

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-542210

(P2009-542210A)

(43) 公表日 平成21年12月3日(2009.12.3)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 2 G O 4 3
C 12 M 1/00 (2006.01)	C 12 M 1/00	A 4 B O 2 4
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	A 4 B O 2 9
G O 1 N 21/64 (2006.01)	G O 1 N 21/64	F 4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2009-518241 (P2009-518241)	(71) 出願人	507028217 キヤノン ユー. エス. ライフ サイエンシズ, インコーポレイテッド CANON U. S. LIFE SCIENCES, INC. アメリカ合衆国 メリーランド州 20850, ロックビル, スイート A-100 , メディカル センター ドライブ 9800 9800 Medical Center Drive Suite A-100 Rockville, Maryland 20850 U. S. A.
(86) (22) 出願日	平成19年6月27日 (2007. 6. 27)	(74) 代理人	100064447 弁理士 岡部 正夫
(85) 翻訳文提出日	平成21年2月24日 (2009. 2. 24)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/014863		
(87) 國際公開番号	W02008/005248		
(87) 國際公開日	平成20年1月10日 (2008. 1. 10)		
(31) 優先権主張番号	60/806, 440		
(32) 優先日	平成18年6月30日 (2006. 6. 30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	11/505, 358		
(32) 優先日	平成18年8月17日 (2006. 8. 17)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マイクロチャネル内のリアルタイムPCR

(57) 【要約】

本発明は、マイクロチャネル内の核酸を增幅するための方法に関する。より具体的には、本発明は、連続流マイクロ流体システムでリアルタイムのポリメラーゼ連鎖反応PCRを実行する方法およびそのようなシステムでリアルタイムPCRを監視する方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

リアルタイムPCRを実行する方法であって、

a) 流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを連続的に移動させる工程と、

b) 前記流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、

c) PCRを達成するために前記流路の定められた部分において温度サイクリングを行う工程と、

d) 前記流路の前記定められた部分に沿った複数の位置で蛍光シグナルの強度を測定する工程とを含む方法。

10

【請求項 2】

さらに、前記流路内の平均流速を測定する工程を含む請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記平均流速は、前記流路からの前記蛍光シグナルの連続画像を比較することにより測定される請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記平均流速は、前記流路内のマーカーの連続画像を比較することにより測定される請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

前記マーカーは、前記試験液中にある請求項4に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記マーカーは、前記分散媒中にある請求項4に記載の方法。

【請求項 7】

さらに、前記流量を調節してそれぞれのPCRサイクルのタイミングを制御する工程を含む請求項2に記載の方法。

【請求項 8】

前記流量は、前記流路の入口または出口における圧力を調節することにより調節される請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記蛍光シグナルの前記強度は、PCRサイクル毎に少なくとも1回測定される請求項1に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記蛍光シグナルの前記強度は、PCRサイクル毎に少なくとも1回測定される請求項2に記載の方法。

【請求項 11】

前記蛍光シグナルの前記強度は、PCRサイクル毎に少なくとも1回測定される請求項7に記載の方法。

【請求項 12】

前記平均流速は、前記流路からの前記蛍光シグナルの連続画像を比較することにより測定される請求項7に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記平均流速は、前記流路内のマーカーの連続画像を比較することにより測定される請求項7に記載の方法。

【請求項 14】

前記マーカーは、前記試験液中にある請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記マーカーは、前記分散媒中にある請求項13に記載の方法。

【請求項 16】

前記温度サイクリングを行う工程は、さらに、

i) 前記流路の前記定められた部分を第1の温度まで加熱する工程と、

50

i i) 前記流路の前記定められた部分を第2の温度まで冷却する工程と、
i i i) 前記流路の前記定められた部分を第3の温度まで加熱する工程とを含む請求項
1に記載の方法。

【請求項17】

前記第1の温度は、約85から約100までの範囲にあり、前記第2の温度は、約
20から約70までの範囲にあり、前記第3の温度は、約55から約80までの
範囲にある請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記流路の前記定められた部分は、PCRの10から50サイクルを完了するのに適し
た長さを有する請求項1に記載の方法。 10

【請求項19】

流路内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法であって、
a) 流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを移動させる工程と、
b) 前記流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、
c) PCRを達成するために前記流路の定められた部分において温度サイクリングを行
う工程と、
d) 前記流路の一部分に沿って反応依存蛍光シグナルの画像をキャプチャする工程と、
e) 前記流路内の前記平均流速を測定する工程と、
f) 前記試験ボーラスの位置を前記平均流速から試験ボーラスが受ける温度サイクルの
数に関係付ける工程とを含む方法。 20

【請求項20】

前記平均流速は、前記流路からの前記反応依存蛍光シグナルの連続画像を比較すること
により測定される請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記平均流速は、前記流路からの反応独立フロー・マーカーの連続画像を比較すること
により測定される請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記反応独立フロー・マーカーは、前記試験ボーラス中で予混合される請求項21に記
載の方法。 30

【請求項23】

前記反応独立フロー・マーカーは、前記試験ボーラスと交互にボーラスとして前記流路
に導入される請求項21に記載の方法。

【請求項24】

前記反応独立フロー・マーカーは、前記分散媒中で予混合される請求項21に記載の方
法。 40

【請求項25】

前記反応独立フロー・マーカーからの散乱光は、波長スペクトルにより前記反応依存蛍
光から分離され検出されうる請求項21に記載の方法。

【請求項26】

前記反応独立フロー・マーカーからの散乱光は、蛍光寿命に基づき前記反応依存蛍光か
ら分離され検出されうる請求項21に記載の方法。 40

【請求項27】

前記反応独立フロー・マーカーは、さらに、前記試験ボーラスの流れ分散を測定するた
めに使用される請求項21に記載の方法。

【請求項28】

反応依存蛍光の前記画像は、PCRサイクル毎に少なくとも1回キャプチャされる請求
項19に記載の方法。

【請求項29】

反応依存蛍光の前記画像は、1回分のPCRサイクルの持続時間よりも短い時間スケ
ールで前記流路の長さにわたって走査することにより逐次的にキャプチャされる請求項19 50

に記載の方法。

【請求項 3 0】

反応依存蛍光の前記画像は、前記流路に沿って複数の地点からシグナルを同時に取得することによりキャプチャされる請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記流量測定は、前記流量を調節するためのフィードバック・ループの一部となっている請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記流速は、前記流路の定められた部分における試料ボーラスの出入りを検出することで測定される請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

流路内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法であって、

a) 流路内のリアルタイム P C R 試薬を含む試験液のボーラスを移動させる工程と、

b) 同じ流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、

c) 前記流路に沿って空間温度帯を施して P C R を達成する工程と、

d) 前記 P C R サイクルにおいて固定点に対応する前記流路に沿った固定空間位置で蛍光シグナルを監視する工程と、

e) 前記流路内の流体の平均流速を測定する工程と、

f) 前記流量を調節して前記 P C R サイクルのタイミングを制御する工程とを含む方法。

【請求項 3 4】

マイクロ流体デバイス内でリアルタイム P C R を実行するためのシステムであって、

リアルタイム P C R 試薬および少なくとも 1 つの分散媒を含む少なくとも 1 つの試験液を含むように構成された少なくとも 1 つの流路を備えるマイクロ流体デバイスと、

前記マイクロ流体デバイスと一体化されるか、または近位にあり、前記試験液中でリアルタイム P C R を実行するために前記少なくとも 1 つの流路の定められた部分に沿って前記試験液の温度サイクリングを行うように構成されている、熱移動要素と、

前記マイクロ流体デバイスと一体化されるか、または近位にあり、前記少なくとも 1 つの流路を照射するように構成されている、照明源と、

前記マイクロ流体デバイスと一体化されるか、または近位にあり、前記少なくとも 1 つの流路の前記定められた部分に沿った複数の位置で蛍光シグナルを検出するように構成されている、検出器とを備えるシステム。

【請求項 3 5】

さらに、前記流路内の前記試験液の平均流速を測定するソフトウェア・システムを備える請求項 3 4 に記載のシステム。

【請求項 3 6】

前記ソフトウェア・システムは、前記流路内の前記蛍光シグナルの連続画像を比較することにより前記試験液の前記平均流速を測定する請求項 3 5 に記載のシステム。

【請求項 3 7】

前記ソフトウェア・システムは、前記流路内のマーカーの連続画像を比較することにより前記試験液の前記平均流速を測定する請求項 3 5 に記載のシステム。

【請求項 3 8】

前記マーカーは、前記試験液中にある請求項 3 7 に記載のシステム。

【請求項 3 9】

前記マーカーは、前記分散媒中にある請求項 3 7 に記載のシステム。

【請求項 4 0】

さらに、前記コンピュータ・システムにより測定された前記平均流速に応答して前記少なくとも 1 つの流路内で連続的に流れる前記少なくとも 1 つの試験液の前記流速を制御するための一要素を備える請求項 3 5 に記載のシステム。

【請求項 4 1】

10

20

30

40

50

前記蛍光シグナルは、P C Rサイクル毎に少なくとも1回測定される請求項3-4に記載のシステム。

【請求項4-2】

前記検出器は、増幅産物からのシグナルおよびマーカーからのシグナルを前記少なくとも1つの流路の前記定められた部分に沿った複数の位置で検出するように構成されている請求項3-4に記載のシステム。

【請求項4-3】

前記検出器は、前記増幅産物および前記マーカーからのシグナルを独立して検出するよう構成されている請求項4-2に記載のシステム。

【請求項4-4】

前記少なくとも1つの流路は、複数の流路を含む請求項3-4に記載のシステム。

10

【請求項4-5】

前記少なくとも1つの試験液は、複数の試験液を含む請求項3-4に記載のシステム。

【請求項4-6】

前記少なくとも1つの分散媒は、複数の分散媒を含む請求項3-4に記載のシステム。

【請求項4-7】

さらに、前記熱移動要素の温度を検出し、前記温度サイクルを制御するためのフィードバック情報を供給するセンサーを備える請求項3-4に記載のシステム。

【請求項4-8】

さらに、前記増幅産物を分析するための手段を備える請求項4-2に記載のシステム。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロチャネル内の核酸を増幅するための方法に関する。より具体的には、本発明は、連続流マイクロ流体システムでリアルタイムのポリメラーゼ連鎖反応P C Rを実行する方法およびそのようなシステムでリアルタイムP C Rを監視する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸の検出は、医薬品、法医学、工業生産加工、農作物および家畜育種、および他の多くの分野の中核をなすものである。疾病(例えば、癌)、感染性微生物(例えば、H I V)、遺伝系、遺伝マーカーなどを検出する能力は、疾病的診断および予後診断、マーカー利用選抜、犯罪現場の特徴の正確な同定、工業用微生物を増殖させる能力、および他の多くの技術にとって普遍的技術となっている。

30

【0003】

注目する核酸の完全性の測定は、感染または癌の病理学に関係するといってよい。少量の核酸を検出する最も強力な基礎技術の1つは、核酸配列の一部または全部を何回も複製し、次いで増幅産物を分析することである。P C Rは、おそらく、多数のさまざまな増幅技術のうち最もよく知られているものであろう。

【0004】

P C Rは、D N Aの短い部分を増幅する強力な技術である。P C Rを用いると、単一のテンプレートD N A分子から開始してD N Aの数百万のコピーを素早く作製することができる。P C Rは、単一鎖へのD N Aの変性、変性された鎖のプライマーのアニーリング、および熱安定性D N Aポリメラーゼ酵素によるプライマーの延長という三相の温度サイクルを含む。このサイクルは、検出され、分析される十分なコピーが得られるまで繰り返される。原理上、P C Rのそれぞれのサイクルで、コピーの数を倍にすることが可能である。実際、それぞれのサイクルの後に行われる乗算は、常に2回未満である。さらに、P C Rサイクリングが続くと、必要な反応剤の濃度が減少するので、増幅されたD N A産物の集積が、最終的に止まる。P C Rの一般的な詳細については、S a m b r o o kおよびR u s s e l l「M o l e c u l a r Cloning - - A Laboratory

40

50

Manual」(第3版)、Vols. 1 - 3、Cold Spring Harbor Laboratory(ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー所在)(2000年)、「Current Protocols in Molecular Biology」、F.M. Ausubelら(編集)、Current Protocols(Greene Publishing Associates, Inc.社とJohn Wiley & Sons, Inc.社の共同事業)、(2005年までの補遺あり)、および「PCR Protocols A Guide to Methods and Applications」、M.A. Innisら(編集)、Academic Press Inc.社(カリフォルニア州サンディエゴ所在)(1990年)を参照のこと。

10

【0005】

リアルタイムPCRとは、典型的にはPCRサイクル毎に1回、反応が進行するとともに増幅されたDNA産物の蓄積を測定するために使用される成長する一組の技術のことである。時間の経過とともに産物の蓄積を監視することにより、反応の効率を測定するだけでなく、DNAテンプレート分子の初期濃度を推定することもできる。リアルタイムPCRに関する一般的な詳細については、「Real-Time PCR: An Essential Guide」、K. Edwardsら(編集)、Horizon Bioscience(英国ノリッジ所在)(2004年)を参照のこと。

【0006】

現在、増幅されたDNAの存在を示すいくつかの異なるリアルタイム検出化学物質が存在する。これらの化学物質の大部分は、PCR過程の結果として特性を変化させる蛍光指示薬に依存する。こうした検出化学物質としては、二本鎖DNAに結合した後に蛍光収率を高めるDNA結合色素(SYBR(登録商標)Greenなど)がある。他のリアルタイム検出化学物質では、フェルスター型共鳴エネルギー移動FRETを利用するが、これは、色素の蛍光収率が他の光吸収部分またはクエンチャーハへの近さに強く依存する減少である。これらの色素およびクエンチャーは、典型的には、DNA配列特異的プローブまたはプライマーに付着する。FRETベースの検出化学物質としては、加水分解プローブおよび立体配座プローブがある。加水分解プローブ(TaqMan(登録商標)プローブなど)では、ポリメラーゼ酵素を使用して、オリゴヌクレオチド・プローブに付着したクエンチャー色素分子からレポーター色素分子を切断する。立体配座プローブ(分子ビーコンなど)では、オリゴヌクレオチドに付着した色素を使用し、その蛍光放射は、標的DNAにハイブリダイズしているオリゴヌクレオチドに立体構造変化が生じると変化する。

20

【0007】

リアルタイムPCRを実行する多数の市販の計測器が存在する。利用可能な計測器の例としては、Applied Biosystems PRISM 7500、Bio-Rad iCycler、およびRoche Diagnostics Light Cycler 2.0がある。これらの計測器の試料容器は、典型的には少なくとも体積10μlの試料液を必要とする閉管である。特定のアッセイにより検出可能なテンプレートDNAの最低濃度が、1マイクロリットル当たり1分子のオーダーであった場合、利用可能な計測器の検出限界は、1試料チューブ当たり標的数十個のオーダーとなるであろう。したがって、單一分子感度を達成するためには、1~1000n1より少ない試料量を試験するのが望ましい。

30

【0008】

つい最近、例えば、マイクロ流体デバイス内の増幅反応を伴う、PCRおよび他の増幅反応を実行する多くの高生産性アプローチが開発されたが、それとともに、それらのデバイス内またはデバイス上の増幅された核酸を検出し、分析する方法も開発された。増幅に関する試料の温度サイクリングは、通常、2つの方法のうちの1つでなされる。第1の方法では、試料液がデバイス内に導入され、時間の経過とともに温度サイクリングが行われ、これは従来のPCR計測器と非常によく似ている。第2の方法では、ポンプを使い、試料液が空間的に変化する温度帯に連続的に送り込まれる。

40

50

【0009】

例えば、Lagallayら(Anal Chem 73:565-570(2001年))では、280n1のPCRチャンバ内で単一のテンプレートDNAを増幅し、検出することを実証している。産物の検出は、キャピラリー電気泳動法を使用してポストPCR処理された。他方、Koppら(Science 280:1046-1048(1998年))では、蛇行流路が95(変性)、72(伸長)、および60(アニーリング)の3つの一定温度帯を通過するガラス基板を使用して連続流PCRを実証している。72の温度帯は、中央領域に配置され、95から60まで進む間に短時間のうちに通過されなければならなかった。検出は、ゲル電気泳動法を使用してポストPCR処理された。このPCR技術は、反応槽の表面全体を加熱することに基づいていないため、反応速度は、加熱/冷却速度ではなく、流量により決定される。これらの参考文献のいずれも、PCR反応のリアルタイム監視については説明していないかった。

10

【0010】

Parkら(Anal Chem 75:6029-6033(2003年))は、3つの温度制御ブロックの周りにらせん状に巻かれたポリイミドコーティング溶融シリカ毛管を使用する連続流PCRデバイスを説明している。試料量は、2μlであった。検出は、ゲル電気泳動法を使用してポストPCR処理された。非透明性のポリイミドの代わりにPTFEでコーティングされた毛管を使用することによりリアルタイムPCR用に計測器を適合させることが可能であるという言及がなされていた。Hahnら(WO2005/075683)も参照のこと。

20

【0011】

Enzelbergerら(米国特許第6,960,437号)は、3つの温度帯を有する回転流路を備えるマイクロ流体デバイスを説明している。試料を導入し、ポンプを使って回転する形でそれらの温度帯に送り込むために、多数の一体化された弁およびポンプが使用される。

20

【0012】

Knappら(米国特許出願公開第2005/0042639号)は、単一分子増幅を行えるマイクロ流体デバイスを説明している。複数の直線的平行流路を有する平面状ガラスチップが開示されている。標的DNAとPCR試薬の混合物が、これらの流路内に注入される。第1の実施形態では、これらの流路はこの混合物で満たされ、流れが停止される。次いで、流路の全長に対し温度サイクリングが実行される。温度サイクリングが完了した後、DNAが増幅された蛍光領域を検出するために、これらの流路の撮像が行われる。第2の実施形態では、PCR混合物の流れは、温度サイクリングの実行とともに増幅帯を連続的に通過し、増幅帯の下流で蛍光が検出される。サイクリングに費やされる時間を変える、サイクリングの下で移動する距離を変える、などにより、異なる増幅度が得られる。この方法が、時間の経過による個々の試料要素進行状況を監視するのではなく、別々の連続的な試料要素について条件(実行されるサイクルなど)を変えることは注目に値する。

30

【0013】

この技術はいずれも、連続流デバイス内で単一標的分子感度をリアルタイム反応監視機能と組み合わせていない。したがって、少量の試料を用いて効率よく正確に実行されうるリアルタイムPCRの堅牢な高生産性方式が必要である。これらの方法は単一標的分子感度を有し、比較的少ない量のPCR試薬を使用し、温度サイクリングに少ないエネルギーを使用することが望ましいであろう。本発明は、本発明の説明を検討した後明らかになるこれらおよび他の特徴を備える。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】米国仮特許出願第60/806,440号

