

(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2015-519900
(P2015-519900A)

(43) 公表日 平成27年7月16日(2015.7.16)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	Z 4 B 02 9
C 12 N 1/02 (2006.01)	C 12 N 1/02	Z 4 B 06 3
C 12 N 5/071 (2010.01)	C 12 N 5/00	Z 2 O 2 A 4 B 06 5
G 01 N 37/00 (2006.01)	G 01 N 37/00	Z 1 O 1
C 12 M 1/00 (2006.01)	G 01 N 37/00	Z 1 O 2

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-514128 (P2015-514128)	(71) 出願人	511237575 フリューダイム・コーポレイション アメリカ合衆国・カリフォルニア・940 80・サウス・サン・フランシスコ・ショ アライン・コート・7000・スイート・ 100
(86) (22) 出願日	平成25年5月21日 (2013.5.21)	(74) 代理人	100147485 弁理士 杉村 憲司
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月13日 (2015.1.13)	(74) 代理人	100164471 弁理士 岡野 大和
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/042086	(74) 代理人	100192924 弁理士 石井 裕充
(87) 國際公開番号	W02013/177206		
(87) 國際公開日	平成25年11月28日 (2013.11.28)		
(31) 優先権主張番号	61/649,845		
(32) 優先日	平成24年5月21日 (2012.5.21)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

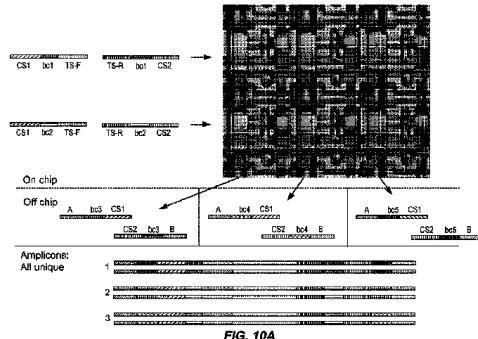
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】粒子集団の単粒子解析方法及び単粒子単離方法

(57) 【要約】

ある実施形態では、本発明は、少なくとも2つのパラメーターが各粒子ごとに測定される、粒子集団中の単粒子をアッセイするための方法およびデバイスを提供する。

1つまたは複数のパラメーターを、粒子が個別の反応容積内にある間に測定することができる。あるいは、またはさらに、1つまたは複数のパラメーターは、例えば反応が個別の反応容積内で実施されかつ反応生成物が回収され解析される、後の解析ステップで測定することができる。特定の実施形態では、1つまたは複数のパラメーターの測定は「並行して」実施され、即ち個別の反応容積内で本質的に同時に実施される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

複数の粒子中の単粒子をアッセイする方法において、

前記複数の粒子を個別の反応容積に捕捉して、それぞれが 1 つの粒子のみを含有する複数の個別の反応容積を生成するステップと、

それぞれ個別の反応容積内にある各粒子に対して複数の反応を行って、各粒子ごとに複数の反応生成物を生成し、少なくとも 1 種の反応生成物が、標的核酸に添加されかつ前記反応生成物の供給源であった前記反応容積の同一性をコード化するヌクレオチド配列を含んでいるサブステップ、および

前記反応生成物を解析して、結果を得るサブステップ

を含む、各粒子ごとに複数のパラメーターをアッセイするステップと、

前記アッセイの結果を各粒子に関連付けて、個別の反応容積内にある前記複数の粒子中の各粒子ごとに複数のパラメーターを含むデータ集合を生成するステップとを含む、複数の粒子中の単粒子をアッセイする方法。

【請求項 2】

前記パラメーターの少なくとも 1 つが、それぞれ個別の反応容積内でアッセイされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記個別の反応容積の内容物が回収される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも 35 % であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも 50 % であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも 65 % であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

それぞれ 1 つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも 85 % であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記個別の反応容積が、マイクロ流体デバイスの個々のコンパートメント内に存在する、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記粒子が、前記複数の反応を行うための 1 種または複数種の試薬を添加する前に、個別の反応容積に捕捉される、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記粒子が細胞である、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記粒子が、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、およびこれらの組合せから選択される、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

40,000 個よりも少ない粒子が前記方法で用いられる、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

10,000個よりも少ない粒子が前記方法で用いられる、請求項1から12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

個別の反応容積内に分布した粒子の数が10個よりも多く、100個よりも多く、または1000個よりも多い、請求項1から13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

前記捕捉するステップが、限界希釈により行われる、請求項1から3または8から14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

限界希釈が、

粒子懸濁液の連続希釈物を調製するステップと、

各希釈物から、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に粒子を分布させるステップと、

各コンパートメント内の粒子の数を決定するステップと、

個別の反応容積に単粒子を捕捉する際に使用される、単粒子のみ含む最も多い数のコンパートメントを生成する希釈物を選択するステップと

を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

各コンパートメント内の粒子の数が、明視野顕微鏡法または蛍光顕微鏡法により決定される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

染色剤、色素または標識を用いて、それぞれ個別の反応容積内の粒子の数を検出する、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

前記粒子が細胞であり、前記染色剤、前記色素または前記標識が、膜透過性の染色剤、色素または標識である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記粒子が細胞であり、それぞれ個別の反応容積内の細胞の数を検出するのに細胞膜透過性核酸色素が用いられる、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記粒子が細胞であり、前記染色剤、前記色素または前記標識が、細胞表面染色剤、色素または標識である、請求項18に記載の方法。

【請求項22】

前記粒子が細胞であり、それぞれ個別の反応容積内の細胞の数を検出するのに、細胞表面マーカーに特異的な標識抗体が用いられる、請求項18に記載の方法。

【請求項23】

前記捕捉するステップが、マイクロ流体デバイス内の複数の捕捉部位での機械的捕捉を含む、請求項1から22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

各捕捉部位が、

1つの粒子のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と、

前記捕捉形体が粒子によって占有されていない場合に、前記捕捉部位内に前記流体を流すことが可能なドレン形体と

を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記マイクロ流体デバイスが、粒子の流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

親和性に基づく捕捉を含み、かつ粒子成分に結合する結合パートナーを用いる、請求項1から25のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

前記結合パートナーが、前記マイクロ流体デバイスの別々の領域に添着され、それぞれ別々の領域は1つの粒子のみを結合可能にする、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

前記親和性に基づく捕捉が、

マイクロ流体デバイス内の複数の捕捉部位に前記結合パートナーを含む支持体を捕捉して、各捕捉部位に固定化された支持体を生成するステップであり、それぞれ固定化された支持体が、1つの粒子のみをそれぞれ固定化された支持体に結合可能とするように結合パートナーを呈示するステップと、

粒子を、前記固定化された支持体上の前記結合パートナーに結合するステップとを含む、請求項26に記載の方法。 10

【請求項 29】

前記支持体が、機械的捕捉によって捕捉される、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

各捕捉部位が、

1つの支持体のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と、

捕捉形体が支持体によって占有されていない場合に、前記捕捉部位内に前記流体を流すことが可能なドレイン形体と

を含む、請求項28に記載の方法。 20

【請求項 31】

前記マイクロ流体デバイスが、支持体および/または粒子の流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項 32】

各捕捉部位が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に位置付けられる、請求項23から25および27から31のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

前記捕捉するステップが、前記粒子を含む溶液を前記マイクロ流体デバイスの前記コンパートメント内に通すサブステップを含み、それによって前記コンパートメントの35%以上が単粒子のみを含む、請求項32に記載の方法。 30

【請求項 34】

前記個別の反応容積がマイクロ流体デバイスの個々のコンパートメント内に存在し、それぞれ個別の反応容積内の粒子の数を決定するステップと、

粒子を含有しないまたは単粒子より多い粒子を含有する任意の反応容積からの結果を無視するステップと

を含む、請求項1から33のいずれかに記載の方法。

【請求項 35】

前記回収するステップが、個別の反応容積から反応生成物を個別に回収するサブステップを含む、請求項3から34のいずれかに記載の方法。

【請求項 36】

前記回収するステップが、複数の個別の反応容積から反応生成物をプールするサブステップを含む、請求項3から34のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 37】

少なくとも1つのアッセイが、DNA配列の検出と、RNA配列の検出と、タンパク質、炭水化物、脂質およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される分子の検出と、小分子の検出と、活性の検出と、イオン濃度の検出と、イオンポテンシャルの検出と、およびレドックス電位の検出とから選択される、請求項1から36のいずれかに記載の方法。

【請求項 38】

前記反応が、DNAの增幅、ヌクレアーゼによるDNAの消化、DNAのライゲーション、DNA分子上へのアダプター配列のライゲーション、DNA分子内へのトランスポゾ

ンのトランスポザーゼ媒介型組込み、DNA配列決定、RNAの逆転写、RNAの増幅、およびRNaseによるRNAの消化から選択される1つまたは複数の反応を含む、請求項1から37のいずれかに記載の方法。

【請求項39】

前記反応が、全ゲノム増幅および/または全トランスクリプトーム増幅を含む、請求項1から38のいずれかに記載の方法。

【請求項40】

前記少なくとも1種の反応生成物が、少なくとも2つの増幅プライマーを使用する核酸増幅を含む反応によって生成され、各増幅プライマーは、前記反応生成物の供給源であった前記反応容積の同一性をコード化するバーコード配列とバーコード配列の組合せを含む、請求項1から39のいずれかに記載の方法。

10

【請求項41】

前記核酸増幅が、1対のインナープライマーおよび1対のアウタープライマーを使用し、

前記インナープライマーは、

第1のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列および標的特異的部分を含む順方向インナープライマーと、

標的特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列および第2のヌクレオチドタグを含む逆方向インナープライマーと

20

を含み、

前記アウタープライマーは、

第2のバーコードヌクレオチド配列および第1のヌレオチドタグ特異的部分を含む順方向アウタープライマーと、

第2のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーと

30

を含み、

前記アウタープライマーは前記インナープライマーよりも過剰であり、

核酸増幅は、5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3' を含むアンプリコンを生成する、

30

請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記核酸増幅が、1対のインナープライマーと、1対のスタッフアープライマーと、1対のアウタープライマーとを使用し、

前記インナープライマーは、

第1のヌクレオチドタグおよび標的特異的部分を含む順方向インナープライマーと、標的特異的部分および第2のヌクレオチドタグを含む逆方向インナープライマーとを含み、

40

前記スタッフアープライマーは、

第3のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列および第1のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向スタッフアープライマーと、

第2のヌクレオチドタグ特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列、第4のヌクレオチドタグを含む逆方向スタッフアープライマーとを含み、

前記アウタープライマーは、

第2のバーコードヌクレオチド配列および第3のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向アウタープライマーと、

第4のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーと

50

を含み、

前記アウタープライマーは、前記インナープライマーよりも過剰な前記スタッファープライマーよりも過剰であり、

前記核酸增幅は、5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第3のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第4のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3'を含むアンプリコンを生成する、

請求項40に記載の方法。

【請求項43】

前記個別の反応容積が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメントであり、前記個別のコンパートメントが、行および列によって画定されたアレイとして並べられており、各アンプリコンにおける前記第1および前記第2のバーコードの組合せが、前記アンプリコンの供給源であった前記コンパートメントの前記行および前記列を特定する、請求項41に記載の方法。

【請求項44】

前記回収するステップが、行におけるまたは列におけるコンパートメントからアンプリコンをプールするサブステップを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記アウタープライマーが、DNA配列決定プライマーにより結合することが可能な第1および第2のプライマー結合部位をさらに含み、前記核酸增幅が、5' - 第1のプライマー結合部位 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のプライマー結合部位 - 3'を含むアンプリコンを生成する、請求項41に記載の方法。

【請求項46】

前記解析するステップが、前記增幅生成物を配列決定するサブステップを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記複数の反応が無傷の粒子上で行われる、請求項1から46のいずれかに記載の方法。

【請求項48】

前記複数の反応が、崩壊した粒子上で行われる、請求項1から47のいずれかに記載の方法。

【請求項49】

前記複数の反応が、溶解した細胞上で行われる、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記粒子が、前記複数の反応を行う前に、生体応答を誘発する薬剤で処理される、請求項1から49のいずれかに記載の方法。

【請求項51】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた1種または複数種の標的核酸の存在または量を決定するステップを含む、請求項1から50のいずれかに記載の方法。

【請求項52】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた1つまたは複数のDNA分子のコピー数を決定するステップを含む、請求項1から51のいずれかに記載の方法。

【請求項53】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた1つまたは複数の座位での遺伝子型を決定するステップを含む、請求項1から52のいずれかに記載の方法。

【請求項54】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた複数の座位に関するハプロタイプを決定するステップを含む、請求項1から53のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 5】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた1つまたは複数のRNA分子の発現レベルを決定するステップを含む、請求項1から54のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた1つまたは複数のRNA分子のヌクレオチド配列を決定するステップを含む、請求項1から55のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 7】

各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた1種または複数種のタンパク質の発現レベルを決定するステップを含む、請求項1から56のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 8】

前記解析の結果が、

表現型に相關する2つ以上のコピー数多型、

表現型に相關する2つ以上の突然変異、または

一緒にになって表現型に相關する、少なくとも1つのコピー数多型および少なくとも1つの突然変異

の存在を示す、請求項1から57のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 9】

前記表現型が、疾患のリスク、存在、重症度、予後、および特定の療法に対する応答性からなる群から選択される、請求項58に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記表現型が、薬物に対する耐性を含む、請求項59に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記解析の結果が、ゲノム組換えの出現を示す、請求項1から60のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 2】

前記解析の結果が、特定のスプライスバリエントの共発現を示す、請求項1から61のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 3】

前記解析の結果が、B細胞内での特定の軽鎖および重鎖の共発現を示す、請求項1から62のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 4】

前記解析の結果が、特定の宿主細胞における特定の病原体の存在を示す、請求項1から63のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 5】

基質上の捕捉部位に結合パートナーを含む支持体を捕捉して、前記捕捉部位に固定化された支持体を生成するステップであり、前記結合パートナーが粒子成分に結合し、前記固定化された支持体が、それぞれ固定化された支持体に1個の粒子のみを結合可能にするように前記結合パートナーを呈示するステップと、

前記固定化された支持体上で前記結合パートナーに粒子を結合するステップとを含む、単粒子を単離する方法。

【請求項 6 6】

前記捕捉するステップが、支持体の機械的捕捉を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記捕捉部位が、

1つの支持体のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と、

前記捕捉形体が支持体によって占有されない場合に、前記捕捉部位内に流体を流すことが可能なドレイン形体と

を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記基質が、流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、請求項65に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 6 9】

前記基質が複数の捕捉部位を含む、請求項 6 5 から 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 0】

各捕捉部位が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に位置付けられる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記粒子を含む溶液を、前記マイクロ流体デバイスの前記コンパートメント内に通すステップを含み、それによって前記コンパートメントの 3 5 % 以上が単粒子のみを含む、請求項 7 0 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年5月21日に出願された米国仮出願第 6 1 / 6 4 9 , 8 4 5 号明細書に基づく利益を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる

。

【0 0 0 2】

本発明は、粒子の集団において、単粒子ベースで多数のパラメーターを解析するのに有用な方法に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 3】

集団における個々の粒子の多数のパラメーターを解析するための方法は、様々な意味において関心が持たれている。特に、細胞集団内の単一細胞ベースで、1つまたは複数のその他のパラメーターと任意選択で組み合わせて多数の核酸を解析する能力には、民間および学術研究所が幅広い関心を寄せている。この目標を達成する様々な手法では、下記の問題：用いられるステップが冗長でありかつ労力を要すること、解析される供給源（組織生検など）から入手することができない多数の細胞を必要とする可能性があること（例えば、10,000 個程度またはそれ以上の細胞）、かつ／または利用可能な技法が、個々の細胞に存在する少量の標的核酸から信頼性ある結果を得る再現性が不十分であり得ること、の1つまたは複数に悩まされる。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 4】

【特許文献 1】米国仮出願第 6 1 / 6 4 9 , 8 4 5 号明細書

【特許文献 2】米国特許公開第 2 0 0 4 / 0 2 2 9 3 4 9 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 6 , 7 9 4 , 4 9 9 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 6 , 6 7 0 , 4 6 1 号明細書

【特許文献 5】米国特許第 6 , 2 6 2 , 4 9 0 号明細書

【特許文献 6】米国特許第 6 , 7 7 0 , 7 4 8 号明細書

40

【特許文献 7】国際出願第 U S 0 3 / 3 7 8 0 8 号パンフレット

【特許文献 8】米国特許第 6 , 6 0 5 , 4 5 1 号明細書

【特許文献 9】米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 6 0 6 4 0 号明細書

【特許文献 1 0】米国特許第 6 , 0 2 7 , 9 9 8 号明細書

【特許文献 1 1】国際公開第 W O 9 7 / 3 1 2 5 6 号パンフレット

【特許文献 1 2】国際公開第 W O 0 1 / 9 2 5 7 9 号パンフレット

【特許文献 1 3】米国特許第 5 , 8 3 0 , 7 1 1 号明細書

【特許文献 1 4】米国特許第 6 , 0 2 7 , 8 8 9 号明細書

【特許文献 1 5】米国特許第 5 , 6 8 6 , 2 4 3 号明細書

【特許文献 1 6】国際公開第 W O 0 0 5 6 9 2 7 A 3 号パンフレット

50

- 【特許文献 17】国際公開第 WO 98 03673 A1 号パンフレット
- 【特許文献 18】米国特許第 7,294,503 号明細書
- 【特許文献 19】米国特許出願公開第 20100022414 号明細書
- 【特許文献 20】米国特許出願公開第 20110000560 号明細書
- 【特許文献 21】米国特許第 4,458,066 号明細書
- 【特許文献 22】米国特許出願公開第 20100178655 号明細書
- 【特許文献 23】米国特許第 7,118,910 号明細書
- 【特許文献 24】米国特許第 5,723,591 号明細書
- 【特許文献 25】米国特許第 5,945,283 号明細書
- 【特許文献 26】国際公開第 WO 97/22719 号パンフレット 10
- 【特許文献 27】米国特許第 6,706,471 号明細書
- 【特許文献 28】米国特許第 6,174,670 号明細書
- 【特許文献 29】米国特許第 6,472,156 号明細書
- 【特許文献 30】米国特許第 6,569,627 号明細書
- 【特許文献 31】米国特許第 5,736,333 号明細書
- 【特許文献 32】米国特許第 5,928,907 号明細書
- 【特許文献 33】米国特許第 6,015,674 号明細書
- 【特許文献 34】国際公開第 WO 03/006677 号パンフレット
- 【特許文献 35】米国特許出願第 09/931,285 号明細書
- 【特許文献 36】国際公開第 WO 05107938 A2 号パンフレット 20
- 【特許文献 37】米国特許公出願開第 20050252773 A1 号明細書
- 【特許文献 38】米国特許公出願開第 20080108063 号明細書
- 【特許文献 39】米国出願第 12/170,414 号明細書
- 【特許文献 40】米国出願第 61/166,105 号明細書
- 【特許文献 41】米国出願第 61/605,016 号明細書
- 【特許文献 42】米国特許第 6,960,437 号明細書
- 【特許文献 43】米国特許第 6,899,137 号明細書
- 【特許文献 44】米国特許第 6,767,706 号明細書
- 【特許文献 45】米国特許第 6,752,922 号明細書
- 【特許文献 46】米国特許第 6,408,878 号明細書 30
- 【特許文献 47】米国特許第 6,645,432 号明細書
- 【特許文献 48】米国特許出願公開第 2004/0115838 号明細書
- 【特許文献 49】米国特許出願公開第 2005/0072946 号明細書
- 【特許文献 50】米国特許出願公開第 2005/0000900 号明細書
- 【特許文献 51】米国特許出願公開第 2002/0127736 号明細書
- 【特許文献 52】米国特許出願公開第 2002/0109114 号明細書
- 【特許文献 53】米国特許出願公開第 2003/0138829 号明細書
- 【特許文献 54】米国特許出願公開第 2002/0164816 号明細書
- 【特許文献 55】国際公開第 WO 2005/084191 号パンフレット
- 【特許文献 56】国際公開第 WO 05/030822 A2 号パンフレット 40
- 【特許文献 57】国際公開第 WO 01/01025 号パンフレット
- 【非特許文献】
- 【0005】
- 【非特許文献 1】Berger および Kimmel (1987) METHODS IN ENZYMOLOGY、152巻: GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES、San Diego: Academic Press, Inc.
- 【非特許文献 2】Sambrookら (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、2版、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory 50

【非特許文献3】AndersonおよびYoung、Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (1985)

【非特許文献4】Ausbelら; PCR Primer: A Laboratory Manual、Difffenbach編、Cold Spring Harbor Press (1995)

【非特許文献5】The Electronic Protocol Book、Chang Bioscience (2002)

【非特許文献6】Msuihら、J. Clin. Micro. 34: 501~07 (1996)

10

【非特許文献7】The Nucleic Acid Protocols Handbook、R. Rapley編、Humana Press、Totowa、N.J. (2002)

【非特許文献8】Abramsonら、Curr Opin Biotechnol. 1993年2月; 4(1): 41~7

【非特許文献9】Dayら、Genomics、29(1): 152~162 (1995)

【非特許文献10】Ehrlichら、Science 252: 1643~50 (1991)

【非特許文献11】Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press (1990)

20

【非特許文献12】Favisら、Nature Biotechnology 18: 561~64 (2000)

【非特許文献13】Rabenauら、Infection 28: 97~102 (2000)

【非特許文献14】Belgrader、Barany、およびLubin、Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay、Sixth International Symposium on Human Identification、1995 (ワールドワイドウェブ: promega.com/geneticidproc/usssymp6proc/blegrad.html - で入手可能)

30

【非特許文献15】LCR Kit Instruction Manual、Cat. #200520、Rev. #050002、Stratagene、2002

【非特許文献16】Barany、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 188~93 (1991)

【非特許文献17】BiおよびSambrook、Nucl. Acids Res. 25: 2924~2951 (1997)

【非特許文献18】Zirviら、Nucl. Acid Res. 27: e40i~vi (1999)

40

【非特許文献19】Deanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5261~66 (2002)

【非特許文献20】BaranyおよびGelfand、Gene 109: 1~11 (1991)

【非特許文献21】Walkerら、Nucl. Acid Res. 20: 1691~96 (1992)

【非特許文献22】Polstraら、BMC Inf. Dis. 2: 18 - (2002);

【非特許文献23】Lageら、Genome Res. 2003年2月; 13(2): 294~307

50

- 【非特許文献24】Landegrenら、Science 241:1077~80(1988)
- 【非特許文献25】Demidov, V.、Expert Rev Mol Diagn. 2002年11月; 2(6):542~8
- 【非特許文献26】Cookら、J Microbiol Methods. 2003年5月; 53(2):165~74
- 【非特許文献27】Schweitzerら、Curr Opin Biotechnol. 2001年2月; 12(1):21~7
- 【非特許文献28】Allcockら(Contemporary Polymer Chemistry、2版) 10
- 【非特許文献29】RozenおよびSkaletsky(2000)Meth. Mol. Biol.、132:365~386
- 【非特許文献30】www.broad.mit.edu/node/1060
- 【非特許文献31】Roche UPLウェブサイト
- 【非特許文献32】Narangら(1979)Meth. Enzymol. 68:90~99
- 【非特許文献33】Bownら(1979)Meth. Enzymol. 68:109~151
- 【非特許文献34】Beaucageら(1981)Tetra. Lett.、22:1859~1862 20
- 【非特許文献35】Heidら、1996年、Real-time quantitative PCR Genome Res. 6:986~94
- 【非特許文献36】Piatekら、1998年、Nat. Biotechnol. 16:359~63
- 【非特許文献37】TyagiおよびKramer、1996年、Nat. Biotechnology 14:303~308
- 【非特許文献38】Tyagiら、1998年、Nat. Biotechnol. 16:49~53(1998)
- 【非特許文献39】Thelwelら、2000年、Nucleic Acids Research、28:3752~3761 30
- 【非特許文献40】Solinassら、2001年、「Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications」、Nucleic Acids Research 29:20
- 【非特許文献41】Neri, B. P. ら、Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis 3826:117~125、(2000)
- 【非特許文献42】Landegrenら、2003年、Padlock and proximity probes for *in situ* and array-based analyses: tools for the post-genomic era, Comparative and Functional Genomics 4:525~30 40
- 【非特許文献43】Nilssonら、2006年、Analyzing genes using closing and replicating circles Trends Biotechnol. 24:83~8
- 【非特許文献44】Nilssonら、1994年、Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection、Science 265:2085~8
- 【非特許文献45】Zhuら、1994年、Anal. Chem. 66:1941~48
- 【非特許文献46】M. Marguliesら(2005)「Genome sequencing in microfabricated high-density pi 50

colitre reactors」*Nature* 437:376から380
 【非特許文献47】J. Shendureら(2005)「Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome」*Science* 309(5741):1728~1732

【非特許文献48】I. Braslavskyら(2003)「Sequence information can be obtained from single DNA molecules」*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:3960~3964

【非特許文献49】M. Ronaghiら(1996)「Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release」*Analytical Biochemistry* 242:84~89

【非特許文献50】Fluorescence Spectroscopy (Pesceら編) Marcel Dekker, New York(1971)

【非特許文献51】Whiteら、Fluorescence Analysis: A Practical Approach, Marcel Dekker, New York, (1970)

【非特許文献52】Berlman、Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules、第2版、Academic Press, New York, (1971)

【非特許文献53】Griffiths、Colour and Constitution of Organic Molecules, Academic Press, New York(1976)

【非特許文献54】Indicators (Bishop編)、Pergamon Press, Oxford, 19723

【非特許文献55】Haugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Eugene(1992)

【非特許文献56】Ungerら(2000)、*Science* 288:113~116

【非特許文献57】Quake & Scherer、2000年、「From micro to nanofabrication with soft materials」、*Science* 290:1536~40

【非特許文献58】Ungerら、2000年、「Monolithic micro fabricated valves and pumps by multilayer soft lithography」、*Science* 288:113~116

【非特許文献59】Thorsenら、2002年、「Microfluidic large-scale integration」、*Science* 298:580~584

【非特許文献60】Chouら、2000年、「Microfabricated Rotary Pump」、*Biomedical Microdevices* 3:323~330

【非特許文献61】Liuら、2003年、「Solving the “world-to-chip” interface problem with a microfluidic matrix」、*Analytical Chemistry* 75、4718~23

【非特許文献62】Hongら、2004年、「A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel arc

10

20

30

40

50

h i t e c t u r e 」、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 2 : 4 3 5 ~ 3
9

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

様々な態様では、本明細書で企図される本発明は、下記の実施形態のいずれか1つまたは複数を含んでもよく、しかしながら、それらに限定される必要はない。

【0007】

実施形態1：複数の粒子中の単粒子をアッセイする方法において：(a)前記複数の粒子を個別の反応容積で捕捉して、それぞれが1つの粒子のみを含有する複数の個別の反応容積を生成するステップと；(b)それぞれ個別の反応容積にある各粒子に対して複数の反応を行って、各粒子ごとに複数の反応生成物を生成し、少なくとも1種の反応生成物が、標的核酸に添加されかつ反応生成物の供給源であった反応容積の同一性をコード化するヌクレオチド配列を含んでいるサブステップ、および反応生成物を解析して、前記結果を得るサブステップを含む、各粒子ごとに複数のパラメーターをアッセイするステップと；(c)アッセイの結果を各粒子に関連付けて、個別の反応容積にある前記複数の粒子中の各粒子ごとに複数のパラメーターを含むデータ集合を生成するステップとを含む、複数の粒子中の単粒子をアッセイする方法。

【0008】

実施形態2：パラメーターの少なくとも1つが、それぞれ個別の反応容積でアッセイされる、実施形態1に記載の方法。

【0009】

実施形態3：個別の反応容積の内容物が回収される、実施形態1または2に記載の方法。

【0010】

実施形態4：それぞれ1つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも35%であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、実施形態1から3のいずれかに記載の方法。

【0011】

実施形態5：それぞれ1つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも50%であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、実施形態1から4のいずれかに記載の方法。

【0012】

実施形態6：それぞれ1つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも65%であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、実施形態1から5のいずれかに記載の方法。

【0013】

実施形態7：それぞれ1つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも85%であるように、前記捕捉するステップを最適化するステップをさらに含む、実施形態1から6のいずれかに記載の方法。

【0014】

実施形態8：個別の反応容積が、マイクロ流体デバイスの個々のコンパートメント内に存在する、実施形態1から7のいずれかに記載の方法。

【0015】

実施形態9：粒子が、前記複数の反応を行うための1種または複数種の試薬を添加する前に、個別の反応容積に捕捉される、実施形態1～8のいずれかに記載の方法。

【0016】

実施形態10：粒子が細胞である、実施形態1から9のいずれかに記載の方法。

【0017】

実施形態11：粒子が、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、およびこれらの組合せか

10

20

30

40

50

ら選択される、実施形態 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【0018】

実施形態 12 : 40,000 個よりも少ない粒子がこの方法で用いられる、実施形態 1 から 11 のいずれかに記載の方法。

【0019】

実施形態 13 : 10,000 個よりも少ない粒子がこの方法で用いられる、実施形態 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

【0020】

実施形態 14 : 個別の反応容積内に分布した粒子の数が 10 個よりも多く、100 個よりも多く、または 1000 個よりも多い、実施形態 1 から 13 のいずれかに記載の方法。

