4での関係から、選択した液滴体積に対応する外周長を取得する。円形形状の場合、それは R_D について式(1)を解くのに充分である。

【0313】

更なる実施形態において、親水性機構のパターンが位置するフロー区画の構成は、機能的気相シールを設けてミクロンサイズの液滴からの蒸発を低減するために決定する必要がある。例えば、アトリットルの水性液滴が周囲条件で基板上に堆積した場合、それは、高い表面／体積比に起因して、数秒以内に蒸発するようになる。その結果、液滴内容物を測定する必要がある用途では、液滴は、延長した時間に渡って安定であることが要求され、

50

蒸発は、大きく減少させたり、または完全になくす必要がある。

【0314】

更なる実施形態において、親水性機構のパターンを収容するフロー区画がここでは開示され、親水性機構は、上述したような特定の最大体積の液滴を支持するように構成され、フロー区画は、体積 V_C を示し、液滴支持親水性パターン of の最大到達可能凝集体積は、 V_{DA} で示される。該パターンが、それぞれ同じ最大液滴体積 (V_D) を示す多数の液滴 (N_D) を収容する場合、 $V_{DA} = V_D \cdot N_D$ である。該パターンが、変化するサイズの液滴を収容する場合、対応する V_{DA} 値は、下記の式 (2) として与えられる。

【0315】

【数5】

$$V_{DA} = \sum_{i=1}^{N_D} V_{D,i} \quad \text{Eqn. 2}$$

10

【0316】

ここで、 $V_{D,i}$ はパターン上の i 番目の液滴の最大体積である。その結果、液体の対応するモル量 (n_{DA}) は、下記の式 (3) である。

【0317】

【数6】

$$n_{DA} = \frac{V_{DA} \rho_L}{M_W} \quad \text{Eqn. 3}$$

20

【0318】

ここで M_W は液体のモル重量であり、 ρ_L は液体の密度である。もし全ての液滴が完全に蒸発するとした場合、蒸発した蒸気は理想気体として挙動すると仮定して、得られた蒸気は、下記の式 (4) のように、フロー区画において対応する蒸気圧 (P_{VAP}) を生成する。

【0319】

【数7】

$$P_{VAP} = \frac{n_{DA} RT}{V_C} \quad \text{Eqn. 4}$$

30

【0320】

ここで、 R は、モル気体定数であり、 T は、温度である。しかしながら、完全な液滴蒸発が $V_C \gg V_{DA}$ について可能なだけであり、理由は、その場合、完全な液滴蒸発によって生成される蒸気量がフロー区画の初期の蒸気圧を著しく変化させないためである。しかしながら、 V_{DA} のそれに接近するフロー区画体積では、飽和蒸気圧 (P_{SAT}) が確立状態になるまで、液滴蒸気はフロー区画での圧力を増加させる。いったん P_{SAT} に到達すると、更なる蒸発は可能ではない。 P_{SAT} 値、即ち、熱力学的平衡において液体の気体成分によって作用される蒸気圧は、下記の式 (5) のように、クラウジウス・クラペイロンの式によって与えられる。

【0321】

【数8】

$$P_{SAT} = P_0 \exp \left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right) \quad \text{Eqn. 5}$$

40

【0322】

ここで、 ΔH_{VAP} は液体の蒸発のエンタルピーであり、 P_0 は対応する基準温度 T_0 での液体の基準蒸気圧である。

【0323】

その結果、蒸発することが可能な液体の最大許容モル量 (n_{VAP}) は、下記の式 (6) のように、理想気体方程式から取得できる。

50

【0324】

【数9】

$$n_{VAP} = \frac{V_C P_{SAT}}{RT} = \frac{V_C P_0}{RT} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad \text{Eqn. 6}$$

【0325】

$n_{VAP} \geq n_{DA}$ では、完全な液滴蒸発が起こる。最大フロー区画体積 (V_{MAX})、即ち、液滴が完全には蒸発しない最大可能フロー区画体積についての表現は、ここでは下記の式 (7) のように取得できる。

【0326】

10

【数10】

$$n_{VAP}(V_C = V_{MAX}) = n_{DA} \quad \Rightarrow$$

$$V_{MAX} = V_{DA} \frac{\rho_L RT}{M_W P_0} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) \quad \text{Eqn. 7}$$

【0327】

その結果、機能的で長期安定な液滴パターンを収容することが可能なフロー区画は、 $V_C < V_{MAX}$ のように構成する必要がある。

【0328】

20

式 (7) での表現は、平衡の状態を参照する。平衡への経路は多数であるが、下記のよう説明できる。(i) 親水性機構のパターンが液体と接触して、例えば、液滴のパターンを生成し、各液滴は初期に最大可能体積を示すようにする。(ii) 飽和圧力がフロー区画内で確立するまで、液体が液滴から蒸発する。(iii) 蒸発に起因して減少した体積を有する液滴が安定に留まる。

【0329】

重要なのは、パターンは、機能的気相シールを生成するのに適した方法で液体と接触する必要がある。例えば、液体プラグをパターンを横断して駆動することによって、液体マイクロ液滴を親水性機構の上に堆積する。いったん液体プラグがアレイ上の全ての機構に接触すると、液体入口および出口は封鎖して、例えば、閉じた環境を提供する必要がある。これは、多くの方法、例えば、(i) 液体入口および出口にバルブを設置することによって、または (ii) 液体フローを同期させて、第1液体プラグが第2液体プラグによって続くようにし、第1のものは液体出口に駆動されて、そして停止し、第2のものは液体入口に駆動され、こうして入口および出口を液体で封鎖することによって達成できる。こうして液滴から蒸発した液体は、フロー区画において飽和圧力を確立するようになり、よって蒸発耐性になる。これは、例1と例2に例示される。

30

【0330】

さらに、式 (7) および下記議論において、フローシステムが調製される気相は、親水性機構のパターンを液体と接触させる前に、蒸発した液体 (即ち、液体の気体成分) を含まないと仮定した。しかしながら、これは、常にそうではないことがある。例えば、液体が大気では、相対湿度 (RH) は、飽和圧力に対する水蒸気圧力を提供し、即ち、 $RH = P_W / P_{SAT}$ であり、ここで P_W は大気中の水蒸気の部分圧力である。大気の初期の相対水蒸気飽和 (RH I) が0に等しい場合、空気は水蒸気含量を有することがなく、よって式 (7) が適用できる。他方では、 $RH I > 0$ の場合、式 (7) は、変更を必要とし、その理由は、飽和圧力を確立するために蒸発する必要がある液滴がより少ないためであり、こうして式 (6) を参照。

40

【0331】

【数 1 1】

$$n_{VAP} = \frac{V_C}{RT} (1 - RHI) P_{SAT} = \frac{V_C (1 - RHI) P_0}{RT} \exp \left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right) \quad \text{Eqn. 8}$$

【0 3 3 2】

これは、 V_{MAX} について下記の式（9）に転換する。

【0 3 3 3】

【数 1 2】

$$V_{MAX} = V_{DA} \frac{\rho_L RT}{(1 - RHI) M_w P_0} \exp \left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right) \quad \text{Eqn. 9} \quad 10$$

【0 3 3 4】

本文脈において、RHI は、可能な限り一般的に理解され、即ち、水に関連するだけでなく、いずれか他の液体にも関連する（定義についての上記セクションを参照）。この場合、RHI のより一般的な定義は、 $RHI = P_L / P_{SAT}$ であり、ここで P_L は適用した液体の気体成分の初期蒸気圧である。 P_L 値は、液滴アレイの形成の前にフローシステムが使用される気相を参照する。気相シールは、いったんフロー区画の内側で飽和圧力に到達すると、確立状態になる。こうしてフロー区画では局所的に、RH 値は、初期値から 1 に上昇し、完全な飽和および機能的気相シールを示す。

【0 3 3 5】

20

一実施形態において、ここで開示するフロー区画は、体積（ V_C ）を有し、体積（ V_C ）は、全てのナノリットルからアトリットルの液滴の凝集最大液滴体積（ V_{DA} ）より大きく、式（9）で計算されるような V_{MAX} より小さい。

【0 3 3 6】

ここで開示する実施形態において、疎水性基板の中または上に親水性機構のパターンを備えた、検体のデジタル計数のためのフローシステムの最適な構成を得るために、（i）個々の親水性機構の構成、（ii）機構のパターンの構成、（iii）パターンが位置する区画の構成、を考える必要がある。集合的に、これらの 3 つの構成は、フローシステムに、気相シールを用いてマイクロ液滴の蒸発耐性パターンを維持する能力を提供する。個々の親水性機構の構成は上述している。フローシステム構成を決定する例示の次のステップは、下記のとおりである。

30

1) 用途に必要とされる液滴の合計数を決定する。上述したように、液滴の合計数は、測定ダイナミックレンジを決定し、検体の予想される濃度範囲に整合させる必要がある。

2) パターンについての V_{DA} 値は、ここでは式（2）から計算でき、フロー区画面積、即ち、 V_C 値について下限を提供する。

3) 適用される液体の公称モル重量（ M_w ）および体積密度（ ρ_L ）、そして測定が行われる温度（ T ）および RHI 値を決定する。基準温度、圧力、蒸気のエンタルピーについて適切な値セットを適用して、式（9）を用いてフロー区画面積について V_{MAX} を計算する。例えば、水については $P_0 = 1.0 \text{ atm}$ 、 $T_0 = 373 \text{ K}$ であり、 40.7 kJ/mol の ΔH_{VAP} 値を示す。

40

4) 親水性機構のパターンの特定配置、例えば、正方形格子アレイ、六角形格子アレイ、矩形格子アレイ、菱形格子アレイなどを決定する。好ましいアレイ幾何形状は、通常、製造方法によって決定されることになる。液滴の合計数を収容するために、アレイの長さおよび幅を決定する。

5) フロー区画幾何形状、例えば、矩形チャネル、円形チャネル、半円形チャネルなどを決定する。好ましいアレイ幾何形状は、通常、製造方法によって決定されることになる。

6) 合計体積が V_{MAX} より小さくなるように、フロー区画幾何形状を拡大縮小する。この例が例 2 において提供される。簡潔には、矩形チャネルの場合、合計体積は、チャネ

50

ルの幅×長さ×高さとして与えられる。チャンネルの幅および長さは、例えば、アレイと整合でき、高さを可変にする。こうして高さは、 V_{MAX} より小さい合計体積を提供するように選択できる。

【0337】

更なる実施形態において、親水性機構は半径 (R_D) を有する円形であり、単一親水性円が支持できる最大液滴体積 (V_D) は式 (1) で提供されるフローシステムがここでは開示される。

【0338】

実施形態において、各ナノリットルからアトリットルの液滴の蒸発は、各ナノリットルからアトリットルの液滴の最大液滴体積の、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、1%未満である。

10

【0339】

フローシステムの所定の構成では、即ち、 V_C 値および V_{DA} 値の特定のセットでは、対応する蒸発割合 θ_{VAP} が計算できる。蒸発割合は、気相の中に蒸発する液滴体積割合、即ち、 $\theta_{VAP} = n_{VAP} / n_{DA}$ として定義される。式 (3) および式 (8) をこの表現の中に挿入すると、下記の式 (10) が得られる。

【0340】

【数13】

$$\theta_{VAP} = \frac{(1-RHI)V_C}{RT} \frac{M_W}{V_{DA}\rho_L} P_{SAT} = \frac{V_C}{V_{DA}} \frac{(1-RHI)M_W P_0}{\rho_L RT} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad \text{Eqn. 10} \quad 20$$

【0341】

θ_{VAP} が1より大きい値を仮定した場合、液滴アレイ全体は、例えば、大きすぎるフロー区画体積、アレイ上の少なすぎる液滴、高すぎる温度、小さすぎる親水性機構などに起因して蒸発した。他方、 θ_{VAP} が1より小さい場合、気相シールは機能的と考えられ、理由は、無傷の液滴（減少した体積を示すが）が親水性機構の上に残留できるためである。

【0342】

原理上は、液滴を蒸発に対して封止可能である、当業者に知られたいずれの気体も使用できる。気相シールの例は、大気、窒素、アルゴンまたはヘリウム、あるいはこれらの混合である。一実施形態において、気相シールは、大気、窒素、アルゴンまたはヘリウムによって設けられる。更なる実施形態において、気相シールは、大気によって設けられる。

30

【0343】

一実施形態において、親水性機構基板のパターンを有する疎水性支持体は平面的である。更なる実施形態において、親水性機構のパターンは、親水性機構がアレイ状に配置された少なくとも1つの領域を含む。

【0344】

実施形態において、親水性機構は、正方形平面アレイ状に編成され、機構は、半径 (R_D) を有する円として形状をなし、アレイは、隣接する機構の間のピッチ (δ) を有し、 δ は少なくとも $3R_D$ であり、アレイは、フロー方向に沿って長さ (L_{AX}) に延びており、アレイは、フロー方向に対して垂直な長さ (L_{AY}) に延びており、チャンネルは、フロー方向に沿って長さ (L_{CX}) を有し、 L_{CX} は L_{AX} より大きいか、またはこれに等しく、チャンネルは、フロー方向に対して垂直な長さ (L_{CY}) を有し、 L_{CY} は L_{AY} より大きいか、またはこれに等しく、チャンネルは、高さ (h) を有し、これは少なくとも $2R_D$ で、多くても h_{MAX} であり、 h_{MAX} は下記の式 (11) から計算される。

40

【0345】

【数14】

$$h_{MAX} = \theta_{MAX} \frac{L_{AX} L_{AY}}{L_{CX} L_{CY} \delta^2} \frac{\rho_L RT}{(1-RHI)M_W P_0} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) V_D(R_D, \gamma) \quad \text{Eqn. 11} \quad 50$$

【0346】

ここで、 θ_{MAX} は液滴の最大許容蒸発体積割合であり、 $V_D(R_D, \gamma)$ は式(1)に係る最大液滴体積である。式(11)に到着するために、式(10)を検討する必要がある、これは蒸発割合(θ_{VAP})を、フロー区画体積(V_C)および液滴アレイの最大凝集体積(V_{DA})の関数として表現する。上述した幾何形状を示すフロー区画では、フロー区画体積は $V_C = h_{L_{CX}} L_{CY}$ であり、最大凝集液滴アレイ体積は $V_{DA} = V_D(R_D, \gamma) L_{AX} L_{AY} \delta^{-2}$ である。気相シールを提供するために、フロー区画の機能的構成を確立する1つの手法は、液滴の最大許容蒸発体積割合を適切な値、例えば、 $\theta_{MAX} = 0.05$ に設定することである。次に、フロー区画高さを唯一の可変パラメータとして残すことによって、最大許容高さ(h_{MAX})は、 $V_C = V_{MAX} = h_{MAX} L_{CX} L_{CY}$ 、 V_{DA} および θ_{MAX} を式(10)に挿入し、 h_{MAX} について解くことによって得られ、こうして式(11)の結果に到着する。

10

【0347】

一実施形態において、親水性機構のパターンは、少なくとも2つの領域を備え、一方の領域のアレイは、他方の領域のアレイと相違する。

【0348】

親水性機構が種々のサイズの液滴を支持するように構成された場合、式(11)の h_{MAX} の計算は、パターン上の液滴体積の最小値に対応する V_D 値を用いて実行する必要がある。こうしてアレイ上の最小液滴および最大液滴の両方は、 θ_{MAX} 値で記述されるものより多く蒸発することなく、安定に残留できる。

20

【0349】

一実施形態において、親水性機構のための支持体は、フロー区画内に中央に設置される。

【0350】

親水性機構を備えるアレイのフロー区画での中央場所が通常は好ましいが、アレイの正確な場所は前回の計算の結果に影響しない。これは、計算が、熱力学的平衡、即ち、親水性機構によって支持された液滴からの蒸発レートが、フロー区画内の蒸気の液滴への凝縮レートに等しいという平衡がフロー区画内で確立されるという仮定に基づいていることに起因している。しかしながら、区画内の蒸気の輸送動態に起因して、中央設置アレイが、非中央設置のものと比較してより高速に平衡に到達できる。

30

【0351】

一実施形態において、親水性機構の数は、少なくとも1000個、少なくとも10000個、少なくとも100000個、少なくとも1000000個、少なくとも10000000個である。

【0352】

一実施形態において、疎水性層は、基板に共有結合的に接合した分子単層(monolayer)である。一実施形態において、疎水性層は、金属基板上に化学吸着した分子単層である。

【0353】

一実施形態において、フロー区画は、チャンネル形状であり、フロー区画の対向端部での2つの開口の間でフロー方向を形成する。一実施形態において、フロー区画および開口は、フロー方向に対して垂直な断面で矩形形状を有する。一実施形態において、フロー区画は、矩形形状を有し、開口は、フロー方向に対して垂直な断面で円形状を有する。

40

【0354】

一態様において、フローシステムを調製する方法がここでは開示される。

【0355】

本発明の全体理解を提供するために、酵素のSELISA分析を可能にするマイクロ液滴のアレイを支持するシステムを含む、特定の例示の実施形態をここでは説明する。しかしながら、ここで説明するシステムおよび方法は、他の適切な用途のために適合でき変更でき、そしてこうした他の追加および変更がその範囲から逸脱しないことは、当業者によって理解されよう。

50

【0356】

図1は、減少した蒸発レートを備えた、複数のマイクロ液滴を支持するためのシステムの一実施形態を示す。詳細には、図1は、矩形フロー区画が複数のマイクロ液滴を収容するシステム18を示す。マイクロ液滴は、フロー区画の底表面に配置される。フロー区画の各端部は、周囲環境に対して開放される。