【特許文献2】WO2005/075683

50

- 【特許文献 3】米国特許第 6,960,437 号
 【特許文献 4】米国特許出願公開第 2005/0042639 号
 【特許文献 5】米国特許第 6,482,364 号
 【特許文献 6】米国特許第 6,042,709 号
 【特許文献 7】米国特許第 6,287,520 号
 【特許文献 8】米国特許第 6,235,471 号
 【特許文献 9】米国特許第 6,149,870 号
 【特許文献 10】米国特許第 5,869,004 号
 【特許文献 11】米国特許第 6,440,722 号
 【特許文献 12】米国特許出願第 2005/0042839 号 10
 【特許文献 13】米国特許第 5,925,517 号
 【特許文献 14】米国特許第 6,150,097 号
 【特許文献 15】米国特許第 6,037,130 号
 【特許文献 16】米国特許第 6,544,732 号
 【特許文献 17】米国特許第 6,855,551 号
 【特許文献 18】米国特許第 6,444,461 号
 【特許文献 19】米国特許第 6,406,893 号
 【特許文献 20】米国特許第 6,391,622 号
 【特許文献 21】米国特許第 6,303,343 号
 【特許文献 22】米国特許第 6,171,850 号 20
 【特許文献 23】米国特許第 5,939,291 号
 【特許文献 24】米国特許第 5,955,029 号
 【特許文献 25】米国特許第 5,965,410 号
 【特許文献 26】米国特許第 7,015,030 号
 【特許文献 27】米国特許米国公開特許出願第 2004/0180346 号
 【特許文献 28】PCT 公開特許出願第 WO98/00231 号
 【特許文献 29】米国特許第 5,271,724 号
 【特許文献 30】米国特許第 5,277,556 号
 【特許文献 31】米国特許第 5,375,979 号
 【特許文献 32】PCT 公開特許出願第 WO94/05414 号 30
 【特許文献 33】PCT 公開特許出願第 WO97/02357 号
 【特許文献 34】米国公開特許出願第 2002/0019059 号
 【非特許文献】
 【0015】
 【非特許文献 1】Sambrook および Russell 「Molecular Cloning - A Laboratory Manual」(第3版)、Vols. 1 - 3、Cold Spring Harbor Laboratory(ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー所在)(2000年)
 【非特許文献 2】「Current Protocols in Molecular Biology」、F.M. Ausubelら(編集)、Current Protocols(Greene Publishing Associates, Inc. 社と John Wiley & Sons, Inc. 社の共同事業)、(2005年までの補遺あり) 40
 【非特許文献 3】「PCR Protocols A Guide to Methods and Applications」、M.A. Innisら(編集)、Academic Press Inc. 社(カリフォルニア州サンディエゴ所在)(1990年)
 【非特許文献 4】「Real-Time PCR: An Essential Guide」、K. Edwardsら(編集)、Horizon Bioscience(英国ノリッジ所在)(2004年)
 【非特許文献 5】Lagally (Anal Chem 73:565-570 (20 50

01年))

【非特許文献6】Koppら(Science 280:1046-1048(1998年))

【非特許文献7】Parkら(Anal Chem 75:6029-6033(2003年))

【非特許文献8】BergerおよびKimmel(「Methods in Enzymology 152」、Academic Press, Inc.(カリフォルニア州サンディエゴ所在)、1987年)

【非特許文献9】SambrookおよびRussell「Molecular Cloning、第3版」(Cold Spring Harbor Laboratory Press(ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー所在)、2001年) 10

【非特許文献10】Yen(「Physiological Reviews」81:1097~1142頁、2001年)

【非特許文献11】Calvertら(「Annals of Internal Medicine」137:603~612頁、2002年)

【非特許文献12】Boland(「Reviews In Gastroenterological Disorders」2 Suppl. 1:S12~S19頁、2002年)

【非特許文献13】「The Molecular Basis of Human Cancer」、ColemanおよびTsongalis(編集)、Humana Press(ニュージャージー州トトワ所在)、2001年 20

【非特許文献14】Zhuら(Anal Chem 66:1941~1948頁、1994年)

【非特許文献15】Leoneら(「Nucl Acids Res」26:2150~2155頁、1995年)

【非特許文献16】TyagiおよびKramer(「Nat Biotechnology」14:303~308頁、1996年)

【非特許文献17】BlockおよびKramer(「Mol Cell Probes」11:187~194頁、1997年)

【非特許文献18】Hsuihら(「J Clin Microbiol」34:501~507頁、1997年) 30

【非特許文献19】Kostrikisら(「Science」279:1228~1229頁、1998年)

【非特許文献20】Sokolら(「Proc Natl Acad Sci. USA」95:11538~11543頁、1998年)

【非特許文献21】Tyagiら(「Nat Biotechnology」16:49~53頁、1998年)

【非特許文献22】Bonnetら(「Prot Natl Acad Sci USA」96:6171~6176頁、1999年)

【非特許文献23】Fangら(「J Am Chem Soc」121:2921~2922頁、1999年) 40

【非特許文献24】Marrasら(「Genet Anal Biomol Eng」14:151~156頁、1999年)

【非特許文献25】Vetら(「Proc Natl Acad Sci USA」96:6394~6399頁、1999年)

【非特許文献26】Nelsonら(「Nucl Acids Res」17:7187~7194頁、1989年)

【非特許文献27】Bruchezら(「Science」281:2013~2016頁、1998年)

【非特許文献28】WarrenおよびNie(「Science」281:2016~50

2018頁、1998年)

【非特許文献29】Alivisatos(「Science」271:933~937頁、1999年)

【非特許文献30】BeaucageおよびCaruthers(「Tetrahedron Letters」22:1859~1862頁、1981年)

【非特許文献31】Needham-Vandevanterら(「Nucleic Acids Res」12:6159~6168頁、1984年)

【非特許文献32】Chowら(「Science」282:396~399頁、1998年)

【非特許文献33】Zhangら(「Anal Chem」71:1138~1145頁、1999年) 10

【非特許文献34】Weiss(「Introductory Statistics、第7版」Addison-Wesley(マサチューセッツ州レディング所在)、2004年)

【非特許文献35】Weiss(「Elementary Statistics、第5版」Addison-Wesley(マサチューセッツ州レディング所在)、2001年))

【非特許文献36】Berinstein(「Finding Statistics Online: How to Locate the Elusive Numbers You Need」、Information Today(ニュージャージー州メドフォード所在)、1998年) 20

【非特許文献37】Everitt(「The Cambridge Dictionary of Statistics」、Cambridge University Press(ニューヨーク州所在)、1998年)

【非特許文献38】Kotz(「Encyclopedia of Statistical Sciences」、vol. 1~9+付録、Wiley(ニューヨーク州所在)、1988年)

【非特許文献39】DillonおよびGoldstein(「Multivariate Analysis: Methods and Applications」、Wiley(ニューヨーク州所在)、1984年) 30

【非特許文献40】TabachnickおよびFidell(「Using Multivariate Statistics」、HarperCollins College Publishers(ニューヨーク州所在)、1996年)

【非特許文献41】Boxら(「Statistics for Experimenters」、Wiley(ニューヨーク州所在)、1978年)

【非特許文献42】Cornell(「Experiments with Mixtures」、Wiley(ニューヨーク州所在)、1990年)

【非特許文献43】John(「Statistical Design and Analysis of Experiments」、SIAM(フィラデルフィア所在)、1998年) 40

【非特許文献44】GibasおよびJambreck(「Bioinformatics Computer Skills」、O'Reilly(カリфорニア州セバストポル所在)、2001年)

【非特許文献45】Pevzner(「Computational Molecular Biology and Algorithmic Approach」、The MIT Press(マサチューセッツ州ケンブリッジ所在)、2000年)

【非特許文献46】Durbinら(「Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids」、Cambridge University Press(英国ケンブリッジ所在)、1998年) 50

【非特許文献47】RashidiおよびBuehler(「Bioinformatic Basic Applications in Biological Science and Medicine」、CRC Press LLC(フロリダ州ボーカ・ラトーン所在)、2000年)

【非特許文献48】G.I.Taylor(「Proc Roy Soc Lond」A 219:186(1953年))

【非特許文献49】R.Ariss(「Proc Roy Soc Lond」A 235:67(1956年))

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、マイクロチャネル内の核酸を増幅するための方法に関する。より具体的には、本発明は、連続流マイクロ流体システムでリアルタイムのポリメラーゼ連鎖反応PCRを実行する方法およびそのようなシステムでリアルタイムPCRを監視する方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0017】

そこで、第1の態様において、本発明は、リアルタイムPCRを実行する方法を提供し、この方法は、a)流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを連続的に移動させる工程と、b)流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c)PCRを達成するために流路の定められた部分において温度サイクリングを行う工程と、d)流路の定められた部分に沿った複数の場所で蛍光シグナルの強度を測定する工程とを含む。一実施形態では、流路はマイクロチャネルまたはマイクロ流体流路であり、その流路の寸法は、試験液中に元々存在している単一DNA分子の増幅および検出を行える十分な小ささである。他の実施形態では、試験液は、すべての必要なリアルタイムPCR試薬を含むことを除き分散媒と実質的に同じである。リアルタイムPCR試薬混合物は、PCRプライマー、dNTP、ポリメラーゼ酵素、塩、緩衝液、表面不動態化剤などを含むことができる。それに加えて、リアルタイムPCR混合物は、非特異的蛍光DNA検出分子、配列特異的蛍光DNAプローブ、またはマーカーを含むことができる。追加の一実施形態では、分散媒は、不混和流体である。分散媒の目的は、一方の試験ボーラスから他方の試験ボーラスへの物質移動を遅らせることである。分散媒の他の目的は、流路内の流体流を追跡するために使用されるボーラス間の区別可能な遷移を行わせることである。分散媒は、マーカーを含むことができる。

【0018】

一実施形態では、流路の定められた部分に沿った熱移動要素を使用して温度サイクリングが行われる。他の実施形態では、熱移動要素は、流路の定められた部分全体において温度サイクリングを行う。つまり、温度サイクリングを行うために、一定温度帯が使用される。他の実施形態では、適切にプログラムされたコンピュータが、熱移動要素の温度サイクリングを制御する。一実施形態では、熱移動要素の温度が検出され、コンピュータにフィードバックされる。これらの実施形態によれば、温度変化が時間によるPCRプロファイルに従うように流路の長さ分(反応帯)に加熱と冷却が行われる。試験ボーラスは、反応帯の上流端から下流端にボーラスが流れるときに必要なPCRサイクル数が達成されるような流量(流速)でこの反応帯にポンプで通される。

【0019】

他の実施形態では、蛍光シグナルの強度は、PCR温度サイクルにおいて特定の時刻および/または温度で測定される。追加の実施形態では、蛍光シグナルの強度は、PCRサイクル毎に1回測定される。他の実施形態では、蛍光シグナルの強度が測定される複数の配置が、流路の定められた部分全体である。他の実施形態では、蛍光シグナルの強度に関するデータは、適切にプログラムされたコンピュータにより処理される。他の実施形態では、流路の長さに沿った少なくとも1つの蛍光シグナルの画像が作成される。他の実施形

10

20

30

40

50

態では、画像キャプチャは、連続的温度サイクリング周期で繰り返し実行される。画像が作成されるか、または蛍光シグナルの強度が複数ピクセル・アレイ検出器を使用して測定されうる。静止メカニズムまたは走査メカニズムまたはその両方を使用して、画像キャプチャを行える。

【0020】

第2の態様では、本発明は、流路内の液体の平均流速を監視することを含むリアルタイムPCRを実行する方法を提供する。本発明の態様によれば、この方法は、第1の態様で述べたような工程を含み、さらに、e) 流路内の流体の平均流速を測定する工程をも含む。流路内の流速を監視することにより、時間により変化する試験ボーラスの配置が測定され、これにより、試験ボーラスで生じたPCRサイクルの数を識別することができる。

10

【0021】

一実施形態では、流体の平均流速は、流路からの反応依存蛍光シグナルの連続画像を比較することにより測定される。第2の実施形態では、流体の平均流速は、流路内のマーカー(つまり、反応独立マーカー)の連続画像を比較することにより測定される。マーカーの使用には、リアルタイムPCRシグナルが検出可能でない場合でも、流量はそのまま検出可能であるという利点がある。潜在的マーカーの例は、色素、半導体量子ドット、ポリマー・マイクロビーズ、散乱金属粒子、超微粒気泡、および当技術分野者に知られているようなものである。一実施形態では、マーカーは、試験液中に存在する。マーカーが試験液中に存在する場合、これは、PCR化学反応に悪影響を及ぼすことがあってはならない。他の実施形態では、マーカーは、分散媒中に存在する。さらに他の実施形態では、マーカーは、試験ボーラスと直列に並ぶ別のボーラスである。追加の実施形態では、マーカーは、励起波長、発光スペクトル、寿命、および当技術分野でよく知られているようなものなどにより、蛍光シグナルから分離し検出することが可能である。さらに他の実施形態では、蛍光シグナルの強度またはマーカーの連続画像に関するデータは、適切にプログラムされたコンピュータにより処理される。これらの実施形態により、平均流速は、連続するPCRサイクルから取った画像を比較することにより決定される。さらに他の実施形態では、流速は、反応帯入口検出器および体積流量計を使用して測定されうる。流速は、例えば、流路の寸法を知り、体積流量を測定することにより推定されうる。

20

【0022】

第3の態様では、本発明は、流路内の液体の流速を監視することと、必要に応じて流速を調節して試験液または試験試料が受けるPCRサイクリングの持続時間を制御することを含むリアルタイムPCRを実行する方法を提供する。本発明の態様によれば、この方法は、第2の態様で述べたような工程を含み、さらに、f) 流体の流速を調節してPCRサイクリングの持続時間を制御する工程を含む。一実施形態では、流速は、試験液が流路の定められた部分を通っている間に所望のPCRサイクル数が完了するように監視および調節される。つまり、流速は、PCRサイクリングの持続時間を決定するように調節される。他の実施形態では、この監視および調節は、適宜プログラムされたコンピュータにより実行される。さらに他の実施形態では、流量は、流路の投入端の圧力を調節することにより調節される。追加の実施形態では、流量は、流路の産出端の圧力調節真空を調節することにより調節される。他の実施形態では、流量は、シリンジ・ポンプなどのポンプを調節することにより調節される。

30

【0023】

第4の態様において、本発明は、流路内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法を提供し、この方法は、a) 流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを移動させる工程と、b) 前記流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c) PCRを達成するために流路の定められた部分において温度サイクリングを行う工程と、d) 流路の一部分に沿って反応依存蛍光シグナルの画像をキャプチャする工程と、e) 流路内の平均流速を測定する工程と、f) 試験ボーラスの位置を平均流量から試験ボーラスが受ける温度サイクルの数に関係付ける工程とを含む。一実施形態では、平均流速は、流路からの反応依存蛍光シグナルの連続画像を比較することにより測定さ

40

50

れる。第2の実施形態では、平均流速は、流路からの反応独立フロー・マーカーの連続画像を比較することにより測定される。反応独立フロー・マーカーは、(i)試験ボーラス内で予混合されるか、(ii)試験ボーラスと交互にボーラスとして流路に導入されるか、または(iii)分散媒内で予混合されうる。他の実施形態では、反応独立フロー・マーカーからの散乱光は、波長スペクトルにより反応依存蛍光から分離され検出されうる。代替実施形態では、反応独立フロー・マーカーからの散乱光は、蛍光寿命に基づき反応依存蛍光から分離され検出されうる。他の実施形態では、反応独立フロー・マーカーは、さらに、試験ボーラスの流れ分散を決定するために使用される。さらに他の実施形態では、反応依存蛍光の画像は、少なくともPCRサイクル毎に1回キャプチャされる。一実施形態では、反応依存蛍光の画像は、1回分のPCRサイクルの持続時間よりも短い時間スケールで流路の長さにわたって走査することにより逐次的にキャプチャされる。代替実施形態では、反応依存蛍光の画像は、流路に沿って複数の地点からシグナルを同時に取得することによりキャプチャされる。他の実施形態では、流速測定は、流速を調節するためのフィードバック・ループの一部である。さらに他の実施形態では、流速は、流路の定められた部分における試料ボーラスの出入りを検出することで測定される。

10

【0024】

第5の態様において、本発明は、流路内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法を提供し、この方法は、a)流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを移動させる工程と、b)同じ流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c)流路に沿って空間温度帯を施してPCRを達成する工程と、d)PCRサイクルにおいて固定点に対応する流路に沿った固定空間位置で蛍光シグナルを監視する工程と、e)流路内の流体の平均流速を測定する工程と、f)流量を調節してPCRサイクルのタイミングを制御する工程とを含む。一実施形態では、流路のいくつかの部分に沿った熱移動要素を使用して温度サイクリングが行われる。他の実施形態では、熱移動要素は、流路のいくつかの部分において温度サイクリングを行う。他の実施形態では、適切にプログラムされたコンピュータが、熱移動要素の温度サイクリングを制御する。一実施形態では、熱移動要素の温度が検出され、コンピュータにフィードバックされる。これらの実施形態によれば、PCR温度プロファイルに従うように流路の一部に加熱と冷却が施される。試験ボーラスは、反応帯の上流端から下流端にボーラスが流れるときに必要なPCRサイクル数が達成されるような流量(流速)でこの反応帯にポンプで通される。本発明のこの態様における流路内の流速を監視することにより、PCRサイクル周期の持続時間が決定されうる。

20

30

30

【0025】

第6の態様では、本発明は、本明細書で説明されている方法を実施するように適合されたシステムおよび/またはキットを提供する。これらのシステムおよび/またはキットは、本明細書の方法工程を実施するためのシステム・インストラクション(例えば、コンピュータ内に、またはコンピュータ可読媒体内に、例えば、システム・ソフトウェアとして、具現化される)を備えることができる。試料を保存し、移動させ、アリコートを取り、または希釈するための流体操作要素、例えば、マイクロ流体操作要素、および検出器要素も、本明細書のシステムおよびキットのコンポーネントとすることができる。それに加えて、梱包材料、一体化要素(例えば、計測器ケース、電源など)、システムおよびキットを使用するためのインストラクションなども、本発明の特徴であるとしてよい。

40

【0026】

一実施形態では、本発明は、1つまたは複数の試験液の温度サイクリングを行うようにそれぞれ構成されている1つまたは複数の增幅流路を備えるマイクロ流体デバイスを具備するシステムを提供する。(複数の)流路の定められた部分に沿って温度サイクリングを行うための熱移動要素も、含まれる。熱移動要素は、マイクロ流体デバイスと一体であるか、または近位にある。マイクロ流体デバイスと一体であるか、または近位にある照明源も含まれ、この照明源は、(複数の)流路を照射するように構成されている。マイクロ流体デバイスと一体であるか、または近位にある検出器も含まれ、この検出器は、(複数の

50

) 流路内の増幅産物および / またはマーカーを検出するように構成されている。一実施形態では、検出器は、異なるシグナルを有する 2 つ以上の検出可能なマーカーから独立にシグナルを検出することができ、例えば、2 つ以上の波長範囲の蛍光または他の放射を同時に検出できる検出器がそうである。システムは、(複数の) 流路内の連続的に移動する試験液および分散媒の流量を制御するための 1 つまたは複数の要素とともに、流量を監視、制御してそれぞれの P C R サイクルのタイミングを制御するためのシステム・インストラクションまたはソフトウェアを含む。典型的には、システムは、熱移動要素の温度を検出し、温度サイクルを制御するためのフィードバック情報を供給するセンサーを備える。典型的には、このシステムは、さらに、増幅産物および / またはマーカーの検出のタイミングなどのデータを生成し、処理し、(複数の) 流路内の試験液の配置を監視するなどのためのシステム・ソフトウェアを備える。

10

【0027】

第 2 の実施形態では、システムは、さらに、試料を複数の試験液に分けて希釈する希釈モジュールとともに、希釈モジュールが試料のアリコートを複数の試験液に分ける仕方を説明するシステム・インストラクションも備えることができる。希釈モジュールは、マイクロ流体デバイスと一体であるか、または近位にあるものとしてよい。

【0028】

システムは、適宜、本明細書で説明されている方法工程のどれかを実行するためのインストラクション付きのソフトウェアを備える。例えば、システムは、温度サイクリングを受ける試験液の 1 つまたは複数から送られてくるシグナルに対し 1 つまたは複数の統計的または確率論的解析を実行する統計的または確率論的システム・ソフトウェアを備えることができる。例えば、統計的または確率論的解析は、ポアソン解析、モンテカルロ解析、遺伝的アルゴリズムの応用、ニューラル・ネットワーク学習、マルコフ・モデリング、隠れマルコフ・モデリング、多次元的尺度構成法、P L S 分析、および / または P C A 分析を含むことができる。統計的または確率論的解析は、適宜、試料中の注目する核酸の濃度、割合、または個数を定量的に決定することを含む。