10

【0021】

実施形態 15 : 前記捕捉するステップが、限界希釈により行われる、実施形態 1 ~ 3 または 8 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【0022】

実施形態 16 : 限界希釈が : 粒子懸濁液の連続希釈物を調製するステップと ; 各希釈物から、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に粒子を分布するステップと ; 各コンパートメント内の粒子の数を決定するステップと ; 個別の反応容積で単粒子を捕捉する際に使用される、単粒子のみ含む最も多い数のコンパートメントを生成する希釈物を選択するステップとを含む、実施形態 15 に記載の方法。

20

【0023】

実施形態 17 : 各コンパートメントの粒子の数が、明視野顕微鏡法または蛍光顕微鏡法により決定される、実施形態 16 に記載の方法。

【0024】

実施形態 18 : 染色剤、色素または標識を用いて、それぞれ個別の反応容積内の粒子の数を検出する、実施形態 16 に記載の方法。

【0025】

実施形態 19 : 粒子が細胞であり、染色剤、色素または標識が、膜透過性の染色剤、色素または標識である、実施形態 18 に記載の方法。

【0026】

実施形態 20 : 粒子が細胞であり、それぞれ個別の反応容積内の細胞の数を検出するのに細胞膜透過性核酸色素が用いられる、実施形態 18 に記載の方法。

30

【0027】

実施形態 21 : 粒子が細胞であり、染色剤、色素または標識が、細胞表面染色剤、色素または標識である、実施形態 18 に記載の方法。

【0028】

実施形態 22 : 粒子が細胞であり、それぞれ個別の反応容積内の細胞の数を検出するのに、細胞表面マーカーに特異的な標識抗体が用いられる、実施形態 18 に記載の方法。

【0029】

実施形態 23 : 前記捕捉するステップが、マイクロ流体デバイス内の複数の捕捉部位での機械的捕捉を含む、実施形態 1 から 22 のいずれかに記載の方法。

40

【0030】

実施形態 24 : 各捕捉部位が : 1 つの粒子のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と ; 捕捉形体が粒子によって占有されていない場合に、捕捉部位内に流体を流すことが可能なドレン形体とを含む、実施形態 23 に記載の方法。

【0031】

実施形態 25 : マイクロ流体デバイスが、粒子の流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、実施形態 23 に記載の方法。

【0032】

実施形態 26 : 親和性に基づく捕捉を含み、かつ粒子成分に結合する結合パートナーを用いる、実施形態 1 から 25 のいずれかに記載の方法。

50

【0033】

実施形態27：結合パートナーが、マイクロ流体デバイスの別々の領域に添着され、それぞれ別々の領域は1つの粒子のみを結合可能にする、実施形態26に記載の方法。

【0034】

実施形態28：前記親和性に基づく捕捉が：マイクロ流体デバイス内の複数の捕捉部位に結合パートナーを含む支持体を捕捉して、各捕捉部位に固定化された支持体を生成するステップであって、それぞれ固定化された支持体が、1つの粒子のみをそれぞれ固定化された支持体に結合可能とするように結合パートナーを呈示するステップと；粒子を、固定化された支持体上の結合パートナーに結合するステップとを含む、実施形態26に記載の方法。

10

【0035】

実施形態29：支持体が、機械的捕捉によって捕捉される、実施形態28に記載の方法。

【0036】

実施形態30：各捕捉部位が：1つの支持体のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と；捕捉形体が支持体によって占有されていない場合に、捕捉部位内に流体を流すことが可能なドレイン形体とを含む、実施形態28に記載の方法。

【0037】

実施形態31：マイクロ流体デバイスが、支持体および／または粒子の流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、実施形態28に記載の方法。

20

【0038】

実施形態32：各捕捉部位が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に位置付けられる、実施形態23～25および27～31のいずれかに記載の方法。

【0039】

実施形態33：前記捕捉するステップが、粒子を含む溶液をマイクロ流体デバイスのコンパートメントに通すサブステップを含み、それによってコンパートメントの35%以上が単粒子のみを含む、実施形態32に記載の方法。

【0040】

実施形態34：個別の反応容積がマイクロ流体デバイスの個々のコンパートメント内に存在し、それぞれ個別の反応容積内の粒子の数を決定するステップと；粒子を含有しないまたは単粒子より多い粒子を含有する任意の反応容積からの結果を無視するステップとを含む、実施形態1から33のいずれかに記載の方法。

30

【0041】

実施形態35：前記回収するステップが、個別の反応容積から反応生成物を個別に回収するサブステップを含む、実施形態3～34のいずれかに記載の方法。

【0042】

実施形態36：前記回収するステップが、複数の個別の反応容積から反応生成物をプールするサブステップを含む、実施形態3～34のいずれかに記載の方法。

【0043】

実施形態37：少なくとも1つのアッセイが、DNA配列の検出；RNA配列の検出；タンパク質、炭水化物、脂質、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される分子の検出；小分子の検出；活性の検出；イオン濃度の検出；イオンポテンシャルの検出；およびレドックス電位の検出から選択される、実施形態1から36のいずれかに記載の方法。

40

【0044】

実施形態38：反応が、DNAの増幅、ヌクレアーゼによるDNAの消化、DNAのライゲーション、DNA分子上へのアダプター配列のライゲーション、DNA分子内へのトランスポゾンのトランスポザーゼ媒介型組込み、DNA配列決定、RNAの逆転写、RNAの増幅、およびRNaseによるRNAの消化から選択される1つまたは複数の反応を含む、実施形態1から37のいずれかに記載の方法。

50

【0045】

実施形態39：反応が、全ゲノム増幅および／または全トランスクリプトーム増幅を含む、実施形態1から38のいずれかに記載の方法。

【0046】

実施形態40：少なくとも1種の反応生成物が、少なくとも2つの増幅プライマーを使用する核酸増幅を含む反応によって生成され、各増幅プライマーは、反応生成物の供給源であった反応容積の同一性をコード化するバーコード配列とバーコード配列の組合せを含む、実施形態1から39のいずれかに記載の方法。

【0047】

実施形態41：核酸増幅が、1対のインナープライマーおよび1対のアウタープライマーを使用し：インナープライマーは：第1のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列および標的特異的部分を含む順方向インナープライマーと；標的特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列および第2のヌクレオチドタグを含む逆方向インナープライマーとを含み；アウタープライマーは：第2のバーコードヌクレオチド配列および第1のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向アウタープライマーと；第2のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーとを含み；アウタープライマーはインナープライマーよりも過剰であり；核酸増幅は、5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3'を含むアンプリコンを生成する、実施形態40に記載の方法。

10

20

30

【0048】

実施形態42：核酸増幅が、1対のインナープライマーと、1対のスタッファープライマーと、1対のアウタープライマーとを使用し：インナープライマーは：第1のヌクレオチドタグおよび標的特異的部分を含む順方向インナープライマーと；標的特異的部分および第2のヌクレオチドタグを含む逆方向インナープライマーとを含み；スタッファープライマーは：第3のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列および第1のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向スタッファープライマーと；第2のヌクレオチドタグ特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列、第4のヌクレオチドタグを含む逆方向スタッファープライマーとを含み；アウタープライマーは：第2のバーコードヌクレオチド配列および第3のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向アウタープライマーと；第4のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーとを含み；アウタープライマーは、インナープライマーよりも過剰なスタッファープライマーよりも過剰であり；核酸増幅は、5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第3のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第4のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3'を含むアンプリコンを生成する、実施形態40に記載の方法。

30

【0049】

実施形態43：個別の反応容積が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメントであり、個別のコンパートメントが、行および列によって画定されたアレイとして並べられており、各アンプリコンにおける第1および第2のバーコードの組合せが、アンプリコンの供給源であったコンパートメントの行および列を特定する、実施形態41に記載の方法。

40

【0050】

実施形態44：前記回収するステップが、行におけるまたは列におけるコンパートメントからアンプリコンをプールするサブステップを含む、実施形態43に記載の方法。

【0051】

実施形態45：アウタープライマーが、DNA配列決定プライマーにより結合することが可能な第1および第2のプライマー結合部位をさらに含み、核酸増幅が、5' - 第1の

50

プライマー結合部位 - 第 2 のバーコードヌクレオチド配列 - 第 1 のヌクレオチドタグ配列 - 第 1 のバーコードヌクレオチド配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第 1 のバーコードヌクレオチド配列 - 第 2 のヌクレオチドタグ配列 - 第 2 のバーコードヌクレオチド配列 - 第 2 のプライマー結合部位 - 3' を含むアンプリコンを生成する、実施形態 4 1 に記載の方法。

【 0 0 5 2 】

実施形態 4 6 : 前記解析するステップが、增幅生成物を配列決定するサブステップを含む、実施形態 4 5 に記載の方法。

【 0 0 5 3 】

実施形態 4 7 : 複数の反応が無傷の粒子上で行われる、実施形態 1 から 4 6 のいずれかに記載の方法。

10

【 0 0 5 4 】

実施形態 4 8 : 複数の反応が、崩壊した粒子上で行われる、実施形態 1 から 4 7 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 5 】

実施形態 4 9 : 複数の反応が、溶解した細胞上で行われる、実施形態 1 から 4 8 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 6 】

実施形態 5 0 : 粒子が、複数の反応を行う前に、生体応答を誘発する薬剤で処理される、実施形態 1 から 4 9 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 7 】

実施形態 5 1 : 各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた 1 種または複数種の標的核酸の存在または量を決定するステップを含む、実施形態 1 から 5 0 のいずれかに記載の方法。

20

【 0 0 5 8 】

実施形態 5 2 : 各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた 1 つまたは複数の DNA 分子のコピー数を決定するステップを含む、実施形態 1 から 5 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 9 】

実施形態 5 3 : 各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた 1 つまたは複数の座位での遺伝子型を決定するステップを含む、実施形態 1 から 5 2 のいずれかに記載の方法。

30

。

【 0 0 6 0 】

実施形態 5 4 : 各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた複数の座位に関するハプロタイプを決定するステップを含む、実施形態 1 から 5 3 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 6 1 】

実施形態 5 5 : 各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた 1 つまたは複数の RNA 分子の発現レベルを決定するステップを含む、実施形態 1 から 5 4 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 6 2 】

実施形態 5 6 : 各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた 1 つまたは複数の RNA 分子のヌクレオチド配列を決定するステップを含む、実施形態 1 から 5 5 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 6 3 】

実施形態 5 7 : 各粒子の内部にあるまたは各粒子に関連付けられた 1 種または複数種のタンパク質の発現レベルを決定するステップを含む、実施形態 1 から 5 6 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 6 4 】

実施形態 5 8 : 解析の結果が : 表現型に相關する 2 つ以上のコピー数多型 ; 表現型に相關する 2 つ以上の突然変異 ; または一緒にになって表現型に相關する、少なくとも 1 つのコピー数多型および少なくとも 1 つの突然変異の存在を示す、実施形態 1 から 5 7 のいずれ

40

50

かに記載の方法。

【0065】

実施形態59：表現型が、疾患のリスク、存在、重症度、予後、および特定の療法に対する応答性からなる群から選択される、実施形態58に記載の方法。

【0066】

実施形態60：表現型が、薬物に対する耐性を含む、実施形態59に記載の方法。

【0067】

実施形態61：解析の結果が、ゲノム組換えの出現を示す、実施形態1から60のいずれかに記載の方法。

【0068】

実施形態62：解析の結果が、特定のスプライスバリエントの共発現を示す、実施形態1から61のいずれかに記載の方法。

【0069】

実施形態63：解析の結果が、B細胞内での特定の軽鎖および重鎖の共発現を示す、実施形態1から62のいずれかに記載の方法。

【0070】

実施形態64：解析の結果が、特定の宿主細胞における特定の病原体の存在を示す、実施形態1から63のいずれかに記載の方法。

【0071】

実施形態65：基質上の捕捉部位に結合パートナーを含む支持体を捕捉して、捕捉部位に固定化された支持体を生成するステップであって、結合パートナーが粒子成分を結合し、固定化された支持体が、それぞれ固定化された支持体に1個の粒子のみを結合可能とするように結合パートナーを呈示するステップと；固定化された支持体上で結合パートナーに粒子を結合するステップとを含む、単粒子を単離する方法。

【0072】

実施形態66：捕捉するステップが、支持体の機械的捕捉を含む、実施形態65の方法。

。

【0073】

実施形態67：捕捉部位が：1つの支持体のみを含有するようにサイズ決めされた捕捉形体と；捕捉形体が支持体によって占有されていない場合、捕捉部位内に流体を流すことが可能なドレン形体とを含む、実施形態65に記載の方法。

【0074】

実施形態68：基質が、流れを各捕捉部位に集束させる集束形体を含む、実施形態65に記載の方法。

【0075】

実施形態69：基質が複数の捕捉部位を含む、実施形態65～68のいずれかに記載の方法。

【0076】

実施形態70：各捕捉部位が、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に位置付けられる、実施形態69に記載の方法。

【0077】

実施形態71：粒子を含む溶液を、マイクロ流体デバイスのコンパートメント内に通すステップを含み、それによってコンパートメントの35%以上が単粒子のみを含む、実施形態70に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】オンチッププロセスを示す、細胞取扱い（「M A 0 0 6」）に適応させたマイクロ流体デバイス用の単位セルアーキテクチャーの概略図である。

【図2】個別の反応容積（マイクロ流体デバイスの「チャンバー」、または「チップ」）当たり単一細胞を得るための、細胞懸濁液の限界希釈の使用を示す図である。様々な細胞

10

20

30

40

50

密度に関する理論的分布（ポアソン分布）が示されている。

【図3A】撮像に明視野を使用したチップ内の細胞計数の結果（A）を示す図である。

【図3B】理論的分布（B）を示す図である。明視野撮像に基づくチップ内の細胞密度は、ポアソン分布に近いがそれよりも低く、この傾向は、細胞密度が高くなるほど悪くなる。

【図4A】蛍光細胞「ゴースト」画像（A）である。「ゴースト」画像（A）は、プレPCR明視野撮像よりも多くの細胞を検出できる。

【図4B】細胞密度は、ポアソン分布（B）に、より緊密に近似することを示す図である。

【図5】使用することができるチップ内の細胞を検出するための特定の方法は、例えば、細胞膜透過核酸染色剤、および／または抗体を用いた細胞特異的表面マーカー検出の使用を含むことを示す図である。これらのより特異的な手法の結果を、 $1 \times 10^6 / \text{m}^1$ の細胞密度に関して示す。

【図6A】ポストRT-PCRゴースト画像（細胞ゴースト）に対する、チップ内の細胞を検出するためのpre-RT-PCR核酸染色剤（Syto10 DNA染色剤）の使用の比較を示す図である。

【図6B】Syto10は、隙間DHのRT-PCRを阻害しない。

【図7】0.5%Tween20または0.5%NP40（後者は、細胞溶解試薬である。）の存在下で実施された隙間DHのRT-PCRを示す図である。どちらも隙間DHのRT-PCRを著しく阻害しなかった。