【0357】

図2は、フロー区画の端部の断面図である。図2は、本実施形態では、端部が、高さ h （垂直矢印で示す）の形状の四角であることを示す。図1に戻って、マイクロ液滴のアレイの各端部は、フロー区画の端部から距離 L_E （二重矢印で示す）だけ離れていることを示す。

10

【0358】

図1のフロー区画は、マイクロ液滴のアレイを支持するフローチャンネルである。マイクロ液滴は、いずれか既知の手法を用いてフローチャンネルの中に挿入できる。図示したフローチャンネルの寸法は、図1から全体的に理解でき、チャンネルの高さ h 、マイクロ液滴のアレイによって覆われるフローチャンネルの長さである L_A 、入口および出口からマイクロアレイを分離するチャンネルの長さである L_E （マイクロ液滴のアレイのいずれの部分も支持しない）によって特徴付けられる。フローチャンネルの長さ、高さおよび形状が与えられると、該フローチャンネルの体積を計算することが可能である。こうした計算の1つの詳細が例2に設定される。

【0359】

20

各液滴が、本質的に半球であり、そのようにモデル化できる。半球状液滴は、ある半径を有することになる。液滴は、本質的には標準ピッチで離隔している。ドットは、直線アレイ、四角アレイまたはいずれか他の適切な配置でもよい。当然ながら、マイクロ液滴のアレイに含まれる液体の合計凝集体積を液滴の半径および数の関数として推定することが可能である。こうした計算の1つの詳細が例2に設定される。

【0360】

いったんフローチャンネルの幾何形状が知られると、利用可能な体積が計算できる。体積および平衡水蒸気圧(P_W)は、クラウジウス・クラペイロンの式によって記述されるように、蒸発する水の量を決定する。こうした計算の1つの詳細が例2に設定される。蒸気圧は、液滴から蒸発した水によって発生するため、それはフローチャンネル内の空気を加湿し飽和させる。その結果、凝集液滴体積の小さい割合だけが平衡蒸気圧を確立するのに充分である場合、残りの水体積は、液滴として表面に保存されることになる。こうして加湿された空気は、図3に示すように気相シール（マイクロ液滴を包囲するドット状充填で示す）を提供する。

30

【0361】

溶液の特定の体積について、例えば、特定の高さ h を選択することによって、図11Bに示すように、蒸発した水の量を約5%に保持できる。

【0362】

気相シールが確立されたプロセスは、図4に顕微鏡写真で示している。ここで、水のプラグが、フローチャンネルの一方の端部から他方へ駆動され、明確に画定されたミクロンサイズの水性液滴を残す。後退する水際(water-front)は顕微鏡写真の左側に見えており、液滴のアレイは水際の右に見えている。黒矢印は、液体が駆動される方向を示す。

40

【0363】

（用途）

ここで説明する本発明は、多くの可能性ある用途を有し、これは当業者に知られており、例えば、文献(Witters et al. in Digital Biology and Chemistry (DOI: 10.1039/C4LC00248B, (Frontier) Lab on a Chip, 2014, 14, pp. 3225-3232))を参照。これらは、アッセイのクラスを含み、我々は単一酵素結合分子分析(SELMA)と称している。SELMA式アッセイは、単一のペプチド、タンパク質及び／又はオリゴヌクレオチド分子の操作および検出に依拠している。

50

【0364】

一態様において、ここで開示されるフローシステムは、1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数の方法において使用できる。

【0365】

S E L M A式測定は、検体が、気相封止された液滴内に固定されるデジタル計数アッセイであり、続いて検体は、1つ以上のステップで酵素共役剤を用いた標識化が施される。液滴のナノリットルからアトリットルの体積に起因して、単一酵素が、検出剤の連続的な酵素的変換によって数秒から数分以内に検出可能な信号を生成することができる。図9において、例示のS E L M A式測定の略図を示しており、例4においてS E L M Aの実験的論証を説明している。

10

【0366】

一態様において、1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のための方法がここでは開示され、該方法は、気相シールの下での複数のナノリットルからアトリットルの液滴に含まれる検体タイプを計数することを含む。

【0367】

ここで開示する実施形態において、気相シールは、マイクロ液滴の蒸発を低減できる、フロー区画内の蒸気圧を確立する。

【0368】

ここで開示する実施形態において、デジタル計数は、フローシステムにおいて実施され、該フローシステムは、疎水性基板の中または上に親水性機構のパターンを有する支持体を備え、疎水性基板は、少なくとも1つの開口を含むフロー区画の中に組み込まれ、親水性機構は、複数のナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成される。

20

【0369】

ここで開示する実施形態において、親水性機構は、半径(R_D)を有する円形であり、単一の親水性円が支持できる最大液滴体積(V_D)は、下記の式である。

【0370】

【数15】

$$V_D = \pi R_D^3 G(\gamma)$$

$$G(\gamma) = \frac{2 - 3 \sin\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right) + \sin^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}{3 \cos^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}$$

30

【0371】

ここで、 γ は疎水性基板上の液体接触角である。

【0372】

ここで開示する実施形態において、気相シールは、各ナノリットルからアトリットルの液滴の蒸発を最大液滴体積の50%未満に低減する。

【0373】

ここで開示する実施形態において、ここで開示するフローシステムは、ここで開示する方法において使用される。

40

【0374】

当業者は、ただ型どおりの実験を用いて、ここで説明した実施形態および実例の多くの同等物を理解するようになり、または究明できる。

【0375】

従って、本発明は、ここで説明した実施形態に限定されず、下記請求項から理解されるべきであり、法律に基づいて許容される限り広く解釈されるべきであることは理解されよう。

【0376】

特に本発明は、下記の番号付け項目に関する。

【0377】

50

番号付け項目 1.

少なくとも 1 つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法であって、サンプルは、複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも 1 つの検体を捕獲可能であり、この方法は、少なくとも 2 つの検出サイクルを含み、各検出サイクルは、下記ステップを含む。

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

【0378】

10

番号付け項目 2.

サンプル、および複数の個別の捕獲部位を有する固相は、少なくとも 1 つの検体の捕獲前または捕獲中に区画化される、番号付き項目 1 に記載の方法。

【0379】

番号付き項目 3.

捕獲された検体および標識剤は、少なくとも 1 つの検体の標識化の前または標識化中に区画化される、番号付き項目 1 に記載の方法。

【0380】

番号付き項目 4.

検体は、ステップ a) の前に各検出サイクルにおける標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって、標識化される、番号付き項目 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

20

【0381】

番号付き項目 5.

固相上の検体の捕獲前または捕獲中に標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって、捕獲された検体が標識化され、ステップ c) は、追加の検出サイクルが行われる前に行われ、続いて再標識化ステップが行われ、捕獲された検体は標識剤を添加することによって標識化される、番号付き項目 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【0382】

番号付き項目 6.

捕獲され標識化された検体は、区画化され、少なくとも 1 つの検体を含む液体区画を生成する、番号付き項目 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

30

【0383】

番号付き項目 7.

少なくとも 1 つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法であって、サンプルは複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも 1 つの検体を捕獲可能であり、この方法は、少なくとも 2 つの検出サイクルを含み、各検出サイクルは、標識剤を添加することによって少なくとも 1 つの検体を標識化し、そして、少なくとも 1 つの捕獲され標識化された検体を区画化して、少なくとも 1 つの検体を含む液体区画を生成するステップを含み、そして、ステップ a) ～ c) を含む。

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

40

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

【0384】

番号付き項目 8.

少なくとも 1 つの検体を潜在的に含有するサンプルのデジタル計数分析方法であって、サンプルは複数の個別の捕獲部位を有する固相と接触しており、各部位は、少なくとも 1 つの検体を捕獲可能であり、少なくとも 1 つの検体は、固相上の少なくとも 1 つの検体の捕獲前または捕獲中に、標識化ステップにおいて標識剤を添加することによって標識化され、この方法は、少なくとも 2 つの検出サイクルを含み、少なくとも 1 つの捕獲され標識

50

化された検体は、区画化され、少なくとも1つの検体を含む液体区画を生成し、そして、ステップa)～c)を含む。

a) 捕獲され標識化された検体からの信号を起動するステップ。

b) 捕獲され標識化された検体からの信号を示す、捕獲部位の数および位置の記録ステップ。

c) 追加の検出サイクルが行われる前に、信号を非活性化するステップ。

追加の検出サイクルが行われる前にステップc)が行われ、続いて再標識化ステップが行われ、少なくとも1つの検体は、標識剤を添加することによって標識化される。

【0385】

番号付き項目9.

分析は、単一分子デジタル計数分析である、番号付き項目1～8のいずれかに記載の方法。

【0386】

番号付き項目10.

サンプルの単一分子デジタル計数分析において偽ポジティブ検出及び／又はバックグラウンドノイズの低減のための、番号付き項目1～9のいずれかに記載の方法。

【0387】

番号付き項目11.

サンプルは、ターゲット検体および非ターゲット化合物を含み、または潜在的に含み、ターゲット検体は、捕獲部位によって捕獲効率 C_1 で捕獲され、非ターゲット化合物は、捕獲部位によって捕獲効率 C_2 ($C_1 \geq C_2$)で捕獲され、ターゲット検体は、第1標識剤によって標識効率 L_1 で標識化され、非ターゲット化合物は、第1標識剤によって標識効率 L_2 ($L_1 \geq L_2$)で標識化され、検出サイクル数 N_c は、下記の式で示す比 α が、

【0388】

【数16】

$$\alpha = \frac{C_1 L_1^{N_c}}{C_2 L_2^{N_c}}$$

1～10の間、好ましくは10～100の間、好ましくは100～1000の間、好ましくは1000～10000の間、好ましくは10000～100000の間、好ましくは100000～1000000の間、好ましくは1000000より大きいように調整され、そして各検出サイクルは、標識化ステップにおいて第1標識剤を適用する、番号付き項目1～10のいずれかに記載の方法。

【0389】

番号付き項目12.

該方法は、偽ポジティブ検出サイクルを含み、標識化ステップにおいて第1標識剤の代わりに第2標識剤が適用され、非ターゲット化合物は、標識効率 L_1 で第2標識剤によって標識化され、ターゲット検体は、第2標識剤によって標識効率 L_2 ($L_1 \geq L_2$)で標識化される、番号付き項目11に記載の方法。

【0390】

番号付き項目13.

サンプル中に存在する非ターゲット化合物の数は、偽ポジティブ検出サイクルにおいて信号を示す捕獲部位の数から推定される、番号付き項目12に記載の方法。

【0391】

番号付き項目14.

サンプル中に存在するターゲット検体の数は、偽ポジティブ検出サイクルの前の全ての検出サイクルにおいて、信号を繰り返し示す捕獲部位の数およびサンプル中に存在する非ターゲット化合物の推定された数から推定される、番号付き項目13に記載の方法。

【0392】

番号付き項目15.

液体区画のせいぜい 99%、例えば、せいぜい 95%、せいぜい 90%、せいぜい 85%、せいぜい 80%、せいぜい最大 75%、せいぜい 70%、せいぜい 65%が、捕獲され標識化された検体を含む、番号付き項目 1～14 のいずれかに記載の方法。

【0393】

番号付き項目 16.

該方法は、偽ポジティブ検出サイクルを含み、該方法は、いずれの標識化ステップを含まない、番号付き項目 1～15 のいずれかに記載の方法。

【0394】

番号付き項目 17.

標識剤は検出様式(modality)を含み、信号を起動するステップは、検出剤を検出様式に配給することによる、番号付き項目 1～16 のいずれかに記載の方法。

10

【0395】

番号付き項目 18.

検出サイクルは、少なくとも 1つの捕獲され標識化された検体からの信号を起動する前に、検体を標識化しなかった標識剤を続いて除去するステップを含む、番号付き項目 1～17 のいずれかに記載の方法。

【0396】

番号付き項目 19.

結合していないサンプル成分は、捕獲された検体または捕獲され標識化された検体から除去される、番号付き項目 1～18 のいずれかに記載の方法。

20

【0397】

番号付き項目 20.

信号の非活性化ステップは、下記から選択される。

a) 捕獲された検体から標識剤を分離するステップ。

b) 標識剤が信号を促進する能力を非活性化させるステップ。

c) a) および b) の組合せ。

ここで、信号の非活性化ステップの後、必要に応じてリンスステップが行われる、番号付き項目 1～19 のいずれかに記載の方法。

【0398】

番号付き項目 21.

サンプルからの少なくとも 1つの検体の捕獲は、固相への固定化によるものである、番号付き項目 1～20 のいずれかに記載の方法。

30

【0399】

番号付き項目 22.

サンプルから少なくとも 1つの検体の捕獲は、検体に特異的な 1つ以上の捕獲プローブを使用することによるものであり、捕獲プローブは固相に付着されている、番号付き項目 1～21 のいずれかに記載の方法。

【0400】

番号付き項目 23.

第 1の数の検出サイクルおよび第 2の数の検出サイクルが使用され、第 1の数の検出サイクルは、第 2の数の検出サイクルとは異なる標識剤を使用する、番号付き項目 1～22 のいずれかに記載の方法。

40

【0401】

番号付き項目 24.

1つ以上の異なる検体タイプ用の 1つ以上の異なる捕獲プローブが固相に付着している、番号付き項目 1～23 のいずれかに記載の方法。

【0402】

番号付き項目 25.

1つ以上の異なる標識剤を使用して、1つ以上の異なる検体タイプを標識化する、番号付き項目 1～24 のいずれかに記載の方法。

50

【0403】

番号付き項目26.

検出サイクルの数は、少なくとも3サイクル、少なくとも4サイクル、少なくとも5サイクル、少なくとも6サイクル、少なくとも7サイクル、少なくとも8サイクル、少なくとも9サイクル、または少なくとも10サイクルである、番号付き項目1～25のいずれかに記載の方法。

【0404】

番号付き項目27.

検出サイクル数は、3～20サイクル、3～15サイクル、3～10サイクル、3～9サイクル、3～8サイクル、3～7サイクル、3～6サイクル、または3～5サイクルである、番号付き項目1～26のいずれかに記載の方法。

10

【0405】

番号付き項目28.

標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、洗浄によって除去される、番号付き項目1～27のいずれかに記載の方法。

【0406】

番号付き項目29.

信号を非活性化するステップは、複数の液体区画において実施される、番号付き項目1～28のいずれかに記載の方法。

20

【0407】

番号付き項目30.

標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、分離は、酵素的開裂によるものである、番号付き項目1～29のいずれかに記載の方法。

【0408】

番号付き項目31.

標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、分離は、pHを調整したり、イオン強度を調整したり、変性塩を添加し、または界面活性剤を添加することによって、化学的開裂または脱着によるものである、番号付き項目1～30のいずれかに記載の方法。

【0409】

番号付き項目32.

標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、分離は加熱によるものである、番号付き項目1～31のいずれかに記載の方法。

30

【0410】

番号付き項目33.

標識剤は、その化学的状態または物理的状态を変化させることによって非活性化される、番号付き項目1～32のいずれかに記載の方法。

【0411】

番号付き項目34.

標識剤は、酵素を含み、酵素の状態は、活性部位の化学的修飾または生化学的修飾によって変化する、番号付き項目1～33のいずれかに記載の方法。

40

【0412】

番号付き項目35.

標識剤は、酵素を含み、酵素の状態は、酵素の三次構造の化学的分裂または物理的分裂によって変化する、番号付き項目1～34のいずれかに記載の方法。

【0413】

番号付き項目36.

捕獲され標識化された検体は、親水性液体を複数の個別の捕獲部位に導入して引き出すことによって区画化されて、捕獲され標識化された検体を収容する液体区画を生成し、各個別の捕獲部位は親水性にされており、複数の個別の捕獲部位が1つの疎水性基板上に配

50

置され、そのため親水性液体を引き出す際、複数の液滴が形成され、各液滴が1つの個別の捕獲部位を占有する、番号付き項目1～35のいずれかに記載の方法。

【0414】

番号付き項目37.

捕獲され標識化された検体は、複数の個別の捕獲部位に第1親水性液体を導入し、続いて第1親水性液体を第2液体と置換することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、2つの液体は非混和性であり、第2液体は第1液体よりも軽く、各個別の捕獲部位が親水性にされており、複数の個別の捕獲部位が疎水性基板上に配置され、そのため第1親水性液体を第2液体と置換する際、第1親水性液体を含む複数の液滴が形成され、各液滴は1つの個別の捕獲部位を占有する、番号付き項目1～36のいずれかに記載の方法。

10

【0415】

番号付き項目38.

捕獲され標識化された検体は、第1液体を複数の個別の捕獲部位に導入することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、各個別の捕獲部位はウェル形状または毛細管形状であり、第1液体は第2液体と置換され、2つの液体は非混和性であり、第2液体は第1液体よりも軽く、そのため第1液体の置換の際、第1液体を含む複数の液滴が形成され、各液滴は1つの個別の捕獲部位を占有する、番号付き項目1～37のいずれかに記載の方法。

20

【0416】

番号付き項目39.

捕獲され標識化された検体は、液体を複数の個別の捕獲部位に導入することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、各個別の捕獲部位はウェル形状または毛細管形状であり、液体は個別の捕獲部位に分配され、そのため各液体区画は1つの個別の捕獲部位を占有する、番号付き項目1～38のいずれかに記載の方法。

【0417】

番号付き項目40.