20

【0029】

システムはさらに、適宜、希釈モジュールにより希釈されるまで試料を保存しておく試料保存モジュール、試料保存モジュールから試料を取り出し、希釈モジュールに送出する試料取り出しモジュールなどの流体操作または保存機能の特徴を備えることができる。これらの特徴は、適宜、流体の連続流(例えば、試料を含む)をシステムに通すように設計されている(これにより、試料処理効率が高まる)。システムは、さらに、増幅産物を分析するための手段およびシステムも備えることができる。一実施形態では、システムは、検出器により検出されるような増幅産物により占有される再現可能なシグナル形状、長さ、幅、体積、または面積と(a) 試験液の 1 つに存在する注目する核酸のコピーの個数、または試料中に存在する注目する核酸のコピーの個数、もしくはその両方または(b) 試料中に存在する(複数の) 増幅産物の同定または(c) 当技術分野で知られ、使用されている他の分析パラメータとの相関性を求めるシステム・ソフトウェアを備えることができる。

30

【0030】

上記の方法またはシステムの多くは、併用することができる。本発明の追加の特徴は、以下の説明を検討した後で明らかになるであろう。

40

【0031】

この特許のファイルは、カラー写真で作製された少なくとも 1 つの図面を含む。(複数の) カラー写真を含むこの特許のコピーは、特許商標庁に申し込み、必要な手数料を支払って入手できる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図 1】本発明の一実施形態によるリアルタイム P C R アーキテクチャのブロック図である。

50

【図2】本発明の一実施形態によるリアルタイムPCRマイクロ流体システムの略図である。

【図3A】図2のシステムからのデータ処理によるセンサー出力画像を示す図である。

【図3B】図2のシステムからのデータ処理によるセンサー出力画像を示す図である。

【図4】本発明の他の実施形態によるリアルタイムPCRマイクロ流体システムの略図である。

【図5】本発明による図4のシステムからのセンサー出力データを示す図である。

【図6】本発明のさらに他の実施形態によるマイクロ流体デバイス内のリアルタイムの定量的PCRに使用されるシステムの図である。

【図7】本発明の一実施形態による動作モードを例示するプロセス図である。 10

【図8A】流れ条件の下でのマイクロ流体流路内のPCR産物の増大を示す蛍光シグナルの画像である。

【図8B】図8Aからのマイクロチャネルに沿ったマーカーの強度のプロットである。

【図9A】流れ条件の下でのマイクロ流体流路内のPCR産物の増大を示す蛍光シグナルの画像である。

【図9B】図9Aからのマイクロチャネルに沿った緑色シグナルの強度のプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0033】

本発明は、マイクロチャネル内の核酸を增幅するための方法に関する。より具体的には、本発明は、連続流マイクロ流体システムでリアルタイムのポリメラーゼ連鎖反応PCRを実行する方法およびそのようなシステムでリアルタイムPCRを監視する方法に関する。 20

【0034】

断りのない限り、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、本発明が関係している技術分野の当技術分野者に通常理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で説明されているものと類似のまたは同等の多数の方法および材料はどれも、本発明を実施する際に使用することができるが、好ましい材料および方法について以下で説明する。

【0035】

図1は、本発明の一実施形態によるリアルタイムPCRアーキテクチャのブロック図である。システムは、試験液貯蔵槽101を備え、これは、上述のように、それぞれのウェルが異なる試験液、例えば、試験試料を含む、マイクロタイター・プレートなどの複数の試験液を含む貯蔵槽であってよい。システムは、さらに、分散媒貯蔵槽102を備える。一実施形態では、試験液は、すべての必要なリアルタイムPCR試薬を試験液が含むことを除き分散媒と実質的に同じである。リアルタイムPCR試薬混合物は、PCRプライマー、dNTP、ポリメラーゼ酵素、塩、緩衝液、表面不動態化剤などを含むことができる。それに加えて、リアルタイムPCR混合物は、非特異的蛍光DNA検出分子、配列特異的蛍光DNAプローブ、またはマーカーを含むことができる。追加の実施形態では、分散媒は、不混和流体（油、フッ素化液体、または他の非水性または疎水性溶媒など）である。分散媒の目的は、一方の試験ボーラスから他方の試験ボーラスへの物質移動を抑止することである。分散媒の他の目的は、流路内の流体流を追跡するために使用されうるボーラス間の区別可能な遷移を行わせることである。一実施形態では、分散媒は、マーカーを含むことができる。 30

【0036】

一実施形態では、試験液および分散媒は、スイッチ104を通してマイクロチャネル103内に導入される。マイクロチャネルの寸法は、試験液中に元々存在している単一DNA分子の増幅および検出を行えるくらい十分に小さい。マイクロチャネル103は、单一マイクロチャネルであるか、またはマイクロ流体デバイスの一部である複数のマイクロチャネルのうちの1つとしてよい（図2、4、および6に示されているものなど）。スイッチ104は、分散媒および試験液がマイクロチャネル103内に逐次的に交互に導入され 40

るよう主制御および処理コンピュータ105の制御下にある。マイクロチャネル103内に導入される試験液および分散媒の体積は、マイクロチャネル103を通して移動するときに、それらの間の配合が最小になるように選択される。

【0037】

連続的な多数の反応（または逐次反応）は、こうして、分散媒によりそれぞれ分離されるマイクロチャネル103を通して異なる試験液の連続的移動の結果として同じマイクロチャネル103内で実行されうる。マイクロチャネル103が、マイクロ流体デバイス内の複数のマイクロチャネルのうちの1つである場合、マイクロ流体デバイスのマイクロチャネル内で多数の反応を並列に実行することもできる。マイクロチャネル103を通る分散媒および試験液の流量は、ポンプ・メカニズム106により制御される。ポンプ・メカニズム106は、マイクロチャネル103内の試験液および分散媒の流量を調節するために主制御および処理コンピュータ105の制御下にある。流量は、試験液がマイクロチャネル103を通過するときに所望の数のPCRサイクルが実行されるように調節される。

【0038】

ポンプ・メカニズム106は、マイクロチャネル103の上流側または入口の陽圧により、またはマイクロチャネル103の下流側または出口の陰圧により、試験液および分散媒の流量を調節することができる。一実施形態では、差圧は、約1psiであるが、他の差圧も使用できる。マイクロチャネル103の長さは、試験液がマイクロチャネル103の反応帯内を移動するときに、例えば、PCRの10から50サイクル、またはそれらの間の任意の数などの所望の数のPCRサイクルの完了に適した長さである。マイクロチャネル103の反応帯は、PCRサイクルの実行のため温度サイクリングが行われるマイクロチャネルの領域である。典型的には、25～30、25～35、25～40、30～35、30～40、または35～40のPCRサイクルが標準増幅反応について実行される。所望の数のPCRサイクルを実行するためのマイクロチャネル103の長さは、さらに、逐次的にマイクロチャネル103内を交互移動する試験液および分散媒の体積に依存する。例えば、反応帯が、40mmである場合、試験液の最小体積は、マイクロチャネル103の反応帯内で1mmを占有し、試験液の最大体積は、マイクロチャネル103の反応帯内で20mmを占有する。したがって、この非制限的例では、最低1個の試料と最大20個の試料が、マイクロチャネル103の反応帯内を試験液が移動するときに増幅されうる。もちろん、マイクロチャネルの長さおよび試料体積は、任意の数の試料を増幅するように選択されうる。

【0039】

試験液がマイクロチャネル103内を移動するときに、PCRサイクルに適した温度となるように温度を制御し、温度サイクリングを行うために温度制御システム107がシステムに備えられている。PCRサイクルに適した温度は、当技術分野者によく知られており、約85から約100までの範囲内の第1の温度、約20から約70までの範囲内の第2の温度、および約55から約80までの範囲内の第3の温度を含むことができる。温度制御システム107は、マイクロチャネル103またはマイクロ流体デバイスのマイクロチャネルと一体化されるか、または近位にある。温度制御システム107は、加熱器108、冷却器109、温度センサー110、および温度コントローラ111を備える。温度コントローラ111は、温度センサー110から温度情報を収集し、温度情報に基づき制御信号を生成する。制御信号は、所望のPCRサイクルに対しマイクロチャネル103内で温度サイクルを実行するように、加熱器108または冷却器109に送られる。温度コントローラ111は、主制御および処理コンピュータ105の制御下にあり、試験液がマイクロチャネル103を通過するときに、所望の数のPCRサイクルが実行されるように温度サイクリングが行われる。異なる試験液における異なるPCR反応は、マイクロチャネル103内の連続流により、マイクロチャネル103内で次々に逐次的に進行する。

【0040】

一実施形態では、加熱および冷却は、適切な温度の空気を吹き付けることにより実行さ

10

20

30

40

50

れうる。他の実施形態では、加熱および冷却は、水または流体槽を循環させることにより実行されうる。追加の実施形態では、加熱および冷却は、当技術分野者によく知られているペルチェ効果素子により実行されうる。電流が横切る、異種金属の接合点により、小さな表面を冷却または加熱することが可能である。ペルチェ素子の温度プローブにより、電気強度に比例して、電力を調節することが可能であり、それにより温度を調節することが可能である。さらに他の実施形態では、金属ブロックが、熱移動要素として使用され、金属ブロックと接触する熱伝冷却器を備える。この金属ブロックは、例えば、アルミニウムなどの、適切な熱移動特性を有する金属（または金属合金）から作ることができる。金属ブロックからの光の後方散乱を低減するために、好ましくは黒色に塗装されるか、または陽極酸化処理される。PCRサイクルに対する温度は、この熱移動ユニットの適当な時間間隔で平衡しうる。例えば、PCRサイクルに対する温度は、約1～2秒またはさらにはそれ以上の速さで平衡しうる。

10

【0041】

一実施形態では、温度制御システム107は、マイクロチャネル103の定められている部分全体、つまりPCRサイクルが実行されるマイクロチャネル103のその部分で温度サイクリングを行う。マイクロチャネル103のこの定められた部分は、反応帯とも呼ばれる。そこで、この実施形態では、温度サイクリングを行うために、一定温度帯が使用される。適切にプログラムされたコンピュータが、熱移動要素の温度サイクリングを制御する。この実施形態によれば、温度変化が時間によるPCRプロファイルに従うように流路の長さ分（反応帯）に加熱と冷却が行われる。試験ボーラスは、反応帯の上流端から下流端にボーラスが流れるとときに必要なPCRサイクル数が達成されるような流量（流速）でこの反応帯にポンプで通される。

20

【0042】

第2の実施形態では、温度制御システム107は、空間温度帯をマイクロチャネル103に沿って施し、ポリメラーゼ連鎖反応を行わせる。一態様では、マイクロチャネル103のいくつかの部分またはマイクロ流体デバイスのマイクロチャネルに沿った熱移動要素を使用して温度サイクリングが行われる。他の態様では、熱移動要素は、マイクロチャネル103のいくつかの部分において温度サイクリングを行う。適切にプログラムされたコンピュータが、熱移動要素の温度サイクリングを制御する。この実施形態によれば、PCR温度プロファイルに従うように流路の一部に加熱と冷却が施される。試験ボーラスは、反応帯の上流端から下流端にボーラスが流れるとときに必要なPCRサイクル数が達成されるような流量（流速）でこの反応帯にポンプで通される。

30

【0043】

本発明の一実施形態には、増幅産物を検出し、マイクロチャネル103内の試験液の流量を監視する光学的撮像システム112が含まれる。一実施形態では、光学的撮像システム112は、好ましくは1つまたは複数の励起源113、1つまたは複数の光学系／フィルタ114、および1つまたは複数の検出器115を備える蛍光撮像システムである。一実施形態では、励起源113で所望の波長の光を発生し、リアルタイムPCRにおいて増幅産物を検出するために使用される標識を励起し、および／またはマイクロチャネル103内の試験液の流量を監視するために存在しうるマーカーを検出する。光学系／フィルタ114は、光線を形成し、かつ／または光を励起源113からマイクロチャネル103上の適切に位置に導くために使用される。光学系／フィルタ114は、さらに、望ましくない波長の光を除去するか、または到達検出器115からの後方散乱を低減するように光をフィルタリングするために使用される。リアルタイムPCRで使用される標識を励起する所望の波長は、使用される正確な標識および／またはマーカー、例えば、挿入色素、分子ビーコン、量子ドット、またはTaqMan（登録商標）プローブに依存するが、これらの波長は当技術分野者によく知られている。同様に、正確な標識および／またはマーカーの放射波長は、当技術分野者によく知られている。検出器115は、励起された標識および／またはマーカーの放射波長を検出し、放射光の強度を測定する。光学的撮像システム112は、好ましくは、マイクロ流体デバイス内の複数のマイクロチャネルを区別すること

40

50

ができる。

【0044】

光学的撮像システム112は、マイクロチャネル103またはマイクロ流体デバイスのマイクロチャネル内の複数の位置で、例えば、PCRサイクル毎に少なくとも1回などの所望の時間間隔で放射光の強度を測定するように光学的/蛍光撮像システム112に指令する主制御および処理コンピュータ105の制御の下にある。検出器115は、放射光の強度のシグナルまたは画像を生成し、增幅産物の分析および試験液の流量の監視のために、それを主制御および処理コンピュータ105に送る。検出器115は、複数ピクセル・アレイ検出器(CCD検出器など)および/または離散単一ピクセルまたは非撮像検出器を備えることができる。検出器115は、マイクロチャネル103またはマイクロ流体デバイスのマイクロチャネルと一体化されるか、または近位にあるものとしてよい。検出器115は、静止型でもよいが、走査型でもよい。検出器115は、意味のある結果を取得し、マイクロチャネル103内の流体流の監視を行うために適切な解像度を有していなければならぬが、これは特に、流体がマイクロチャネル103内を連続的に移動しているからである。

【0045】

上述のように、リアルタイムPCR混合物は、非特異的蛍光DNA検出分子(挿入色素など)、配列特異的蛍光DNAプローブ(分子ビーコン、TaqMan(登録商標)プローブ、または量子ドット・プローブなど)、またはフロー・マーカー(量子ドットなど)を含んでいてよく、また分散媒は、フロー・マーカーを含むことができる。一実施形態では、光学的撮像システム112は、DNA検出分子またはプローブからの蛍光の強度(つまり、蛍光シグナルの強度)を検出し、かつ/またはマーカーの蛍光を検出すために使用される。マーカーの蛍光は、分散媒から試験液を線引きするために使用することができ、また試験液もしくは分散媒の流速を測定し、監視するためにも使用できる。蛍光シグナルの強度は、増幅産物を検出し、増幅産物の量を測定し、試験液中に存在する元の分子の個数を測定し、またリアルタイムPCRについて当技術分野者によく知られている操作などをを行うために使用されうる。蛍光シグナルの強度は、さらに、試験液の流速を測定し、監視するためにも使用されうる。

【0046】

一実施形態では、蛍光シグナルの強度は、PCR温度サイクルにおいて特定の時刻および/または温度で測定される(例えば、蛍光シグナルが撮像される)。他の実施形態では、蛍光シグナルの強度は、PCRサイクル毎に1回測定される。画像をキャプチャする最適な時間は、使用される化学物質による。例えば、増幅産物を検出するために挿入色素が使用される場合、PCRサイクルの伸長フェーズの終わりに画像がキャプチャされなければならない。増幅産物を検出するためにTaqMan(登録商標)プローブが使用される場合、PCRサイクルの任意の時刻に画像がキャプチャされうる。主制御および処理コンピュータ105は、所望の時刻および温度で撮像するようにプログラムできる。さらに他の実施形態では、蛍光シグナルの強度は、複数の位置で測定される。蛍光シグナルの強度が測定される複数の位置は、マイクロチャネルの異なる部分であってよい。蛍光シグナルの強度が測定される複数の位置は、マイクロチャネルの定められた部分全体(つまり、反応帯)であってよい。他の実施形態では、流路の長さに沿った少なくとも1つの蛍光シグナルの画像が作成される。他の実施形態では、画像キャプチャは、連続的温度サイクリング周期で繰り返し実行される。画像が作成されるか、または蛍光シグナルの強度が複数ピクセル・アレイ検出器(CCDまたはCMOSイメージセンサー)または単一のピクセル検出器を使用して測定されうる。蛍光は、光ファイバー/レンズの組合せなどの大きな視野角を持つ結像光学系および/または小さな視野角を持つ光学系を使用して集光されうる。静止メカニズムまたは走査メカニズムまたはその両方を使用して、画像キャプチャを行える。蛍光シグナルの強度に関するデータは、適切にプログラムされたコンピュータにより処理される。

【0047】

10

20

30

40

50

試験液がマイクロチャネル 103 内を移動し、所望の回数の P C R サイクルを完了した後、試験液は、適宜、ポスト P C R 分析器 116 に送ることができる。ポスト P C R 分析器 116 は、P C R 増幅産物上で使用されうる分析技術を含むことができる。このような技術は、限定はしないが、配列決定法、電気泳動法、プロ・ビング法、溶融曲線分析法などを含む。

【 0 0 4 8 】

本発明によるマイクロチャネル内のリアルタイム P C R に使用されるシステムの例は、図 2、4、および 6 に概略が示されている。図 2 には、複数のマイクロチャネルを含むマイクロ流体デバイス 201 を備えるリアルタイム P C R システム 200 が例示されている。マイクロチャネル内の流体に対し重力の影響があるため、マイクロ流体デバイス 201 は、好ましくは、試験液および分散媒が概ね水平な方向に流れるように配向される。しかし、マイクロ流体デバイス 201 は、分散媒および試験液が、垂直方向を含む他の方向に流れるように配向されうる。熱移動要素は、マイクロ流体デバイス 201 の近位に配置される。光学的撮像システムは、照射レーザー 202 およびマイクロ流体デバイス 201 内のマイクロチャネルに適切な（複数の）励起波長を照射するためのビーム形成レンズ 203 を備える。光学的撮像システムは、さらに、（複数の）放射波長をフィルタリングし、後方散乱を低減するためのフィルタ 204 および複数ピクセル・アレイ検出器 205 を備える。リアルタイム P C R システム 200 は、さらに、適宜レンズ 207 を備えることもできる。このシステムを使用するデータ処理によるセンサー出力画像が図 3 A および 3 B に示されている。図 3 A は、100 nM F A M 蛍光色素で満たされた 8 個の平行なマイクロ流体チャネルの二次元画像を示している。図 3 B は、図 3 A の注目するボックス 301 の領域のプロファイル・プロットを示している。

10

20

30

【 0 0 4 9 】

図 4 には、複数のマイクロチャネルを含むマイクロ流体デバイス 401 を備えるリアルタイム P C R 用のシステム 400 が例示されている。熱移動要素（図に示されていない）は、マイクロ流体デバイス 401 の近位に配置される。光学的撮像システムは、照射レーザー 402 およびマイクロ流体デバイス 401 内のマイクロチャネルに適切な（複数の）励起波長を照射するためのビーム形成レンズ 404 を備える。光学的撮像システムは、さらに、（複数の）放射波長をフィルタリングし、後方散乱を低減するためのフィルタ 405 および C C D 検出器 406 を備える。リアルタイム P C R システム 400 は、さらに、適宜レンズ 403 を備えることもできる。このシステムを使用した 512 ピクセル直線 C C D アレイ・センサーからのセンサー出力データが、図 5 に示されている。このセンサー出力データを示すために、マイクロチャネルは、100 nM F A M 蛍光色素で満たされる。ピークは、マイクロチャネルからの蛍光のあることを示している。この実施形態では、レーザー光線および検出器の視野角は、マイクロチャネルの長さに関して走査され、これにより、蛍光を流路に沿った位置の関数として測定する。