【図8】MA006チップで実施された、11遺伝子の標準曲線增幅を示す図である。これらの結果は、Cell1sDirect（商標）ワンステップqRT-PCRキットを0.5%NP40（細胞溶解用、およびチップ内での過減作用を防止するため）と共に使用して、細胞内の遺伝子特異的RNAをMA006チップ内のアンプリコンに変換することができることを実証する。

【図9】4プライマー組合せバーコード化方法を用いて、2つのバーコードの組合せを各アンプリコンの両端に置いた状態を示す図である。インナープライマーは、標的特異的部分（順方向プライマーの「TS-F」および逆方向プライマーの「TS-R」）、バーコードヌクレオチド配列（「bc2」）、および異なるヌクレオチドタグを含む。アウタープライマーは、タグ特異的部分（「CS1」および「CS2」）、異なるバーコードヌクレオチド配列（「bc1」）、配列決定プライマー用のプライマー結合部位（「A」および「B」）を含む。

【図10A】4プライマーバーコード化を、MA006などのチップ上でどのように実施できるかを示す図である。増幅は、インナープライマーを用いてオンチップで実施され、チャンバーの各行は、同じバーコードを持つ同じインナープライマー対を有する。

【図10B】4プライマーバーコード化を、MA006などのチップ上でどのように実施できるかを示す図である。チャンバーの各列からの反応生成物をプールとして採取し、各プールを、異なるアウタープライマー対を使用した増幅に供することができる。この増幅は、初期増幅が実施されたチャンバーを一意的に特定する（行および列により）アンプリコンのいずれかの端部にバーコードの組合せを有するアンプリコンを生成する。

【図11】各遺伝子特異的アンプリコン（赤）に関して読み取られた数として表される、単一細胞（実施例1）から遺伝子特異的アンプリコンの配列決定することにより得られた結果を、全RNAに関する結果と比較した図である。この図から明らかなように、これらのRNAの表現は、全RNAで観察された場合に比べ、個々の細胞で測定された場合に異なる。

【図12A】捕捉形体およびドレインを有する捕捉部位を示す図である。流れを集束させるバッフルがない部位である。

【図12B】捕捉形体およびドレインを有する捕捉部位を示す図である。バッフルを備えた部位である。

【図13】追加の捕捉部位のデザインが、図13に示される通りであることを示す図であ

10

20

30

40

50

る。

【図14A】捕捉アーキテクチャーは、細胞が表面マーカーに接触するようになる可能性を最大限にるように設計できることを示す図である。例えば、1つまたは複数のチャネル壁上のバッフルを使用して、ビーズを捕捉形体に向けることができる。例示的な捕捉形体／バッフルの組合せ。

【図14B】捕捉アーキテクチャーは、細胞が表面マーカーに接触するようになる可能性を最大限にないように設計できることを示す図である。例えば、1つまたは複数のチャネル壁上のバッフルを使用して、ビーズを捕捉形体に向けることができる。捕捉形体の性能は、バッフルの角度、捕捉部位からバッフルまでの距離、バッフルの長さ、捕捉形体のサイズおよび形状、捕捉形体のドレイン（存在する場合）のサイズを含めた1つまたは複数の変数を調節することによって、調節することができる。チャネル壁上のバッフルは、ビーズを捕捉形体に向けるのに使用される。

【図14C】捕捉アーキテクチャーは、細胞が表面マーカーに接触するようになる可能性を最大限にないように設計できることを示す図である。例えば、1つまたは複数のチャネル壁上のバッフルを使用して、ビーズを捕捉形体に向けることができる。捕捉形体は、チャネル壁上のバッフルに連結され；個々の捕捉形体／バッフルの組合せを、交互に配された壁上に位置付けて、流れを調節捕捉形体／バッフルの組合せに集束させることができる。

【図15A】単粒子（例えば、細胞）が捕捉されるように親和性試薬（例えば、抗体）を後で示す、単一の親和性試薬でコーティングされたビーズを捕えるのに、捕捉形体を使用するための方策を示す図である。（A-1）流れは、捕捉形体を含有するチャネル内で開始する。（A-2）抗体結合ビーズは、ビーズが捕捉形体に留まるまで、捕捉形体に向かって流れる。（A-3）次いでチャネルを洗浄して、捕捉されていないビーズを除去する。

【図15B】単粒子（例えば、細胞）が捕捉されるように親和性試薬（例えば、抗体）を後で示す、単一の親和性試薬でコーティングされたビーズを捕えるのに、捕捉形体を使用するための方策を示す図である。（B-1）抗体が結合する細胞表面マーカーを保持する細胞は、捕捉ビーズを含有するチャネルに流入する。（B-2）マーカーを保持する細胞は、捕捉されたビーズにより呈示される抗体と相互に作用し結合する。呈示領域は、結合された細胞によって、ただ1つの細胞が各捕捉ビーズに結合するように、立体閉塞を通してその他の細胞が捕捉ビーズと相互作用しないようサイズ決めされる。（B-3）次いでチャネルを洗浄して、結合していない細胞を除去し、各捕捉部位に固定化した1つの細胞を残す。

【図16A】（A）別々の場所（ニッチ）で単一細胞を捕捉するように設計されたマイクロ流体デバイスを概略的に示す図である。単一細胞の捕捉によって、単一細胞レベルでの生物学的事象の解析が可能になる。

【図16B】（B）流れは、オーバーフローチャネル内よりもニッチ上でより強力になるように設計される。ニッチは、狭い隙間（約3μmの高さ）を含有する。細胞がニッチに進入すると、ニッチは遮断され、ニッチ内には、もはや流入しないようになれる。流れは、やはり細胞によって遮断されるまで、次に占有されていないニッチ内を通過する。全てのニッチは、細胞がオーバーフローチャネル内を通過して廃棄物として出て行く前に、1つの細胞を捕捉すべきである。

【図16C】（C）下記（D）～（F）に提示される追加の詳細が示された（A）を、概略的に示す図である。

【図16D】（D）緩衝液入口は細胞入口と共に収束して、細胞が、一連の横断細胞捕捉チャネルに最も近いフィーダーチャネルの側面に押しつけられるようになれる。

【図16E】細胞オーバーフローチャネル内に対し、ニッチ内への細胞の優先的な流れを誘発させる横断細胞捕捉チャネルの抵抗は、細胞オーバーフローチャネルの場合よりも低い。

【図16F】（E）各ニッチは、ただ1つの細胞を捕捉するのに十分大きい。ニッチ内の

10

20

30

40

50

細胞は、特定の回路の抵抗を上昇させ、流れを、細胞のない回路に向ける。

【図16G】(F)(A)の実際のデバイスは、ニッチ内に位置付けられた、捕捉されたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0079】

ある実施形態では、本発明は、少なくとも2つのパラメーターが各粒子ごとに測定される、粒子の集団中の単粒子をアッセイするための方法およびデバイスを提供する。1つまたは複数のパラメーターは、粒子が個別の反応容積内にある間に測定することができる。あるいは、またはさらに、1つまたは複数のパラメーターは、後の解析ステップで測定することができ、例えば反応が個別の反応容積で実施されかつ反応生成物は回収され解析される場合に測定することができる。特定の実施形態では、1つまたは複数のパラメーターの測定は、「並行して」、即ち個別の反応容積内で本質的に同時に実施される。この方法は、全体として集団から得られた測定値に勝る、いくつかの利点をもたらす。特に、本明細書に記述される方法によれば、パラメーター、例えば、2つの遺伝子が同じ細胞内で発現することを決定することができない集団測定とは対照的に、個々の細胞での発現レベルを決定することができない集団測定とは対照的に、個々の細胞での2つの遺伝子の発現レベルを測定することができる。これは、細胞の不均質集団を特徴付けかつ/または均質集団内の細胞表現型の範囲を決定するのに役立つ。単粒子解析の結果を、アッセイがなされた各粒子に関連付ける能力を活用することができ、例えば2つ以上のパラメーターが表現型に関連付けられる。測定された2つ以上のパラメーターは、異なるタイプのパラメーター、例えばRNA発現レベルおよびヌクレオチド配列とすることができます。本明細書に記述される単一細胞解析法のさらなる適用例を、以下に記述する。

10

20

30

40

50

【0080】

方法は、個別の反応容積内の集団の粒子を捕捉して、それぞれ1個の粒子のみを含有する複数の個別の反応容積を生成するステップを必要とする。例示的な実施形態では、個別の反応容積は、例えば本明細書に記述されるもののいずれかなど、マイクロ流体デバイスの個々のコンパートメント内に存在する。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、特にマイクロ流体粒子解析システムの記述に関する、D arid onらの2004年1月18日に公開された米国特許出願公開第2004/0229349号明細書も参照されたい。複数のパラメーターが、各粒子ごとにアッセイされる。アッセイの結果を各粒子に関連付けて、個別の反応容積内にある集団中の各粒子ごとに複数のパラメーターを含むデータ集合を生成する。様々な実施形態では、パラメーターの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、またはそれ以上を、それぞれ個別の反応容積でアッセイする。

【0081】

ある実施形態では、パラメーターは、1種または複数種の反応生成物を生成するために、それぞれ個別の反応容積内で核酸增幅などの反応を行うことによってアッセイし、この生成物を解析して結果を得、次いでこの結果を粒子に関連付けて、データ集合に入力する。粒子は、1つまたは複数の反応を行うための1種または複数種の試薬に接触させる前に、個別の反応容積内で捕捉されてもよい。あるいは、またはさらに、粒子をそのような試薬の1種または複数種に接触させてよく、反応混合物を個別の反応容積内に分布させてよい。様々な実施形態では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、またはそれ以上の反応が、それぞれ個別の反応容積内で行われる。反応生成物の解析は、個別の反応容積内で実施することができる。しかし、いくつかの実施形態では、後続の解析のためにまたはその他の目的のために、個別の反応容積内の内容物を回収することが有利である。例えば、核酸增幅が個別の反応容積内で実施される場合、例えばPCRおよび/または核酸配列決定による後続の解析のために、内容物を回収することが望ましいと考えられる。個別の反応容積の内容物は個別に解析されてもよく、その結果は、当初の反応容積内に存在する粒子に関連付けられる。あるいは、粒子/反応容積の同一性を、例えばマルチプライマ-核酸增幅法に関して以下に論じられるように、反応生成物中でコード

化することができる。さらに、これら2つの方策は、個別の反応容積の集合がコード化されるように組み合わせることができ、したがって集合内の各反応容積は一意的に特定可能になり、次いでプールされ、次いで各プールが個別に解析されるようになる。

【0082】

(定義)

特許請求の範囲および明細書で使用される用語は、他に指定されない限り以下のように定義される。これらの用語は、明確にするために特に定義されるが、定義の全ては、当業者がこれらの用語をどのように理解し得るかに矛盾するものではない。

【0083】

「核酸」という用語はヌクレオチドポリマーを指し、他に限定しない限り、天然に生ずるヌクレオチドに類似した手法（例えば、ハイブリダイズする）で機能することができる天然のヌクレオチドの公知の類似体を含む。 10

【0084】

核酸という用語は、例えば、ゲノムDNA；通常はメッセンジャーRNA（mRNA）の逆転写によってまたは増幅によって得られる、mRNAのDNA表現である相補的DNA（cDNA）；合成によりまたは増幅によって生成されたDNA分子；およびmRNAを含めた、DNAまたはRNAの任意の形を含む。

【0085】

核酸という用語は、二本または三本鎖核酸および一本鎖分子を包含する。二本または三本鎖核酸において、核酸鎖は同一の拡がりを持つ必要がない（即ち、二本鎖核酸は、両方の鎖の全長にわたって二本鎖である必要はない。） 20

【0086】

両方の鎖の全長に沿って二本鎖ではない二本鎖核酸は、本明細書で「粘着末端」または「尾部配列」と呼ばれる5'または3'伸長部を有する。「粘着末端」という用語は、制限酵素によって生成されたものなど、比較的短い5'または3'伸長を指すのにしばしば使用され、それに対して「尾部配列」という用語は、より長い5'または3'伸長部を指すのにしばしば使用される。

【0087】

核酸という用語は、メチル化および/またはキャッピングによるような、その任意の化学修飾も包含する。核酸修飾は、追加の電荷、分極率、水素結合、静電相互作用、および個々の核酸塩基または全体としての核酸に対する官能性を組み込む、化学基の付加を含むことができる。そのような修飾は、塩基修飾、例えば2' - 位糖修飾、5' - 位ピリミジン修飾、8 - 位プリン修飾、シトシン環外アミンでの修飾、5 - プロモ - ウラシルの置換、主鎖修飾、異常な塩基対の組合せ、例えばイソ塩基イソシチジンおよびイソグアニジンの組合せなどを含んでいてもよい。 30

【0088】

より具体的には、ある実施形態では、核酸は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2 - デオキシ - D - リボースを含む。）、ポリリボヌクレオチド（D - リボースを含有する。）、および任意のその他のタイプの核酸であって、プリンまたはピリミジン塩基のN - またはC - グリコシドである核酸、ならびに非ヌクレオチド主鎖を含有するその他のポリマー、例えばポリアミド（例えば、ペプチド核酸（PNA：peptide nucleic acids））およびポリモルホリノ（Neugeneとして、Antivirals, Inc.、Corvallis、Oregonから市販されている。）ポリマー、およびその他の合成配列特異的核酸ポリマーであって、DNAおよびRNAで見られるような塩基対合および塩基スタッキングが可能な核酸塩基を配置内に含有することを前提としたポリマーを含むことができる。核酸という用語は、それらLNAの開示に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,794,499号明細書、第6,670,461号明細書、第6,262,490号明細書、および第6,770,748号明細書に記載されている連結核酸（LNA：linked nucleic acids）も包含する。 40 50

【0089】

核酸は、固相媒介化学合成などの完全に化学的な合成プロセスから、または核酸を生成する任意の種からの単離を経たような生物学的供給源から、またはDNA複製、PCR増幅、逆転写などの分子生物学のツールによって核酸の操作を伴うプロセスから、またはそれらのプロセスの組合せから、誘導することができる。

【0090】

核酸分子内の要素の順序は、典型的には5'から3'と本明細書では記述される。二本鎖分子の場合、「上」鎖は、慣習に従い典型的には5'から3'と示され、要素の順序は、上鎖に関連して本明細書では記述される。

【0091】

「標的核酸」という用語は、本明細書に記述される方法で検出される特定の核酸を指すために、本明細書では使用される。

【0092】

本明細書で使用される「標的ヌクレオチド配列」という用語は、例えば、標的核酸の増幅によって得られた増幅生成物またはRNA標的核酸の逆転写により生成されたcDNAなど、標的核酸のヌクレオチド配列を含む分子を指す。