捕獲され標識化された検体は、液体を複数の個別の捕獲部位に導入することによって区画化されて、検体を収容する液体区画を生成し、各個別の捕獲部位はウェル形状であり、液体は、蓋を複数の捕獲部位の上に付与することによって置換され、そのため複数の捕獲部位が形成され、各液滴は、蓋によって境界設定された1つのウェル形状の捕獲部位を占有する、番号付き項目1～39のいずれかに記載の方法。

30

【0418】

番号付き項目41.

捕獲され標識化された検体は、複数の個別の捕獲部位および捕獲され標識化された検体を含む第1液体を第2液体に導入することによって区画化されて、捕獲され標識化された検体を収容する液体区画を生成し、第2液体は第1液体と非混和性であり、そのため第1液体で構成され、第2液体によって包囲された複数のエマルジョン液滴が形成され、各エマルジョン液滴は、少なくとも1つの個別の捕獲部位および少なくとも1つの捕獲され標識化された検体を含む、番号付き項目1～40のいずれかに記載の方法。

40

【0419】

番号付き項目42.

各検出サイクルにおいて信号を示す液体区画の位置は、他の検出サイクルにおいて信号を示す液体区画の位置と比較され、その結果、液体区画が信号を示す連続的な検出サイクルの数が計数され、液体区画は、少なくとも2つのカテゴリーに分類され、液体区画の第1カテゴリーは第2カテゴリーよりも多い計数を示す、番号付き項目1～41のいずれかに記載の方法。

【0420】

番号付き項目43.

連続検出サイクルにおいて信号を繰り返し示す液体区画の数は、サンプル中のターゲッ

50

ト検体の濃度を計算するために適用される、番号付き項目42に記載の方法。

【0421】

番号付き項目44.

個別の捕獲部位の数は、少なくとも1000個、好ましくは少なくとも10000個、好ましくは少なくとも100000個、好ましくは少なくとも1000000個、好ましくは少なくとも10000000個である、番号付き項目1～43のいずれかに記載の方法。

【0422】

番号付き項目45.

個別の捕獲部位は、円形または球状であり、個々の個別の部位の直径は、1mm未満、好ましくは100μm未満、好ましくは10μm未満、好ましくは1μm未満である、番号付き項目1～44のいずれかに記載の方法。

10

【0423】

番号付き項目46.

個別の捕獲部位は、円形または球状であり、個別の部位の直径は、0.5～5μm、0.5～10μm、0.5～50μm、0.5～100μm、10～1000μm、50～1000μm、100～1000μmの間である、番号付き項目1～45のいずれかに記載の方法。

【0424】

番号付き項目47.

個別の捕獲部位は、正方形(quadratic)であり、個別の部位の長さは、1mm未満、好ましくは100μm未満、好ましくは10μm未満、好ましくは1μm未満である、番号付き項目1～46のいずれかに記載の方法。

20

【0425】

番号付き項目48.

個別の捕獲部位は、正方形(quadratic)であり、個別の部位の長さは、0.5～5μm、0.5～10μm、0.5～50μm、0.5～100μm、10～1000μm、50～1000μm、100～1000μmの間である、番号付き項目1～47のいずれかに記載の方法。

【0426】

番号付き項目49.

固相は、下記のものである、番号付き項目1～48のいずれかに記載の方法。

a) 固体基板、

b) コロイドビーズ、または、

c) コロイドビーズの集合体。

30

【0427】

番号付き項目50.

液体区画は、気相シール下の複数の液体ナノリットルからアトリットル液滴の形態である、番号付き項目1～49のいずれかに記載の方法。

【0428】

番号付き項目51.

液体区画は、ウェル形状の捕獲部位、空洞形状の捕獲部位、または毛細管形状の捕獲部位を占有する、番号付き項目1～50のいずれかに記載の方法。

40

【0429】

番号付き項目52.

液体区画は、複数の油中水型エマルジョン液滴の形態である、番号付き項目1～51のいずれかに記載の方法。

【0430】

番号付き項目53.

液体区画は、水非混和性の液相の下で複数の水性ナノリットルからアトリットル液滴の

50

形態である、番号付き項目 1 ～ 5 2 のいずれかに記載の方法。

【0431】

番号付き項目 5 4 .

デジタル計数は、サンプル中の 1 つ以上の検体タイプのデジタル計数のためのフローシステム (10) において行われ、フローシステムは、疎水性基板 (16) の内または上に親水性機構 (14) のパターンを有する支持体 (12) を備え、疎水性基板 (16) は、少なくとも 1 つの開口を含むフロー区画 (18) 内に埋め込まれ、親水性機構 (14) は、最大液滴体積をそれぞれ有する複数の液体ナノリットルからアトリットル液滴を支持するように構成され、そしてフロー区画 (18) は、各ナノリットルからアトリットル液滴の蒸発を低減する気相シールを支持するように構成される、番号付き項目 1 ～ 5 3 のいずれかに記載の方法。

10

【0432】

番号付き項目 5 5 .

気相シールは、マイクロ液滴の蒸発を低減できるフローシステム内の蒸気圧を確立する、番号付き項目 5 4 に記載の方法。

【0433】

番号付き項目 5 6 .

気相シールは、各ナノリットルからアトリットル液滴の蒸発を最大液滴体積の 50 パーセント未満まで減少させる、番号付き項目 5 4 ～ 5 5 のいずれかに記載の方法。

【0434】

番号付き項目 5 7 .

(i) 疎水性基板 (16) の内または上にある親水性機構 (14) のパターンを、1 つ以上の検体タイプを含むサンプルと接触させるステップを含む、番号付き項目 5 4 ～ 5 6 のいずれかに記載の方法。

20

【0435】

番号付き項目 5 8 .

(i i) 親水性機構 (14) の上に 1 つ以上の検体タイプを捕獲するステップを含む、番号付き項目 5 4 ～ 5 7 のいずれかに記載の方法。

【0436】

番号付き項目 5 9 .

(i i i) 少なくとも 1 つの捕獲された検体タイプを、検出対象の検体タイプに特異的な標識剤で標識化するステップを含む、番号付き項目 5 4 ～ 5 8 のいずれかに記載の方法。

30

【0437】

番号付き項目 6 0 .

捕獲され標識化された検体は、検出剤を、パターンを横断するように流し、パターンから引き出して、個々の液滴をナノリットルからアトリットル液滴の形態に生成するステップ (i v) によって、区画化されて、少なくとも 1 つの検体を収容する液体区画を生成する、番号付き項目 5 4 ～ 5 9 のいずれかに記載の方法。

【0438】

番号付き項目 6 1 .

標識剤と検出剤の両方を収容する液滴の数を計数するステップ (v) を含む、番号付き項目 5 4 ～ 6 0 のいずれかに記載の方法。

40

【0439】

番号付き項目 6 2 .

ステップ (i i i) 、 (i v) および (v) を 1 回以上繰り返すことを含む、番号付き項目 5 4 ～ 6 1 のいずれかに記載の方法。

【0440】

番号付き項目 6 3 .

第 1 標識剤の代わりに、検出対象の第 2 検体タイプに特異的な第 2 標識剤を使用するこ

50

とによって、ステップ (i i i)、(i v) および (v) を繰り返すことを含む、番号付き項目 5 4 ~ 6 2 のいずれかに記載の方法。

【0 4 4 1】

番号付き項目 6 4 .

ステップ (i i i)、(i v) および (v) を繰り返す前に、前回のステップに存在する標識剤を非活性化させるステップを含む、番号付き項目 5 4 ~ 6 3 のいずれかに記載の方法。

【0 4 4 2】

番号付き項目 6 5 .

標識剤は、捕獲された検体からの分離によって非活性化され、そしてフローシステムの洗浄によって除去される、番号付き項目 5 4 ~ 6 4 のいずれかに記載の方法。

10

【0 4 4 3】

番号付き項目 6 6 .

標識剤は、酵素および特定の検体認識部位(moiety)を含み、検体認識部位は、下記の分子グループ、即ち、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、アプタマー、抗体、それらの複合体またはそれらの合成変異体から選択される、番号付き項目 1 ~ 6 5 のいずれかに記載の方法。

【0 4 4 4】

番号付き項目 6 7 .

個別の捕獲部位は、親水性機構である、番号付き項目 1 ~ 6 6 のいずれかに記載の方法。

20

【0 4 4 5】

番号付き項目 6 8 .

1 つ以上の異なる検体タイプのための 1 つ以上の捕獲プローブ (2 2) が、親水性機構 (1 4) に付着している、番号付き項目 1 ~ 6 7 のいずれかに記載の方法。

【0 4 4 6】

番号付き項目 6 9 .

親水性機構に付着した 2 つ以上のタイプの捕獲プローブ (2 2) を含み、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域 (2 4) 内に配置される、番号付き項目 1 ~ 6 8 のいずれかに記載の方法。

30

【0 4 4 7】

番号付き項目 7 0 .

捕獲プローブ (2 2) は、下記のプローブグループ、即ち、オリゴヌクレオチド、アプタマー、タンパク質、抗体、ペプチドまたはそれらの合成変異体から選択される、番号付き項目 1 ~ 6 9 のいずれかに記載の方法。

【0 4 4 8】

番号付き項目 7 1 .

液体中に 1 つ以上のタイプの検体を含有するサンプルは、完全浸漬によって親水性機構 (1 4) を含む基板と接触する、番号付き項目 1 ~ 7 0 のいずれかに記載の方法。

【0 4 4 9】

番号付き項目 7 2 .

標識化は、検体のための標識剤を含有する溶液を、捕獲された検体と完全浸漬によって接触させることによって行われる、番号付き項目 1 ~ 7 1 のいずれかに記載の方法。

40

【0 4 5 0】

番号付き項目 7 3 .

検体は、下記の検体グループ、即ち、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質、タンパク質／オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質／脂質複合体、ペプチド、エキソソーム、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、ナノ粒子、細胞断片または細胞から選択される、番号付き項目 1 ~ 7 2 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 1】

50

番号付き項目 7 4.

サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または組織から選択される、番号付き項目 1 ～ 7 3 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 2】

番号付き項目 7 5.

サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または組織、の研究室処理サンプルから選択される、番号付き項目 1 ～ 7 4 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 3】

番号付き項目 7 6.

デジタル計数分析は、単一分子の検出と定量化の両方を含む、番号付き項目 1 ～ 7 5 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 4】

番号付き項目 7 7.

捕獲された検体は、捕獲の後に捕獲プローブ（2 2）と共有結合するようになる、番号付き項目 1 ～ 7 6 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 5】

番号付き項目 7 8.

捕獲プローブは、オリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドであり、検体は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む分子複合体であり、検体は、捕獲プローブ配列に対して相補的な配列を介して捕獲プローブと結合され、共有結合架橋は、鎖間架橋剤、例えば、白金錯体、マイトマイシン C、ナイトロジェンマスタード、ソラレンまたはアルデヒドなどを使用することによって実行される、番号付き項目 1 ～ 7 7 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 6】

番号付き項目 7 9.

捕獲プローブは、タンパク質、アプタマー、ペプチドまたはその合成変異体であり、検体は、タンパク質、ペプチドまたは、タンパク質もしくはペプチドを含む複合体であり、検体は、検体の特異領域の構造的認識によって捕獲プローブに結合され、共有結合架橋は、化学固定剤、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウム、メチルグリオキサールまたは酢酸ウラニルなどを使用することによって実行される、番号付き項目 1 ～ 7 8 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 7】

番号付き項目 8 0.

捕獲プローブは、合成オリゴヌクレオチドであり、合成修飾は、捕獲の後に検体と捕獲プローブとの間に共有結合が確立できるように検体に対して反応性の化学基を組み込む、番号付き項目 1 ～ 7 9 のいずれかに記載の方法。

【0 4 5 8】

番号付き項目 8 1.

検体と捕獲プローブとの間の共有結合は、検体／捕獲プローブ複合体を化学物質と接触させることによって起動される、番号付き項目 8 0 に記載の方法。

【0 4 5 9】

番号付き項目 8 2.

検体と捕獲プローブとの間の共有結合は、検体／捕獲プローブ複合体を電磁放射線と接触させることによって起動される、番号付き項目 8 0 に記載の方法。

【0 4 6 0】

番号付き項目 8 3.

デジタル計数測定は、単一酵素結合分子分析（S E L M A）、デジタルポリメラーゼ連鎖反応（d P C R）、単一酵素結合免疫吸着法（s E L I S A）またはデジタル単一酵素結合免疫吸着法（d E L I S A）を含む、番号付き項目 1 ～ 8 2 のいずれかに記載の方法

10

20

30

40

50

。

【0461】

番号付き項目84。

少なくとも1つの検体は、オリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドの配列は、例えば、単一ヌクレオチドの多型、挿入または欠失など、1つ以上の塩基対変化を有するゲノム配列または転写ゲノム配列であり、サンプルは、潜在的に、2つ以上の非ターゲットオリゴヌクレオチドを含み、非ターゲットオリゴヌクレオチドは、ターゲットと同じゲノム配列または転写されたゲノム配列を有するが、1つ以上の塩基対変化を伴わない、番号付き項目1～83のいずれかに記載の方法。

【0462】

番号付き項目85。

サンプルは、第1および第2検体タイプを含み、第1検体タイプはサンプル中に第1配列および第1濃度を有し、第2検体タイプはサンプル中に第2配列および第2濃度を有し、第1配列および第2配列は異なり、第1および第2配列はゲノム配列または転写されたゲノム配列であり、ここに開示するように、第1および第2濃度は測定され、互いに比較してコピー数の変動を識別する、番号付き項目1～84のいずれかに記載の方法。

【0463】

番号付き項目86。

気相は、大気によって提供され、捕獲プローブは一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択され、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置され、検体は、処理した血液サンプルから抽出された一本鎖DNAであり、標識剤は、検出様式(modality)および認識部位を備え、検出様式は酵素であり、認識部位は、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択される、番号付き項目1～85のいずれかに記載の方法。

。

【0464】

番号付き項目87。

複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用であって、各部位は、番号付き項目1～86のいずれかに記載の方法で少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

【0465】

番号付き項目88。

複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用であって、各部位は、デジタル計数分析における計数誤差を減少させるために、例えば、偽ポジティブ検出及び／又はバックグラウンドノイズの低減のために、番号付き項目1～87のいずれかに記載の方法で少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

【0466】

番号付き項目89。

複数の個別の捕獲部位を有する固相の使用であって、各部位は、デジタル計数分析における計数誤差を減少させるために、例えば、偽ポジティブ検出及び／又はバックグラウンドノイズの低減のために、番号付き項目1～86のいずれかに定義される少なくとも2つの検出サイクルを行うことによって、少なくとも1つの検体を捕獲可能である。

【0467】

(本発明の更なる詳細な実施形態)

体積がピコリットル以下のマイクロ液滴を基板上の所定場所に液相で保持するプロセスが、マイクロ液滴を、少なくとも1つの開口を有するチャンネル内に配置することと、チャンネルの空間を、マイクロ液滴の蒸発を低減できるチャンネル内蒸気圧を確立する値に設定することを含む。

【0468】

本発明はさらに、下記の実施形態に関する。

【0469】

実施形態 1.

サンプル中の 1 つ以上の検体タイプのデジタル計数のためのフローシステムが、疎水性基板の中または上に親水性機構のパターンを有する支持体を備え、疎水性基板は、少なくとも 1 つの開口を含むフロー区画の中に組み込まれ、親水性機構は、それぞれ最大液滴体積を有する複数のナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成され、フロー区画は、各ナノリットルからアトリットルの液滴の蒸発を低減する気相シールを支持するように構成される。

【0470】

実施形態 2.

実施形態 1 に係るフローシステムにおいて、フロー区画は、体積 (V_C) を有し、体積 (V_C) は、全てのナノリットルからアトリットルの液滴の凝集最大液滴体積 (V_{DA}) より大きく、下記式によって計算される V_{MAX} より小さい。

【0471】

【数17】

$$V_{MAX} = V_{DA} \frac{\rho_L RT}{(1 - RHI) M_W P_0} \exp \left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right)$$

【0472】

ここで、 ρ_L は液体の体積密度であり、 R はモル気体定数であり、 T は温度であり、 RHI は液体の気体成分の初期相対蒸気飽和であり、 P_0 は対応する基準温度 T_0 での液体の基準蒸気圧であり、 M_W は液体のモル重量であり、 ΔH_{VAP} は液体の蒸発のエンタルピーである。

【0473】

実施形態 3.

実施形態 1 ～ 2 のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構が (R_D) の半径を有する円形であり、単一の親水性円が支持できる最大液滴体積 (V_D) は、下記式である。

【0474】

【数18】

$$V_D = \pi R_D^3 G(\gamma) \quad 30$$

$$G(\gamma) = \frac{2 - 3 \sin \left(\frac{\pi}{2} - \gamma \right) + \sin^3 \left(\frac{\pi}{2} - \gamma \right)}{3 \cos^3 \left(\frac{\pi}{2} - \gamma \right)}$$

【0475】

ここで、 γ は疎水性基板での液体接触角である。

【0476】

実施形態 4.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、各ナノリットルからアトリットルの液滴の蒸発は、最大液滴体積の 50 % 未満、各ナノリットルからアトリットルの液滴の最大液滴体積の、40 % 未満、好ましくは 30 % 未満、好ましくは 20 % 未満、好ましくは 10 % 未満、好ましくは 5 % 未満、好ましくは 1 % 未満である。

【0477】

実施形態 5.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、気相シールは、大気、窒素、アルゴン及び／又はヘリウムによって構成される。

【0478】

実施形態 6.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、気相シールは、大気によ

50

って構成される。

【0479】

実施形態7.