【 0 0 5 0 】

複数の蛍光体から多色感知を行うことができるマイクロ流体デバイス内のリアルタイム P C R に有用なシステムは、図 6 に例示されている。この実施形態では、リアルタイム P C R システム 600 は、好ましくは複数のマイクロチャネル、およびマイクロ流体デバイス 602 の近位に配置されている熱素子（図に示されていない）を備えるマイクロ流体デバイス 602 を備える。この実施形態は、さらに、多色励起光をマイクロ流体デバイス 602 内の流路に送るための、例えば、赤色と青色の光などの複数波長の光を放射することができる光源 608 を備える。この実施形態の一態様では、光源 608 は、異なる波長の光を放射する複数の L E D を備える。リアルタイム P C R システム 600 は、さらに、励起フィルタ 607、および複数の励起波長の光（赤色光および青色光など）を通す二重帯域通過干渉フィルタ 605 を備える。システム 600 は、さらに、例えば、増幅産物中の蛍光体およびフロー・マーカー中の異なる蛍光体から放射光を集光し、検出器 604 に向けて送るためのレンズ 601 も備える。一実施形態では、励起光を遮蔽し、蛍光体からの蛍光を通す放射フィルタ 606 も備えられる。検出器 604 は、例えば、C M O S イメー

40

50

ジセンサーなどの多色感知を行える複数ピクセル・アレイとすることができる。

【0051】

好ましい一実施形態では、システム600は、さらに、多色の同時撮像を可能にする検出器604上にRGB色を配列するカラー・フィルタ・アレイ610を備える。カラー・フィルタ・アレイ610は、例えば、ベイヤー・フィルタとすることが可能である。本発明の多色システムでは、多色の同時撮像が可能であり、これにより、例えば、異なる蛍光体を使用してDNAおよびフロー・マーカーの検出を行える。

【0052】

本明細書で説明されているシステムは、マイクロチャネル内でリアルタイムPCRを実行する方法、およびマイクロチャネル内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法に特に適合される。本発明による方法の一実施形態では、試験液のボーラスが連続的にマイクロチャネル内に移動される。試験液は、上述のようなリアルタイムPCR試薬を含む。分散媒は、マイクロチャネル内で連続的に移動される。分散媒は、試験ボーラスと逐次交互に移動する。PCRを達成するためにマイクロチャネルの定められた部分において温度サイクリングが行われる。蛍光シグナルの強度は、マイクロチャネルの定められた部分に沿った複数の位置で測定される。そこで、この実施形態によれば、リアルタイムPCRを実行する方法は、a)流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを連続的に移動させる工程と、b)流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c)PCRを達成するために流路の定められた部分において温度サイクリングを行う工程と、d)流路の定められた部分に沿った複数の場所で蛍光シグナルの強度を測定する工程とを含む。

10

20

30

40

【0053】

一実施形態では、流路の定められた部分に沿った熱移動要素を使用して温度サイクリングが行われる。他の実施形態では、熱移動要素は、流路の定められた部分全体において温度サイクリングを行う。つまり、温度サイクリングを行うために、一定温度帯が使用される。他の実施形態では、適切にプログラムされたコンピュータが、熱移動要素の温度サイクリングを制御する。一実施形態では、熱移動要素の温度が検出され、コンピュータにフィードバックされる。これらの実施形態によれば、温度変化が時間によるPCRプロファイルに従うように流路の長さ分(反応帯)に加熱と冷却が行われる。試験ボーラスは、反応帯の上流端から下流端にボーラスが流れるときに必要なPCRサイクル数が達成されるような流量(流速)でこの反応帯にポンプで通される。

【0054】

他の実施形態では、蛍光シグナルの強度は、PCR温度サイクルにおいて特定の時刻および/または温度で測定される。追加の実施形態では、蛍光シグナルの強度は、PCRサイクル毎に1回測定される。他の実施形態では、蛍光シグナルの強度が測定される複数の配置が、流路の定められた部分全体である。他の実施形態では、蛍光シグナルの強度に関するデータは、適切にプログラムされたコンピュータにより処理される。他の実施形態では、流路の長さに沿った少なくとも1つの蛍光シグナルの画像が作成される。他の実施形態では、画像キャプチャは、連続的温度サイクリング周期で繰り返し実行される。画像が作成されるか、または蛍光シグナルの強度が複数ピクセル・アレイ検出器を使用して測定されうる。静止メカニズムまたは走査メカニズムまたはその両方を使用して、画像キャプチャを行える。

【0055】

本発明による方法の第2の実施形態では、リアルタイムPCRの実行は、マイクロチャネル内の流体の流量(流速)を監視することを含む。液体は、試験液または分散媒としてよい。流路内の流量を監視することにより、時間により変化する試験ボーラスの配置が測定され、これにより、試験ボーラスで生じたPCRサイクルの数を識別することができる。そこで、この実施形態によれば、リアルタイムPCRを実行する方法は、a)流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを連続的に移動させる工程と、b)流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c)PCRを達成するた

50

めに流路の定められた部分において温度サイクリングを行う工程と、d) 流路の定められた部分に沿った複数の場所で蛍光シグナルの強度を測定する工程と、e) 流路内の流体の平均流量を測定する工程とを含む。

【0056】

一実施形態では、流体の平均流速は、流路からの反応依存蛍光シグナルの連続画像を比較することにより測定される。第2の実施形態では、流体の平均流速は、流路内のマーカー(つまり、反応独立マーカー)の連続画像を比較することにより測定される。マーカーの使用には、リアルタイムPCRシグナルが検出可能でない場合でも、流量はそのまま検出可能であるという利点がある。潜在的マーカーの例は、色素、半導体量子ドット、ポリマー・マイクロビーズ、散乱金属粒子、超微粒気泡、および当技術分野者に知られているようなものである。一実施形態では、マーカーは、試験液中に存在する。マーカーが試験液中に存在する場合、これは、PCR化学反応に悪影響を及ぼすことがあってはならない。他の実施形態では、マーカーは、分散媒中に存在する。さらに他の実施形態では、マーカーは、試験ボーラスと直列に並ぶ別のボーラスである。追加の実施形態では、マーカーは、励起波長、発光スペクトル、寿命、および当技術分野でよく知られているようなものなどにより、蛍光シグナルから分離し検出することが可能である。さらに他の実施形態では、蛍光シグナルの強度またはマーカーの連続画像に関するデータは、適切にプログラムされたコンピュータにより処理される。これらの実施形態により、平均流速は、連続するPCRサイクルから取った画像を比較することにより決定される。さらに他の実施形態では、流量は、反応帯入口検出器および流速計を使用して測定されうる。流速は、例えば、流路の寸法を知り、体積流量を測定することにより推定されうる。

10

20

30

40

【0057】

本発明による方法の第3の実施形態では、リアルタイムPCRの実行は、マイクロチャネル内の流体の流量(流速)を監視することと、必要に応じて流量を調節して試験液が受けるPCRサイクリングの持続時間を制御することとを含む。そこで、この実施形態によれば、リアルタイムPCRを実行する方法は、a) 流路内のリアルタイムPCR試薬を含む試験液のボーラスを連続的に移動させる工程と、b) 流路内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c) PCRを達成するために流路の定められた部分において温度サイクリングを行う工程と、d) 流路の定められた部分に沿った複数の場所で蛍光シグナルの強度を測定する工程と、e) 流路内の流体の平均流速を測定する工程と、f) 流体の流量を調節してPCRサイクリングの持続時間を制御する工程とを含む。

【0058】

一実施形態では、流量は、試験液が流路の定められた部分を通っている間に所望のPCRサイクル数が完了するように監視および調節される。つまり、流量は、PCRサイクリングの持続時間を決定するように調節される。他の実施形態では、この監視および調節は、主制御および処理コンピュータ105などの適宜プログラムされたコンピュータにより実行される。さらに他の実施形態では、流量は、流路の投入端の圧力を調節することにより調節される。追加の実施形態では、流量は、流路の産出端の圧力調節真空を調節することにより調節される。他の実施形態では、流量は、シリンジ・ポンプなどのポンプを調節することにより調節される。一実施形態では、流量は、試験液がマイクロチャネルの反応帯内を移動するときに所望の回数のPCRサイクルが実行されるように監視および調節される。例えば、マイクロチャネルの反応帯が30mmであり、30回のPCRサイクルを実行することが望ましい場合、1mm/サイクルの流量が達成され維持されるように流量が監視される。それぞれのPCRサイクルの長さは、30から60秒のオーダーであるため、マイクロチャネル内の流速は、この例ではかなり低速である。

【0059】

図7は、本発明の一実施形態により流体が流路内を移動するときに流体の流速を調節するための動作モードを例示するプロセス図である。この実施形態では、流速を調節するために、閉ループ・フィードバックが使用される。第1に、流路内の流体は、ポンプ圧設定点で、例えば、ポンプ・メカニズム106などの調節済み圧力ポンプを作動させることに

50

より移動される。流体が流路内を移動すると、P C R 温度プロファイルが、流路の定められた部分に対し実行される。P C R 温度サイクルにおける適切な時刻に、システムは、流路の内容物の1つまたは複数の画像を取り込む。これらの画像データおよび取り込み時刻は、後で分析できるように、例えば、主制御および処理コンピュータ105などのデータベースに格納される。2つの連続画像が得られない場合、温度サイクリングおよび画像取り込みが、圧力設定点を変えることなく繰り返される。2つの連続画像が得られる場合、これらの画像は、比較され、これにより、流体が流路に沿ってどれだけ遠くまで移動したかを決定することができる。平均変位を経過した時間で割ると、平均流速が求められる。測定された流速と所望の流速との間に差がある場合、ポンプ圧設定点は、所望の流速が得られるように自動的に調節され、プロセスが繰り返される。測定された流速と所望の流速との間に差がない場合、ポンプ圧設定点は同じままであり、プロセスが繰り返される。

10

【0060】

上述のシステムは、マイクロチャネル内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法に特に適合される。一実施形態によれば、マイクロチャネル内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法は、a)マイクロチャネル内のリアルタイムP C R試薬を含む試験液のボーラスを移動させる工程と、b)前記マイクロチャネル内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c)P C Rを達成するためにマイクロチャネルの定められた部分において温度サイクリングを行う工程と、d)マイクロチャネルの一部分に沿って反応依存蛍光シグナルの画像をキャプチャする工程と、e)マイクロチャネル内の平均流量を測定する工程と、f)試験ボーラスの位置を平均流量から試験ボーラスが受ける温度サイクルの数に関係付ける工程とを含む。

20

【0061】

一実施形態では、平均流量は、流路からの反応依存蛍光シグナルの連続画像を比較することにより測定される。第2の実施形態では、平均流量は、流路からの反応独立フロー・マーカーの連続画像を比較することにより測定される。反応独立フロー・マーカーは、(i)試験ボーラス内で予混合されるか、(ii)試験ボーラスと交互にボーラスとして流路に導入されるか、または(iii)分散媒内で予混合されうる。他の実施形態では、反応独立フロー・マーカーからの散乱光は、波長スペクトルにより反応依存蛍光から分離され検出されうる。代替実施形態では、反応独立フロー・マーカーからの散乱光は、蛍光寿命に基づき反応依存蛍光から分離され検出されうる。他の実施形態では、反応独立フロー・マーカーは、さらに、試験ボーラスの流れ分散を決定するために使用される。さらに他の実施形態では、反応依存蛍光の画像は、少なくともP C Rサイクル毎に1回キャプチャされる。一実施形態では、反応依存蛍光の画像は、1回分のP C Rサイクルの持続時間よりも短い時間スケールで流路の長さにわたって走査することにより逐次的にキャプチャされる。代替実施形態では、反応依存蛍光の画像は、流路に沿って複数の地点からシグナルを同時に取得することによりキャプチャされる。他の実施形態では、流量測定は、流量を調節するためのフィードバック・ループの一部である。さらに他の実施形態では、流量は、流路の定められた部分における試料ボーラスの出入りを検出することで測定される。

30

【0062】

他の実施形態によれば、マイクロチャネル内のポリメラーゼ連鎖反応の進行状況を監視する方法は、a)マイクロチャネル内のリアルタイムP C R試薬を含む試験液のボーラスを移動させる工程と、b)同じマイクロチャネル内の分散媒を、順次試験ボーラスと交互に、移動させる工程と、c)マイクロチャネルに沿って空間温度帯を施してP C Rを達成する工程と、d)P C Rサイクルにおいて固定点に対応するマイクロチャネルに沿った固定空間位置で蛍光シグナルを監視する工程と、e)マイクロチャネル内の流体の平均流量を測定する工程と、f)流量を調節してP C Rサイクルのタイミングを制御する工程とを含む。

40

【0063】

一実施形態では、流路のいくつかの部分に沿った熱移動要素を使用して温度サイクリングが行われる。他の実施形態では、熱移動要素は、流路のいくつかの部分において温度サ

50

イクリングを行う。他の実施形態では、図1に例示されている主制御および処理コンピュータなどの、適切にプログラムされたコンピュータが、熱移動要素の温度サイクリングを制御する。一実施形態では、熱移動要素の温度が検出され、コンピュータにフィードバックされる。これらの実施形態によれば、PCR温度プロファイルに従うように流路の一部に加熱と冷却が施される。試験ボーラスは、反応帯の上流端から下流端にボーラスが流れるときに必要なPCRサイクル数が達成されるような流量(流速)でこの反応帯にポンプで通される。本発明のこの態様における流路内の流量を監視することにより、PCRサイクル周期の持続時間が決定されうる。

【0064】

一実施形態では、本発明は、さらに、上述した方法を実施するように適合されたシステムおよび/またはキットを提供する。上で例示されているように、これらのシステムおよび/またはキットは、本明細書の方法工程を実施するためのシステム・インストラクション(例えば、コンピュータ内に、またはコンピュータ可読媒体内に、例えば、システム・ソフトウェアとして、具現化される)を備えることができる。試料を保存し、移動させ、アリコートを取り、または希釈するための流体操作要素、例えば、マイクロ流体操作要素、および検出器要素も、本明細書のシステムおよびキットのコンポーネントとすることができます。それに加えて、梱包材料、一体化要素(例えば、計測器ケース、電源など)、システムおよびキットを使用するためのインストラクションなども、本発明の特徴であるとしてよい。

【0065】

一実施形態では、本発明は、1つまたは複数の試験液の温度サイクリングを行うようにそれぞれ構成されている1つまたは複数の増幅流路(マイクロチャネル)を備えるマイクロ流体デバイスを具備するシステムを提供する。(複数の)流路の定められた部分に沿って温度サイクリングを行うための熱移動要素も、含まれる。熱移動要素は、マイクロ流体デバイスと一緒にであるか、または近位にある。マイクロ流体デバイスと一緒にであるか、または近位にある照明源も含まれ、この照明源は、(複数の)流路を照射するように構成されている。マイクロ流体デバイスと一緒にであるか、または近位にある検出器も含まれ、この検出器は、(複数の)流路内の増幅産物および/またはマーカーを検出するように構成されている。一実施形態では、検出器は、異なるシグナルを有する2つ以上の検出可能なマーカーから独立にシグナルを検出することができ、例えば、図6に例示されているシステムなどの、2つ以上の周波数の蛍光または他の放射を同時に検出できる検出器がそうである。システムは、(複数の)流路内の連続的に移動する試験液および分散媒の流量を制御するための1つまたは複数の要素とともに、流量を監視、制御してそれぞれのPCRサイクルのタイミングを制御するためのシステム・インストラクションまたはソフトウェアを含む。典型的には、システムは、熱移動要素の温度を検出し、温度サイクルを制御するためのフィードバック情報を供給するセンサーを備える。典型的には、このシステムは、さらに、増幅産物および/またはマーカーの検出のタイミングなどのデータを生成し、処理し、(複数の)流路内の試験液の配置を監視するためのシステム・ソフトウェアを備える。

【0066】

一実施形態では、システムは、さらに、試料を複数の試験液に分けて希釈する希釈モジュールとともに、希釈モジュールが試料のアリコートを複数の試験液に分ける仕方を説明するシステム・インストラクションも備えることができる。希釈モジュールは、マイクロ流体デバイスと一緒にであるか、または近位にあるものとしてよい。

【0067】

一実施形態では、システムは、適宜、本明細書で説明されている方法工程のどれかを実行するためのインストラクション付きのソフトウェアを備える。例えば、システムは、温度サイクリングを受ける試験液の1つまたは複数から送られてくるシグナルに対し1つまたは複数の統計的または確率論的解析を実行する統計的または確率論的システム・ソフトウェアを備えることができる。例えば、統計的または確率論的解析は、ポアソン解析、モ

10

20

30

40

50

ンテカルロ解析、遺伝的アルゴリズムの応用、ニューラル・ネットワーク学習、マルコフ・モデリング、隠れマルコフ・モデリング、多次元的尺度構成法、部分的最小二乗PLS分析、および／または主成分分析PCAを含むことができる。統計的または確率論的解析は、適宜、試料中の注目する核酸の濃度、割合、または個数を定量的に決定することを含む。これらの統計的評価法は、診断または予後診断に関連する存在量または割合と診断または予後診断との相関性を求めるために使用できる。

【0068】

一実施形態では、システムはさらに、適宜、希釈モジュールにより希釈されるまで試料を保存しておく試料保存モジュール、試料保存モジュールから試料を取り出し、希釈モジュールに送出する試料取り出しモジュールなどの流体操作または保存機能の特徴を備えることができる。これらの特徴は、適宜、流体の連續流（例えば、試料を含む）をシステムに通すように設計されている（これにより、試料処理効率が高まる）。システムは、さらに、増幅産物を分析するための手段およびシステム・ソフトウェアも備えることができる。一実施形態では、システムは、検出器により検出されるような増幅産物により占有される再現可能なシグナル形状、長さ、幅、体積、または面積と（a）試験液の1つに存在する注目する核酸のコピーの個数、または試料中に存在する注目する核酸のコピーの個数、もしくはその両方または（b）試料中に存在する（複数の）増幅産物の同定または（c）当技術分野で知られ、使用されている他の分析パラメータとの相関性を求めるシステム・ソフトウェアを備えることができる。

10

【0069】

本発明の方法で増幅され、検出されうる注目する核酸は、本質的にどのような核酸であってもよい。多数の核酸およびアミノ酸の配列（逆翻訳により核酸配列を導出できる）が利用可能である。10万もの知られている核酸を同定する試みはなされておらず、本発明の方法でそのどれをも検出できる。知られている核酸に対する共通配列リポジトリとしては、GenBank EMBL、DDBJ、およびNCB Iがある。他のリポジトリは、インターネットを検索することにより容易に見つけられる。核酸は、RNA（例えば、増幅はRT-PCRを含む）またはDNA（例えば、増幅はPCRを含む）、またはその類似体（例えば、合成核酸またはその類似体の検出用）とすることができる。核酸の変異、例えば、突然変異、单一对クレオチド多型SNP、対立遺伝子、アイソタイプ、フラグメント、全長核酸、単位複製配列などが検出されうる。さらに、本発明は、定量的であるため、これらの方法により発現量、フラグメンテーション、または遺伝子コピー数の変異を検出することができる。

20

30

【0070】

一般に、本発明の方法は、注目する核酸について患者から、例えば、患者の体液および／または排泄物から抽出された試料をスクリーニングする際に特に有用である。これは、比較的大量のそのような物質から抽出された試料を本発明の方法でスクリーニングできるからである（このような物質の除去は、比較的非侵襲的でもある）。注目する核酸（例えば、癌細胞中に存在する）は、試料の関係する核酸集団の1%以下（例えば、注目する遺伝子の対立遺伝子の約1%、0.1%、0.001%、0.0001%以下）を容易に含むことができる。したがって、全血、血清、血漿、排泄物、尿、膣分泌物、射精液、滑液、バイオプシー、脳脊髄液、および羊水、痰、唾液、リンパ液、涙液、汗、または尿などは、本発明の方法により希な核酸またはフラグメンテーションについて容易にスクリーニングすることができるが、本質的に注目するどのような組織についてもいえる。これらの試料は、典型的には、インフォームド・コンセントに従って、標準的医療検査室手法により患者から採取される。