【0093】

本明細書で使用される「相補的」という用語は、2種のヌクレオチド同士で精密に対応できる能力を指す。即ち、核酸の所与の位置にあるヌクレオチドが別の核酸のヌクレオチドと水素結合可能な場合、2種の核酸はその位置で互いに相補的であると見なされる。2つの一本鎖核酸分子同士の相補性は「部分的」であってもよく、この場合はヌクレオチドの一部のみが結合し、または全相補性が一本鎖分子同士の間に存在するときには完了することができる。核酸鎖同士の相補性の程度は、核酸鎖同士のハイブリダイゼーションの効率および強度に、著しい影響を及ぼす。

【0094】

「特異的ハイブリダイゼーション」は、定められたストリンジエンシー条件下、ハイブリダイゼーション混合物中に存在するその他のヌクレオチド配列との実質的な結合が存在しない状態での、核酸と標的ヌクレオチド配列との結合を指す。当業者には、ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーを緩和することによって配列ミスマッチが許容されることが、理解される。

10

20

30

【0095】

特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で実施される。「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」という文言は、定められたイオン強度およびpHでの、約5から約20の範囲の温度または特定の配列に関する融解温度(T_m)よりも25低い温度を、一般に指す。本明細書で使用される T_m は、二本鎖核酸分子の集団が半分解離して一本鎖になる温度である。核酸の T_m を計算するための方法は、当技術分野で周知である(例えば、参照により共に本明細書に組み込まれる、BergerおよびKimmel(1987)METHODS IN ENZYMOLOGY、152巻:GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES、San Diego:Academic Press, Inc.、およびSambrookら(1989)MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、2版、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratoryを参照)。標準の参考文献により示されるように、 T_m 値の簡単な推定値は、核酸が1M NaClの水溶液である場合、方程式: $T_m = 81.5 + 0.41(\%G + C)$ により計算することができる(例えば、AndersonおよびYoung、Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION(1985)参照)。ハイブリッドの融解温度(したがって、ストリンジエントなハイブリダイゼーションに関する条件)は、プライマーまたはプローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成物)と、標的核酸(溶液状態でまたは固定化された状態などで存在するDNA

40

50

、RNA、塩基組成物)の性質、ならびに塩およびその他の成分(例えばホルムアミド、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコールが存在しましたは存在しない。)の濃度など、様々な因子によって影響を受ける。これらの因子の影響は周知であり、当技術分野の標準の参考文献で論じられている。ほとんどの配列の特異的ハイブリダイゼーションを実現するのに適切な、例示的なストリンジエント条件は:少なくとも約60°の温度、およびpH7での約0.2モルの塩濃度である。

【0096】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、比較的短い核酸、一般には200ヌクレオチドよりも短い、より特別には100ヌクレオチドよりも短い、最も特別には50ヌクレオチドよりも短い核酸を指すのに使用される。典型的には、オリゴヌクレオチドは一本鎖DNA分子である。

10

【0097】

「アダプター」という用語は、使用中に核酸の一端または両端に付加されるようになる核酸を指すのに使用される。アダプターは、一本鎖、二本鎖であってもよく、または一本および二本鎖部分を含んでいてもよい。

【0098】

「プライマー」という用語は、適切な緩衝剤中および適切な温度で、適切な条件下(即ち、4種の異なるヌクレオシド三リン酸および重合させる薬剤、例えばDNAまたはRNAポリメラーゼまたは逆転写酵素の存在下)、核酸とハイブリダイズ(「アニール」とも言う。)させてヌクレオチド(RNAまたはDNA)重合の開始部位として働くことが可能な、オリゴヌクレオチドを指す。プライマーの適切な長さは、プライマーの意図される使用に依存するが、プライマーは、典型的には少なくとも7ヌクレオチド長であり、より典型的には10から30ヌクレオチドに及び、さらにより典型的にはその長さが15から30ヌクレオチドに及ぶ。その他のプライマーは、いくらか、より長くすることができ、例えば30から50ヌクレオチド長にすることができる。この文脈において、「プライマ-長」は、相補的「標的」配列にハイブリダイズしあつヌクレオチド合成をプライム処理するオリゴヌクレオチドまたは核酸の部分を指す。短いプライマー分子は、鋳型を用いて十分に安定したハイブリッド複合体を形成するのに、より低い温度を一般に必要とする。プライマーは、鋳型の正確な配列を反映する必要はないが、鋳型とハイブリダイズするのに十分相補的でなければならない。「プライマ-部位」または「プライマ-結合部位」という用語は、プライマーがハイブリダイズする標的核酸のセグメントを指す。

20

【0099】

プライマーは、プライマーまたはその一部が核酸内のヌクレオチド配列にハイブリダイズする場合、別の核酸にアニールすると言われる。プライマーが特定の核酸配列にハイブリダイズするという記述は、プライマーがそのヌクレオチド配列に完全にまたは排他的にハイブリダイズすることを示唆するものではない。例えば、ある実施形態では、本明細書で使用される增幅プライマーは、「ヌクレオチドタグにアニールする」と言われる。この記述は、ヌクレオチドタグに全体的にアニールするプライマー、ならびにヌクレオチドタグに部分的におよび隣接するヌクレオチド配列、例えば標的ヌクレオチド配列に部分的にアニールするプライマーを包含する。そのようなハイブリッドプライマーは、增幅反応の特異性を増大させることができる。

30

【0100】

本明細書で使用される、「標的核酸に対する実質的なアニーリングが回避されるような」プライマーの選択は、プライマーが、予想よりも短いアンプリコンを生成する標的核酸内のプライム処理から得られたアンプリコンとは対照的に、標的核酸の両端で予想される部位でのプライム処理から得られるという意味で、增幅後に検出されるアンプリコンの大部分が「全長」となるように選択されることを意味する。様々な実施形態では、プライマーは、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも

40

50

99%が全長であるように選択される。

【0101】

「プライマー対」という用語は、増幅されるDNA配列の5'末端の補体とハイブリダイズする5'、「上流プライマー」または「順方向プライマー」と、増幅される配列の3'末端とハイブリダイズする3'、「下流プライマー」または「逆方向プライマー」とを含む、一組のプライマーを指す。当業者に認識されるように、「上流」および「下流」または「順方向」および「逆方向」という用語は限定を意図するものではなく、むしろ特定の実施形態における例示的な向きを示すものである。

【0102】

2つのプライマー対が使用される実施形態では、例えば増幅反応では、それらの相対的な位置を示すために、プライマー対を「インナー」および「アウター」プライマー対と呼んでもよく；即ち、「インナー」プライマーは、アウタープライマーが組み込まれる位置の間にある位置で反応生成物（例えば、アンプリコン）中に組み込まれる。

【0103】

3つのプライマー対が使用される実施形態では、例えば増幅反応では、「スタッファープライマー」は、インナーおよびアウタープライマーの間に位置を有するプライマーを指すのに使用することができ；即ち、「スタッファー」プライマーは、インナーおよびアウタープライマーの間の中間の位置で反応生成物（例えば、アンプリコン）中に組み込まれる。

【0104】

「プローブ」は、1つまたは複数のタイプの化学結合を介して、一般には相補的な塩基対を介して、通常なら水素結合形成を介して相補的配列の標的核酸に結合することができる、したがって二重構造が形成される、核酸である。プローブは、「プローブ結合部位」に結合しましたハイブリダイズする。プローブは、特にプローブがその相補的標的にハイブリダイズすると、プローブの容易な検出が可能になるように、検出可能なラベルで標識することができる。しかし代わりに、プローブは標識されなくてもよいが、直接または間接的に標識された配位子との特異的結合によって検出可能にすることができる。プローブは、そのサイズを著しく変えることができる。一般に、プローブはその長さが少なくとも7から15ヌクレオチドである。その他のプローブは、少なくとも20、30または40ヌクレオチド長である。さらにその他のプローブは、いくらかより長く、少なくとも50、60、70、80または90ヌクレオチド長である。さらにその他のプローブは、さらに長く、少なくとも100、150、200、またはそれ以上のヌクレオチド長である。プローブは、上記の値のいずれか（例えば、その長さが15～20ヌクレオチド）により範囲が定められた任意の範囲内にある、任意の長さとすることもできる。

【0105】

プライマーまたはプローブは、好ましくは標的核酸配列に相補的とすることができる、または完全には相補的にならないものとすることができます。ある実施形態では、プライマーは、少なくとも7ヌクレオチドの配列にわたり、より典型的には10～30ヌクレオチドの範囲の配列にわたり、しばしば少なくとも14～25ヌクレオチドの配列にわたり、標的核酸配列の補体に対して少なくとも65%の同一性を有し、よりしばしば少なくとも75%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する。ある塩基（例えば、プライマーの3'塩基）は、標的核酸の配列の対応する塩基に対し、一般に望ましくは完全に相補的であることが理解される。プライマーおよびプローブは、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下、典型的には標的核酸にアニールされる。

【0106】

「ヌクレオチドタグ」という用語は、標的ヌクレオチド配列に付加される所定のヌクレオチド配列を指すのに、本明細書では使用される。ヌクレオチドタグは、標的ヌクレオチド配列の同一性または標的ヌクレオチド配列が誘導されたサンプルの同一性など、標的ヌクレオチド配列に関する情報の項目をコード化することができる。ある実施形態では、そ

10

20

30

40

50

のような情報は、1つまたは複数のヌクレオチドタグで、例えば2つのヌクレオチドタグの組合せでコード化されてもよく、標的ヌクレオチド配列のいずれかの端部上のタグは、標的ヌクレオチド配列の同一性をコード化することができる。

【0107】

「トランスポゾン」という用語は、トランスポザーゼ酵素によって核酸に付加することができるオブリゴヌクレオチドを指す。

【0108】

本明細書で使用される「バーコードプライマー」という用語は、バーコードプライマーが増幅反応に用いられる場合、生成されたアンプリコンに関する情報をコード化する特定のバーコードヌクレオチド配列を含むプライマーを指す。例えば異なるバーコードプライマーは、バーコードヌクレオチド配列が、得られるアンプリコンのサンプル由来を示すように、いくつかの異なるサンプルのそれぞれから1つまたは複数の標的配列を増幅するように用いることができる。

10

【0109】

本明細書で使用される「コード化反応」という用語は、少なくとも1つのヌクレオチドタグが標的ヌクレオチド配列に付加される反応を指す。ヌクレオチドタグは、例えば「コード化PCR」によって付加することができ、この場合、少なくとも1つのプライマーは、標的特異的部分と、標的特異的部分の5'末端に位置付けられたヌクレオチドタグとを含み、第2のプライマーは、標的特異的部分のみ、または標的特異的部分と、標的特異的部分の5'末端に位置付けられたヌクレオチドタグとを含む。PCRをコード化するのに利用可能なPCRプロトコルの例示的な例については、係属中のWO出願US03/37808および米国特許第6,605,451号明細書を参照されたい。ヌクレオチドタグは、少なくとも1つのプライマーが標的特異的部分および標的特異的部分の5'末端に位置付けられたヌクレオチドタグを含み、第2のプライマーが標的特異的部分のみまたは標的特異的部分および標的特異的部分の5'末端に位置付けられたヌクレオチドタグを含む、ライゲーション反応を含めた「コード化ライゲーション」反応によって付加することができる。例示的なコード化ライゲーション反応は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、特にライゲーション反応に関するものである米国特許出願公開第2005/0260640号明細書に記載されている。

20

【0110】

本明細書で使用される「コード化反応」は、標的ヌクレオチド配列に連結されたヌクレオチドタグを含む「タグ付き標的ヌクレオチド配列」を生成することができる。

30

【0111】

プライマーの一部に関連して本明細書で使用される「標的特異的」ヌクレオチド配列という用語は、適切なアニーリング条件下、標的核酸または標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールすることができる配列を指す。

【0112】

プライマーの一部に関連して本明細書で使用される「ヌクレオチドタグ特異的ヌクレオチド配列」という用語は、適切なアニーリング条件下、ヌクレオチドタグに特異的にアニールすることができる配列を指す。

40

【0113】

本発明の教示による増幅は、少なくとも1種の標的核酸の少なくとも一部が、直線的にまたは指数関数的に核酸配列を増幅するための広範な技法を含むがこれらに限定することのない、典型的には鋳型依存的な手法で再生される、任意の手段を包含する。増幅ステップを行うための例示的な手段は、リガーゼ連鎖反応(LCR: ligase chain reaction)、リガーゼ検出反応(LDR: ligase detection reaction)、ライゲーション後のQ-レプリカーゼ増幅、PCR、プライマー伸長、鎖置換増幅(SDA: strand displacement amplification)、超分岐鎖置換増幅、多置換増幅(MDA: multiple displacement amplification)、核酸鎖塩基増幅(NASBA: nu

50

cleic acid strand-based amplification)、2ステップ多重増幅、およびローリングサークル増幅(RCA:rolling circle amplification)などと、これらの多重バージョンおよび組合せを含み、例えばOLA/PCR、PCR/OLA、LDR/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/PCR、およびPCR/LCR(組合せ連鎖反応--CCRとしても知られる。)などが含まれるがこれらに限定するものではない。そのような技法の記述は、数ある出典の中でも、Ausbelら、PCR Primer: A Laboratory Manual、Diffenbach編、Cold Spring Harbor Press(1995); The Electronic Protocol Book、Chang Bioscience(2002); Msuihら、J. Clin. Micro. 34:501~07(1996); The Nucleic Acid Protocols Handbook、R. Rapley編、Humana Press、Totowa、N.J.(2002); Abramsonら、Curr Opin Biotechnol. 1993年2月; 4(1):41~7、米国特許第6,027,998号明細書; 米国特許第6,605,451号明細書、Baranyら、国際公開第WO 97/31256号パンフレット; Wenzら、国際公開第WO 01/92579号パンフレット; Dayら、Genomics 29(1):152~162(1995)、Ehrlichら、Science 252:1643~50(1991); Innissら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press(1990); Favisら、Nature Biotechnology 18:561~64(2000); およびRabenauら、Infection 28:97~102(2000); Belgrader、Barany、およびLubin、Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay、Sixth International Symposium on Human Identification、1995(ワールドワイドウェブ: promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html-で入手可能); LCR Kit Instruction Manual、Cat. #200520、Rev. #050002、Stratagene、2002; Barany、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:188~93(1991); BiおよびSambrook、Nucl. Acids Res. 25:2924~2951(1997); Zirviら、Nucl. Acid Res. 27:e40i~viii(1999); Deanら、Proc Natl Acad Sci USA 99:5261~66(2002); BaranyおよびGelfand、Gene 109:1~11(1991); Walkerら、Nucl. Acid Res. 20:1691~96(1992); Polstraら、BM C Inf. Dis. 2:18-(2002); Lageら、Genome Res. 2003年2月; 13(2):294~307、およびLandegrenら、Science 241:1077~80(1988)、Demidov, V.、Expert Rev Mol Diagn. 2002年11月; 2(6):542~8.、Cookら、J Microbiol Methods. 2003年5月; 53(2):165~74、Schweitzerら、Curr Opin Biotechnol. 2001年2月; 12(1):21~7、米国特許第5,830,711号明細書、米国特許第6,027,889号明細書、米国特許第5,686,243号明細書、国際公開第WO 00056927A3号パンフレット、および国際公開第WO 9803673A1号パンフレットに見出すことができる。