サンプル中の1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のためのフローシステムが、疎水性基板の中または上に親水性機構のパターンを有する支持体を備え、疎水性基板は、少なくとも1つの開口を含むフロー区画の中に組み込まれ、親水性機構は、複数のナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成される。

【0480】

実施形態8.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムは、親水性／疎水性パターンとの液体接触を可能にするために、液滴領域を覆う1つ以上のフロー区画を備える。

10

【0481】

実施形態9.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムは、フローシステムに液体および試薬を供給するための1つ以上の液体装填パッドを備える。

【0482】

実施形態10.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムは、フロー区画を液体装填パッドに接続する液体入口を備える。

【0483】

実施形態11.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、液体は、入口から出口への圧力降下を用いてフロー区画を横断して駆動される。

20

【0484】

実施形態12.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムは、フローチャネルを圧力源に接続する液体出口を備え、吸引を提供し、よってフローチャネルを介して液体駆動に介在する。

【0485】

実施形態13.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、気相シールは、大気、窒素、アルゴン及び／又はヘリウムによって構成される。

30

【0486】

実施形態14.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、気相シールは、大気によって構成される。

【0487】

実施形態15.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムは、1つ以上の区別できる検体タイプのための1つ以上の捕獲プローブを備え、捕獲プローブは、親水性機構に付着される。

40

【0488】

実施形態16.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置される。

【0489】

実施形態17.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、支持体は平面的である。

【0490】

実施形態18.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構は平面的であ

50

る。

【0491】

実施形態19.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構のパターンは、親水性機構がアレイ状に配置された少なくとも1つの領域を含む。

【0492】

実施形態20.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構は、正方形平面アレイ状に編成され、機構は、半径(R_D)を有する円として形状をなし、アレイは、隣接する機構の間のピッチ(δ)を有し、 δ は少なくとも $3R_D$ であり、アレイは、フロー方向に沿って長さ(L_{AX})に延びており、アレイは、フロー方向に対して垂直な長さ(L_{AY})に延びており、チャンネルは、フロー方向に沿って長さ(L_{CX})を有し、 L_{CX} は L_{AX} より大きい、またはこれに等しく、チャンネルは、フロー方向に対して垂直な長さ(L_{CY})を有し、 L_{CY} は L_{AY} より大きい、またはこれに等しく、チャンネルは、高さ(h)を有し、これは少なくとも $2R_D$ で、多くても h_{MAX} であり、 h_{MAX} は下記の式から計算される。

【0493】

【数19】

$$h_{MAX} = \theta_{MAX} \frac{L_{AX} L_{AY}}{L_{CX} L_{CY} \delta^2} \frac{\rho_L R T}{(1 - RHI) M_W P_0} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) \pi R_D^3 G(\gamma) \quad (20)$$

$$G(\gamma) = \frac{2 - 3 \sin\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right) + \sin^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}{3 \cos^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}$$

【0494】

ここで、 γ は疎水性材料についての液体接触角であり、 θ_{MAX} は液滴の最大許容蒸発体積割合であり、 ρ_L は液体の体積密度であり、 R はモル気体定数であり、 T は温度であり、 RHI は液体の気体成分の初期相対蒸気飽和であり、 P_0 は対応する基準温度 T_0 での液体の基準蒸気圧であり、 M_W は液体のモル重量であり、 ΔH_{VAP} は液体の蒸発のエンタルピーである。

【0495】

実施形態21.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構のパターンは、少なくとも2つの領域を備え、一方の領域のアレイは、他方の領域のアレイと相違する。

【0496】

実施形態22.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構を支持する領域は、フロー区画内に中央に設置される。

【0497】

実施形態23.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構の数は、少なくとも1000個、好ましくは少なくとも10000個、好ましくは少なくとも100000個、好ましくは少なくとも1000000個、好ましくは少なくとも10000000個、好ましくは少なくとも100000000個である。

【0498】

実施形態24.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、フロー区画は、チャンネル形状であり、区画の対向端部での2つの開口の間でフロー方向を形成する。

【0499】

10

20

30

40

50

実施形態 25.

実施形態 13に係るフローシステムにおいて、フロー区画および開口は、フロー方向に対して垂直な断面で矩形形状を有する。

【0500】

実施形態 26.

実施形態 13に係るフローシステムにおいて、フロー区画は、矩形形状を有し、開口は、フロー方向に対して垂直な断面で円形形状を有する。

【0501】

実施形態 27.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構は、ナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成され、液滴は、少なくとも90度、多くても150度の、疎水性基板での接触角を示す。

10

【0502】

実施形態 28.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性機構は、少なくとも0.1 μm 、多くても100 μm の半径を有するナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成される。

【0503】

実施形態 29.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、親水性基板は、ガラス、親水性ポリマーまたは金属酸化物化合物である。

20

【0504】

実施形態 30.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、疎水性層は、基板に共有結合的に接合した分子単層である。

【0505】

実施形態 31.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、疎水性層は、金属基板上に化学吸着した分子単層である。

【0506】

実施形態 32.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、1つ以上の捕獲した検体は、捕獲に続いて、捕獲プローブと共有結合的に架橋または結合できる。

30

【0507】

実施形態 33.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、捕獲プローブは、オリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドであり、検体は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む分子複合体であり、検体は、捕獲プローブ配列に対して相補的な配列を介して捕獲プローブと結合され、共有結合架橋は、鎖間架橋剤、例えば、白金錯体、マイトマイシンC、ナイトロジェンマスタード、ソラレンまたはアルデヒドなどを使用することによって実行される。

40

【0508】

実施形態 34.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、捕獲プローブは、タンパク質、ペプチドまたはその合成変異体であり、検体は、タンパク質、ペプチドまたは、タンパク質もしくはペプチドを含む複合体であり、検体は、検体の特異領域の構造的認識によって捕獲プローブに結合され、共有結合架橋は、化学固定剤、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウムまたは酢酸ウラニルなどを使用することによって実行される。

【0509】

50

実施形態 35.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、デジタル計数は、デジタル計数測定である。

【0510】

実施形態 36.

前述した実施形態のいずれかに係るフローシステムにおいて、デジタル計数測定は、単一酵素結合分子分析 (SELM A)、デジタルポリメラーゼ連鎖反応 (dPCR)、単一酵素結合免疫吸着法 (SELISA) またはデジタル単一酵素結合免疫吸着法 (dELISA) である。

【0511】

10

実施形態 37.

前述した実施形態のいずれかで定義されるフローシステムを調製する方法。

【0512】

実施形態 38.

少なくとも1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のための、前述した実施形態のいずれかで定義されるフローシステムを使用する方法。

【0513】

実施形態 39.

少なくとも1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のための方法であり、該方法は、気相シールの下での複数のナノリットルからアトリットルの液滴に含まれる検体タイプを計数することを含む。

20

【0514】

実施形態 40.

実施形態 39に係る方法において、気相シールは、マイクロ液滴の蒸発を低減できる、フローシステム内の蒸気圧を確立する。

【0515】

実施形態 41.

実施形態 39～40のいずれかに係る方法において、デジタル計数は、フローシステムにおいて実施され、該フローシステムは、疎水性基板の中または上に親水性機構のパターンを有する支持体を備え、疎水性基板は、少なくとも1つの開口を含むフロー区画の中に組み込まれ、親水性機構は、複数のナノリットルからアトリットルの液滴を支持するように構成される。

30

【0516】

実施形態 42.

実施形態 39～41のいずれかに係る方法において、親水性機構は、半径 (R_D) を有する円形であり、単一の親水性円が支持できる最大液滴体積 (V_D) は、下記の式である。

【0517】

【数20】

$$V_D = \pi R_D^3 G(\gamma)$$

40

$$G(\gamma) = \frac{2 - 3 \sin\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right) + \sin^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}{3 \cos^3\left(\frac{\pi}{2} - \gamma\right)}$$

【0518】

ここで、 γ は疎水性基板上の液体接触角である。

【0519】

実施形態 43.

実施形態 39～42のいずれかに係る方法において、気相シールは、各ナノリットルか

50

らアトリットルの液滴の蒸発を最大液滴体積の50%未満に低減する。

【0520】

実施形態44.

実施形態39～43のいずれかに係る方法において、フローシステムは、実施形態1～36のいずれかにおいて定義される。

【0521】

実施形態45.

実施形態39～44のいずれかに係る方法はさらに、(i)疎水性基板の中または上にある親水性機構のパターンを、1つ以上の検体タイプを含むサンプルに接触させるステップを含む。

10

【0522】

実施形態46.

実施形態39～45のいずれかに係る方法は、(ii)親水性機構の上で少なくとも1つの検体タイプを捕獲するステップを含む。

【0523】

実施形態47.

実施形態39～46のいずれかに係る方法は、(iii)少なくとも1つの捕獲された検体タイプを、検出される検体タイプに特異的な標識剤を用いて標識化するステップを含む。

20

【0524】

実施形態48.

実施形態39～47のいずれかに係る方法は、(iv)検出剤を、パターンを横断して流し、パターンから引き出して、個々の液滴をナノリットルからアトリットルの液滴の形態に生成するステップを含む。

【0525】

実施形態49.

実施形態39～48のいずれかに係る方法は、(v)標識剤および検出剤の両方を収容する液滴の数を計数するステップを含む。

【0526】

実施形態50.

実施形態39～49のいずれかに係る方法は、ステップ(iii)、(iv)および(v)を1回以上繰り返すことを含む。

30

【0527】

実施形態51.

実施形態39～50のいずれかに係る方法は、第1標識剤の代わりに、検出される第2検体タイプに特異的な第2標識剤を使用することによって、ステップ(iii)、(iv)および(v)を繰り返すことを含む。

【0528】

実施形態52.

実施形態39～51のいずれかに係る方法は、ステップ(iii)、(iv)および(v)を繰り返す前に、前回ステップに存在する標識剤を不活性化するステップを含む。

40

【0529】

実施形態53.

実施形態39～52のいずれかに係る方法において、標識剤は、表面結合した検体からの脱離によって不活性化され、フローシステムの洗浄(flushing)によって除去される。

【0530】

実施形態54.

実施形態39～53のいずれかに係る方法において、標識剤は、酵素的切断によって脱離される。

【0531】

50

実施形態 55.

実施形態 39～54 のいずれかに係る方法において、標識剤は、pH を調整し、イオン強度を調整し、変性塩を追加し、または洗浄剤を追加することによって、化学的切断または脱着によって脱離される。

【0532】

実施形態 56.

実施形態 39～55 のいずれかに係る方法において、標識剤は、フローシステムの温度を上昇させることによって脱離される。

【0533】

実施形態 57.

実施形態 39～56 のいずれかに係る方法において、標識剤は、その化学的または物理的な状態を変化させることによって不活性化される。

【0534】

実施形態 58.

実施形態 39～57 のいずれかに係る方法において、標識剤は酵素を含み、酵素の状態は、活性部位の化学的または生化学的修飾によって変化する。

【0535】

実施形態 59.

実施形態 39～58 のいずれかに係る方法において、標識剤は酵素を含み、酵素の状態は、酵素の三次構造の化学的または物理的分断によって変化する。

【0536】

実施形態 60.

実施形態 39～59 のいずれかに係る方法において、標識剤は、酵素および特異検体認識部位を含み、検体認識部位は、下記の分子グループ、即ち、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、アプタマー、抗体、その複合体またはその合成変異体から選択される。

【0537】

実施形態 61.

実施形態 39～60 のいずれかに係る方法において、1 つ以上の区別できる検体タイプのための 1 つ以上の捕獲プローブは、親水性機構に付着される。

【0538】

実施形態 62.

実施形態 39～61 のいずれかに係る方法において、1 つ以上の区別できる検体タイプのための 1 つ以上の捕獲プローブは、リンカー(linker)部位によって親水性機構に付着され、リンカー部位は、下記の分子グループ、即ち、ポリ(エチレングリコール)、直鎖または分岐アルカン、ペプチド、オリゴヌクレオチド、またはその合成変異体から選択される。

【0539】

実施形態 63.

実施形態 39～62 のいずれかに係る方法は、親水性機構に付着された 2 つ以上のタイプの捕獲プローブを備え、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置される。

【0540】

実施形態 64.

実施形態 39～63 のいずれかに係る方法において、捕獲プローブは、下記のプローブグループ、即ち、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、またはその合成変異体から選択される。

【0541】

実施形態 65.

実施形態 39～64 のいずれかに係る方法において、液体中に 1 つ以上の検体タイプを含むサンプルは、完全浸漬によって親水性機構を含む基板と接触する。

10

20

30

40

50

【0542】

実施形態66.

実施形態39～65のいずれかに係る方法は、液体を除去し、基板を洗浄することを含む。

【0543】

実施形態67.

実施形態39～66のいずれかに係る方法において、標識化は、完全浸漬によって、検体の標識剤を含む溶液を、捕獲した検体と接触させることによって実施される。

【0544】

実施形態68.

実施形態39～67のいずれかに係る方法は、残りのプローブを含む溶液を除去し、基板を洗浄することを含む。

【0545】

実施形態69.

実施形態39～68のいずれかに係る方法において、液体は、入口から出口への圧力降下を用いてフロー区画を横断して駆動される。

【0546】

実施形態70.

実施形態39～69のいずれかに係る方法において、検体は、下記の検体グループ、即ち、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質、タンパク質／オリゴヌクレオチド複合体、タンパク質／脂質複合体、ペプチド、エキソソーム(exosome)、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、ナノ粒子、細胞断片または細胞から選択される。

【0547】

実施形態71.

実施形態39～70のいずれかに係る方法において、サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または組織から選択される。

【0548】

実施形態72.

実施形態39～71のいずれかに係る方法において、サンプルは、下記のサンプルグループ、即ち、血液、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液、涙液または、処理した血液サンプルなどの組織、の研究室処理サンプルから選択される。

【0549】

実施形態73.

実施形態39～72のいずれかに係る方法において、1つ以上の捕獲した検体は、捕獲に続いて、捕獲プローブと共有結合的に架橋または結合できる。

【0550】

実施形態74.

実施形態39～73のいずれかに係る方法において、捕獲プローブは、オリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドであり、検体は、捕獲プローブ配列に対して相補的な配列を介して捕獲プローブと結合されたオリゴヌクレオチドであり、共有結合架橋は、鎖間架橋剤、例えば、白金錯体、マイトマイシンC、ナイトロジェンマスタード、ソラレンまたはアルデヒドなどを使用することによって実行される。

【0551】

実施形態75.

実施形態39～74のいずれかに係る方法において、捕獲プローブは、タンパク質、ペプチドまたはその合成変異体であり、検体は、タンパク質、ペプチドまたは、タンパク質もしくはペプチドを含む複合体であり、検体は、検体の特異領域の構造的認識によって捕獲プローブに結合され、共有結合架橋は、化学固定剤、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウムまたは酢酸ウラニルなどを使用することによって実行

10

20

30

40

50

される。

【0552】

実施形態76.

実施形態39～75のいずれかに係る方法において、デジタル計数は、デジタル計数測定である。

【0553】

実施形態77.

実施形態39～76のいずれかに係る方法において、デジタル計数測定は、単一酵素結合分子分析 (S E L M A)、デジタルポリメラーゼ連鎖反応 (d P C R)、単一酵素結合免疫吸着法 (s e l i s a) またはデジタル単一酵素結合免疫吸着法 (d e l i s a) である。

10

【0554】

実施形態78.

実施形態1～38のいずれかに係るフローシステムにおいて、気相は、大気によって提供され、及び／又は、捕獲プローブは、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択され、及び／又は、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置され、及び／又は、検体は、処理した血液サンプルから抽出された一本鎖または二本鎖のDNAであり、及び／又は、標識剤は、検出様式(modality)および認識部位を備え、及び／又は、検出様式は酵素であり、及び／又は、認識部位は、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択される。

20

【0555】

実施形態79.

実施形態39～77のいずれかに係る方法において、気相は、大気によって提供され、及び／又は、捕獲プローブは、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択され、及び／又は、異なるタイプの捕獲プローブが複数領域に配置され、及び／又は、異なるタイプの捕獲プローブは複数領域に配置され、及び／又は、検体は、処理した血液サンプルから抽出された一本鎖または二本鎖のDNAであり、及び／又は、標識剤は、検出様式および認識部位を備え、及び／又は、検出様式は酵素であり、及び／又は、認識部位は、一本鎖DNAオリゴ、一本鎖ロックド核酸オリゴまたは一本鎖ペプチド核酸オリゴのグループから選択される。

30

【0556】

実施形態80.

少なくとも1つ以上の区別できる検体タイプのデジタル計数のための、気相シールの下での複数のナノリットルからアトリットルの液滴の使用。

【0557】

実施形態81.

実施形態80に係る使用は、実施形態39～77、79のいずれかに係る方法によって実行される。

【0558】

実施形態82.