40

【0071】

増幅に先立って、核酸は、利用可能な方法、例えば、BergererおよびKimmell（「Methods in Enzymology 152」、Academic Press, Inc.（カリфорニア州サンディエゴ所在）、1987年）、SambrookおよびRussell「Molecular Cloning、第3版」（Cold

50

Spring Harbor Laboratory Press(ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー所在)、2001年)、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons、2005年まで更新)において教示されている方法により、適宜試料から精製される。さらに、細胞または他の試料から核酸を精製するためのキットは多数市販されている(例えば、両方ともPharmacia Biotech社のEasy Prep(商標)、Flexi Prep(商標)、Stratagene社のStrataClean(商標)、およびQiagen社のQIAprep(商標)を参照のこと)。それとは別に、例えば、アリコートを取り希釈した後に、単純に、試料に対し増幅操作を直接行うこともできる。単一分子検出の利点の1つは、反応における試料成分が低濃度であるため核酸精製の必要性が減じる点である。つまり、試料を希釈することで、注目する核酸を反応混合物中に分配するのと同時に不要な成分の存在量を減らせる。

10

【0072】

本明細書の方法で検出される注目する核酸のクラスの1つは、癌に伴うものである。癌に関連する核酸は、本発明の方法、例えば、過剰発現または突然変異したポリペプチド増殖因子(例えば、sis)、過剰発現または突然変異した増殖因子受容体(例えば、erb-B1)、過剰発現または突然変異した、Gタンパク質などのシグナル変換タンパク質(例えば、Ras)、または非受容体型チロシン・キナーゼ(例えば、abl)、または過剰発現または突然変異した調節タンパク質(例えば、myc、myb、jun、fosなど)、および/または類似物をエンコードする方法で検出されうる。好ましい一実施形態では、注目する特定の、または任意の核酸がフラグメンテーションの量に関してスクリーニングされ、高いフラグメンテーションは一般に正常細胞のアポトーシスに関連し、低いフラグメンテーションは、例えば、癌細胞の腐肉形成に関連する。一般に、癌は、シグナル変換分子および対応する癌遺伝子産物、例えば、Mos、Ras、Raf、およびMetをエンコードする核酸、ならびに転写活性化因子および抑制因子、例えば、p53、Tat、Fos、Myc、Jun、Myb、Rel、および/または核内受容体に結合することが多い。俗に細胞の「分子警官」と呼ばれるp53は、特に関連性があり、知られているすべての癌の約50%は、p53における1つまたは複数の遺伝子病変に帰着できる。

20

【0073】

30

癌に関連のある遺伝子のクラスの1つは、核ホルモン受容体のクラスであり、詳しく記述されており、また、発癌活性をもたらすようにこれらの受容体を修飾する機序が解決されている。例えば、甲状腺ホルモン作用の生理学的および分子的機序は、Yen(「Physiological Reviews」81:1097~1142頁、2001年)とそこに引用されている参考文献において検討されている。知られており、適切に特徴付けられている核内受容体は、グルココルチコイド(GR)、アンドロゲン(AR)、電解質コルチコイド(MR)、プロゲスチン(PR)、エストロゲン(ER)、甲状腺ホルモン(TR)、ビタミンD(VDR)、レチノイド(RARおよびRXR)、およびエイコサノイドを結合するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体PPARに対するものを含む。いわゆる「オーファン核受容体」は、核内受容体スーパーファミリーの一部でもあり、ステロイド受容体および甲状腺受容体などの古典的核内受容体と構造的に相同である。これらの受容体をエンコードする核酸、またはその発癌形態は、本発明の方法で検出されうる。現在利用可能なすべての薬品治療の約40%は、核内受容体および/またはその発癌形態のアゴニストまたはアンタゴニストであり、分析の対象としてこれらの受容体(およびそのコードする核酸)の相対的重要性を強調する形になっている。

40

【0074】

50

癌に関連する注目する核酸のクラスの1つは、例えば、排泄物から抽出された試料中の結腸癌の診断に用いられるものである。結腸癌は、散発性または遺伝性であるよく見られる疾病である。結腸癌のさまざまなパターンの分子的機序は、ある程度詳しく知られている。一般に、胚性突然変異は、遺伝性結腸癌症候群に由来するが、体細胞変異の蓄積は、

散発性結腸癌に由来する。アシュケナージ系ユダヤ人の間では、以前には多型として考えられていた突然変異が、家族性結腸癌の原因となりうる。遺伝子の少なくとも3つの異なるクラスの突然変異、つまり癌遺伝子、サブレッサ遺伝子、およびミスマッチ修復遺伝子が、結腸癌疫学において説明されている。例示的な1つの核酸は、DCC (delet ed in colon cancer)、つまりフィプロネクチンとの相同性を有する細胞接着分子をエンコードする。結腸癌の追加の形態は、常染色体優性遺伝子、つまり病変を含むhMSH2である。家族性大腸腺腫症は、染色体#5のMCC遺伝子座に病変を有する結腸癌の他の形態である。結腸癌の詳細については、Calvertら(「Annals of Internal Medicine」137:603~612頁、2002年)および引用されている参考文献を参照のこと。排泄物中に検出されるさまざまな結腸癌および結腸癌マーカーに関しては、例えば、Boland(「Reviews In Gastroenterological Disorders」2 Supp. 1:S12~S19頁、2002年)および引用されている参考文献を参照のこと。他の癌と同様に、Rasおよびp53などの癌との相関性を有するさまざまな他の遺伝子の突然変異は、癌の有用な診断指標である。他の様態では、本発明の方法を使用するフラグメンテーション・レベルの検出は、結腸癌の検出において特に役立つ。例えば、便試料から取り出せる患者全DNAの量は少ないので、本発明の増幅の様態は、DNAを調べる上で有益であると考えられる。正常な結腸のライニングから腐肉形成された細胞から得たDNAは、一般的に、例えば、長さが約100塩基対の複数のフラグメントに分解されるが、結腸腫瘍細胞から結腸内腔に入れるDNAは、一般的にはフラグメント化されないままとしてよい。便試料中の特定の閾値を超える一部のフラグメント化されていない核酸の存在を検出することは、結腸癌の存在に相關しうる。

10

20

30

40

50

【0075】

子宮頸癌は、例えば、膣分泌物から得られる試料中のもう1つの検出対象である。子宮頸癌は、ヒト乳頭腫ウイルスにより引き起こされることがあり、また2つの癌遺伝子E6およびE7を有する。E6は、p53に結合し、p53を取り除き、E7は、PRBと結合し、PRBを取り除く。p53の消失とE2F/DP増殖因子の制御されない作用は、pRBの調節なしで、子宮頸癌を引き越す機序の1つである。さらに、結腸癌と同様に、膣スワップ中の特定の閾値を超える一部のフラグメント化されていない核酸の存在を検出することは、子宮頸癌の存在に相關しうる。

【0076】

本発明の方法による検出の他の対象は、例えば、涙液から抽出された試料中の網膜芽細胞腫、および例えば、CSF中の、または組織標本採取により得られた神経線維腫症1型を含む。他の多くの癌形態が知られており、本発明の方法を使用して、例えば、関連する遺伝子病変、フラグメンテーションの割合、または注目している全長核酸の絶対濃度を検出することにより見つけることができる。該当する病変またはフラグメンテーション値を検出することにより検出される癌は、リンパ、血液、胃、腸、結腸、睾丸、脾臓、膀胱、頸部、子宮、皮膚、および関連する遺伝子病変またはフラグメンテーション閾値が存在する本質的に他のすべてのものの癌を含む。この話題については、「The Molecular Basis of Human Cancer」、ColemanおよびTsongalis(編集)、Humana Press(ニュージャージー州トトワ所在)、2001年を参照のこと。

【0077】

同様に、病原体または感染性微生物からの核酸は、例えば、伝染性真菌、例えば、アスペルギルス属またはカンジダ種、細菌、特に病原菌(およびもちろん、病原性であるその特定の菌株)のモデルの役目を果たす大腸菌、さらにはブドウ球菌(例えば、黄色ブドウ球菌)、または連鎖球菌(例えば、肺炎球菌)などの医学上重要な細菌、胞子虫類(例えば、マラリア原虫)、根足虫(例えば、エントアメーバ属)および鞭毛虫(トリパノソーマ属、リーシュマニア属、トリコモナス属、ジアルジア属など)などの原虫、(+)RNAウイルス(例として、ポックスウイルス、例えば、ワクチニア・ウイルス、ピコルナウ

イルス、例えば、ポリオ、トガウイルス、例えば、風疹、ラビウイルス属、例えば、HCV、およびコロナウイルス)、(-)RNAウイルス(例えば、ラブドウイルス、例えば、VSV、パラミクソウイルス、例えば、RSV、オルトミクソウイルス、例えば、インフルエンザ、ブンヤウイルス属、およびアレナウイルス属)、dsDNAウイルス(例えば、レオウイルス属)、RNAからDNAへのウイルス、つまり、レトロウイルス、例えば、HIVおよびHTLV、ならびにB型肝炎などの特定のDNAからRNAへのウイルスなどのウイルスについて、本発明の方法により検出可能である。本発明の単一および低コピー増幅の方法は、多くの場合、例えば、生(全長核酸を有する)と死、さらに溶解された病原体(フラグメント化された核酸を有する)を識別するために細菌感染からの浸出液中で使用することができる。

10

【0078】

アミダーゼ、アミノ酸ラセマーゼ、アシラーゼ、デハロゲナーゼ、ジオキシゲナーゼ、ジアリールプロパンペルオキシダーゼ、エピメラーゼ、エポキシドヒドロラーゼ、エステラーゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、グルコース・イソメラーゼ、グリコシダーゼ、グリコシル・トランスフェラーゼ、ハロペルオキシダーゼ、モノオキシゲナーゼ(例えば、p450s)、リパーゼ、リグニン・ペルオキシダーゼ、ニトリル・ヒドラターゼ、ニトリラーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、スブチリシン、アミノ基転移酵素、およびヌクレアーゼなどの酵素(例えば、工業用酵素)をエンコードするさまざまな核酸も、本明細書の方法により検出されうる。同様に、虫害抵抗性タンパク質(例えば、Cryタンパク質)などの農業関係のタンパク質、デンプン、および脂質産生酵素、植物および昆虫毒、毒素抵抗性タンパク質、マイコトキシン解毒タンパク質、植物成長酵素(例えば、リブロース1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ)、リポキシゲナーゼ(LOX)、およびホスホエノールピルビン酸塩(PEP)カルボキシラーゼも、検出されうる。

20

【0079】

標準もしくはマイクロ流体の流体操作アプローチ(またはその組合せ)を使用して、試料のアリコートを取り、かつ/または試料希釈できる。希釈/アリコート分配を行う標準的な流体操作アプローチは、例えば、ピペットで試料から適切な量を取りマイクロタイター・トレイ内に入れ、適切な希釈液を加えることを含む。これらの操作は、手作業で、または例えば、マイクロタイター・トレイ内の希釈液を連続的に使用するように設計されている操作装置などの利用可能な高生産性流体操作装置を使用して実行されうる。高生産性機器(例えば、自動ピベッターおよびロボット・マイクロタイター・トレイ操作機能を組み込んでいる)が好ましいが、それは、本発明では、注目する試料のアリコートを何回も作り、使用することを考えているからである。

30

【0080】

流体操作のための多数の自動化システムが、市販されており、本発明の文脈において試料のアリコートを取り、かつ/または試料を希釈するのに使用できる。例えば、さまざまな自動化システムが、Zymark Corporation社(現在は、Caliper Life Sciences社(マサチューセッツ州ホプキンソン所在)から販売されており、典型的には、例えば、ロボットおよび流体操作モジュールを備える。同様に、例えば、マイクロタイター・トレイ操作のためにさまざまな実験室システムで使用される、ふつうのORCA(登録商標)ロボットも、例えば、Beckman Coulter, Inc.社(カリフォルニア州フラートン)から市販されている。いずれの場合も、従来の高生産性システムは、本発明の方法を実施する際に、マイクロ流体システム(例えば、従来のシステムは、試料のアリコートを取ってマイクロタイター・トレイ内に入れるために使用することができ、そこからマイクロ流体システムは物質を引き出すことができる)の代わりに、またはそれと併せて使用できる。

40

【0081】

マイクロ流体システムは、本発明に都合よく応用できる好ましい流体操作および増幅技術を備える。上述のような典型的な実施形態では、マイクロスケールのキャビティ(少なくとも1つの次元が約500μM未満であり、多くの場合約100μM未満である流路、

50

チャンバなど)のネットワークを含むマイクロ流体デバイス内に試料が引き込まれ、キャビティ(例えば、流路および/またはチャンバ)のネットワーク内で試料が混合され、希釈され、アリコートが取られ、あるいは他の何らかの方法で操作される。例えば、マイクロスケール・デバイスは、マイクロスケール・デバイスの本体構造から外に向かって延びる、ネットワークと流体で連絡する、1つまたは複数の毛管を備えることができる。一実施形態では、陰圧(真空)が毛管に加えられ、流体が容器(例えば、マイクロタイター・トレイ上のウェル)からネットワーク内に引き込まれる。このプロセスは、複数の毛管流路を備えるデバイスを使用することにより多重化され、これにより、多数の試料をネットワーク内に引き込み、同時に処理することができる。それとは別に、複数の試料が、マイクロ流体デバイス内に逐次引き込まれ、同時処理および分析のために複数の流路の内部に送り込まれる。また乾燥した試料との試料インターフェースは、この基本システムを使用して、例えば、毛管から流体を部分的に、または完全に追い出して、試料を水和させてから、試料をマイクロ流体デバイス内に引き込むことにより実行されうる(流体は、典型的には毛管先端の懸滴として試料と接触し、次いで毛管内に引き戻される)。いずれかのアプローチについては、さらに、米国特許第6,482,364号、第6,042,709号、第6,287,520号、および第6,235,471号を参照のこと。本質的にどのような流体操作(アリコート分配、希釈、加熱、および冷却)も、利用可能な方法を使用してネットワーク内で実行できる。マイクロスケール・デバイス内の希釈およびアリコート分配操作に関する詳細は、特許文献、例えば、米国特許第6,149,870号、第5,869,004号、および第6,440,722号で説明されている。混合/希釈されるか、アリコート分配される試料および成分は、ピペット要素を通して、またはデバイスそれ自体にある反応成分貯蔵槽から、または一般にその両方で、マイクロスケール・デバイス内に持ち込まれる。例えば、試料は、ピペット流路を通してマイクロ流体デバイス内に入れられ、希釈され、(複数の)デバイス希釈および/または試薬貯蔵槽から通常の試薬を供給されうる。遺伝子座特異試薬(例えば、増幅プライマー対)は、デバイス上のウェル内に入れることができるか、またはデバイスから離して、例えば、マイクロタイター・プレート内に保管されうる(この場合、これらはピペット流路でアクセスできる)。これらの操作のどれか、またはすべてが、連続的または停止流フォーマットで実行されうる。

【0082】

マイクロ流体デバイスは、典型的には、反応アセンブリ(反応混合物のアセンブリ)、温度サイクリング、および撮像(検出)工程における光学系の「キュベット」としての作用を含む、複数の機能を実行する。反応アセンブリでは、加熱が開始する前の最後に組み合わされる反応混合物成分(特に、マグネシウムおよび酵素)のアセンブリが行われる。これは、「ホット・スタート」と呼ばれ、特異性の利点を有する。温度サイクリングでは、システムは、適宜、一定の流体移動と一連の連続的な温度変化の両方をもたらす。撮像時に、高データ転送速度CCD検出器、複数ピクセル・アレイ検出器、または光ファイバー・ボール・ヘッド・レンズ検出器は、例えば、定量化の方法に適したダイナミックレンジをもたらすうえで有用である。

【0083】

本発明を実施する際に使用されうる流体操作のあらゆる側面を実行する市販のシステムが利用可能である。例には、Caliper Life Sciences社(マサチューセッツ州ホプキンソン所在)が市販している250 HTSシステムおよびAIM 90 SEが含まれる。これらのシステムでは、直列の連続的な流れで実験を行い、「チップ・ツー・ワールド」インターフェース、またはシッパーと呼ばれるサンプル・アクセス・システムを使用し、このシッパーを通して、マイクロウェル・プレート内の物質が、チップに取り付けられた1つまたは複数の毛管に少しづつ吸い込まれ、チップの流路内に引き込まれる。そこで、注目する成分と混合され、処理および結果検出工程が実行される。例えば、米国特許出願第2005/0042839号を参照のこと。

【0084】

10

20

30

40

50

従来の流体操作またはマイクロ流体アプローチ（またはその両方）が使用されるかどうか関係なく、アリコート分配および／または希釈事象は、特定の結果が得られるよう実行されうる。例えば、試料は、それぞれのアリコートで等しく希釈されるか、それとは別に、個々のアリコートが、区別を付けて希釈されうる（例えば、希釈系列が作成されうる）。それらのアリコート自体は、システムにより使用される流体操作アプローチに適切な量であるとしてよく、例えば、マイクロ流体アプローチでは 100 nL、10 nL、またはさらには 1 nL 以下のマイクロタイター・プレートに対し数マイクロリットルのオーダーである。

【0085】

これらのアリコートは、関連する核酸の高い、または低いコピー数を有するように選択されうる（例えば、低いコピー数のアリコートでは、関連する核酸の 50 以下、一般には 25 以下、通常は 10 以下、多くの場合 5 以下、2 以下、または 1 以下のコピー数）。生成されるアリコートの数は、試料のサイズと実行者が望む定量的情報の量に依存する。例えば、希な核酸の単純検出が望ましい場合、アリコートの 1 つにおける核酸を検出するために、十分に低いかつ／または単一のコピー数のアリコートが試料から作られる。さらに定量的情報が必要な場合、例えば、所定の信頼値で信頼できる統計的情情報をもたらすように十分なコピーが作成される。いずれの場合も、これは、1 アリコートから 10⁹ 以上のアリコートまでのどれか、例えば、10、100、1,000、10,000、100,000、1,000,000、10,000,000 またはそれ以上のアリコートを含むことができる。本発明により注目する核酸について作成され、評価されうるアリコートの数には理論的限界はないが、システムの効率および試料のサイズに関しては実用上の配慮がある（効率が低ければ低いほど、所定の時間に分析できるアリコートの数は少なくなり、試料サイズが大きければ大きいほど、試料から作ることができるアリコートの数は増える）。マイクロ流体アプローチを使用することで、試薬使用量（および付随する試薬コスト）を最低限に抑えられる。適宜增幅を行っている間を含む、試料および試薬の連續流を形成するようにシステムをフォーマットすることにより、本発明のシステムは、注目する核酸に対する多くの異なる試料を探索するプロセスの速度を大幅に高められる。同様に、停止流アプローチが使用される場合、PCR 反応からの信号の同時処理を使用して、注目する核酸に対する試料を探索するプロセスの速度を高めることができる。以下の実施例では、モデル試料のポアソン統計量の妥当な定量的情情報をもたらすために、それぞれの希釈範囲に対しアリコートが約 150 あれば十分であった。明らかに、これらの方では使用するアリコートを増減することもできる。