【0114】

いくつかの実施形態では、増幅は:少なくとも1種の標的核酸における相補的なまたは実質的に相補的な配列に少なくとも1つのプライマーをアニールするステップ; ポリメラーゼを使用した鑄型依存的な手法で少なくとも1つのヌクレオチド鎖を合成するステップ

10

20

30

40

50

; および新たに形成された核酸二重鎖を変性させて鎖を分離するステップの連続手順の少なくとも1回のサイクルを含む。サイクルは、繰り返されても繰り返されなくてよい。增幅は、熱サイクリングを含むことができ、または等温的に行うことができる。

【0115】

「qPCR」という用語は、「リアルタイムPCR」または「動的ポリメラーゼ連鎖反応」としても公知の定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR: polymerase chain reaction) を指すのに、本明細書では使用される。

【0116】

パラメーターに関して本明細書で使用される「実質的に」という用語は、パラメーターが有用な結果をもたらすのに十分であることを意味する。したがって、核酸配列に適用される「実質的に相補的な」は、記述される文脈で働くのに十分相補的であることを一般に意味する。典型的には、実質的に相補的とは、用いられる条件下でハイブリダイズするのに十分相補的であることを意味する。本明細書に記述されるいくつかの実施形態では、反応生成物は、未反応のプライマーと区別されなければならない。

10

【0117】

「試薬」は、分析物（例えば、解析される核酸）以外の、反応に使用される任意の薬剤を広く指す。核酸増幅反応用の例示的な試薬には、緩衝剤、金属イオン、ポリメラーゼ、逆転写酵素、プライマー、鑄型核酸、ヌクレオチド、標識、色素およびヌクレアーゼなどが含まれるが、これらに限定するものではない。酵素反応用の試薬には、例えば、基質、補因子、緩衝剤、金属イオン、阻害剤および活性化剤が含まれる。

20

【0118】

「ユニバーサル検出プローブ」という用語は、生成物中に存在する標的核酸配列の同一性とは無関係に、増幅生成物の存在を特定する任意のプローブを指すのに本明細書では使用される。

【0119】

「ユニバーサルqPCRプローブ」という用語は、qPCR中に増幅生成物の存在を特定するような任意のプローブを指すのに本明細書では使用される。特定の実施形態では、ヌクレオチドタグは、ユニバーサルqPCRプローブなどの検出プローブが結合する、ヌクレオチド配列を含むことができる。タグが標的ヌクレオチド配列の両端に付加される場合、各タグは、望みに応じて、検出プローブにより認識される配列を含むことができる。そのような配列の組合せは、タグ付き標的ヌクレオチド配列の同一性またはサンプル供給源に関する情報をコード化することができる。その他の実施形態では、1つまたは複数の増幅プライマーは、ユニバーサルqPCRプローブなどの検出プローブが結合する、ヌクレオチド配列を含むことができる。このように、1、2、またはそれ以上のプローブ結合部位を、本明細書に記述される方法の増幅ステップ中に増幅生成物に付加することができる。当業者なら、前置増幅（実施される場合）および増幅中に多数のプローブ結合部位を組み込むことによって多重検出が容易になり、2種以上の異なる増幅生成物を所与の増幅混合物またはそのアリコートで検出できることを、認識する。

30

【0120】

「ユニバーサル検出プローブ」という用語は、検出可能な標識（例えば蛍光標識）で標識されたプライマー、ならびにSYBRグリーンおよびEVAグリーンなどの二本鎖DNA (dsDNA: double-stranded DNA) 色素を含めたDNA結合色素などの非配列特異的プローブを包含することも意図される。

40

【0121】

「標的特異的qPCRプローブ」という用語は、生成物中に存在する標的ヌクレオチド配列へのqPCRプローブのハイブリダイゼーションに基づいて、qPCR中に増幅生成物の存在を特定するqPCRプローブを指すのに本明細書では使用される。

【0122】

本明細書で使用される「染色剤」は、その成分の検出を容易にするために反応またはアッセイ混合物の成分に結合する、任意の有機または無機分子を一般に指す。

50

【0123】

本明細書で使用される「色素」という用語は、340nm以上 の波長の電磁放射線を吸収する任意の有機または無機分子を一般に指す。

【0124】

本明細書で使用される「標識」という用語は、検出可能および／または定量可能なシグナルを提供するのに使用することができる、任意の原子または分子を指す。特に、標識は、核酸またはタンパク質に直接または間接的に結合することができる。プローブに結合することができる適切な標識には、放射性同位体、蛍光体、発色団、質量標識、電子稠密粒子、磁気粒子、スピノン標識、化学ルミネセンスを放出する分子、電気化学的に活性な分子、酵素、補因子および酵素基質が含まれるが、これらに限定するものではない。

10

【0125】

本明細書で使用される「蛍光色素」という用語は、ランプ、光ダイオードまたはレーザーなどの、電磁放射線の供給源による照射後、蛍光メカニズムによって、より長い波長の電磁放射線を放出する任意の色素を一般に指す。

【0126】

「エラストマー」という用語は、当技術分野で使用される一般的な意味を有する。したがって、例えば *A 1 l c o c k l a (C o n t e m p o r a r y P o l y m e r C h e m i s t r y*、2版) は、それらのガラス転移温度と液化温度との間の温度で存在するポリマーとして一般にエラストマーについて記述する。エラストマー材料は弾性特性を示すが、それは力に応答して主鎖のコイル状態が解除されるように、ポリマー鎖が容易に捩れ運動を受け、主鎖のコイル状態が解除されて、力が存在しないときには以前の形状をとることができるようにになるからである。一般に、エラストマーは力が加えられると変形するが、その後、力が除去されるとその当初の形状に戻る。

20

【0127】

本明細書で使用される「変動」という用語は、任意の相違を指すのに使用される。変動は、個体間または集団間の相違を指すことができる。変動は、一般的なまたは通常の状況との相違を包含する。したがって「コピー数の変動」または「突然変異」は、一般的なまたは通常のコピー数またはヌクレオチド配列との相違を指すことができる。「発現レベルの変動」または「スプライスバリエント」は、特定の、細胞または組織、発達段階、状態などに関し、一般的なまたは通常の発現レベルまたはRNAまたはタンパク質とは異なる発現レベルまたはRNAまたはタンパク質を指すことができる。

30

【0128】

「多型マーカー」または「多型部位」は、ヌクレオチド配列の多様化が生ずる座位である。例示的なマーカーは、少なくとも2つの対立遺伝子を有し、そのそれぞれは、選択された集団の1%超、より典型的には10%超、または20%超の頻度で生ずる。多型部位は、1つの塩基対程度に小さくてもよい。多型マーカーは、制限断片長多型 (RFLP: restriction fragment length polymorphism)、様々なタンデム反復数 (VNTR: variable number of tandem repeats)、高度可変領域、ミニサテライト、ジヌクレオチド反復、トリヌクレオチド反復、テトラヌクレオチド反復、単純配列反復、欠失、Aluなどの挿入元素を含む。第1の特定可能な対立遺伝子形態は参照形態として任意に設計され、その他の対立遺伝子形態は、代替のまたは変化した対立遺伝子として設計される。選択された集団で最も頻繁に生じる対立遺伝子形態は、野生型形態と時々呼ばれる。二倍体生物は、対立遺伝子形態に関して同型接合性であっても異型接合性であってもよい。二対立遺伝子多型には2つの形態がある。三対立遺伝子多型には3つの形態がある。

40

【0129】

「一塩基多型」 (SNP: single nucleotide polymorphism) は、対立遺伝子配列同士の変動部位である、单一のヌクレオチドで占有された多型部位で生じる。部位は、通常、対立遺伝子の高度に保存された配列 (例えば、集団の1/100または1/1000未満が変化する配列) により先導されかつ同様の配列が後に

50

続く。S N P は、通常、多型部位で 1 つのスクレオチドを別のスクレオチドに置換することにより、生ずる。遷移は、1 つのプリンの、別のプリンによる置換えであり、または 1 つのピリミジンの、別のピリミジンによる置換えである。塩基転換は、ピリミジンによるプリンの置換えであり、またはその逆である。S N P は、参照対立遺伝子に対するスクレオチドの欠失またはスクレオチドの挿入から生じさせることもできる。

【 0 1 3 0 】

本明細書で使用される「粒子」という用語は、そのサイズおよび複雑さが分子から細胞に及ぶことができる実体要素を指す。この用語は、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、およびこれらの組合せ（例えばリボタンパク質）のような分子のほか、ウイルス、染色体、細胞小胞およびオルガネラ、ならびに細胞を包含する。

10

【 0 1 3 1 】

「捕捉形体」という用語は、粒子の捕捉を容易にするマイクロ流体デバイス内の「捕捉部位」と呼ばれる別々の部位に位置付けられた形体を指すのに本明細書では使用される。捕捉形体は、結合親和性によってかつ／または機械的捕捉によって、または任意のその他の手段によって、捕捉を容易にできる。ある実施形態では、捕捉形体は、ただ 1 個の粒子が捕捉形体を占有することができるようにはまたは捕捉形体により含有できるよう、サイズ決め／設計される。

【 0 1 3 2 】

「ドレン形体」という用語は、捕捉部位内の流体の流れを容易にする捕捉部位の内部または近くに位置付けられた形体を指すのに、本明細書では使用される。例えば捕捉部位は、捕捉部位に粒子を保持するように設計された物理障壁など、1 つまたは複数の形体を有していてもよい。捕捉部位でのドレン形体は、確実に、その部位が空である場合に（即ち、粒子を含有していない。）十分低い流動インピーダンスで粒子を含まない流体がその部位内を流れることができるようにし、その結果、捕捉部位の周りではなく捕捉部位に向かう粒子の流れを増強させる。

20

【 0 1 3 3 】

本明細書で使用される集束形体という用語は、粒子の流れを各捕捉部位に集束させる、マイクロ流体デバイスの任意の形体を指す。集束形体は、数ある中でも粒子の流れを望み通りに方向付ける 1 つまたは複数の物理形体、真空力、ループ内の流体の流れ、重力、遠心力、磁力、電気の力（例えば、電気泳動および／もしくは電気浸透力）、ならびに／または光学的に発生させた力を含めた任意の適切な手段によって、粒子の流れを集束させることができる。

30

【 0 1 3 4 】

支持体の捕捉を含む実施形態に関連して使用されるように、「支持体」という用語は、支持体を捕捉することができる捕捉部位までマイクロ流体デバイス内を通過するよう適切に成形されサイズ決めされた、不溶性基質を指す。

【 0 1 3 5 】

反応、反応混合物、反応容積などに関連して本明細書で使用されるように、「分離」という用語は、反応、反応混合物、反応容積、例えば反応が他の反応とは切り離された状態で実施される状態を指す。個別の反応、反応混合物、反応容積は例えば、必ずしもその必要はないがエマルジョンの状態であってもよい液滴で実施されるものを含み（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれかつ特に液滴を形成し解析するためのデバイスおよび方法の記述に関する、「Micro fabricated crossflow devices and methods」という名称の、Quake らに 2007 年 11 月 13 日に発行された米国特許第 7,294,503 号明細書；参照によりその全体が本明細書に組み込まれかつ特に液滴を形成し解析するためのデバイスおよび方法の記述に関する、「Dropplet libraries」という名称の、Link らによる 2010 年 1 月 28 日に公開された米国特許出願公開第 2010022414 号明細書；および参照によりその全体が本明細書に組み込まれかつ特に液滴を形成し解析するためのデバイスおよび方法の記述に関する、「Manipulation of Micro

40

50

「fluidic Droplets」という名称の、Millerらによる2011年1月6日に公開された米国特許出願公開第2011/0000560号明細書参照)、それと共に、反応、反応混合物、反応容積などは、機械的障壁、例えば個別の容器、マイクロタイタープレートの個別のウェル、またはマトリックス型マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメントによって分離される。

【0136】

(粒子)

本明細書に記述される方法は、任意のタイプの粒子を解析するのに使用することができる。ある実施形態では、粒子は、流体に懸濁させるのに十分小さいが流体とは区別可能になるように十分大きい任意の物体を、一般に含む。粒子は、微視的または近微視的であってもよく、約0.005から100μm、0.1から50μm、または約0.5から30μmの直径を有していてもよい。あるいは、またはさらに、粒子は約10⁻²⁰から10⁻⁵グラム、10⁻¹⁶から10⁻⁷グラム、または10⁻¹⁴から10⁻⁸グラムの質量を有していてもよい。ある実施形態では、粒子は、生物学的供給源からの粒子(「生物学的粒子」)である。生物学的粒子は、例えば、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、およびこれらの組合せまたは凝集体(例えばリポタンパク質)などの分子のほか、ウイルス、染色体、細胞小胞およびオルガネラ、ならびに細胞などの、より大きい実体要素を含む。本明細書に記述されるように解析することができる粒子は、解析される分子が結合する不溶性成分、例えばビーズを有するものも含む。

10

【0137】

例示的な実施形態では、粒子が細胞である。本明細書に記述される方法で粒子として使用するのに適切な細胞は、任意の自己複製膜結合生物学的実体要素、またはその任意の非複製膜結合派生物を一般に含む。非複製派生物は、老化細胞、末端分化細胞、細胞キメラ、血清飢餓細胞、感染細胞、非複製突然変異体、無核細胞などであってもよい。本明細書に記述される方法で使用される細胞は、数ある特徴の中で、任意の起源、遺伝的背景、健康状態、固定化状態、膜透過性、前処理、および/または集団の純度を有していてもよい。適切な細胞は、真核性、原核性、古細菌、および/または同様のものであってもよく、動物、植物、真菌、原生生物、細菌、および/または同様のものからであってもよい。例示的な実施形態では、ヒト細胞が解析される。細胞は、生命体の発生における任意の段階からのものであってもよく、例えば哺乳類細胞(例えば、ヒト細胞)の場合には、胚性、胎性、または成人細胞が解析されてもよい。ある実施形態では、細胞が幹細胞である。細胞は、野生型;天然、化学的、またはウイルス性突然変異体;設計製作された突然変異体(トランスジェニックなど);および/または同様のものであってもよい。さらに、細胞は、数ある状態の中でも、成長、静止、形質転換、および/または不死化の状態にあってもよい。さらに細胞は、単一細胞からのクローン集団または非常に類似した細胞の小さい集合として、一般に誘導された単一培養物であってもよく;親和性結合、FACS、薬物選択などの任意の適切なメカニズムによって事前に分類されていてもよく;かつ/または全く異なる細胞型の混合または不均質集団であってもよい。