実施形態80～81のいずれかに係る使用は、実施形態1～38、78のいずれかに係るフローシステムにおいて実行される。

40

【0559】

下記において、用途のいくつかの非限定的例を説明する。

【0560】

(例1：フェムトリットル水性マイクロ液滴アレイの形成および保存)

安定したマイクロ液滴を形成するために、平面的な疎水性領域の上に組み込まれた親水性円形機構の正方形アレイをリン酸緩衝水溶液と接触させた。溶液の10 μl プラグをアレイの表面を横断するように駆動して、図4の顕微鏡写真に示すように、親水性機構の上

50

にマイクロ液滴を残した。

【0561】

フローシステムは、液体を案内するために、矩形チャネルの各端部において2つの開口によって画定した。チャネルの幅は3 mm、長さは16 mm、高さは150 μmであった。アレイは、チャネル内に中央に配置し、2.9 mmの幅、14 mmの長さを備え、合計406000個の親水性機構を含んだ。親水性円の直径は5 μm、円同士の間隔は10 μmであった。疎水性表面での水溶液の接触角は約110度で、実験は21℃の周囲温度で行った。液滴体積のせいぜい3%が蒸発するのが許容され、これは、式(11)に従って、乾燥空気(RHI=0)について約680 μmのチャネルの最大高さを意味する。フロー区画の高さは150 μmに過ぎず、最大高さ未満であるため、気相シールは機能的であり、マイクロ液滴を無傷に維持できた。

10

【0562】

10 μl体積をチャネル入口に接続された装填パッドの中に配置することによって、アレイは、バルク水溶液と接触した。次に、チャネル出口において負圧を印加し、10 μl液体プラグを5 μl/minのフローレートでチャネルを横断するように駆動した。いったんバルク液体の後退エッジがチャネル出口に到達すると、圧力を終了して、新しい液体プラグを装填パッドに配置した。機能的気相シールに起因して、親水性機構の上部に形成された液滴は、著しい蒸発を経験することなく、1時間を超えて安定に残留した。例えば、図12Cを参照。

20

【0563】

(例2：フローチャネル、液滴およびアレイの幾何形状を最適化することによって、水性マイクロ液滴のアレイを蒸発耐性にする方法)

化学的にパターン化された固体基板が組み込まれたフローチャネルについて検討する。化学パターンは、アレイに編成された円形の親水性領域からなる。親水性アレイは、連続的な疎水性領域によって包囲される。こうして、例1に示すように、いったん水溶液が注入され、続いてフローチャネルから引き出されると、マイクロ液滴のアレイが親水性機構の上部に形成される。

【0564】

フローチャネルの寸法は、図13で定義され、チャネルの高さであるh、アレイによってカバーされるフローチャネルの長さである l_A 、入口／出口に至り、アレイを収容していない、チャネルの余剰部の長さである l_E 、によって特徴付けられる。アレイを定義するパラメータは、固体基板上の親水性機構の半径として定義される液滴半径 R_D 、および隣接する液滴の間の中心間距離である δ である。下記において、我々は、正方パターンに編成されたアレイを仮定しているが、他のアレイパターンについての手法が下記に示すものと同じ原理を用いて導出できる。

30

【0565】

最初に我々は、フローチャネルに存在する水の合計モル量を計算する。これは、液滴(V_D)の体積を計算し、それを存在する液滴の合計数で乗算することによって行われる。我々は、液滴が球の体積の半分を示す半球によって表現できると仮定する。アレイおよびフローチャネルは、y方向に沿って同一であるため、我々は、液滴の単一ラインで構成される1次元アレイ(略図したもののよう)、そして液滴間間隔 δ の幅を備えた疑似1次元フローチャネルを検討する必要があるだけである。1次元アレイに沿った液滴の合計数(N_D)は、下記の式(12)である。

40

【0566】

【数21】

$$N_D = l_A / \delta \quad \text{Eqn. 12}$$

【0567】

全液滴の合計モル量(n_{TOT})は、下記の式(13)として評価できる。

【0568】

50

【数 2 2】

$$n_{TOT} = \frac{m_W}{M_W} = \frac{N_D V_D \rho_W}{M_W} = \frac{l_A}{\delta} \frac{2\pi R_D^3 \rho_W}{3M_W} \quad \text{Eqn. 13}$$

【0 5 6 9】

ここで、 m_W は全液滴の合計質量であり、 M_W は水のモル重量（ 18.016 g/mol ）であり、 ρ_W は水の密度（ 1000 g/l ）である。所定の温度でどのぐらいの水の量が蒸発するかを計算するために、我々は、クラウジウス・クラペイロンの式を利用して、水の平衡蒸気圧（ P_W ）を計算する必要がある。

【0 5 7 0】

10

【数 2 3】

$$P_W = P_0 \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad \text{Eqn. 14}$$

【0 5 7 1】

ここで、 P_0 は基準温度 T_0 での基準平衡蒸気圧であり、 T は反応温度であり、 R は気体定数（ $8.31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ）であり、 ΔH_{VAP} （ $40.65 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ）は水の蒸発時のエンタルピー変化である。 P_0 および T_0 についての適切な値は、それぞれ 293 K の温度で 2.34 kPa とできる。 V_F の体積を有する閉じたフローチャンネルでは、水の蒸気圧は、どのぐらいの水が水蒸気として空気中に転移するかを示す。平衡時の水蒸気の水蒸気量（ n_{EVAP} ）は、理想気体の法則から下記の式（15）として得られる。

20

【0 5 7 2】

【数 2 4】

$$n_{EVAP} = \frac{P_W}{RT} V_F = \frac{P_0}{RT} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) (2l_E + l_A) h \delta \quad \text{Eqn. 15}$$

【0 5 7 3】

蒸発した水の割合（ θ_W ）は、ここでは蒸発した水と水の合計モル量との比として評価できる。

30

【0 5 7 4】

【数 2 5】

$$\begin{aligned} \theta_W &= \frac{n_{EVAP}}{n_{TOT}} = \frac{P_0}{RT} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) (2l_E + l_A) h \delta \frac{3M_W \delta}{2\pi l_A R_D^3} \\ &= \frac{3hP_0 M_W}{2\pi R T \rho_W} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) \frac{\delta^2}{R_D^3} \left(2\frac{l_E}{l_A} + 1\right) \end{aligned} \quad \text{Eqn. 16}$$

【0 5 7 5】

ここで我々は、（i）無次元の倍率（scaling factor） $N = \delta / R_D$ （これはアレイを特徴付ける幾何形状パラメータである（即ち、より大きい N 値は、より希少に存在するアレイを導く））、および（ii）無次元の倍率（scaling factor） $\phi = l_E / l_A$ （これはフローチャンネル設計を特徴付ける幾何形状パラメータである（即ち、大きな ϕ 値は、アレイがフローチャンネルの小さい部分だけを占拠することを示す））。この表記を用いて、式（16）は、下記の式（17）として書き換えられる。

40

【0 5 7 6】

【数 2 6】

$$\theta_W = \frac{3hP_0 M_W}{2\pi R T \rho_W} \frac{1}{R_D} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) N^2 (2\phi + 1) \quad \text{Eqn. 17}$$

50

【0577】

式(17)は、所望の最大蒸発割合(θ_{MAX})が選ばれた場合、対応する最大高さ(h_{MAX})が評価できるように再整理できる。

【0578】

【数27】

$$h_{MAX} = \frac{2\pi RT\rho_W}{3P_0M_W} \exp\left(\frac{\Delta H_{VAP}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) \frac{R_D}{N^2(2\varphi+1)} \theta_{MAX} \quad \text{Eqn. 18}$$

【0579】

図11において、式(17)および式(18)が、種々のフローチャネル／液滴／アレイの幾何形状および温度についてプロットされている。さらに図12において、温度およびフローチャネル幾何形状の関数として液滴安定性の実験論証が示される。液滴保存のために最適化されたフローチャネル(図12C)では、液滴アレイは、温度の範囲(ここで論証するように、25~45℃)で、少なくとも1.5時間の延長期間に渡って安定に残留する。原理上は、いったん熱力学的平衡が確立すると、液滴アレイは無期限に安定的になる。しかしながら、現実には、フローチャネル／アレイは、外部環境から完全に封止できず、よって液滴はゆっくり蒸発することがある。

【0580】

(例3：フローシステムの製造)

フローシステムの製造は、2つの主要ステップで行った。1つのステップは、UVフォトリソグラフィおよびマイクロ加工(microfabrication)処理を利用して、パターン化した親水性機構を製造するものであり、一方、第2ステップは、親水性パターンを、直角(right)の幾何形状を示すフロー区画に集積化することに取り組むものである。以下、両方のステップについてより詳細に説明する。

【0581】

・パターン化親水性基板のマイクロ加工

本発明の実施形態において、親水性機構は、石英(quartz)(SiO_2)で構成し、疎水性領域は、ペルフルオロデシルトリクロロシラン(FDTS)で構成した。製造プロセスの第1ステップにおいて、FDTSの分子単層を、MVD100分子気相成膜システム(アプライド・マイクロストラクチャ社)を用いて分子気相成膜によって石英ウエハの上に堆積した。FDTSは、石英の表面でのシラノール基との共有結合を受け、ウエハ表面での疎水性単分子層を生成した。

【0582】

次に、AZ5214Eフォトレジスト(マイクロケミカルズ社、GmbH)の層をスピニングによってFDTS処理ウエハの上部に堆積し、続いて90℃でウエハのソフトバークを行い、余分な溶媒を蒸発させた。フォトレジストは、ズース・マスクアライナー・モデルMA6(ズースマイクロテック社)を用いてクロムマスクを介してUV照射に露光し、続いてAZ351B現像液(マイクロケミカルズ社、GmbH)でウエハの現像を行った。こうしてフォトレジストの接続パターンがウエハに残留し、円形孔を下方のFDTS単分子層に露出させた。

【0583】

最後の処理ステップにおいて、FDTS単分子層を選択的に除去し、下方の親水性石英表面を露出させた。これは、モデル300プラズマプロセッサ(テブラ社)を用いて短期間、ウエハを酸素プラズマに曝すことによって達成し、こうしてFDTS単分子層を除去し、より厚いフォトレジスト膜を残した。フォトレジスト膜を除去するために、ウエハを10分間、アセトン中で超音波処理して膜を溶解し、こうして疎水性FDTS分子単層によって包囲された親水性石英機構のパターンを設けた。

【0584】

・フローチャネルでのマイクロ加工アレイの集積化

集積化の前に、フロー区画に嵌め込むために、マイクロ加工ウエハを矩形ピース(25

10

20

30

40

50

mm×12mm)に切断した。アレイが更なる表面機能化を必要とする場合、下記の例4～5で説明するように、区画集積化の前に機能化プロトコルを行った。

【0585】

フローチャネルおよび液体装填パッドは、ポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)シートのCNCフライス加工によって調製した。フローチャネルは、1mmの幅、8mmの長さ、100μmの高さおよび200μmの壁厚を有した。フローチャネルは、蠕動ポンプに接続された出口によって終端され、蠕動ポンプは、液体駆動のために必要になる吸引を提供した。液体装填パッドは、約100μlの体積を示し、入口を介してフローチャネルに接続した。フローチャネル、装填パッド、入口および出口は、単一の8mm厚のPMMAスラブから彫刻され、以下ではPMMAフロー構造と称している。

10

【0586】

親水性機構のマイクロ加工アレイを収容する矩形ウエハピース(チップ)をPMMAフロー構造に装着するために、142μmの公称厚さを備えた両面感圧接着フィルム(Arcare 90106、アドヒーシブリサーチ社)のピースをCO₂レーザ機器を用いて切断した。レーザ切断した接着フィルムの幾何形状は、PMMAフロー構造と整合させ、僅かに小さくして、フローチャネルが、接着材で接着しないように包囲されるようにした。次に、接着材をPMMAフロー構造の底面に付着し、続いてアレイチップを接着材の上部に配置した。そしてアセンブリ(PMMAフロー構造、接着材、アレイチップ)を2つの平坦な5mm厚のPMMAシートの間に挟んで(sandwich)、接合プレスに配置した。このサンドイッチを40℃、60秒間、6kNの圧力でクランプした。こうして接着材は、フローチャネルの高さによって規定されたように、100μmの厚さに圧縮された。得られた接合アセンブリは、機能的フローシステムを規定した。

20

【0587】

(例4：単一DNA分子のデジタル計数)

本例では、集積化液滴アレイチップを備えたフローシステムを用いて単一の生体分子(本ケースでは、一本鎖DNA)がどのように検出され、デジタル計数できるかを示す。フローシステムアセンブリは、例1～3で説明した手順に従って製造し動作させたが、液滴アレイチップのPMMAフロー構造への集積化の前に、チップは、一本鎖ターゲットDNAの特異的捕獲を可能にするために、更なる表面機能化を施した。マイクロ加工チップは、4μmの直径を有し、8μmの機構間間隔で正方アレイ状に配置された93750個の円形親水性機構で構成した。

30

【0588】

・表面機能化プロトコル

液滴アレイチップは、アセトン中で10分間の超音波処理によって全面的に洗浄し、続いてイソプロパノール中で10分間の超音波処理を行い、続いてエタノール中で10分間の超音波処理を行った。チップは、窒素フロー下で乾燥し、95%(v/v)エタノール中の1%(v/v)エポキシシラン(Dynasylan GLYEO、エボニックインダストリーズ社)液の溶液に浸漬した。チップは、30分間、エポキシシラン溶液中で培養し、続いて95%エタノールを用いて3回洗浄し、窒素フロー下で乾燥し、110℃で30分間、硬化させた。

40

【0589】

次に、シラン処理したチップ上のエポキシ基は、ポリ(エチレングリコール)部位に存在するアミン基と反応した。ポリ(エチレングリコール)は、メトキシポリ(エチレングリコール)₂₀₀₀-アミン(OH-PEG₂₀₀₀-NH₂)(ジェンケム・テクノロジー社)およびカルボン酸-ポリ(エチレングリコール)₂₀₀₀-アミン(COOH-PEG₂₀₀₀-NH₂)(ジェンケム・テクノロジー社)の混合物で構成した。混合物は、OH-PEG₂₀₀₀-NH₂とCOOH-PEG₂₀₀₀-NH₂の10:1のモル比を有し、10mMのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、138mMのNaCl、2.7mMのKCl、1.5Mの硫酸アンモニウム、pH7.4において100g/lの公称総濃度を有した。チップは、混合物とともに40℃で20時間、培養した。続いて、チップ

50

は、Milli-Q水（ミリポア社）を用いて3回洗浄し、窒素フロー下で乾燥した。

【0590】

最後の表面改質ステップにおいて、チップは、DNAターゲットに特異的な捕獲プローブを用いて機能化した。捕獲プローブは、N-末端にリジン基を備えた14merのペプチド核酸（PNA）であり、表面グラフト化した $\text{COOH-PEG}_{2000}\text{-NH}_2$ 上のカルボン酸基への付着のために使用した。N-末端からC-末端へのPNAプローブの配列は、K-O-ACA TAG TTG ACA CG-OO（SEQ ID NO: 1: ACA TAG TTG ACA CG）（パナジーン社）であり、Kはリジン基を表し、Oはエチレングリコールリンカーを表し、文字G, C, A, Tは、DNA核酸塩基のPNA類似体を表す。

10

【0591】

最初に、PNAプローブとの反応のために、チップの表面を、100mMの2-（N-モルホリノ）エタンスルホン（MES）緩衝剤中で化合物の各々について25g/lの公称濃度で、1:1のモル比でN-ヒドロキシスクシンイミドおよびN-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩の混合物に浸漬することによって、調製した。チップは、4℃で30分間、混合物中で培養し、続いて100mMのMES緩衝剤の中で短い洗浄を行った。次に、チップは、100mMのMES緩衝剤でのPNAプローブの100nM溶液に浸漬し、30分間、周囲温度で培養した。続いて、チップは、100mMのMES緩衝剤を用いて短く洗浄を行い、続いて50mMのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの中に10分間、浸漬した。チップは、Milli-Q水を用いて3回洗浄し、窒素フロー下で乾燥し、そして、例3において概説したように、PMMAフロー構造に接合するまで真空デシケータの中で保存した。

20

【0592】

・検出プロトコル

検出のターゲットは、50-bpのDNAオリゴ（5'-TCT GTC GTA GGC ACA GAG CGG TCT TAC GGC CAG TCG CGT GTC AAC TAT GT-3'（SEQ ID NO: 2））であった。DNAオリゴの最後の14個の塩基対は、PNA捕獲プローブに対して相補的であり、一方、DNAオリゴの最初の12個の塩基対は、DNA系標識剤に対して相補的であった。標識剤は、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素に共役した1つ以上の12-bpのDNAオリゴによって構成した。標識DNAオリゴの配列は、5'-GCC TAC GAC AGA-3'-TEG-ビオチン（TEG-ビオチンに結合したSEQ ID NO: 3）であって、TEGは、テトラエチレングリコールリンカーを表す。

30

【0593】

標識剤は、ニュートラアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ（NAv-HRP）共役（conjugate）（Invitrogen, A2664）を、1:3モル比のNAv-HRP対オリゴの中で標識オリゴと混合することによって調製した。NAv-HRPの最終濃度は100nMであり、混合物は、5×サリンソジウムシトレート（SSC）緩衝液、1.0g/lのウシ血清アルブミン（BSA）、0.5%（v/v）トリトンX-100、pH7.0で調製した。混合物は、4℃で24時間、培養し、ビオチン化DNAオリゴをNAv-HRPでのニュートラアビジン部位(moiety)に付着できるようにした。得られた共役は、NAv-HRP当り3つの結合DNAオリゴの平均を示し、以下ではNAv-HRP-LO₃と省略することにする。

40

【0594】

下記の緩衝液は、検出実験のために使用した。

【0595】

パッシベーション緩衝液：5×SSC緩衝液、0.5%（v/v）トリトンX-100、10g/lのBSA、pH7.0。

標識緩衝液：5×SSC緩衝液、0.5%（v/v）トリトンX-100、10g/lのBSA、pH7.0。

50

洗浄緩衝液1：10 mMのPBS、138 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、0.1% (v/v) トリトンX-100、50 g/lの20 kDaモル重量のポリ(エチレングリコール) (PEG₂₀₀₀₀)、pH 7.4。