【0086】

本発明の方法は、試料またはアリコートからの注目する 1 つの核酸および適宜 1 つまたは複数の追加の核酸の 1 つまたは複数の配列を増幅することを含む。増幅された核酸の検出を容易にするためにリアルタイム PCR および／またはリアルタイム逆転写酵素 PCR（例えば、TaqMan（登録商標）プローブ、分子ビーコン・ベース・プローブ、または量子ドット・ベース・プローブ）が使用される。

【0087】

当技術分野者であれば、一般的に、これらの増幅法の詳細を熟知していると期待される。これらの増幅法に関する詳細は、例えば、Sambrook および Russell、「Molecular Cloning、第 3 版」（Cold Spring Harbor Laboratory Press（ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー所在）、2001 年）、Ausubel ら、「Current Protocols in Molecular Biology」（John Wiley & Sons（ニューヨーク州所在）、2005 年まで更新）、「Real-Time PCR: An Essential Guide」、K. Edwards ら（編集）（Horizon Bioscience（英国ノリッジ所在）、2004 年）で説明されている。

【0088】

一態様では、リアルタイム PCR は、例えば、蛍光標識を使用して、本明細書で説明さ

10

20

30

40

50

れているようなさまざまなアリコートまたは反応混合物に対し実行される。蛍光標識は、単一種有機分子に限定されるべきではなく、無機分子、有機分子および／または無機分子の多分子混合物、結晶、ヘテロポリマーなどを含むことが認識されている。好適な蛍光標識は、例えば、DNA結合色素、分子ビーコン、Ta q Man（登録商標）プローブ、または量子ドットにより形成されうる。增幅産物（二本鎖である）は、溶液中の色素分子を結合して、錯体を形成する。適切な色素を使用することで、溶液中で遊離している色素分子と増幅産物に結合されている色素分子とを区別することが可能である。例えば、いくつかの色素は、増幅産物に結合されたときのみ蛍光を発する。好適な色素の例には、限定はしないが、LC Green（Idaho Technology（ユタ州ソルトレークシティー所在）、SYBR（登録商標）Green、SYBR（登録商標）Green ER（商標）、およびPico Green（Invitrogen Corp.（カリフォルニア州カールズバッド所在）、臭化エチジウム、ヨウ化プロピジウム、クロモマイシン、アクリジン・オレンジ、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Toto-1、Yoyo-1、およびDAPI（4'，6-ジアミノ-2-フェニリンドールHCL）が含まれる。挿入色素の使い方に関する追加の詳細は、Zhuら（Anal Chem 66：1941～1948頁、1994年）で説明されている。

10

【0089】

分子ビーコンMBは、適切なハイブリダイゼーション条件の下で自己ハイブリダイズしてシステム・アンド・ループ構造を形成する、オリゴヌクレオチドまたはPNAである。MBは、標識およびクエンチャーを、オリゴヌクレオチドまたはPNAの末端に有し、それにより、分子内ハイブリダイゼーションを許す条件の下で、標識は、典型的には、クエンチャーにより消光される（または少なくともその蛍光性を変えられる）。MBが分子内ハイブリダイゼーションを示さない条件の下では（例えば、標的核酸に、例えば、増幅時に単位複製配列の一領域に結合されたとき）、MB標識は消光されない。

20

【0090】

MBを作り、使用する標準的方法に関する詳細は、文献において明確に述べられており、MBは、多くの市販の試薬供給元のものを利用できる。さらに、例えば、Leoneら（「Nucl Acids Res」26：2150～2155頁、1995年）、TyagiおよびKramer（「Nat Biotechnology」14：303～308頁、1996年）、BlokkおよびKramer（「Mol Cell Probe」11：187～194頁、1997年）、Hsuihら（「J Clin Microbiol」34：501～507頁、1997年）、Kostrikisら（「Science」279：1228～1229頁、1998年）、Sokolら（「Proc Natl Acad Sci. USA」95：11538～11543頁、1998年）、Tyagiら（「Nat Biotechnology」16：49～53頁、1998年）、Bonnetら（「Prot Natl Acad Sci USA」96：6171～6176頁、1999年）、Fangら（「J Am Chem Soc」121：2921～2922頁、1999年）、Marrasら（「Genet Anal Biomol Eng」14：151～156頁、1999年）、およびVetら（「Proc Natl Acad Sci USA」96：6394～6399頁、1999年）も参照のこと。MBの構造および使用に関する追加の詳細は、特許文献、例えば、米国特許第5,925,517号、第6,150,097号、および第6,037,130号で説明されている。

30

【0091】

MBは、リアルタイム、例えば、PCR、LCR中、または他の核酸増幅反応中を含む、核酸の検出および定量化を行うための安定した試薬である（例えば、MBは、形成しながら標的を検出するために使用されうる）。Cruachem（cruachem.com）、Oswel Research Products Ltd.（英国所在、oswel.com）、Invitrogen Corp.（カリフォルニア州カールズバッド所在、invitrogen.com）、Midland Certified Rea

40

50

gent Company (テキサス州ミッドランド所在、mrc.com) および Gorilla Genomics, LLC (カリフォルニア州アラメダ所在) を含む、さまざまなメーカーが、標準および特注の分子ビーコンを生産している。Stratagene (カリフォルニア州ラジョラ所在) 社の Sentinel (商標) Molecular Beacon Allelic Discrimination Kits ならびに Eurogentec SA (ベルギー所在、eurogentec.com) および Isogen Bioscience BV (オランダ所在、isogen.com) のさまざまなキットなど、分子ビーコンを利用するさまざまなキットも市販されている。

【0092】

MB成分(例えば、蛍光体またはクエンチャーにより標識されたものを含む、オリゴ)は、従来の方法を使用して合成されうる。例えば、オリゴまたはペプチド核酸(PNA)は、標準的な方法を使用して市販の自動化オリゴヌクレオチド/PNA合成装置で合成できる。標識は、自動合成時に、または前に説明されている合成後反応によりオリゴに付着させることができ、例えば、TyagiおよびKramer ('Nat Biotech nology' 14: 303~308頁、1996年) および米国特許第6,037,130号および第5,925,517号を参照のこと。官能化されたオリゴの合成の追加の詳細については、Nelsonら ('Nucl Acids Res' 17: 7187~7194頁、1989年) を参照のこと。標識/クエンチャーは、例えば、制御多孔性ガラス・カラムを使用して、例えば、クエンチャー(例えば、4'-ジメチルアミノアゾベンゼン-4' -スルホニル部分(DABSYL))を導入することにより、オリゴヌクレオチドまたはPNAに導入することができる。例えば、クエンチャーは、自動合成時にオリゴヌクレオチドの3'末端に付加することができ、4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸(DABCYL)のスクシンイミジルエステルは、付着部が第1級アミノ基である場合に使用することができ、4-ジメチルアミノフェニルアゾ-フェニル-4' -マレイミド(DABMI)は、付着部がスルフィドリル基である場合に使用できる。同様に、フルオレセインは、ヌクレオシドをフルオレセインで置き換えたフルオレセインホスホラミダイトを使用するか、またはスペーサーを介してチミジン環のところにフルオレセイン部分を導入するフルオレセインdTホスホラミダイトを使用することにより、オリゴ内に導入されうる。フルオレセイン部分を末端位置に結合するために、ヨードアセトアミドフルオレセインがスルフィドリル基に結合されうる。テトラクロロフルオレセイン(TET)は、5' - テトラクロロ - フルオレセインホスホラミダイトを使用して自動合成時に導入されうる。他の反応性蛍光体誘導体およびそのそれぞれの付着部は、アミノ基に結合された5-カルボキシローダミン-6G(RHD)のスクシンイミジルエステル、スルフィドリル基に結合されたテトラメチルローダミンのヨードアセトアミド、アミノ基に結合されたテトラメチルローダミンのイソチオシアネート、またはスルフィドリル基に結合されたテキサス・レッドのスルホニルクロリドを含む。これらの標識された成分の合成時に、必要ならば、コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドまたはPNAが、例えば、高圧液体クロマトグラフィまたは他の方法により精製できる。

【0093】

TaqMan(登録商標)プローブは、2つの異なる蛍光色素で標識されている短い(例えば、20~25塩基)オリゴデオキシヌクレオチドからなる。それぞれのプローブの5'末端には、レポーター色素が見つかり、それぞれのプローブの3'末端には、消光色素が見つかる。オリゴヌクレオチド・プローブ配列は、PCR単位複製配列中に存在する内部標的配列に相補的なものとすることができます。プローブが無傷であれば、2つの蛍光体間にエネルギー移動が生じ、レポーターからの放射は、クエンチャーにより消光される(蛍光共鳴エネルギー移動またはFRET)。PCRの伸長フェーズでは、プローブは、反応で使用されるポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により切断され、これにより、オリゴヌクレオチド・クエンチャーからレポーターを放出し、レポーター放射強度の増大を生じる。

【0094】

10

20

30

40

50

したがって、TaqMan（登録商標）プローブは、標識とクエンチャーとを有するオリゴヌクレオチドであり、そこで標識は、増幅で使用されるポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ作用によりハイブリダイゼーションの後および増幅中に放出される。これは、合成時の増幅のリアルタイム尺度となる。さまざまなTaqMan（登録商標）試薬が、例えば、Applied Biosystems社（本部はカリフォルニア州フォスター市に所在）だけでなく、Biosearch Technologies社（例えば、ブラック・ホール・クエンチャーブローブ）などのさまざまな専業メーカーからも市販されている。

【0095】

量子ドットは、量子ドットの粒子サイズの選択により所望のエネルギーにチューニングされうる特徴的なスペクトル放射を有する蛍光半導体ナノ結晶である。量子ドットは、分光光度計で観測され測定されうる特徴的な放射スペクトルを放射する。量子ドットの発光スペクトルは、試料のサイズ不均質性に応じて25～30nmと狭い線幅を有し、線形状は、裾を引く領域のない対称的なガウス型またはほぼガウス型である。裾引き領域のないチューニング可能性、狭い線幅、および対称的発光スペクトルの組合せにより、システム内では増倍サイズの量子ドットの分解能が高められ、研究者たちは、量子ドットで標識されたさまざまな生物学的部分を同時に調べることができる。それに加えて、ナノ結晶量子ドットの励起波長の範囲は広く、すべての利用可能な量子ドットの放射波長に比べてエネルギーを高くすることができます。したがって、これにより、通常はスペクトルの紫外線または青色領域内の単一光源を備えるシステムにおいてすべての量子ドットの同時励起が可能になる。量子ドットは、さらに、従来の有機蛍光色素よりも強固であり、有機色素に比べて光退色に耐性がある。ヌクレオチドの蛍光標識としての量子ドットの使用は、Bruchezら（「Science」281：2013～2016頁、1998年）、WarrenおよびNie（「Science」281：2016～2018頁、1998年）、Alivisatos（「Science」271：933～937頁、1999年）、および米国特許第6,544,732号および第6,855,551号で説明されている。さまざまな量子ドット試薬が、例えば、Invitrogen Corp.社（カリフォルニア州カールズバッド所在、invitrogen.com）またはEvident Technologies社（ニューヨーク州トロイ所在、evidenttech.com）から市販されている。

【0096】

多色多重化アッセイは、量子ドット・バイオコンジュゲーションの具体的な強みである。量子ドット・ナノ結晶からの放射は、狭く、対称的であり、したがって、他の色との重なりは最小であり、隣接する検出流路内への滲み出しが少なく、クロストークも減衰され、さらに多くの色を同時に使用できる。それぞれのバイオコンジュゲーション色は、同じ基礎材料に基づくので（サイズのみ異なる）、1つの色に対するコンジュゲーションおよび使用法は、異なる色のすべてに容易に外挿され、アッセイ開発が簡素化され高速化される。さらに、すべての量子ドット・ナノ結晶は、単一の光源を使用して励起することができ、狭いレーザーと広いランプ励起は両方とも有用である。3色または4色検出は、もはや、複数のレーザーまたは根気のいる位置合わせおよび補正を必要としない。

【0097】

一般に、プローブ、分子ビーコン、PNA、LNA（ロックト核酸）などを含む、オリゴヌクレオチドを作る合成法は、よく知られている。例えば、オリゴヌクレオチドは、例えばNeedham-Vandeventerら（「Nucleic Acids Res」12：6159～6168頁、1984年）で説明されているような、市販の自動合成装置を使用して、BeaucageおよびCaruthers（「Tetrahedron Letters」22：1859～1862頁、1981年）で説明されている固相ホスホラミダイト・トリエステル法により化学的に合成されうる。修飾オリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドは、さらに、当技術分野者に知られているさまざまな営利的供給元から入手することもできる。オリゴ合成サービスを行う営利事業者は多数有り、したがつ

10

20

30

40

50

て、これは広くアクセス可能な技術といえる。核酸は、The Midland Certified Reagent Company社(mcrc@oligos.com)、The Great American Gene Company社(www.genco.com)、ExpressGen Inc.社(www.expressgen.com)、Operon Technologies Inc.社(カリフォルニア州アラメダ所在)、および他の多くの会社などのさまざまな営利供給元から特注品として入手可能である。同様に、PNAは、PeptidoGenic社(pkim@ccnet.com)、HTI Bio-products, inc.社(www.hfibio.com)、BMA Biomedicals Ltd社(英国所在)、Bio-Synthesis, Inc.社、および他の多くの会社などのさまざまな供給元から特注品として入手できる。

10

【0098】

例えば、マイクロ流体デバイス内の増幅反応を伴う、PCRおよび他の増幅反応を実行する多くの高生産性アプローチが開発されたが、それとともに、それらのデバイス内またはデバイス上の増幅された核酸を検出し、分析する方法も開発された。これらの高生産性アプローチは、本発明とともに使用するように適合されうる。このような技術に関する詳細は、例えば、技術および特許文献、例えば、Koppら('Science' 280: 1046~1048頁、1998年)、Chowら('Science' 282: 396~399頁、1998年)、Zhangら('Anal Chem' 71: 1138~1145頁、1999年)、米国特許第6,444,461号、第6,406,893号、第6,391,622号、第6,303,343号、第6,171,850号、第5,939,291号、第5,955,029号、第5,965,410号、および第7,015,030号、米国公開特許出願第2004/0180346号および第2005/0042639号、他の多くの文献において説明されている。

20

【0099】

増幅された核酸を検出するための利用可能な方法を本発明において使用することができる。共通のアプローチは、分子ビーコン、量子ドット、またはTaqMan(登録商標)プローブを用いるリアルタイム増幅検出、挿入色素(上述のような)の検出、増幅された核酸それ自体に組み込まれている標識の検出などを含む。増幅された核酸(単位複製配列)は、均質な(実質的に分離されていない)反応混合物または溶液中で検出されうる。

30

【0100】

増幅および検出機能は、本発明におけるマイクロ流体デバイスを備えるシステム内に一体化されるのがふつうである。核酸を検出するための検出機能を備える利用可能なマイクロ流体システムは、Caliper Technologies社(カリフォルニア州マウンテン・ビュー所在)の250 HTSシステムおよびAMS 90 SEだけでなくAgilent 2100バイオアナライザー(Agilent社、カリフォルニア州パロ・アルト所在)を含む。検出(および分離/検出)機能を備えるシステムに関する追加の詳細は、特許文献、例えば、本明細書で説明されている参考文献、およびPCT公開特許出願第WO98/00231号において明確に説明されている。

40

【0101】

一般に、本明細書のデバイスは、適宜、例えば蛍光、リン光、放射能、pH、電荷、吸光度、発光、温度、磁力などを検出する、シグナル検出器を備える。蛍光検出は、特に好ましく、一般的に増幅された核酸の検出、特にリアルタイムPCR増幅に使用される(しかし、下流の操作は、単位複製配列に対し実行することができ、これは、質量分析またはサイズ排除などの他の検出方法を伴う場合がある)。

【0102】

(複数の)検出器が、適宜、増幅反応および/またはハイブリダイゼーション反応から届く1つまたは複数のシグナルを監視する。例えば、検出器は、「リアルタイム」増幅アッセイ結果に対応する光シグナルを監視することができる。検出器は、単一の種類のシグナルを監視するか、または、例えば、複数の異なるシグナルを同時に監視することができ

50

る。

【0103】

例示的な検出器は、光電子増倍管、フォトダイオード、アバランシェ・フォトダイオード、フォトレジスタ、ボロメータ、マイクロチャネル・プレート検出器、CCDアレイ(強度増倍および電子増倍CCDアレイ)、CMOSイメージセンサーおよび/または類似の要素を含む。波長識別は、多層誘電体干渉フィルタ、色吸収フィルタを使用して、または回折および/または屈折光学素子による分散により達成できる。検出可能なシグナルを放出する単位複製配列または他の成分は、検出器内を流れ去るか、またはそれとは別に、検出器は、增幅反応の部位に相対的に移動しうる(または、検出器は、例えば、CCDアレイのように、流路領域、またはマイクロタイター・ウェルに対応する多数の空間位置を同時に監視することができる)。本発明の検出器は、例えば、マイクロ流体デバイスの1つまたは複数の検出領域内に流れ込む本発明の核酸に関連付けられているプローブから来るシグナルを検出することができる。

【0104】

検出器は、例えば、検出器シグナル情報をアッセイ結果情報(例えば、注目している核酸の存在、注目している核酸の長さ、注目している長さの核酸の割合、および/または病状との相関)に変換するためのソフトウェアなどを有する、コンピュータ(または他の論理デバイス)を備えるか、または動作可能なようにリンクされうる。

【0105】

シグナルは、例えば、知られている発生源からのシグナルを監視することによりマイクロ流体システムを較正することで適宜較正される。例えば、シグナルは、基準光源、内部基準シグナルと突き合わせて較正されるか、または背景上の正のシグナルを検出するように正規化されうる。

【0106】

本発明によるマイクロ流体システムは、さらに、システム内のシグナルを監視するために複数の異なる検出システムを使用することができる。本発明の検出システムは、特定の流路領域(または他の反応検出領域)内の物質を検出し、監視するために使用される。検出された後、流路内の細胞または液滴の流量および流速は、センサーにより適宜測定され、上述のように制御されうる。

【0107】

本発明の方法およびシステムで使用される検出システムの例には、光学センサー、温度センサー、圧力センサー、pHセンサー、伝導度センサーなどを含めることができる。これらの種類のセンサーはそれぞれ、本明細書で説明されているマイクロ流体システム内に容易に組み込まれる。これらのシステムでは、そのような検出器は、マイクロ流体デバイスまたはそのデバイスの1つまたは複数の流路、チャンバまたは導管内に、またはそれに隣接して配置することができ、そのため、検出器は、デバイス、流路、またはチャンバとセンサーによる連絡範囲内にある。本明細書で使用されているような、特定の領域または要素の「センサーによる連絡範囲内にある」という語句は、一般に、検出器がマイクロ流体デバイス、マイクロ流体デバイスの一部、または検出器が意図されている、マイクロ流体デバイスの一部の内容物の特性を検出できるような位置に検出器を配置することを指す。例えば、マイクロスケール流路とのセンサーによる連絡範囲内に配置されているpHセンサーは、その流路内に配置された流体のpHを決定することができる。同様に、マイクロ流体デバイスの本体とのセンサーによる連絡範囲内に配置された温度センサーは、デバイスそれ自体の温度を決定することができる。

【0108】

本発明による好ましい検出システムは、本明細書で説明されているマイクロ流体システム内に組み込まれているマイクロ流体デバイスの流路および/またはチャンバ内の物質の光学的特性を検出するための光学的検出システムを含む。このような光学的検出システムは、典型的には、マイクロ流体デバイスのマイクロスケール流路に隣接して配置され、デバイスの流路またはチャンバに差し渡された光学的検出窓を介して流路とセンサーによる