20

30

【0138】

膜を含み(例えば、細胞または細胞小胞またはオルガネラ)、細胞壁を含み、または1つもしくは複数の内部成分を外部空間から分離する任意のその他のタイプの障壁を含む粒子は、無傷であってもよく、または部分的に(例えば、透過性)もしくは完全に(例えば、内部成分を放出させるため)潰れていてもよい。粒子が細胞である場合、固定されかつ/または固定されていない細胞を使用してもよい。生きているまたは死んでいる、固定されたまたは固定されていない細胞は、無傷の膜を有していてもよく、かつ/またはイオン、染色剤、色素、標識、配位子などが取り込まれるように透過性にされた/潰れた膜であってもよく、かつ/または細胞内容物が放出されるように溶解してもよい。

40

【0139】

本明細書に記述される方法の1つの利点は、その他の方法で必要とされる数百万の粒子よりはるかに少ない数を含めた、事実上任意の数の粒子を解析するのに使用できることで

50

ある。様々な実施形態では、解析される粒子の数は、約 10、約 50、約 100、約 500、約 1000、約 2000、約 3000、約 4000、約 5000、約 6000、約 7000、約 8000、約 9000、約 10000、約 15000、約 20000、約 25000、約 30000、約 35000、約 40000、約 45000、約 50000、約 75000、または約 100,000 個とすることができます。特定の実施形態では、解析される粒子の数は、上記列挙された任意の 2 つの値により定められた範囲内に含めることができる。

【0140】

(粒子の捕捉)

粒子は、当技術分野で公知のまたは本明細書に記述される任意の手段によって、個別の反応容積に捕捉されてもよい。粒子を含有する個別の反応容積は、液滴、エマルジョン、容器、マイクロタイタープレートのウェル、またはマトリックス型マイクロ流体デバイスのコンパートメントに形成することができる。ある実施形態では、捕捉形体は、個別の反応容積内で、捕捉部位に 1 つまたは複数の細胞を保持する。好ましい実施形態では、捕捉形体は、捕捉部位に単一細胞のみを優先的に保持する。ある好ましい実施形態では、各捕捉部位は、マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内に位置付けられる。「個別のコンパートメント」という用語は、コンパートメントが個別の反応容積を含有できるように、マイクロ流体デバイス内のその他のコンパートメントから少なくとも一時的に分離されたコンパートメントを指すために本明細書で使用される。一時的な分離は、例えば、Fluidigm, Inc. (South San Francisco, CA) から入手可能なマイクロ流体デバイスの場合には弁の使用により、実現することができる。分離の程度は、アッセイ / 反応をコンパートメント内で個別に実施することができるようでなければならない。本明細書で使用される「捕捉形体」という用語は、単一のまたは複数のメカニズムであって、順にかつ / または並行して動作するものを含む。捕捉形体は、流体の流れによって加えられる位置決め力を克服するように動作してもよい。適切な捕捉形体は、数ある中でも、流れに連結された物理障壁（「機械的捕捉」と呼ぶ。）、化学的相互作用（「親和性に基づいた捕捉」と呼ぶ。）、真空力、ループ内の流体の流れ、重力、遠心力、磁力、電気の力（例えば、電気泳動もしくは電気浸透力）、および / または光学的に発生した力を基にしてもよい。

【0141】

捕捉形体は、選択的であっても選択的でなくてもよい。選択的メカニズムは、部分的に選択的であってもよく、即ち、入力された粒子の全てには至らない（部分集合）量を保持してもよい。部分的に選択的なメカニズムは、少なくとも一つには、確率的集束形体（以下、参照）を利用してよい。あるいはまたはさらに、選択的メカニズムは粒子依存的であってもよく、即ち、サイズ、表面化学、密度、磁気特性、電荷、光学的性質（屈折率など）、および / または同様のものなど、入力された粒子の 1 つまたは複数の性質に基づいて粒子が保持される。

【0142】

(機械的捕捉)

機械的捕捉は、少なくとも部分的に、例えばマイクロ流体デバイスに配置された任意の適切な物理障壁との粒子接触に基づいてよい。そのような粒子 - 障壁接触は、一般に、流体の流れ方向に沿った長手方向の粒子運動を制限し、これは流れに支援された保持をもたらすものである。流れに支援された粒子 - 障壁接触は、側面から側面への / 直交する（横断）運動を制限してもよい。適切な物理障壁は、チャネルまたはその他の通路（即ち、壁、屋根、および / または床）の任意の部分から内向きに延びる突出部によって形成されてもよい。例えば、突出部は、固定されかつ / または移動可能であってもよく、数ある中でも、カラム、ポスト、ブロック、パンプ、壁、および / または部分的 / 完全に閉鎖された弁が含まれる。弁などのいくつかの物理障壁は、移動可能でも規制可能であってもよい。あるいは、またはさらに、物理障壁は、チャネルもしくはその他の通路に形成されたりス部（例えば、ニッチ）によってまたは流体透過性膜によって、画定されてもよい。その

10

20

30

40

50

他の物理障壁は、通路の断面寸法に基づき形成されてもよい。例えば、サイズ選択的チャネルは、チャネルに進入するのには大き過ぎる粒子を保持してもよい(サイズ選択的チャネルは、フィルターチャネル、マイクロチャネル、または粒子制限的もしくは粒子選択的チャネルと呼んでもよい。)。実施例2および4は、例示的な機械的捕捉の実施形態を提供する。

【0143】

(親和性に基づく捕捉)

親和性に基づく捕捉は、1つまたは複数の化学的相互作用に基づいて粒子を保持してもよく、即ち、結合パートナーが粒子成分に結合する。化学的相互作用は、数ある中でも、イオン性、静電性、疎水性、ファンデルワールス、および/または金属配位相互作用を含めた、共有結合性および/または非共有結合性の相互作用であってもよい。化学的相互作用は、粒子を選択的にかつ/または非選択的に保持してもよい。選択的および/または非選択的な保持は、例えばマイクロ流体デバイスにおける粒子と表面との間の特異的および/または非特異的化学相互作用に基づいてもよい。

10

【0144】

特定の化学メカニズムは、特異的結合パートナー(SBP: specific binding partners)を使用してもよく、例えば第1および第2のSBPはそれぞれ粒子およびデバイスの表面に配置されている。例示的なSBPは、ビオチン/アビジン、抗体/抗原、レクチン/炭水化物などを含んでいてもよい。SBPは、デバイス形成の前、最中、および/または後に、マイクロ流体デバイス内に局所的に配置されてもよい。例えば、基質および/または流体層成分の表面は、基質および流体層成分が接合される前に、SBP部材の接着/結合によって局所的に修正されてもよい。あるいは、またはさらに、SBPは、例えばSBP部材とデバイスとの局所化学反応によって(光による局所照明によって触媒されたものなど)、デバイスが形成された後に、マイクロ流体デバイスの一部に局所的に関連付けられてもよい。SBP部材を持つビーズが捕捉部位に機械的に捕捉され、親和性に基づいた粒子(即ち、細胞)捕捉のためのSBP部材を提示する実施形態について記述した実施例3も参照されたい。

20

【0145】

非特異的化学メカニズムは、マイクロ流体デバイスの表面化学の局所的な相違を利用してよい。そのような局所的な相違は、上述のように、マイクロ流体デバイス形成の前、最中、および/または後に生じてもよい。局所的な相違は、例えば疎水性もしくは親水性領域および/または材料の局在化結合を生成するために、局在化した化学反応から生じ得る。結合した材料は、数ある中でもポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリエチレンイミン、アルブミン、ゼラチン、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、エンタクチン、ビトロネクチン、フィブリリン、エラスチン、ヘパリン、硫酸ケラタン、硫酸ヘパラン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、および/または細胞外基質抽出物/混合物を含んでいてもよい。

30

【0146】

(その他の捕捉形体)

その他の捕捉形体は、親和性に基づいたまたは機械的捕捉の代替としてまたは追加として使用されてもよい。これらのメカニズムおよび/または上述のメカニズムの一部または全ては、少なくとも部分的に、保持を支援するために、粒子とマイクロ流体デバイスチャネルまたは通路との間の摩擦を利用してよい。

40

【0147】

捕捉形体は、真空力、流体の流れ、および/または重力に基づいてもよい。真空に基づいた捕捉形体は、例えばチャネルから外向きに定められた力を使用して、通路表面とのより緊密な接触へと粒子を引き入れる力を発揮してもよい。真空の印加および/または粒子の保持は、チャネルまたはその他の通路の壁にあるアパー/チャーナ/オリフィスによって支援されてもよい。対照的に、流体の流れに基づいた捕捉形体は、粒子を保持するループなどの流体の流路を生成してもよい。これらの流体の流路は、出口のない閉鎖チャネル回路

50

によって（例えば、弁の閉鎖および能動的なポンプ送出によって）、かつ／またはリセス部内の略円形の流体の流れによって生成されたような渦によって、形成されてもよい。重力に基づいた捕捉形体は、通路の底面に対して粒子を保持してもよく、したがって摩擦と組み合わされることにより粒子運動を制限する。重力に基づいた保持は、リセス部および／または低減された流体の流量によって、容易にすることができます。

【0148】

捕捉形体は、遠心力、磁力、および／または光学的に発生した力に基づいてもよい。遠心力に基づく捕捉形体は、通路表面に対して粒子を押すことにより、典型的には流体の流れにほぼ直交する力を粒子に加えることにより、粒子を保持してもよい。そのような力は、マイクロ流体デバイスの遠心分離によってかつ／または流体の流路内での粒子運動によって、発揮されてもよい。磁力に基づいた捕捉形体は、マイクロ流体デバイスの外部および／または内部に発生した磁場を使用して、粒子を保持してもよい。磁場は、粒子の強磁性および／または常磁性部分と相互作用してもよい。例えば、ビーズは少なくとも部分的に強磁性材料で形成されてもよく、または細胞は、表面結合したもしくは内部移行した強磁性粒子を含んでいてもよい。電気の力に基づく捕捉形体は、電場を使用して、荷電粒子および／または集団を保持してもよい。対照的に、光学的に発生した力に基づき動作する捕捉形体は、粒子を保持するのに光を使用してもよい。そのようなメカニズムは、数ある中でも光ピンセットの原理に基づいて動作してもよい。

【0149】

捕捉形体の別の形は、チャネルに固定的にまたは一時的に入口があるが出口がない、ブラインドフィルチャネルである。例えば、マイクロ流体デバイスがP D M Sなどの気体透過性材料から作製される場合、デッドエンドチャネルに存在する気体は逃げることができ、または入口を経た液体の流入によって外に押し遣られたときに気体透過性材料を通してチャネルの外に出ることができる。これは、ブラインドフィーリングの好ましい例である。ブラインドフィーリングは、入口と、ゲート制御されまたは弁により弁制御される出口とを有するチャネルまたはコンパートメントと共に使用することができる。この例では、気体が満たされたチャネルまたはコンパートメントのブラインドフィーリングは、入口を通してチャネルまたはコンパートメントを満たしながら出口弁が閉じたときに生じる。入口が弁も有する場合、弁は、ブラインドフィルが終了した後に閉じることができ、出口は、チャネルまたはコンパートメントの内容物を別のチャネルまたはコンパートメントに向けて曝すように開放することができる。第3の入口がチャネルまたはコンパートメントと連通している場合、第3の入口は、別の流体、気体、または液体をチャネルまたはコンパートメントに導入して、ブラインドフィルされた液体を排出させることにより、測定された量でチャネルまたはコンパートメントから排出させることができる。

【0150】

（集束形体）

粒子の捕捉は、各捕捉部位に粒子の流れを集束させる1つまたは複数の集束形体を使用して、マイクロ流体デバイス内で増強させることができる。集束形体は例えば、直接および／または間接的、流体媒介型および／または非流体媒介型、外部および／または内部なども含めたそれらの起源および／または動作原理を反映させるように、様々な方法で限定することなく分類されてもよい。これらの分類は、相互に排他的ではない。したがって、所与の集束形体は、2つ以上の方法で粒子を位置決めしてもよく；例えば電場は、粒子を直接（例えば、電気泳動を介して）および間接的に（例えば、電気浸透を介して）位置決めしてもよい。

【0151】

集束形体は、粒子の位置を長手方向にかつ／または横断方向に画定するように作用してもよい。「長手方向の位置」という用語は、マイクロ流体チャネルの長軸および／またはチャネル内の流体フロー流に、平行なまたは沿った位置を示す。対照的に、「横断方向の位置」という用語は、チャネルの長軸および／または関連する主な流体フロー流に直交する位置を示す。長手方向および横断方向の両方の位置は、「長軸」を湾曲チャネルの「接

10

20

30

40

50

線」と同等に考えることにより、局所的に画定することができる。集束形体は、長手方向の流れと横断方向の流れとの間で、チャネルおよび／または流動の流れの長軸に対して任意の角度で、経路に沿って粒子を移動させるように作用してもよい。

【0152】

集束形体は、単独でかつ／または組み合わせて使用されてもよい。組み合わせて使用される場合、形体は、順次（即ち、連続的に）かつ／または並行に（即ち、同時に）使用してもよい。例えば、流体の流れなどの間接的なメカニズムは、大雑把な位置決めで使用されてもよく、光ピンセットなどの直接的なメカニズムは、最終的な位置決めに使用されてもよい。

【0153】

直接的な集束形体は、力が粒子に直接作用して粒子をマイクロ流体ネットワーク内に位置決めする、任意のメカニズムを一般に含む。直接的な集束形体は、数ある中でも光学的、電気的、磁気的、および／または重力に基づく力を含めた任意の適切なメカニズムに基づいてもよい。光学的集束形体は、粒子の位置決めを媒介しましたは少なくとも容易にするのに光を使用する。適切な光学的集束形体は、位置決め力を粒子に与えるのに適切に集束された移動可能な光源を使用する、「光ピンセット」を含む。電気的集束形体は、粒子を位置決めするのに電気を使用する。適切な電気的メカニズムは「エレクトロキネシス」を含み、即ち、マイクロ流体ネットワークの一部または全てに渡る電圧および／または電流の印加であり、これは上述のように、荷電粒子を直接（例えば、電気泳動を介して）および／または流体中のイオンの運動を通して間接的に（例えば、電気浸透を介して）移動させることができる。磁気集束形体は、磁気相互作用に基づいて粒子を位置決めするのに磁気を使用する。適切な磁気メカニズムでは、磁場を流体ネットワークの内部または周囲に印加して、粒子の中、上、または周囲での強磁性および／または常磁性材料との関連付けを介して粒子を位置決めする。重力に基づく集束形体は、例えば細胞培養物の位置で接着細胞と基質とを接触させるように粒子を位置決めするのに、重力の力を使用する。