洗浄緩衝液2：10 mMのPBS、138 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、50 g/lのPEG₂₀₀₀₀、pH 7.4。

検出緩衝液：10 mMのPBS、138 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、10 g/lのPEG₂₀₀₀₀、1.0 mMのH₂O₂、pH 7.4。

【0596】

変化する公称DNAターゲット濃度(10 fM, 1 fM, 100 aM)の溶液、そしてDNAターゲットを含まないコントロールを、検出実験の直前に、5×SSC緩衝液、0.5%のトリトンX-100、pH 7.0の中で調製した。検出実験を実施するために、フローシステムを下記の方法で動作させた。

ステップ1：25 µlのDNAターゲット溶液を0.2 µl/分のフローレートでフローチャンネルを通過させる。

ステップ2：フローチャンネルを10 µlのパッシベーション緩衝液で注入する。

ステップ3：10分間培養し、そして溶液をフローチャンネルから排出する。

ステップ4：フローチャンネルを、標識緩衝液中の50 pMのNA_v-HRP-LO₃の10 µlで注入する。

ステップ5：10分間培養し、そして溶液をフローチャンネルから排出する。

ステップ6：100 µlの洗浄緩衝液1を10 µl/分のフローレートで作動させる。

ステップ7：100 µlの洗浄緩衝液2を10 µl/分のフローレートで作動させる。

ステップ8：検出緩衝液中の200 µMのampliflu red (シグマアルドリッチ社、90101-5MG-F)溶液の3 µlを5 µl/分のフローレートで作動させる。

【0597】

簡潔には、上記プロトコルは、ステップ1において、DNAターゲットを、表面付着したPNA捕獲プローブに結合できるようにした。次にステップ4～5において、捕獲したDNAターゲットをNA_v-HRP-LO₃で標識化した。ステップ6～7において余分な標識剤を除去した後、ステップ8において、検出試薬ampliflu redを含むマイクロ液滴を確立した。ampliflu redは、西洋ワサビペルオキシダーゼのための蛍光性基質であり、この上で酵素的処理が蛍光化合物レソルフィン(励起570 nm、発光585 nm)に変換される。その結果、標識剤を収容する液滴は、蛍光信号を発生し、これは蛍光顕微鏡を用いて容易に検出された。

【0598】

ステップ8に続いて、フローシステムは、蛍光顕微鏡(ツァイス社Axio Vert. A1)の下で555 nmのLED励起光源を用いて適切な蛍光フィルタセットと組合せて検査され、レソルフィンからの発光信号を検出した。対応する明視野および蛍光顕微鏡写真は、図14に示すように、1.4 MPのCCDカメラ(Axio Cam MR3)を用いて記録した。

【0599】

蛍光顕微鏡写真は、画像解析ソフトウェアImage Jを用いて定量化し、蛍光液滴の数を計数した。簡潔には、グレースケールの顕微鏡写真は、特定の強度閾値未満の画素値を0に、閾値超えの画素値を1にフォーマット化することによって、2値フォーマットに変換した。次に、値「1」の接続された画素クラスタを計数した。4画素未満からなるクラスタは、ノイズとして破棄した。全体アレイについてのクラスタの合計数は、後続のデータ解析のために記録した。同じ強度閾値を全ての検出実験からの全ての蛍光顕微鏡写真に適用した。

【0600】

20回の検出実験の合計からの結果を図15に示す。図は、DNAターゲットの異なる濃度について検出可能な蛍光信号を示す、アレイ上に存在する液滴の百分率割合を示す。

コントロールサンプルでは、DNAターゲットが存在せず、多数の液滴が検出可能であった。これはたぶん、アレイ上での非特異的に結合した（例えば、物理吸着または化学吸着）標識剤の存在に起因している。非特異的結合（NSB）は、ありふれた現象であり、単一分子計数などの高感度応用において顕著である。ここで示す実験において、NSB標識剤を収容する液滴の割合は、 $0.280 \pm 0.097\%$ （5回の実験からの平均 $\pm$ 標準偏差）であった。他方では、ターゲットDNAを含むサンプルは、検出可能なマイクロ液滴のより高い割合を示すことが判り、分子ターゲットの微量の特異的検出および定量化を論証している。しかしながら、ターゲットDNAの濃度が増加すると、蛍光液滴の数は、正比例的な方法で増加しなかった。これは、例えば、フローシステムの他の表面での非特異的吸着、あるいは、可能性として表面結合したDNAターゲットの不完全標識化によるターゲットの濃度依存損失に起因しているであろう。

10

【0601】

（例5：単一DNA分子の繰り返し検出）

本例において、捕獲されたDNAターゲットが、標識剤の不活性化によってどのようにして繰り返し検出できるかを示す。本例で使用したフローシステムは、例1～3に従って製造し動作し、そして例4で提供された表面機能化プロトコルに従って機能化した。

【0602】

後述するように、捕獲されたターゲットの繰り返し検出を使用する利点は、検出が繰り返される度に信号対ノイズ比が改善され、検出限界が改善されることである。さらに、これは、1つ以上の単一ヌクレオチド多型(polymorphism)（SNP）を抱えるDNAターゲットと、SNPなしで他は同じである野生型DNA鎖、例えば、例6との間を識別する観点で、増加した特異性を可能にする。

20

【0603】

本例において、我々は、例4で説明したのと同じ検出プロトコルを適用し、標識化ステップおよび検出ステップを3回繰り返した。捕獲プローブはPNAをベースとし、標識剤はDNAをベースとしているため、T7エクソヌクレアーゼを用いて標識剤を選択的に除去して、標識剤を消化するとともに、捕獲プローブ/ターゲット複合体を無傷に維持することが可能であった。さらに、NSB標識剤からの信号を除去するために、プローブの酵素部分をフェノールの溶液を用いて不活性化し、これはペルオキシダーゼ酵素の活性部位の構造を選択的に変更し、下記の検出アッセイ(assay)において信号を生成するのを防

30

【0604】

パッシベーション緩衝液、標識緩衝液、洗浄緩衝液1、洗浄緩衝液2および検出緩衝液は、例4において適用したのと同じであった。さらに、下記の2つの試薬を適用した。

【0605】

消化(digestion) 緩衝液：50 mMの酢酸カリウム、20 mMの酢酸トリス、10 mMの酢酸マグネシウム、1 mMのDTT、pH 7.9での1500単位/mlのT7エクソヌクレアーゼ（ニュー・イングランド・バイオラボ社、M0263L）。

【0606】

不活性化緩衝液：5.0 mMのフェノール、10 mMのPBSでの1.0 mMの H_2O_2 、138 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、pH 7.4。

40

【0607】

同じ捕獲DNAターゲットの3つの区別できる検出ステップを可能にするため、実験を下記の方法で実行した。

ステップ1：25 μ lのDNAターゲット溶液を0.2 μ l/分のフローレートでフローチャンネルを通過させる。

ステップ2：フローチャンネルを10 μ lのパッシベーション緩衝液で注入する。

ステップ3：10分間培養し、そして溶液をフローチャンネルから排出する。

ステップ4：フローチャンネルを、標識緩衝液中の50 pMのNA_v-HRP-LO₃の10 μ lで注入する。

50

ステップ5：10分間培養し、そして溶液をフローチャネルから排出する。

ステップ6：100 μ lの洗浄緩衝液1を10 μ l/分のフローレートでフローチャネルを通過させる。

ステップ7：100 μ lの洗浄緩衝液2を10 μ l/分のフローレートでフローチャネルを通過させる。

ステップ8：検出緩衝液中の200 μ Mのampliflu red（シグマアルドリッチ社、90101-5MG-F）溶液の3 μ lを5 μ l/分のフローレートで作動させる。

ステップ9：液滴アレイの蛍光および明視野顕微鏡写真を記録する。

ステップ10：フローチャネルを10 μ lの消化緩衝液で注入する。

10

ステップ11：10分間培養し、そして溶液をフローチャネルから排出する。

ステップ12：20 μ lの不活性化緩衝液を5 μ l/分のフローレートでフローチャネルを通過させる。

ステップ13：50 μ lの洗浄緩衝液1を10 μ l/分のフローレートでフローチャネルを通過させる。

ステップ14：ステップ4～13を繰り返す。

ステップ15：ステップ4～9を繰り返す。

【0608】

各サンプルについて、例4で概説したものと同一設定および手順を用いて、一連の3つの連続した蛍光顕微鏡写真を記録し解析した。シリーズの第1顕微鏡写真は、第1検出ステップに対応しており、シリーズの次の顕微鏡写真は、第2検出ステップに対応しており、以下同様である。明視野顕微鏡写真で可視である、フローシステム表面での特定マーキングを使用することによって、蛍光顕微鏡写真の座標は、検出ステップ間のXY位置の変化のために修正した。こうして、異なる検出ステップについて個々の液滴のXY位置を比較することが可能であった。次に、検出シリーズの各顕微鏡写真について、蛍光信号を示す液滴のXY画素位置を記録し、シリーズの残りの2つのメンバーと比較した。標識剤および検出剤を追加した場合、検出ステップ間で5画素以上は相違しない液滴位置は、「永続的」液滴、即ち、信号を繰り返し生成する液滴であると考えた。

20

【0609】

3回の検出ステップの結果は図16に示しており、100 aMのDNAターゲットを含むサンプルについて一連の蛍光顕微鏡写真を示す。顕微鏡写真において、永続的液滴は円で標識化した。DNAターゲットが追加されていないコントロールサンプルでは、永続的液滴は、全ての3つの検出ステップにおいて識別できなかった。

30

【0610】

下記の表は、100 aMのDNAターゲットサンプルとコントロールサンプルとの間の定量的比較を示す。表は、100 aMのターゲットDNAを含む5つの同様に調製したサンプル、およびターゲットDNAを含まない5つの同様に調製したコントロールサンプルからの平均結果を要約している。表は、コントロールサンプル（第1行）および100 aMのターゲットDNAサンプル（第2行）について、例5で定義されるように、永続的液滴の平均ポジティブ割合（Avg.）を提供する。標準偏差（St. dev.）は、5つのサンプルの標準偏差に対応する。第3行は、各後続ステップから得られる信号対ノイズ（S/N）比を提供する。S/N比は、理論値によって括弧内に補完された、実験的に測定された値として提供される。実験値は、第2行の平均値を第1行の平均値で除算することによって得られた。理論値は、100 aMのサンプルについての平均値を、（i）第1検出ステップについては0.28%、（ii）第2検出ステップについては $7.84 \cdot 10^{-4}\%$ （ $0.28\% \cdot 0.28\%$ ）、（iii）第3検出ステップについては $2.2 \cdot 10^{-6}\%$ （ $0.28\% \cdot 0.28\% \cdot 0.28\%$ ）で除算することによって計算した。

40

【0611】

【表 1】

	分析1		分析2		分析3	
	Avg.	St. dev.	Avg.	St. Dev.	Avg.	St. Dev.
コントロール	0.280 %	0.097 %	$6.1 \cdot 10^{-4}$ %	$9.2 \cdot 10^{-4}$ %	N/A	N/A
100 aM	0.507 %	0.160 %	0.243 %	0.091 %	0.221 %	0.084 %
S/N比	1.81 (1.81)		398 (310)		Inf. (100,674)	

【0612】

コントロールサンプルについて永続的液滴の百分率割合は、検出ステップの各繰り返しごとに減少し、その結果、S/N比の増加をもたらす。この理由は、コントロールサンプルにおいてNSB標識剤だけが蛍光信号を提供するためである。これらはアレイにランダム式で結合しており、これらの信号は後続の検出ステップの間で不活性化されるため、同じ液滴が後続の検出ステップで信号を生成するようにならない。例えば、NSB標識剤のランダム結合パターンを仮定すると、NSB標識剤を収容する液滴の割合が各検出ステップにおいて0.28%である場合（例えば、図15D）、全3回の検出ステップにおいて永続的液滴を観測する $2.2 \cdot 10^{-6}$ %（ $0.28\% \cdot 0.28\% \cdot 0.28\%$ ）の機会だけが存在する。100000個の液滴を収容するアレイでは、 $2.2 \cdot 10^{-6}$ %の偽ポジティブ検出レートは、0.002回の偽ポジティブ検出だけに対応する。こうしてコントロールサンプルでは永続的液滴を観測するようにならない。

【0613】

その結果、これらの特定の実験設定では、NSB標識剤から由来する全てのノイズが排除でき、よって、少なくとも3回の連続した検出ステップについて永続する液滴は、極めて高い確率で、機能的に組織化された捕獲プローブ/DNAターゲット/標識化プローブ複合体を表す。

【0614】

（例6：ターゲットとは単一の塩基対だけ配列が相違する非ターゲットDNAの1:10000（ターゲット：非ターゲット）バックグラウンドでの単一DNA分子の検出のためのフローシステム設定の説明）

本例において、100 μ lのサンプル溶液中に存在するDNA検体のデジタル検出を実施できるフローシステムが、後述するステップを続けることによって得られる。検体（ターゲットDNA）は、サンプル中に約10 aMの濃度で存在すると予想され、下記の配列セグメント：5'-TCT GTC GTA GGC ACA GAG CGG TCT TAC GGC CAG TCG CGT GTC AAC TAT-3'（SEQ ID NO:4）を含む。検体に加えて、サンプルは、約10000倍以上の濃度、即ち、100 fMの他の非ターゲットDNA分子（野生型DNA）を含むと予想され、下記の配列セグメント：5'-TCT GTC GTA GGC ACA GAG CGG TCT TAC GGC CAG TCG CGT GTC CAC TAT-3'（SEQ ID NO:5）を含む。ターゲットおよび野生型DNAは、ボールド体の下線付き位置だけ配列が相違する。

【0615】

捕獲プローブは、ターゲットおよび野生型DNAの5'末端に対して相補的であるように選択された一本鎖PNAオリゴであり、これは、下記の配列5'-GTG CCT ACG ACA GA-3'（SEQ ID NO:6）を含む捕獲プローブを用いることによって達成でき、5'および3'は、プローブのN-末端およびC-末端にそれぞれ対応する。IDTオリゴアナライザソフトウェア(<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)によれば、捕獲プローブについての溶融温度は、少なくとも46.8℃であると予想され、よってターゲットおよび野生型DNAの100%が、周囲温度、即ち、23℃で結合するようになる。その結果、アレイは、少なくとも6百万個(mio.)のDNA分子の結合を収容するように設計される必要があり、これは、100 fMのDNAを含む100 μ lサンプルの100%結合に対応する。

【0616】

デジタル計数測定を実施するには、捕獲されたターゲットDNAは、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ（これらの全てが市販されている蛍光性基質を有する）などの酵素に共役した下記配列 5'-ATA GTT GAC AC-3'（SEQ ID NO: 7）を含む一本鎖DNAオリゴからなる標識剤を用いて標識化される必要がある。標識剤は、3'-末端においてDNAターゲットの配列に正確に整合する。最適結合条件の下で、ターゲットDNAの82.6%が23℃の温度で標識剤と結合するようになる（IDTオリゴアナライザ）。しかしながら、同じ条件の下で、ターゲットと野生型との間の高い配列類似性に起因して、野生型DNAの1%も標識剤によって結合されるようになる。その結果、デジタル計数測定を実施するには、アレイは、少なくとも120000個の親水性機構を提示することが必要になる。120000個の機構の量は、第1標識ステップおよび第1検出ステップが実施された場合、アレイの液滴の約半分が蛍光信号を生成するように（即ち、6百万個の野生型DNAの1%+60000個のターゲットDNAの82.6%）、選択される。

10

【0617】

120000個の親水性機構を収容するために、機構は、5 μ mの直径を有する円として形状をなし、10 μ mの最隣接間隔を持つ正方形アレイ状に配置することになる。式（1）によれば、個々の親水性機構は、 $V_D = 52$ フェムトリットルの最大体積を有する水性液滴を支持できる。最大液滴体積を計算するために、ペルフルオロデシルトリクロロシラン（FDTS）支持体上での水の接触角に対応する110°の γ 値を適用した。その結果、液滴アレイの凝集体積は、 $V_{DA} = 6.2$ ナノリットル（52フェムトリットルの120000倍）である。そして最大フロー区画体積は、式（9）から $V_{MAX} = 326 \mu$ lとして得られる。

20

【0618】

最大フロー区画体積を計算するために、下記の値を適用した。 $\rho_L = 1000 \text{ kg/m}^3$ は水の体積密度であり、 $R = 8.31 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$ はモル気体定数であり、 $T = 296 \text{ K}$ （23℃）は温度であり、 $RHI = 0$ は乾燥大気の初期相対蒸気飽和として採用され、 $P_0 = 1226 \text{ Pa}$ は $T_0 = 283 \text{ K}$ （10℃）の温度での水蒸気の蒸気圧であり、 $M_W = 18.016 \cdot 10^{-3} \text{ kg/mol}$ は水のモル重量であり、 $\Delta H_{VAP} = 40.65 \cdot 10^3 \text{ J/mol}$ は水の蒸発のエンタルピーである。これらの値は、ランゲ(Lange)物理化学ハンドブック(ISBN-13: 9780070163843)およびアトキンス物理化学、第1巻、熱力学と動力学(ISBN-13: 9780716785675)から入手した。

30

【0619】

しかしながら、液滴が、(i) 撮像検出ステップ時に安定に留まるように、(ii) 酵素反応のための最適条件を提供するために、少量の液滴体積だけが蒸発するのを許容される。液滴の最大許容蒸発体積割合は、5%、即ち、 $\theta_{MAX} = 0.05$ に設定され、よって $V_C = 16.3 \mu$ l、即ち、 $V_C = \theta_{MAX} \cdot V_{MAX}$ のフロー区画体積を導く。