10

20

30

40

50

連絡範囲内にある。光学的検出システムは、流路内の物質から放射される光、物質の透過率または吸収度、さらには物質のスペクトル特性を測定することができるシステムを含む。好ましい態様では、検出器は、蛍光または化学発光物質などの、物質から放射される光の量を測定する。そのようなものとして、検出システムは、典型的には、検出窓を通して透過してきた光ベースのシグナルを収集し、その信号を適切な光検出器に伝達するための集光光学系を備える。変化する電力、視野直径、および焦点距離の顕微鏡対物は、この光学トレインの少なくとも一部として容易に使用される。光検出器は、適宜、分光光度計、フォトダイオード、アバランシェ・フォトダイオード、光電子増倍管、ダイオード・アレイ、または場合によっては、電荷結合素子 C C D などの結像系である。検出システムは、典型的には、アナログ - デジタル、またはデジタル - アナログ・コンバータを介して、コンピュータに結合され、検出された光データを分析、記憶領域への格納、およびデータ操作のためコンピュータに伝送する。

10

【0109】

標識された単位複製配列などの蛍光物質の場合、検出器は、典型的には、蛍光物質を活性化する適切な波長の光を発生する光源だけでなく、光源を検出窓を通して流路またはチャンバに入っている物質に向けるための光学系を備える。光源は、レーザーおよび L E D を含む、適切な波長を発生する任意の数の光源であってよい。他の検出システムでは、他の光源が使用される。例えば、広帯域光源は、典型的には、光散乱 / 透過検出方式などで使用される。典型的には、光選択パラメータは、当技術分野者によく知られている。

20

【0110】

検出器は、独立のユニットとして存在することができるが、システムまたはマイクロ流体デバイスと一体化し、単一の計測器にできる。これらの機能を單一ユニットに一体化することで、少数のまたは（複数の）単一通信ポートを使用してコントローラ、検出器、およびコンピュータの間で情報をやり取りできるようにすることにより、これらの計測器をコンピュータと接続するのが容易になる。

【0111】

データを生成し、分析する方法、さらには他の関連する概念を理解する際に役立つ一般文献として、Weiss (「I n t r o d u c t o r y S t a t i s t i c s 、 第 7 版」Addison - Wesley (マサチューセッツ州レディング所在)、2004年)、Weiss (「E l e m e n t a r y S t a t i s t i c s 、 第 5 版」Addison - Wesley (マサチューセッツ州レディング所在)、2001年)、Berinstein (「F i n d i n g S t a t i s t i c s O n l i n e : H o w t o L o c a t e t h e E l u s i v e N u m b e r s Y o u N e e d 」、I n f o r m a t i o n T o d a y (ニュージャージー州メドフォード所在)、1998年)、Everitt (「T h e C a m b r i d g e D i c t i o n a r y o f S t a t i s t i c s 」、Cambridge University Press (ニューヨーク州所在)、1998年)、Kotz (「E n c y c l o p e d i a o f S t a t i s t i c a l S c i e n c e s 」、v o l . 1 ~ 9 + 付録、Wiley (ニューヨーク州所在)、1988年)、D i l l o n および Goldstein (「M u l t i v a r i a t e A n a l y s i s : M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s 」、Wiley (ニューヨーク州所在)、1984年)、Tabachnick および Fidell (「U s i n g M u l t i v a r i a t e S t a t i s t i c s 」、H a r p e r C o l l i n s C o l l e g e P u b l i s h e r s (ニューヨーク州所在)、1996年)、Boxら (「S t a t i s t i c s f o r E x p e r i m e n t e r s 」、Wiley (ニューヨーク州所在)、1978年)、Cornell (「E x p e r i m e n t s w i t h M i x t u r e s 」、Wiley (ニューヨーク州所在)、1990年)、John (「S t a t i s t i c a l D e s i g n a n d A n a l y s i s o f E x p e r i m e n t s 」、SIAM (フィラデルフィア所在)、1998年)、Gibas および Jambeck (「B i o i n f o r m a t i c s C o m p u t e r S k i l l s 」、O ' Reilly (カリフォルニア州セバストポル

30

40

50

所在)、2001年)、Pevzner(「Computational Molecular Biology and Algorithmic Approach」、The MIT Press(マサチューセッツ州ケンブリッジ所在)、2000年)、Durbinら(「Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids」、Cambridge University Press(英国ケンブリッジ所在)、1998年)、およびRashidiおよびBuehler(「Bioinformatic Basics: Applications in Biological Science and Medicine」、CRC Press LLC(フロリダ州ボーカ・ラトーン所在)、2000年)が挙げられる。

10

【0112】

増幅反応からのシグナルの非常に再現性の高いピーク・パラメータ、例えば、振幅、幅面積、および/または形状特徴は、反応に対する開始コピー数に相関し、かつ/または背景変動から注目する信号を区別するために使用されうる。この相関は、熱拡散率およびTaylor-Aris分散を考慮して、理論的レベルで求められるか、または標準との比較(例えば、出発物質について知られているコピー数を有する増幅反応に対するピーク形状、例えば、高さ、幅、または一般的な形状プロファイルとの比較)により求められうる。核酸の長さを測定する場合に2つ以上のプローブについて検出器シグナルを解釈する際に、同じ、または異なるピーク・パラメータを評価することができる。

20

【0113】

圧力駆動層流流路内で粒子を自由に拡散するために、修正拡散方程式を用いて、流路に沿った濃度プロフィルを近似することができる。G. I. Taylor(「Proc Roy Soc Lond」A 219:186(1953年))およびR. Aris(「Proc Roy Soc Lond」A 235:67(1956年))を参照のこと。Taylor分散係数(D_T)は、マーカーの流れが通過するマイクロ流体キャビティの寸法および形状、平均流速(v)、および分子拡散率(D_m)に依存する。 $D_T = D_m (1 + k v^2 w^2 / D_m^2)$ であるが、ただし、 w は、特性流路幅であり、 k は、流路断面の形状に依存する無次元係数である。好ましくは、流体パラメータおよび流路寸法は、許容可能なレベルまで分散を低減するように選択される。

30

【0114】

本発明のシステムは、マイクロ流体デバイス、反応混合物、検出器、試料貯蔵要素(マイクロタイマー・プレート、コンポーネントの乾燥アレイなど)、フロー・コントローラ、増幅デバイス、またはマイクロ流体モジュール、コンピュータ、および/または同様のものを備えることができる。これらのシステムは、注目する核酸のアリコートを取り、増幅し、分析するために使用されうる。システムのマイクロ流体デバイス、増幅コンポーネント、検出器、および貯蔵要素は、すでに、上である程度詳しく説明されている。以下の説明では、適切なコントローラおよびコンピュータを取りあげるが、多くの構成が利用可能であり、当技術分野者であれば、その使用に長けていると予想され、また本発明にどのように応用できるかを理解するであろう。

40

【0115】

例えば、圧力ベースの制御または動電学的な制御により、本発明のデバイス内の流体および/または物質の輸送および方向を制御するために、さまざまな制御用計装機器が本明細書で説明されているマイクロ流体デバイスと適宜併用される。

【0116】

例えば、多くの場合において、流体輸送および方向は、流体流を駆動するために外部または内部圧力源を組み込んだ圧力ベースのフロー・システムを使用して、その全部または一部が制御される。内部供給源は、微細加工ポンプ、例えば、隔膜ポンプ、熱ポンプ、ラム波ポンプ、および当技術分野で説明されているものなどを備える。例えば、米国特許第5,271,724号、第5,277,556号、および第5,375,979号、およびPCT公開特許出願WO94/05414号およびWO97/02357号を参照の

50

こと。本明細書で説明されているシステムは、さらに、動電学的物質方向および輸送システムを使用することができる。

【0117】

好ましくは、外部圧力源が使用され、流路末端のポートに印加される。これらの印加される圧力、または真空は、流路の長さにわたって差圧を発生し、これにより流体流を通す。本明細書で説明されている相互接続された流路網では、体積に対する差流量は、異なる圧力または真空を複数のポートに印加することにより、または好ましくは、単一の真空を共通の廃液ポートに印加し、所望の流量が得られるように適切な抵抗を持つさまざまな流路を構成することにより適宜得られる。例示的なシステムは、米国公開特許出願第2002/0019059号で説明されている。

10

【0118】

典型的には、コントローラ・システムは、本明細書で説明されているようにマイクロ流体デバイスまたはシステム要素を受け入れるか、またはインターフェースするように適宜構成される。例えば、コントローラおよび／または検出器は、適宜、コントローラおよび／または検出器とデバイスとの間で適切なインターフェースを容易に取れるようにマイクロ流体デバイスが取り付けられているステージを備える。典型的には、ステージは、入れ子になっているウェル、位置合わせピンおよび／または孔、非対称エッジ構造（デバイスの適切な位置合わせがしやすいようにする）などの適切な取り付け／位置合わせ構造要素を備える。多くのこののような構成は、本明細書で引用されている参考文献において説明されている。

20

【0119】

上述の制御用計装は、さらに、上流の流量を制御するために注目する領域の下流にある物質の動電学的注入または取り出しを行えるようにするために適宜使用される。上述のと同じ計装および技術は、さらに、フロー制御要素として機能するように下流ポート内に流体を注入するために使用される。

【0120】

上記のように、コントローラ・システムおよび／または検出システムのいずれか、または両方が、事前プログラムされた、またはユーザー入力インストラクションに従ってこれらの計装の動作を指令し、それらの計装からデータおよび情報を受け取り、この情報を解釈し、操作し、ユーザーに報告する機能を持つ適切にプログラムされたプロセッサまたはコンピュータ（論理デバイス）に結合されうる。そのようなものとして、コンピュータは、典型的には、図1に例示されている主制御および処理コンピュータ105などの、それらの計装の一方または両方（例えば、必要に応じてアナログ・デジタルまたはデジタル・アナログ・コンバータを含む）に適宜結合される。

30

【0121】

コンピュータは、典型的には、例えばGUIによる、設定パラメータ・フィールドへのユーザー入力の形態、または例えば、さまざまな異なる特定の操作について事前プログラムされた、事前プログラム・インストラクションの形態のユーザー・インストラクションを受け取るための適切なソフトウェアを備える。次いで、ソフトウェアは、これらのインストラクションを適切な言語に変換し、所望の操作を実行するように流体方向および輸送コントローラの操作を指令する。次いで、コンピュータは、システム内に含まれる1つまたは複数のセンサー／検出器からデータを受け取り、そのデータを解釈し、ユーザーの理解できるフォーマットで送るか、または、例えば、流量（連続流に対する流量を含む）、温度、印加電圧などの監視および制御などにおいて、そのデータを使用してプログラミングに従い他のコントローラ・インストラクションを開始する。

40

【0122】

これらのシステムおよび／またはキットは、本明細書の方法工程を実施するためのシステム・インストラクション（例えば、コンピュータ内に、またはコンピュータ可読媒体内に、例えば、システム・ソフトウェアとして、具現化される）を備えることができる。例えば、システムは、適宜、検出器により検出された、注目する核酸の増幅されたコピーに

50

より占有される形状、長さ、幅、体積、および／または面積と、アリコートの1つに存在する注目する核酸のコピーの数、または試料中に存在する注目する核酸のコピーの数、またはその両方との相関を求めるシステム・ソフトウェアを備える。同様に、システムは、適宜、試料を注目する核酸のコピーを含まない複数のゼロ・コピー・アリコートおよび注目する核酸の單一コピーを含む1つまたは複数の單一コピー・アリコートを含む、複数のアリコートに分けるように希釈モジュールに指令するシステム・インストラクションを含む。

【0123】

上記の統計関数を、システム・ソフトウェアに組み込むことも可能であり、例えば、コンピュータ、コンピュータ・メモリ、またはコンピュータ可読媒体に埋め込むことができる。例えば、コンピュータは、（温度サイクリングを介して）増幅を受けるアリコートの1つまたは複数から送られてくるシグナルに対し1つまたは複数の統計的または確率論的解析を実行する統計的または確率論的システム・ソフトウェアを備えることができる。統計的または確率論的解析ソフトウェアは、適宜、試料中の注目する核酸の濃度、割合、または個数を定量的に決定する。

10

【0124】

システムのコンピュータおよびソフトウェアは、1つまたは複数の解析結果からのシグナル・データを受け取って評価し、注目する核酸に対する計量および／または比例測定を行う。基本形態では、例えば、シグナルの振幅または積分面積は、例えばn L当たりのコピー数、ng / μLなどの所望の単位で出力に対する換算係数で調節されうる。それとは別に、知られている濃度の1つまたは複数の標準物質を分析して、回帰分析用にデータを生成し、濃度が変化する検出可能なシグナルの変化を式（標準曲線）として表し、1つまたは複数のシグナル・パラメータを式に挿入して、未知の濃度を決定することができる。特定の一実施形態では、注目する核酸の計量は、特定の強度の信号を得るために必要な増幅サイクル数に基づくことができる。

20

【0125】

本発明では、コンピュータは、典型的には、流路内の物質を監視するためのソフトウェアを備える。それに加えて、このソフトウェアは、適宜、物質の動電学的または圧力変調注入または引き出しを制御するために使用される。注入または引き出しは、上述のように流量を変調し、成分など混合するためなどに使用される。

30

【0126】

以下の実施例は、限定はしないが、請求されている発明を例示するために提示されている。本明細書で説明されている実施例および実施形態は、例示することのみを目的としており、このことを考慮してさまざまな修正形態または変更形態が、当技術分野者に示唆され、また本出願の精神および範囲ならびに付属の請求項の範囲の中に含まれるものであることは理解される。

【0127】

連続流条件の下でマイクロ流体デバイス内のPCR増幅のリアルタイム検出を実証するための実験が実施された。8流路マイクロ流体デバイスが、この実験に使用された。それぞれのマイクロチャネルの寸法は、およそ幅180μm、深さ11μmである。マイクロ流体デバイスの反応帯は、長さが約40mmであった。fimA細菌DNAは、標準リアルタイムPCR技術を使用して増幅された。fimA DNAテンプレートおよびリアルタイムPCR試薬を含む試験液は、適宜フロー・マーカーを含む分散媒と交互に形成した。1サイクルにつき95℃で10秒、55℃で10秒、72℃で20秒を含む、60秒のPCRサイクル時間が使用された。流量は、実験時にマイクロチャネル内に連続流を通して毎分約1mmとした。この実験で使用されたリアルタイムPCRシステムは、470nmのピークおよび630nmのピークを有するLED配列、励起フィルタ、および二重帯域通過干渉フィルタを備えていた。検出器の条件は、検出器：CMOS 12.8Mピクセル、レンズ：50mm f/1.4、倍率：約1:1、放射フィルタ：510~565nmおよび660~710nmの通過帯域を有する干渉フィルタ、ISO感度：3200

40

50

0、であった。同時多色画像取り込みが、72の伸長フェーズで実行された。増幅産物を検出するために、SYBR Green色素が使用され、フロー・マーカーとして、Alexa Fluor 647赤色素が適宜使用された。

【0128】

この実験の結果は、図8A～8Bおよび図9A～9Bに示されている。図8Aは、連続流PCR条件の下での流路の長さ30mmの部分を示している。Alexa Fluor 647色素ボーラスからなる赤色フロー・マーカーが、見える状態にある。右側の流路の下流端でしか目立たない緑色光は、SYBR Green I色素からのもので、増幅DNAの存在を示している。図8Bは、図8Aからのマイクロチャネル2(上から2番目)に沿った赤色シグナルの強度のプロットを示している。拡散と分散により、これらの色素マーカー・ボーラスは、流路を下るにつれて広がり、その結果、下流のシグナル・ピークが幅広になり、短くなる。しかしながら、これらの効果は弱く、ボーラスは、流速を測定するために使用できる十分明確な区別を保持する。

10

【0129】

図9Aは、連続流PCR条件の下での流路の長さ30mmの部分を示している。緑色光は、伸長フェーズにおいて集光されたSYBR Green色素蛍光からのもので、増幅DNAの存在を示している。この場合、流路内に別のフロー・マーカーが注入されることはなかった。図9Bは、図9Aからのマイクロチャネル2(上から2番目)に沿った緑色シグナルの強度のプロットを示している。流路の上流端に向かう形で、試料要素が少ないPCR温度サイクルを受ける場合、測定された強度は、背景散乱によって左右される。下流に進むにつれ、シグナルは急上昇し、次いで飽和する。シグナル対位置のこのシグモイド形状は、従来のリアルタイムPCRシステムで見られるシグナル振幅対サイクル数の形状に似ている。これらの結果は、連続流条件の下でPCR増幅のリアルタイム検出を示している。

20

【0130】

本発明を説明する英語原文の文脈において「a」および「an」および「the」および類似の指示対象を使用している場合(特に、請求項の文脈において)、本明細書において特に断りのない限り、または文脈上明らかに矛盾していない限り、単数形と複数形の両方を含むものと解釈されるべきである。「含む、備える(comprising)」、「持つ、有する(having)」、「含む、備える(including)」、および「含む、含有する、収める(containing)」という言葉は、断りのない限り、制約のない表現(つまり、「限定はしないが、...を含む」を意味する)と解釈されるべきである。本明細書の値の範囲の記載は、本明細書において断りのない限り、その範囲内に収まるそれぞれの個別の値を個々に参照する簡便法として使用されることを単に意図しており、それぞれの個別の値は、本明細書に個々に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書で説明されているすべての方法は、本明細書に断りのない限り、または文脈上明らかに矛盾していない限り、適当な順序で実行できる。本明細書に記載される任意のおよびすべての例、または例示的な言い回し(例えば、「...などの(such as)」の使用は、単に本発明をわかりやすくすることを意図しているだけであり、断りのない限り本発明の範囲に制限を課すことはしない。本明細書におけるどのような言い回しも、非請求要素を本発明の実施に本質的であるとして示すものとして解釈すべきではない。

30

【0131】

本発明の実施形態は、本明細書において説明されており、本発明を実施するために発明者に知られている最良の態様を含む。これらの実施形態の変更形態は、上記の説明を読んだ後、当技術分野者にとって明確になるものとしてよい。発明者は、当技術分野者がこのような変更形態を適宜採用することを期待し、発明者は、本明細書で特に説明されているのと違う形で本発明が実施されることを意図している。したがって、本発明は、適用法により許されているとおりに付属の請求項に記載されている主題のすべての修正形態および同等の形態を含む。さらに、可能なすべての変更形態における上述の要素の任意の組合せ

40

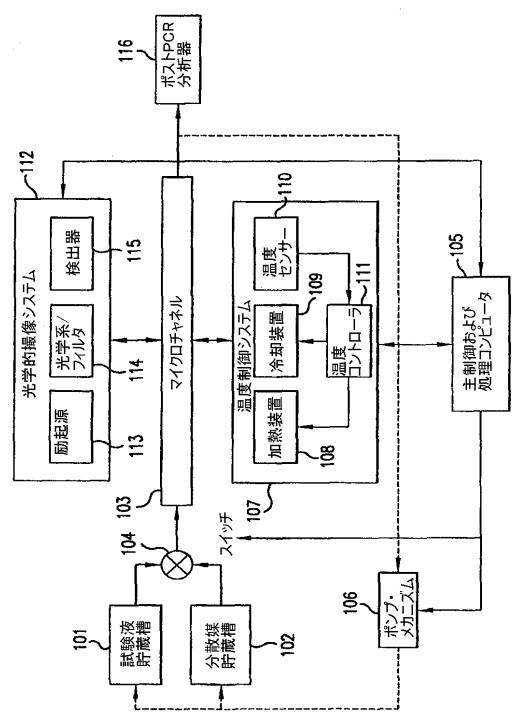
50

は、本明細書に断りのない限り、または文脈上明らかに矛盾していない限り本発明により包含される。

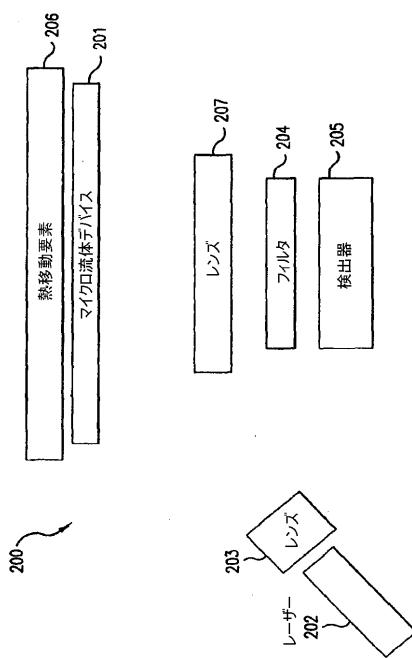
【 0 1 3 2 】

本出願中で引用されているすべての刊行物、特許出願、および／または他の文書は、それぞれの個別の刊行物、特許、特許出願、および／または他の文書が、すべての目的に関して参照により組み込まれることを個別に指示されていた場合と同じ程度にすべての目的に関して全体として参照により本明細書に組み込まれる。

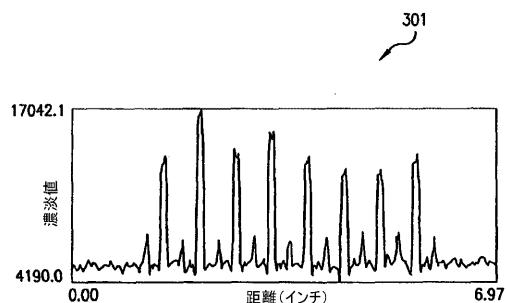
【 义 1 】



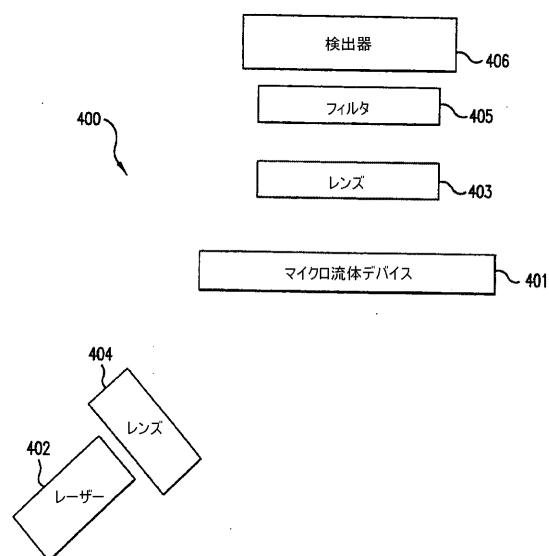
【 义 2 】



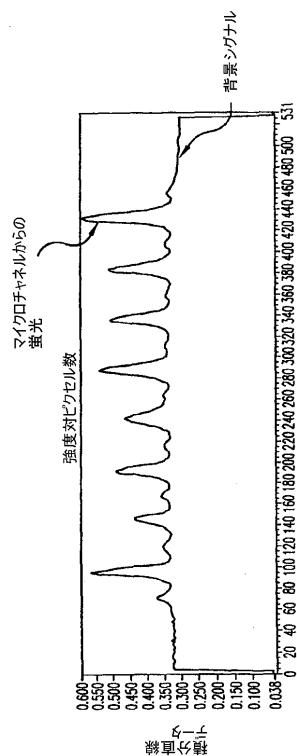
【図3B】



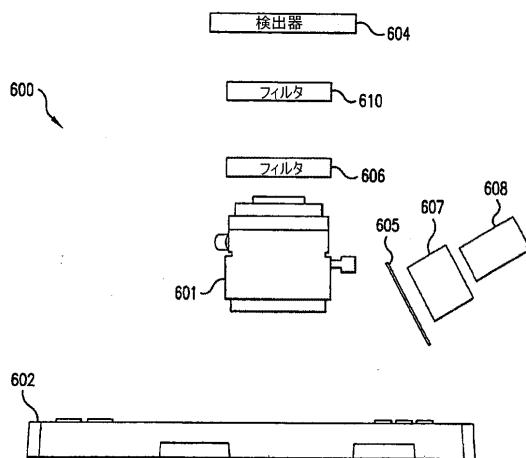
【図4】



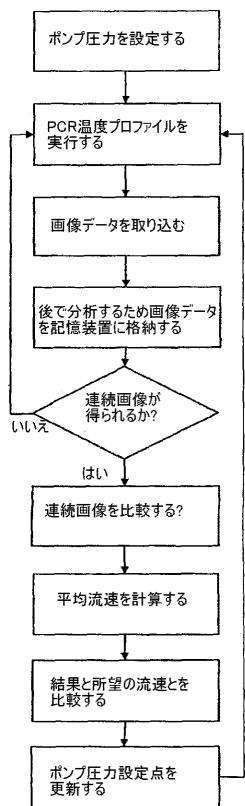
【図5】



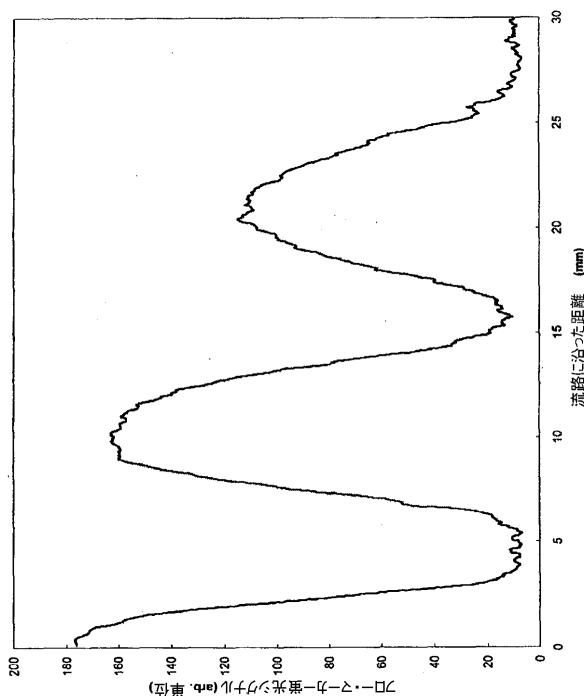
【図6】



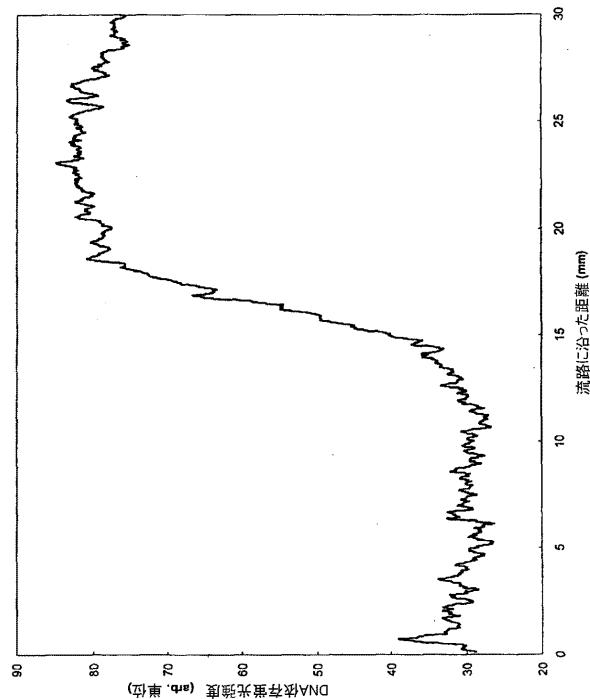
【図7】



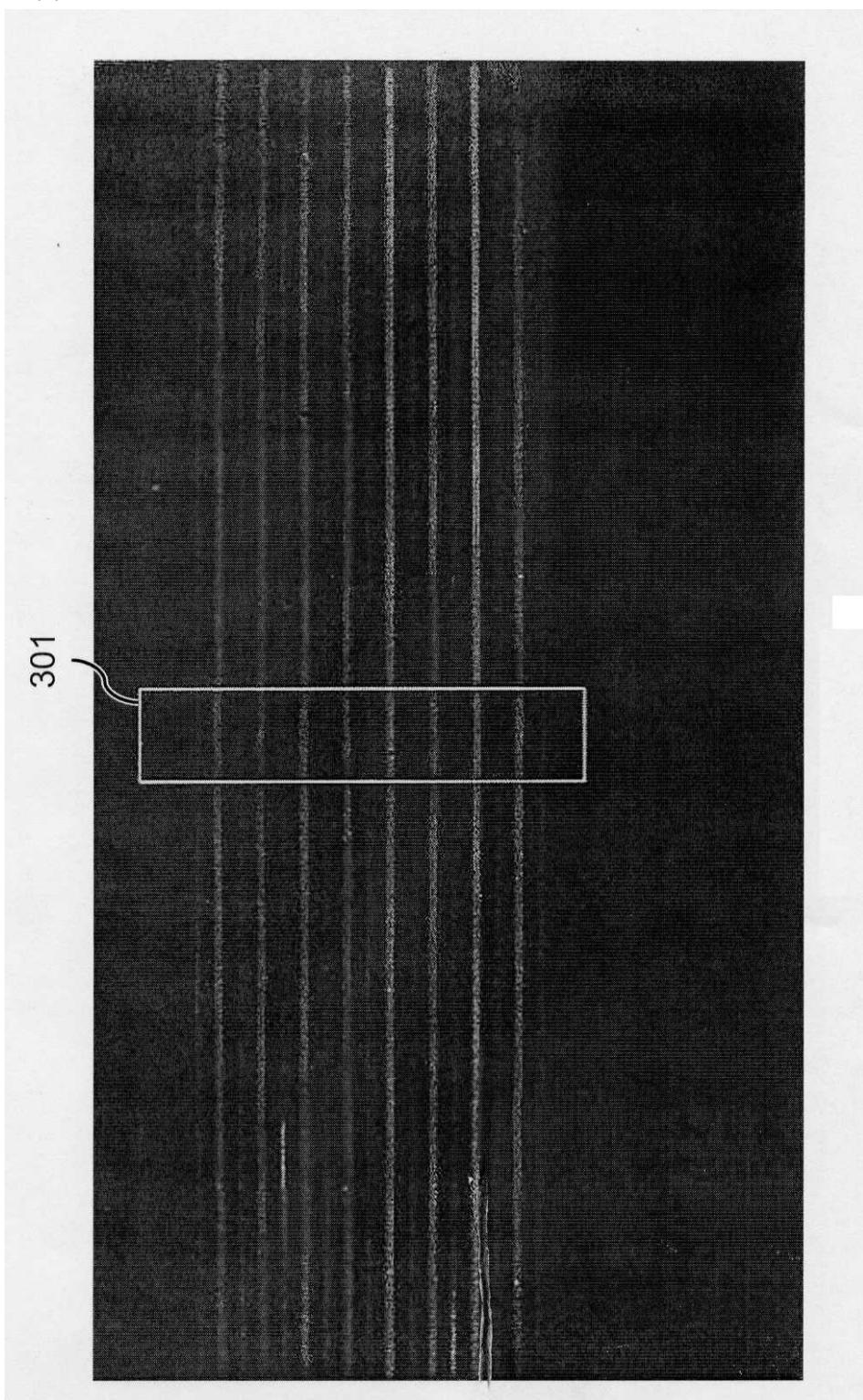
【図8B】



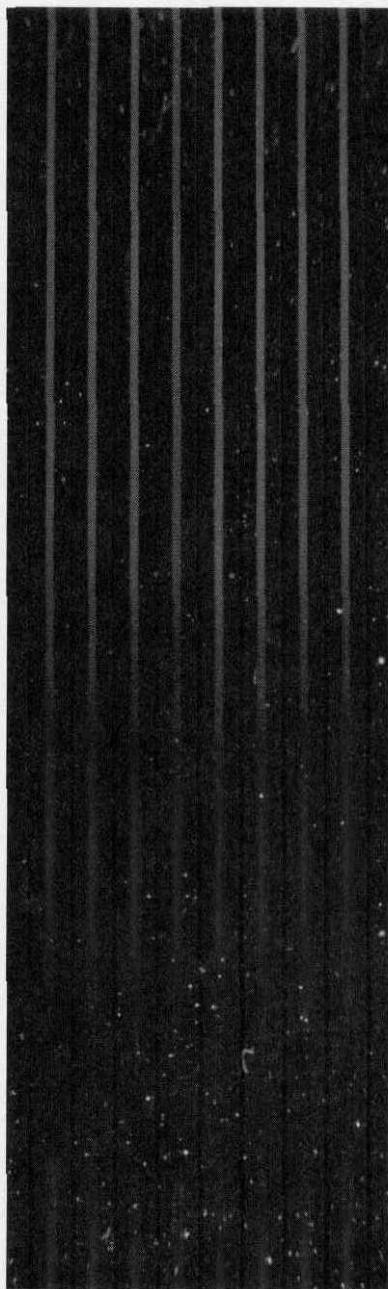
【図9B】



【図 3 A】

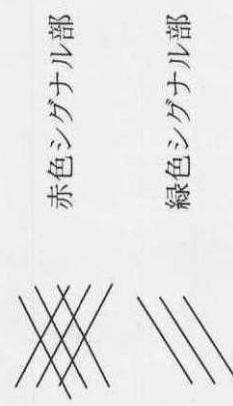
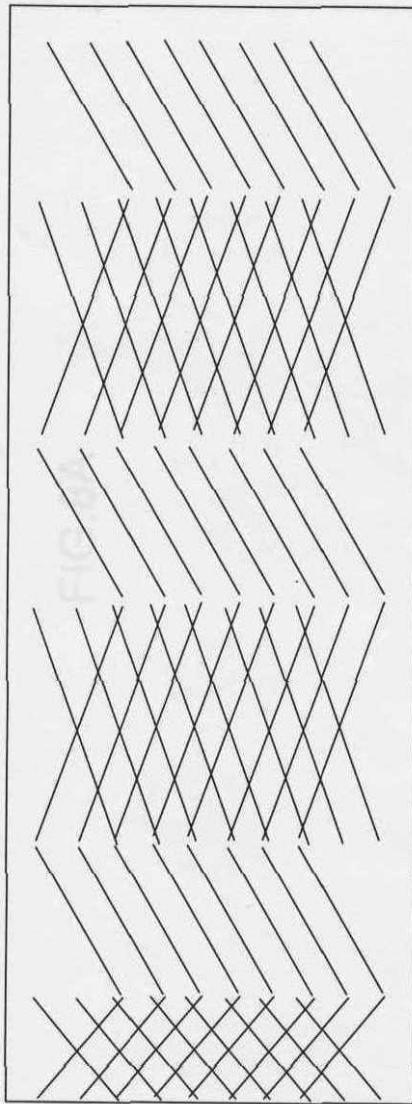


【図 8 A】

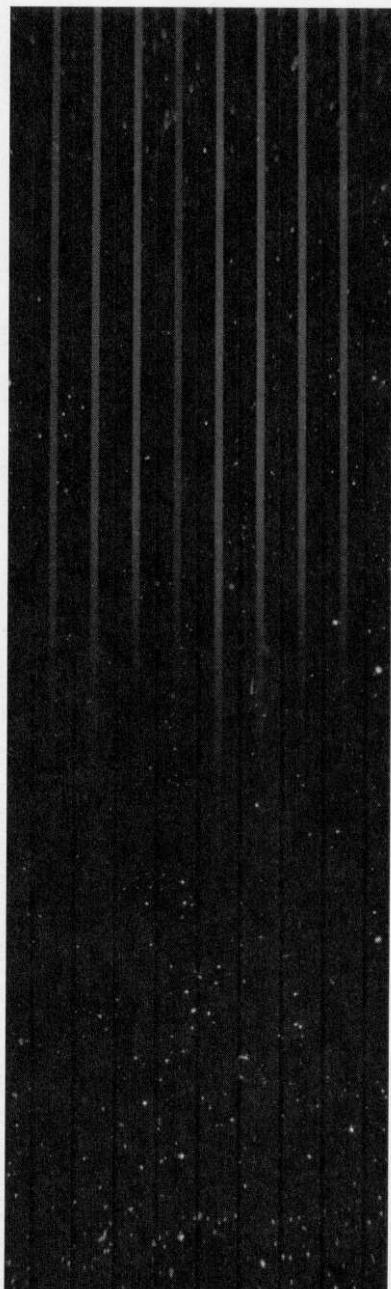


[画像]

[画像の模式図]



【図 9 A】

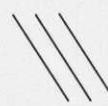


[画像]

[画像の模式図]

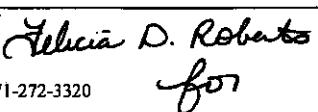


緑色シグナル部



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/14863															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12Q 1/68(2006.01);C12P 19/34(2006.01);C12M 1/00(2006.01)																	
USPC: 435/6,91.2,288.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6,91.2,288.1																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 2005/0202489 A1 (CHO et al) 15 September 1005 (15.09.2005), see entire document.</td> <td style="padding: 2px;">1-3, 7-12, 16-20, 28-36, 40, 41, 44-48</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">---</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">4-6, 13-15, 21-27, 37- 39, 42, 43</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">PARK et al. Cylindrical compact thermal-cycling device for continuous-flow polymerase chain reaction. Anal. Chem. 01 November 2003, Vol. 75, No. 21, pages 6029-6033, see entire document.</td> <td style="padding: 2px;">1-48</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2005/0202489 A1 (CHO et al) 15 September 1005 (15.09.2005), see entire document.	1-3, 7-12, 16-20, 28-36, 40, 41, 44-48	---			Y		4-6, 13-15, 21-27, 37- 39, 42, 43	Y	PARK et al. Cylindrical compact thermal-cycling device for continuous-flow polymerase chain reaction. Anal. Chem. 01 November 2003, Vol. 75, No. 21, pages 6029-6033, see entire document.	1-48
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	US 2005/0202489 A1 (CHO et al) 15 September 1005 (15.09.2005), see entire document.	1-3, 7-12, 16-20, 28-36, 40, 41, 44-48															

Y		4-6, 13-15, 21-27, 37- 39, 42, 43															
Y	PARK et al. Cylindrical compact thermal-cycling device for continuous-flow polymerase chain reaction. Anal. Chem. 01 November 2003, Vol. 75, No. 21, pages 6029-6033, see entire document.	1-48															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.															
Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 02 May 2008 (02.05.2008)		Date of mailing of the international search report 21 MAY 2008															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer David C. Thomas Telephone No. 571-272-3320  <i>[Signature]</i>															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US07/14863

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, MEDLINE, SCIENCE DIRECT
search terms: PCR, real-time, channel, fluorescent, flow, cycling, reagents, carrier, fluid, marker

フロントページの続き

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

(74)代理人 100085176

弁理士 加藤 伸晃

(74)代理人 100094112

弁理士 岡部 讓

(74)代理人 100096943

弁理士 白井 伸一

(74)代理人 100101498

弁理士 越智 隆夫

(74)代理人 100104352

弁理士 朝日 伸光

(74)代理人 100128657

弁理士 三山 勝巳

(72)発明者 ハッソン,ケントン,シー.

アメリカ合衆国 20878 メリーランド,ゲイザースバーグ,マラソン サークル 1562
0,アパートメント 301

(72)発明者 デイル,グレゴリー,エー.

アメリカ合衆国 20878 メリーランド,ゲイザースバーグ,インスピレーション レーン
316

(72)発明者 井上 裕司

アメリカ合衆国 20814 メリーランド,ベ特斯ダ,ウッドモント アヴェニュー 7701

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA05 EA01 FA02 GB07 HA01 JA03 KA02

KA09 LA02 LA03

4B024 AA11 AA19 AA20 BA80 CA05 CA09 HA12 HA19

4B029 AA23 BB20 FA15 HA06 HA09

4B063 QA13 QA20 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR62 QS25 QS38 QS39

QX02