【0620】

フロー区画の最終幾何形状設計は、10:1のアスペクト比、 $L_{CX} = 15 \text{ mm}$ の長さおよび $L_{CY} = 1.5 \text{ mm}$ の幅を示す区画について矩形チャネル形状を選択することによって得られる。チャネルの高さは、最大液滴体積の5%未満が蒸発するのを確保するために、 $h_{MAX} = 724 \mu\text{m}$ ($h_{MAX} = V_C / (L_{CY} \cdot L_{CX})$) 未満にすることが必要とされる。10:1のアスペクト比は、親水性機構のアレイに適用でき、アレイは、 $L_{AX} = 10.9 \text{ mm}$ および $L_{AY} = 1.1 \text{ mm}$ に対応した、 1091×110 個の円形機構を提示するようになる。

40

【0621】

上述したフローシステム設定では、DNAターゲットは、例5で説明したように、標識ステップおよび検出ステップを3回繰り返すことによって、ターゲットを10000倍上回るバックグラウンドで容易に検出可能になる。こうして平均で60496個のDNA分子（6百万個の野生型DNAの1%+ターゲットDNAの82.6%）が第1検出ステップ

50

において信号を提供すると予想され、野生型DNAの60000個の偽ポジティブ検出およびターゲットDNAの496個の正しい検出に対応する。

【0622】

第2検出ステップにおいて、平均で1010個のDNA分子（60000個の野生型DNAの1%+496個のターゲットDNAの82.6%）が永続的な信号を提供すると予想され、野生型DNAの600個の偽ポジティブ検出およびターゲットDNAの410個の正しい検出に対応する。第3検出ステップにおいて、平均で344個のDNA分子（600個の野生型DNAの1%+410個のターゲットDNAの82.6%）が永続的な信号を提供すると予想され、野生型DNAの6個の偽ポジティブ検出およびターゲットDNAの338個の正しい検出に対応する。

10

【0623】

第3検出ステップでは、正しい検出の数は、偽ポジティブ検出の数を56倍だけ上回ると予想され、優れた定量化精度を提供する。しかしながら、標識および検出ステップを4回繰り返すことによって、偽ポジティブ検出は、完全に除去できるものと予想される。

【0624】

（例7：信号ポジティブ捕獲部位の数と適用した検出サイクル数との間の分析的關係）

【0625】

基準（野生型）オリゴヌクレオチド配列と比較して、単一塩基対置換の形態で遺伝子変化を示す配列を有するターゲットオリゴヌクレオチドを検出し定量化するように設計された本発明の実施形態を検討する。この場合、ターゲット検体は、単一塩基対置換オリゴヌクレオチドであり、したがって基準（野生型）オリゴヌクレオチドは、非常に類似した非ターゲット分子を構成し、これは従来の単一分子計数法の偽ポジティブ検出率に大きく寄与するであろう。本実施形態では、捕獲部位は、ターゲット検体と非ターゲット分子の両方に共通した配列に対して相補的なオリゴヌクレオチド捕獲プローブで機能化できる。他方、標識剤は、単一塩基対置換を示すターゲット検体の部分に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドで構成してもよい。その結果、ターゲット検体の標識化効率は、非ターゲット分子の標識化効率よりも高いと予想されるが、必ずしもかなり高いわけではない。

20

【0626】

本例において、捕獲部位上に捕獲されたターゲット検体および非ターゲット分子の数は、それぞれ N_{TA} および N_{NM} であり、利用可能な捕獲部位の総数は N_C であると考えられる。本例では、ターゲット検体と非ターゲット検体の両方がポアソン分布に従って捕獲部位間に分布すると仮定する。その結果、少なくとも1つのターゲット検体を収容する区画の数（ C_{TA} ）および少なくとも1つの非ターゲット分子を収容する区画の数（ C_{NM} ）は、下記の式（19）（20）である。

30

【0627】

【数28】

$$C_{TA} = N_C \left(1 - \exp \left(-N_{TA}/N_C \right) \right) \quad \text{Eqn. 19}$$

40

$$C_{NM} = N_C \left(1 - \exp \left(-N_{NM}/N_C \right) \right) \quad \text{Eqn. 20}$$

【0628】

標識剤によるターゲット検体の標識化効率は P_{TA} であり、標識剤による非ターゲット分子の標識化効率は P_{NM} であることをさらに検討する。本例では、標識化効率は、標識剤にそれぞれハイブリッド結合(hybridize)したターゲット検体および非ターゲット分子の割合を表す。標識化効率は、例えば、融解曲線分析によって直接測定してもよく、あるいはターゲット検体、非ターゲット分子および標識剤のオリゴヌクレオチド配列に基づいて推定してもよい。

50

【0629】

n 個の個々のターゲット検体を収容する捕獲部位が少なくとも 1 つの標識剤でうまく標識化される確率 ($P_{TA}(n)$) は、下記の式 (21) である。

【0630】

【数29】

$$P_{TA}(n) = 1 - (1 - P_{TA})^n$$

Eqn. 21

【0631】

同様に、n 個の個々の非ターゲット分子を収容する捕獲部位が少なくとも 1 つの標識剤でうまく標識される確率 ($P_{NM}(n)$) は、下記の式 (22) である。

10

【0632】

【数30】

$$P_{NM}(n) = 1 - (1 - P_{NM})^n$$

Eqn. 22

【0633】

さらに、正確に n 個のターゲット検体を含む捕獲部位の分布 ($f_{TA}(n)$) は、下記のようにポアソン分布によって与えられる。

【0634】

【数31】

$$f_{TA}(n) = \frac{\left(\frac{N_{TA}}{N_C}\right)^n \exp\left(-\frac{N_{TA}}{N_C}\right)}{n!}$$

Eqn. 23

20

【0635】

その結果、正確に n 個のターゲット検体を示す捕獲部位の数 ($C_{TA}(n)$) は、 $C_{TA}(n) = N_C \cdot f_{TA}(n)$ である。同様に、正確に n 個の非ターゲット分子 ($f_{NM}(n)$) を含有する捕獲部位の分布は、下記の式 (24) によって与えられ、正確に n 個の非ターゲット分子を示す捕獲部位の数 ($C_{NM}(n)$) は、 $C_{NM}(n) = N_C \cdot f_{NM}(n)$ である。

【0636】

【数32】

$$f_{NM}(n) = \frac{\left(\frac{N_{NM}}{N_C}\right)^n \exp\left(-\frac{N_{NM}}{N_C}\right)}{n!}$$

Eqn. 24

30

【0637】

標識化ステップにおいて同じタイプの標識剤を再適用する多数の反復検出サイクルを含む分析では、各検出ステップについてターゲット検体を含む連続的に標識化された捕獲部位の平均数 ($L_{TA}(x)$) (x は検出サイクルの数を表す) は、少なくとも 1 つの標識剤を有する捕獲部位の全ての可能な配置を合計することによって見出される。

【0638】

【数33】

40

$$\begin{aligned} L_{TA}(x) &= \sum_{n=1}^{N_{TA}} C_{TA}(n) P_{TA}(n)^x = N_C \sum_{n=1}^{N_{TA}} f_{TA}(n) P_{TA}(n)^x \\ &= N_C \sum_{n=1}^{N_{TA}} \frac{\left(\frac{N_{TA}}{N_C}\right)^n \exp\left(-\frac{N_{TA}}{N_C}\right)}{n!} (1 - (1 - P_{TA})^n)^x \end{aligned}$$

Eqn. 25

【0639】

同様に、各検出サイクルについての非ターゲット分子を含む連続的に標識された捕獲部位の平均数 ($L_{NM}(x)$) (x は反復数を表す) は、下記の式 (26) として与えられる。

50

【0640】

【数34】

$$L_{NM}(x) = N_C \sum_{n=1}^{N_{NM}} f_{NM}(n) P_{NM}(n)^x$$

$$= N_C \sum_{n=1}^{N_{NM}} \frac{\left(N_{NM}/N_C\right)^n \exp\left(-N_{NM}/N_C\right)}{n!} (1 - (1 - P_{NM})^n)^x \quad \text{Eqn. 26}$$

【0641】

ターゲット検体および非ターゲット分子の配列依存の標識化に加えて、標識剤はまた、例えば、疎水性または静電的な相互作用によって、捕獲部位上に非特異的に保持されるようにできる。本例では、非特異的に保持された標識剤の数（ $L_{NSR}(x)$ ）は、下記の式（27）のように計算できると仮定している。

10

【0642】

【数35】

$$L_{NSR}(x) = f_{NSR}^x N_C \quad \text{Eqn. 27}$$

【0643】

ここで、 x は反復数であり、 f_{NSR} は少なくとも1つの非特異的に保持された標識剤を収容する区画の割合である。 f_{NSR} の値は、ターゲット検体および非ターゲット分子の両方が存在しない状態で検出サイクルを実行し、そして信号を表示する捕獲部位の計数することによって実験的に得られる。その結果、区画化後に検出サイクル数（ $C_T(x)$ ）の関数として検出可能な信号を示す捕獲部位の予想される数は、ターゲット検体の配列依存の標識化、非ターゲット分子の配列依存の標識化、および配列独立の非特異的に保持された標識剤からの寄与を合計することによって見出される。

20

【0644】

【数36】

$$C_T(x) = L_{TA}(x) + L_{NM}(x) + L_{NSR}(x) \quad \text{Eqn. 28}$$

【0645】

図18において、 L_{TA} 、 L_{NM} および L_{NSR} からの寄与が4つの異なる構成についてプロットされている。図18において、 C_T 、 L_{TA} 、 L_{NM} および L_{NSR} の値は、(A) $N_{TA} = 10$ 、 $N_{NM} = 10$ 、 $N_C = 100$ 、 $P_{TA} = 0.9$ 、 $P_{NM} = 0.05$ 、および $f_{NSR} = 0$ 、(B) $N_{TA} = 10$ 、 $N_{NM} = 100$ 、 $N_C = 100$ 、 $P_{TA} = 0.9$ 、 $P_{NM} = 0.05$ 、および $f_{NSR} = 0.05$ 、(C) $N_{TA} = 10$ 、 $N_{NM} = 1$ 、 $N_C = 100$ 、 $P_{TA} = 0.9$ 、 $P_{NM} = 0.05$ 、および $f_{NSR} = 0$ 、ならびに、(D) $N_{TA} = 10$ 、 $N_{NM} = 1$ 、 $N_C = 1$ 、 $P_{TA} = 0.9$ 、 $P_{NM} = 0.05$ 、および $f_{NSR} = 0.05$ について計算される。

30

【0646】

図18A～図18Dにおいて、ターゲット検体は、非ターゲット分子および非特異的に保持された標識剤の両方によって非常に数が多くなり、そうでなければ従来の単一検出サイクル実験の精度を損なうであろう。非特異的に保持された標識剤を示す捕獲部位の5%集団（ $f_{NSR} = 0.05$ ）の存在は、最初の3～4検出サイクル内で迅速に排除される。さらに、非ターゲット分子に由来する偽ポジティブ信号は、最初の3～6検出サイクル内で数桁の大きさを急速に減少するとともに、ターゲット検体からの特定の信号は実質的に変化しないままである。

40

【0647】

（例8：適用した検出サイクル数の関数として、単一分子デジタル計数分析の検出限界（LOD）、定量化限界（LOQ）およびダイナミックレンジ（DR）の評価）

【0648】

50

(表1) および (表2) は、1回 (C1)、2回 (C2)、回数 (C3)、4回 (C4) の検出サイクルを示す分析について、偽ポジティブ捕獲部位の平均数 (N_{FP})、信号ポジティブ捕獲部位の数の標準偏差 (δN_{FP})、検出限界 (LOD)、定量化限界 (LOQ)、およびダイナミックレンジ (DR) のシミュレーション値を列挙する。

【0649】

本例において、 N_{FP} 値は、捕獲部位の数 (N_C)、ターゲット検体の数 (N_{TA})、非ターゲット分子の数 (N_{NM})、標識剤によるターゲット検体の標識化効率 (P_{TA})、標識剤による非ターゲット分子の標識化効率 (P_{NM})、および非特異的に保持された標識剤の割合 (f_{NSR}) についての値を特定することによってシミュレーションによって得られた。例7を参照。

【0650】

シミュレーションを初期化するために、各捕獲部位には一意的なインデックスを割り当てた。捕獲ステップをシミュレートするために、シミュレーションアルゴリズムは、利用可能な数の捕獲部位の間でターゲット検体および非ターゲット分子をランダムに分布させた。個々のターゲット検体または非ターゲット分子に割り当てられた捕獲部位は、シミュレーションの残部については変化しなかった。次に、標識化ステップは、(各捕獲部位について) (式21) ~ (式22) に従って $P_{TA}(n)$ および $P_{NM}(n)$ を計算するためにシミュレーションを行った。ここで、 n は、それぞれ捕獲部位に存在するターゲット検体および非ターゲット分子の総数を表し、次に0から1までの2つのランダム値を引き出す。もし第1ランダム値が $P_{TA}(n)$ 未満であった場合、捕獲部位は、ターゲット検体/標識剤複合体を含むものと考えられた。もし第2ランダム値が $P_{NM}(n)$ 未満であった場合、捕獲部位は、非ターゲット分子/標識剤複合体を含むものと考えられた。両方の場合、捕獲部位は、標識化されたものとして登録され、それ以外は登録されなかった。

【0651】

非特異的に保持された標識剤を説明するために、 $f_{NSR} \cdot N_C$ 個の捕獲部位をランダムに選択し、標識化されたものとして登録した。全ての捕獲部位の一意的なインデックスのリストは、標識化状態または非標識化状態と共に編集され、各標識化ステップの終わりに保存した。後続の検出サイクルをシミュレーションするために、新しいシミュレーションした標識化プロセスを実施し、全ての捕獲部位についての一意的なインデックスおよび標識化状態の新しいリストを編集した。

【0652】

全ての検出サイクルをシミュレーションした後、各検出サイクルの標識化リストを互いに比較して、全ての検出サイクルにおいて永続的に標識化された捕獲部位を識別した。単一のシミュレーションの結果は、永続的に標識化された捕獲部位の数 (N_{PL}) であった。 N_{FP} 値を得るために、同じ初期化パラメータを適用する1000回のシミュレーションを行って、 N_{FP} は、全ての記録された N_{PL} 値の平均値として計算した。同様に、 δN_{FP} 値を得るために、全ての記録された N_{PL} 値の標準偏差を計算した。LOD値、LOQ値およびDR値を得るために、シミュレーションを $N_{TA} = 0$ で行い、偽ポジティブ事象のみが生じるようにし、よってシミュレーションは、測定の固有の計数誤差の推定値を提供するであろう。LOD値、LOQ値およびDR値は、それぞれ $N_{FP} + 3\delta N_{FP}$ 、 $N_{FP} + 10\delta N_{FP}$ および N_C / LOQ として計算した。

【0653】

(表1) および (表2) に示すシミュレーション結果について、下記の値を適用した。即ち、 $N_C = 10^5$ 、 $N_{TA} = 0$ 、 $P_{NM} = 0.05$ 、 $f_{NSR} = 0$ 、および $N_{NM} = 10^3 \sim 10^5$ 。表から判るように、試験のLOD値、LOQ値およびDR値は、検出サイクルが繰り返されるたびに、ますます良くなり (値は減少する)、これは、少ない偽ポジティブ検出 (N_{FP}) に起因する。しかしながら、サンプル中の非ターゲット分子の数は、LOD値、LOQ値およびDR値に悪影響を及ぼし、これは、利用可能な捕獲部位の総数に対する偽ポジティブ捕獲部位の高い割合に起因する。

【0654】

(下記表 2) 1 0 0 0 個 (左) および 1 0 0 0 0 個 (右) の非ターゲット分子を含有するサンプルに対する S E L M A 試験の理論的な分析性能。

【 0 6 5 5 】

【表 2】

	$N_{NM} = 1,000$					$N_{NM} = 10,000$				
	N_{FP}	δN_{FP}	LOD	LOQ	DR	N_{FP}	δN_{FP}	LOD	LOQ	DR
C1	49.4	6.8	70	118	842	499.1	22.6	567	725	138
C2	2.4	1.7	7	19	4,942	28.6	5.1	44	80	1,234
C3	0.1	0.4	1	4	19,284	1.4	1.2	5	13	7,140
C4	0	0	0	0	100,000	0.1	0.3	1	3	26,175

10

【 0 6 5 6 】

(下記表 3) 1 0 0 0 0 0 個 (左) および 1 0 0 0 0 0 0 個 (右) の非ターゲット分子を含有するサンプルに対する S E L M A 試験の理論的な分析性能。

【 0 6 5 7 】

【表 3】

	$N_{NM} = 100,000$					$N_{NM} = 1,000,000$				
	N_{FP}	δN_{FP}	LOD	LOQ	DR	N_{FP}	δN_{FP}	LOD	LOQ	DR
C1	4,888	87.6	5,151	5,764	17	39,349	153	39,810	40,834	2
C2	462	27.2	544	734	136	16,403	106	16,720	17,461	6
C3	53	6.8	73	121	820	7,166	64	7,356	7,801	13
C4	7	2.6	15	33	2,919	3,255	46	3,392	3,712	27

20

30

【配列表フリーテキスト】

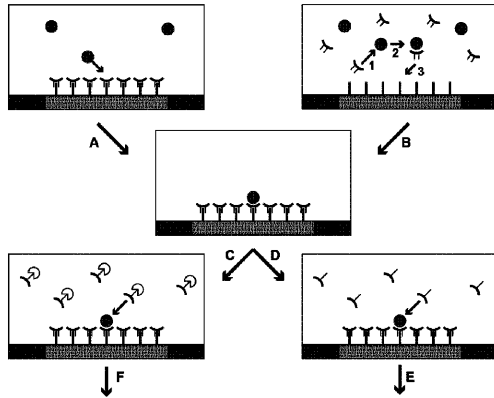
【 0 6 5 8 】

配列表

SEQ ID NO: 1: ACA TAG TTG ACA CG
 SEQ ID NO: 2: 5' -TCT GTC GTA GGC ACA GAG
 CGG TCT TAC GGC CAG TCG CGT GTC AAC TAT
 GT-3'
 SEQ ID NO: 3: 5' -GCC TAC GAC AGA-3'
 SEQ ID NO: 4: 5' -TCT GTC GTA GGC ACA GAG
 CGG TCT TAC GGC CAG TCG CGT GTC AAC TAT-
 3'
 SEQ ID NO: 5: 5' -TCT GTC GTA GGC ACA GAG
 CGG TCT TAC GGC CAG TCG CGT GTC CAC TAT-
 3'
 SEQ ID NO: 6: 5' -GTG CCT ACG ACA GA-3'
 SEQ ID NO: 7: 5' -ATA GTT GAC AC-3'

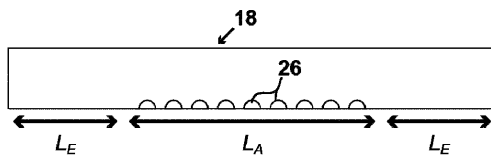
40

Fig. 9



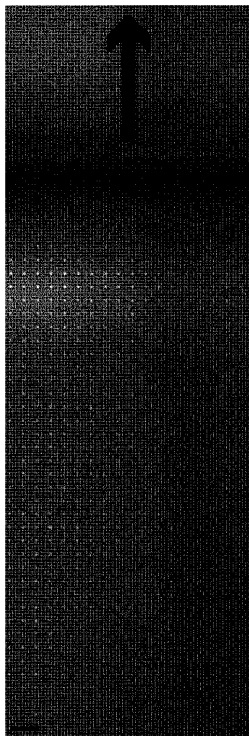
【図 1】

Fig. 1



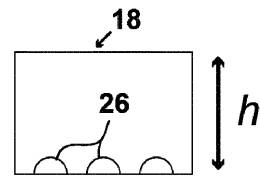
【図 4】

Fig. 4



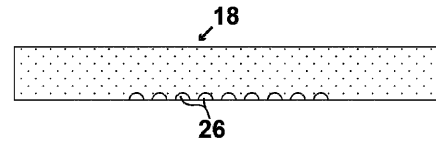
【図 2】

Fig. 2



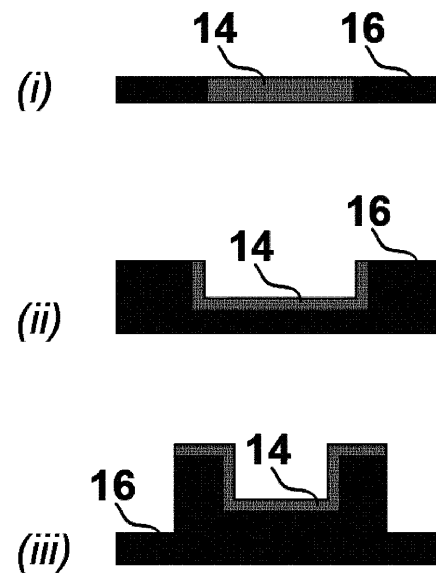
【図 3】

Fig. 3

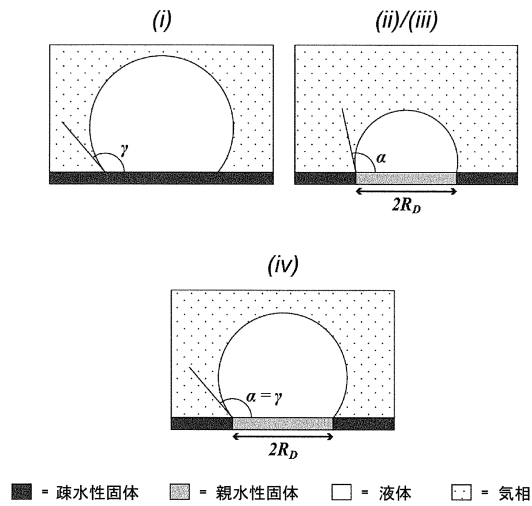


【図 5】

Fig. 5

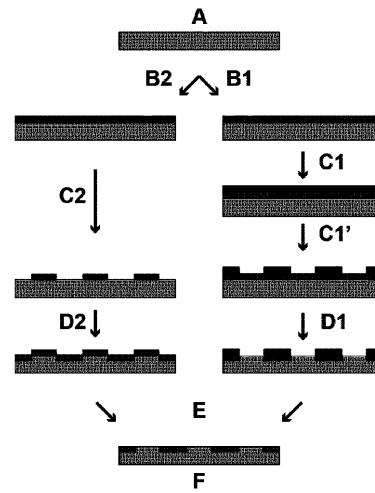


【図 6】

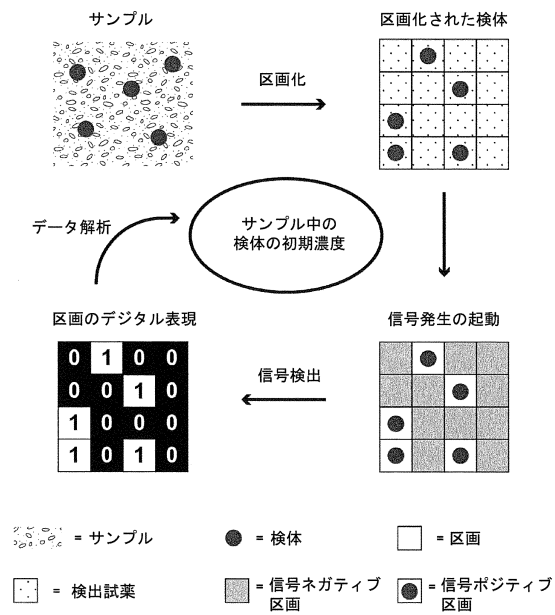


【図 7】

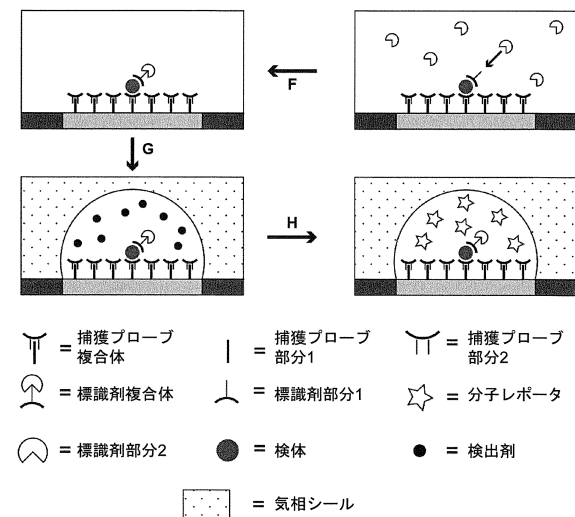
Fig. 7



【図 8】

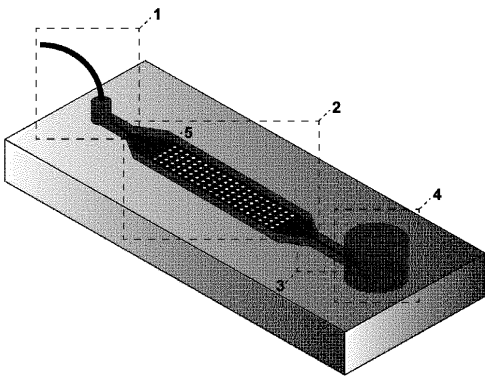


【図 9】

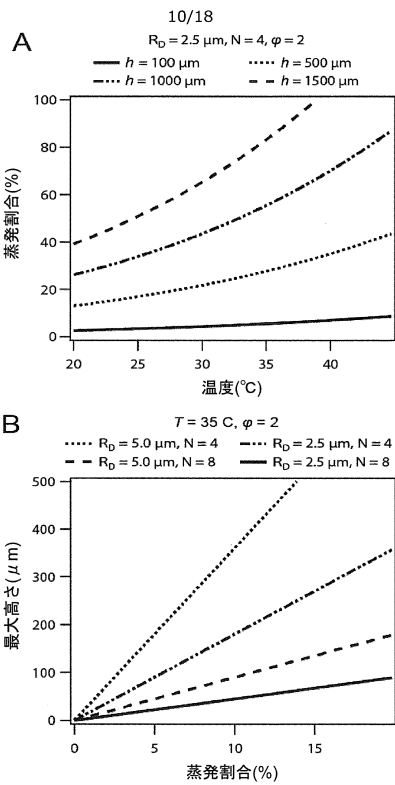


【図 1 0】

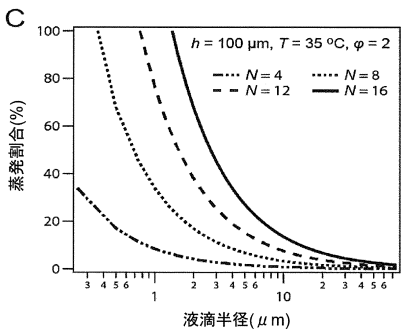
Fig. 10



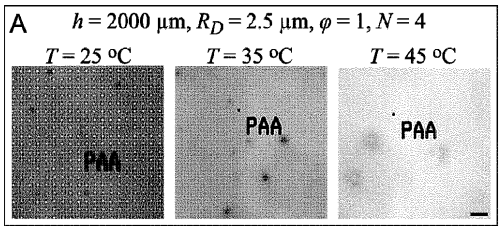
【図 1 1 - 1】



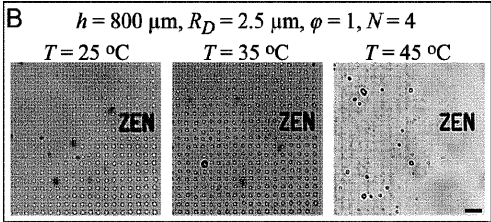
【図 1 1 - 2】



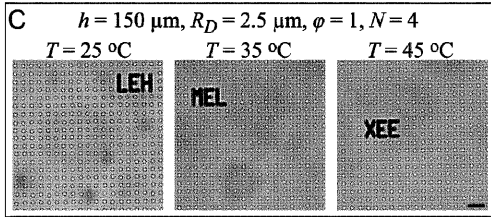
【図 1 2 A】



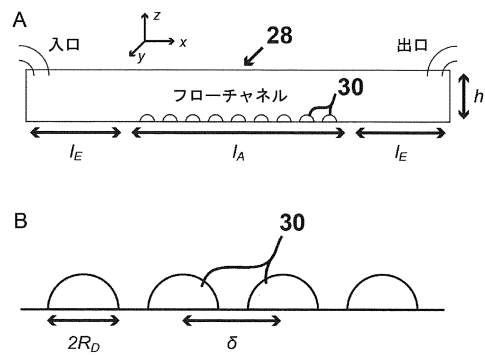
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】

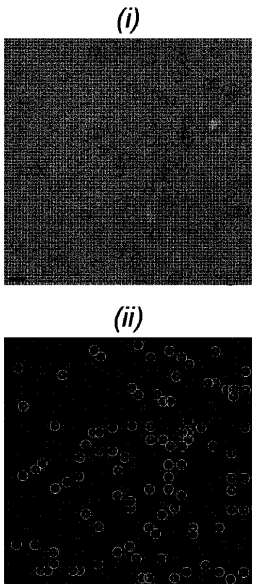


【図 1 3】

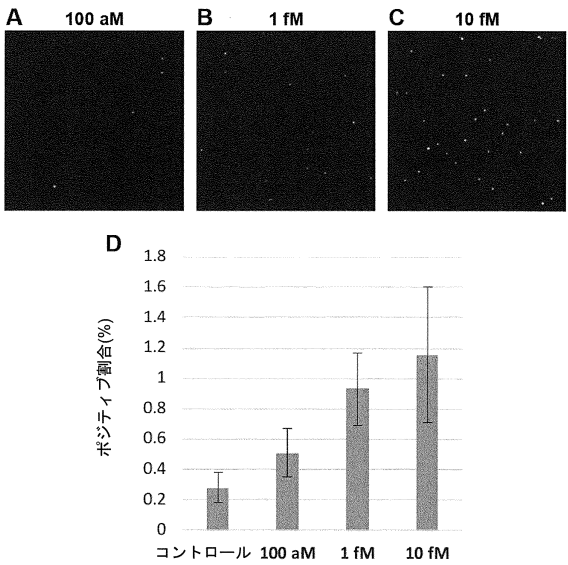


【図 1 4】

Fig. 14

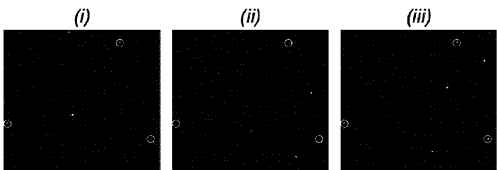


【図 1 5】



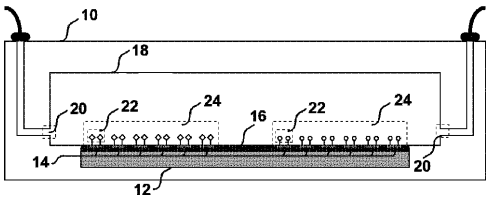
【図 1 6】

Fig. 16

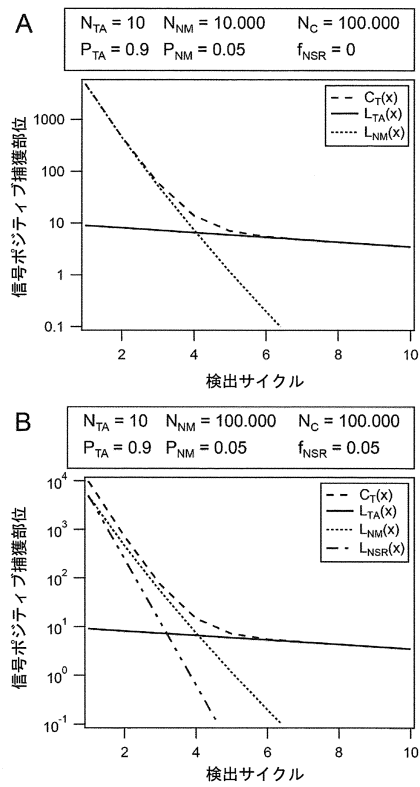


【図 1 7】

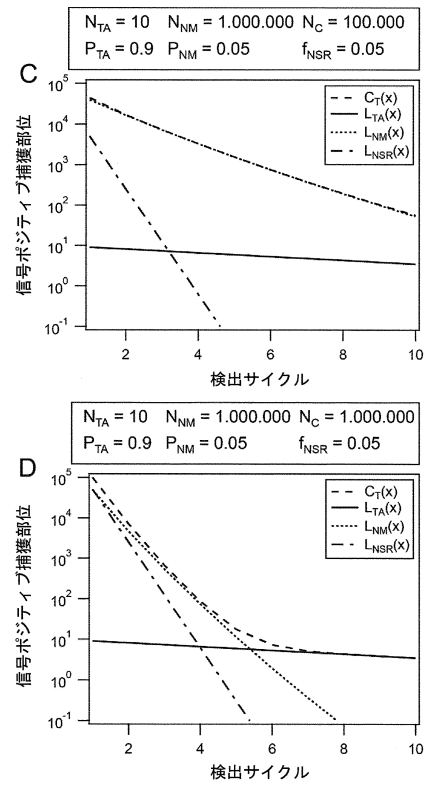
Fig. 17



【図 18-1】



【図 18-2】



【配列表】

0006925051000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 17165915.4

(32)優先日 平成29年4月11日(2017.4.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

早期審査対象出願

(72)発明者 アンドレアス・ヤーネ・クニング
デンマーク2300コペンハーゲン・エス、チロルズギャーゼ17、2チル・ヘイレ

審査官 倉持 俊輔

(56)参考文献 特表2010-538260(JP, A)
米国特許出願公開第2008/0026379(US, A1)
特表2010-515074(JP, A)
特開2009-068995(JP, A)
KIM, S. H. et al., LARGE-SCALE FEMTOLITER DROPLET ARRAY FOR DIGITAL COUNTING OF SINGLE BIOMOLECULES, LAB ON A CHIP, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2012年, Vol.12, pp.4986-4991, URL, <http://dx.doi.org/10.1039/c2lc40632b>
RISSIN, D. M. et al., SINGLE-MOLECULE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY DETECTS SERUM PROTEINS AT SUBFEMTOMOLAR CONCENTRATIONS, NATURE BIOTECHNOLOGY, 米国, 2010年 6月, Vol.28, No.6, pp.595-599, URL, <http://dx.doi.org/10.1038/NBT.1641>
WITTERS, D. et al., DIGITAL BIOLOGY AND CHEMISTRY, LAB ON A CHIP, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2014年, Vol.14, No.17, pp.3225-3232, URL, <http://dx.doi.org/10.1039/c4lc00248b>
GUO, Q. et al., A molecular beacon microarray based on a quantum dot label for detecting single nucleotide polymorphisms, Biosensors and Bioelectronics, 2015年 9月15日, Vol.77, pp.107-110

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)