10

20

30

40

50

【0154】

間接的な集束形体は、長手方向にかつ／または横断方向にマイクロ流体ネットワーク内で粒子を移動させるように、例えば流体を介して、粒子に間接的に力を作用させる、任意のメカニズムを一般に含む。長手方向の間接的な集束形体は、一般に、チャネルおよび／またはその他の通路に沿った流体の流れによって生成されかつ／または規制されてもよい。したがって、長手方向の集束形体は、流量および／または通路を規制する弁および／またはポンプによって、容易になりかつ／または規制されてもよい。ある場合には、長手方向の集束形体は、電気浸透性集束形体によって容易になりかつ／または規制されてもよい。あるいは、またはさらに、長手方向の集束形体は、入力に基づいたものであってもよく、即ち、流体カラムの不等な高さによって生成された圧力水頭を含めた圧力または重力に基づいたメカニズムなどの入力メカニズムによって、容易になりかつ／または規制される。

【0155】

横断方向の間接的な集束形体は、一般に、チャネル接合部での流体フロー流、フロー流が減じられた横方向に配置された領域、チャネルのベンド、および／または物理障壁（即ち、バッフル）によって、生成されかつ／または規制されてもよい。チャネル接合部は、その部位から流体を運び出す数に対する、その部位に流体を運び入れるチャネルの数に基づいて、統合部位であっても分割部位であってもよい。物理障壁は、捕捉部位に向かって粒子の流れを定めるのに適切な、任意のデザインを有していてもよい。例えばバッフルは、例えば捕捉部位に向かって粒子の流れを定める角度で、任意のチャネル表面から外向きに延びてもよい。バッフルの長、チャネル表面との角度、および捕捉部位からの距離は、捕捉部位に向かって粒子の流れを増強させるように調節することができる。バッフルは、チャネルまたはその他の通路（即ち、壁、屋根、および／または床）の任意の部分から内向きに延びる突出部により形成されてもよい。例えば突出部は、数ある中でもカラム、ポスト、ブロック、パンプ、壁、および／または部分的に／完全に閉鎖した弁も含め、固定

されかつ／または移動可能であってもよい。弁などのいくつかの物理障壁は、移動可能であっても規制可能であってもよい。

【0156】

いくつかの実施形態では、各捕捉部位ごとに多数のバッフルを用いてもよい。例えば、チャネルの各側壁からある角度で外向きに延びるバッフルを用いて、チャネルの中心に位置付けられた捕捉部位に向かって粒子の流れを定めることができる。図14A～Bを参照されたい。機械的捕捉が用いられる場合、バッフルは、捕捉部位内で物理障壁から間隔を空けて配置されてもよい。あるいは、またはさらに、バッフルは、捕捉部位内の物理障壁に接触していてもよくまたはこの物理障壁との一体化部分であってもよい。図14Aおよび14Cを参照されたい。例えば、チャネル壁からある角度で外向きに延びるバッフルは、凹型捕捉形体（例えば、物理障壁）に接触することができまたはこの捕捉形体の一体化部分とすることができます。「凹型」捕捉形体は、流体の流れ方向にほぼ面している捕捉形体の側面が、凹型であることが理解される。バッフルは、チャネル壁から離れてかつ凹型捕捉形体に向かって粒子を定め、粒子の捕捉を容易にする。流れの経路に沿った、隣の捕捉部位は、類似のバッフル凹型捕捉形体構成を有することができ、バッフルがチャネルの同じ壁から伸びている。しかし、いくつかの実施形態では、隣のバッフル凹型捕捉形体は、反対側のチャネル壁から伸びることが有利である。この交互に配された構成は、1つのバッフルからの流れを隣に集束させるように作用し、それによって各バッフルに沿った流れは各凹型捕捉形体内への粒子の流れを増強させる。図14Cを参照されたい。

10

【0157】

横断方向の間接的集束形体は、その他のメカニズムの中でも層流、確率的分配、および／または遠心力に基づくものであってもよい。マイクロ流体デバイス内の粒子および／または試薬の横断方向の位置決めは、少なくとも部分的には層流に基づくメカニズムによって媒介されてもよい。層流に基づくメカニズムは、チャネル内の入力フロー流の位置が、チャネル内の追加のフロー流の存在、不在、および／または相対的位置により決定される、任意の集束形体を一般に含む。そのような層流に基づくメカニズムは、統合部位であるチャネル接合部によって定められてもよく、この接合部では、接合部に向かって流動する2つ、3つ、またはそれ以上のチャネルからの入口フロー流が統合して、より少ない数の出口フロー流、好ましくは接合部から離れて流動する1つの流れを形成している。マイクロ流動規模での流動する流れの層流特性により、統合部位は、層状出口フロー流として統合した後に、入口フロー流の相対的な分布を維持することができる。したがって、粒子および／または試薬は、どの入口チャネルが粒子および／または試薬を運ぶかに基づいて、層流の流れのいずれか選択された1つまたは複数に局在化して保持されてもよく、そのため粒子および／または試薬は横断方向に位置決めされる。例えば図16Dを参照されたい。

20

30

【0158】

各入口フロー流の相対的なサイズ（または流量）および位置は、粒子および／または試薬を運ぶフロー流の位置と相対的な幅との両方を決定してもよい。例えば、2つのより大きい（より広い）フロー流によって挟まれた、比較的小さい（狭い）粒子／試薬の入口フロー流は、単一出口チャネル内の狭い中心位置を占有してもよい。対照的に、同等にサイズ決めされたフロー流およびより小さい（より狭い）フロー流によって挟まれた、比較的大きい（広い）粒子／試薬の入口フロー流は、より小さいフロー流に向かって横断方向に付勢された、より広い位置を占有してもよい。いずれの場合も、層流に基づくメカニズムは、粒子／試薬が出口チャネルの断面積の部分集合に「集束」するので、を集束メカニズムと呼んでもよい。層流に基づくメカニズムは、複数の全く異なる捕捉部位に粒子および／または試薬を個々に指定するのに使用されてもよい。

40

【0159】

層流に基づくメカニズムは、粒子／試薬の横断方向の位置を変える可変メカニズムであってもよい。上述のように、各入口フロー流の相対的な関与は、粒子／試薬フロー流の横断方向の位置を決定してもよい。任意の入口フロー流の変化した流れは、出口フロー流へ

50

のその関与を変化させる可能性があり、それに応じて粒子／試薬フロー流をシフトさせる。灌流メカニズムと呼ばれる極端な場合、試薬（または粒子）フロー流は、隣接する入口フロー流からの流れの存在または不在に基づいて、保持される粒子（試薬）に接触した状態でまたは間隔を空けた状態で、横断方向に移動してもよい。そのようなメカニズムは、例えば異なる横断方向の位置を有する捕捉部位に粒子を向けるため、粒子の可変のまたは規制された横断方向の位置決めを行うのに使用されてもよい。

【0160】

マイクロ流体デバイス内の粒子および／または試薬の横断方向の位置決めは、少なくとも部分的には、確率的（または分配流）集束形体により媒介されてもよい。確率的横断集束形体は、入力された粒子または試薬の少なくとも部分的にランダムに選択された部分集合が、主なフロー流から横に離れてチャネル内の少ない流体流の領域に（または、おそらくは全く異なるチャネルに）分布される、任意の集束形態を一般に含む。流れが少ない領域は、粒子の保持、処理、検出を促進させ、粒子の損失を最小限に抑え、かつ／または粒子と基質との接触を促進させることができる。確率的集束形体は、数ある中でも分割流動部位および／または局所的に拡がったチャネルによって、決定されてもよい。

10

【0161】

分割流動部位は、流体流量が少ない領域を形成することによって、確率的位置決めを行うことができる。分割流動部位は、1つ（好ましくは）または複数の入口チャネルからの入口フロー流が、2つ、3つ、またはそれ以上のチャネルを含めたより大きな数の出口チャネルに分割される、任意のチャネル接合部を一般に含む。そのような分割部位は、確率的にかつ／または粒子の性質（質量など）に基づいて選択されてもよい粒子の部分集合を、接合部にまたはその付近に形成された流量の少ない領域または準停滞流の領域に送出することができる。部分集合により表される粒子の割合は、入口チャネルに対する出口チャネルの相対的な流動方向に依存してもよい。これらの流動方向は、入口フロー流にほぼ直交していてもよく、反対方向に向けられて、「T接合部」を形成する。あるいは、出口流の方向は、90度未満および／または超の角度を形成してもよい。

20

【0162】

2つ以上の出口チャネルを有する分割流集束形体は、分配流メカニズムとして使用されてもよい。特に、チャネル接合部に運ばれた流体、粒子、および／または試薬は、2つ以上の出口チャネルを経た流体流に応じて分配されてもよい。したがって、2つ以上のチャネルに進入する粒子または試薬の分数比または体積は、チャネルの相対的なサイズおよび／またはチャネルを経る流体の流量によって規制することができ、言い換えれば弁またはその他の適切な流動規制メカニズムによって規制することができる。第1の組の実施形態では、出口チャネルは非常に不等なサイズのものであってもよく、したがって粒子および／または試薬の少ない割合しか、より小さいチャネルには向けられない。第2の組の実施形態では、試薬の所望の希釈を形成するのに弁を使用してもよい。第3の組の実施形態では、2つ以上の流体経路の1つに粒子を選択的に向けるのに、弁を使用してもよい。

30

【0163】

局所的に広がったチャネルは、主なフロー流に対して横向きの流量が少ない領域を生成することによって、確率的位置決めを促進させてもよい。低い流量は、低い流量の領域に、入力された粒子の部分集合を堆積させ得る。そのような広がったチャネルは、ある角度で湾曲するまたは曲がる非線形チャネルを含んでいてもよい。あるいは、またはさらに、広がった領域は、特に湾曲したまたは曲がったチャネルの外縁が、チャネル壁により形成されたリセス部、チャネルと交差するチャンバー、および／または同様のものにより形成されていてもよい。

40

【0164】

粒子および／または試薬の横断方向の位置決めは、少なくとも部分的に、遠心集束形体により媒介されてもよい。遠心集束形体では、粒子が、例えば流体経路の曲げ部分を経て移動することによる、速度の変化によって決定された遠心力を経験する可能性がある。粒子のサイズおよび／または密度は、速度変化率を決定することができ、粒子の全く異なる

50

サイズおよび／または密度を、全く異なる横断方向の位置に分布させる。

【0165】

(ドレイン形体)

ある実施形態では、捕捉部位がドレイン形態も含む。例えば、機械的捕捉が用いられる場合、ドレイン形体は、捕捉形体の内部および／または周りに流体が流動することを可能にるように、しかし粒子は流さないようにサイズ決めされた捕捉形体内に1つまたは複数の中断部分を含むことができる。したがって例えば、捕捉形体は、空間(ドレイン形体)によって分離された2つの物理障壁を含むことができ、この空間は、障壁に向かって細胞を定めるよう十分低いインピーダンスで障壁間に粒子を含まない流体を流動可能とするのに十分大きいものであり、それによって粒子捕捉の可能性が高くなる。物理障壁間の空間は、一般に、捕捉部位で捕捉される粒子が障壁間を通過しないように、十分小さくかつ／または適切に構成されるべきである。特定の例示的な実施形態では、捕捉形体は、第1および第2の端部を有する2つの凹型物理障壁を含み、これらの障壁は、ドレイン形体を形成する障壁の第1の端部間の小さい空間、および障壁の第2の端部間のより大きい空間と共に、配置構成されている。図14Bを参照されたい(d3は、ドレインを形成するd1よりも大きい)。この構成において、障壁は、粒子を捕捉するように適切にサイズ決めされた「カップ」を形成し、カップの基部にはドレインがある。ドレインのおかげで、粒子は、カップが占有されていない限りカップに向かって流動する。粒子がカップに流入すると、ドレインには「栓」がされ、そのため粒子の流れはカップの周りで増強し、マイクロ流体デバイス内の次の捕捉形体に向かう傾向がある。

10

20

30

40

50

【0166】

(非最適化単粒子捕捉)

特定の実施形態では、限界希釈などの捕捉技法を使用して、粒子を個別の反応容積に捕捉する。このタイプの捕捉では、捕捉部位で単一細胞のみ優先的に保持する、例えばマイクロ流体デバイスにおける結合親和性または機械的形体などのいかなる捕捉形体も使用しない。例えば限界希釈は、連続希釈の粒子懸濁液を調製し、各希釈物からのアリコートを個別の反応容積に分布することによって実施することができる。各反応容積内の粒子の数を決定し、次いで単粒子のみを有する反応容積の最も高い割合を生成する希釈物を選択し、これを使用して粒子を捕捉し、本明細書に記述されるパラメーター測定を行う。

【0167】

(最適化単粒子捕捉)

いくつかの実施形態では、方法は、ただ1個の粒子を有する個別の反応容積の予測される割合を、限界希釈などの方法を使用して実現されたものよりも増大させるのに(即ち、約33パーセントよりも高く)、最適化された捕捉技法の使用を必要とする。これらの実施形態の変形例で、捕捉は、それぞれただ1個の粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合が、個別の反応容積の総数の少なくとも約35パーセント、少なくとも約40パーセント、少なくとも約45パーセント、少なくとも約50パーセント、少なくとも約55パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約65パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約75パーセント、少なくとも約80パーセント、少なくとも約85パーセント、少なくとも約90パーセント、または少なくとも約95パーセントになるように最適化される。特定の実施形態では、それぞれただ1つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合は、上記列挙された任意の2つのパーセンテージにより定められた範囲内に包含される。それぞれただ1つの粒子のみを有する個別の反応容積の予測される割合は、特定の捕捉技法に応じて、経験的または統計的手段により決定することができる(例えば、限界希釈は、ポアソン分布と矛盾のない手法でただ1つの粒子を有する反応容積を生成する。)。本明細書で使用される「最適化する」という用語は、最適な結果が実現されることを示唆せず、約33パーセントよりも高いただ1つの粒子を有する個別の反応容積の予測される割合を増大させるために何らかの対策がとられるだけである。特定の実施形態では、例えば各反応容積(捕捉部位)での複数粒子の保持を除外する、サイズに基づくメカニズムを使用して最適化された単粒子捕捉を実現することがで

きる。

【0168】

ある実施形態では、それぞれ個別の反応容積（即ち、マイクロ流体デバイス内の各捕捉部位）に単粒子を優先的に捕捉するように、機械的捕捉を単独でまたは1つもしくは複数のその他の捕捉形体と組み合わせて使用する。例えば、各捕捉部位は、ただ1つの粒子を含有するようにサイズ決めされた1つまたは複数の物理障壁を含むことができる。物理障壁の形状は、粒子の保持を増強するように設計することができる。例えば、粒子が細胞である場合、物理障壁は、ただ1つの細胞を保持するのに適切な凹面を形成するようにサイズ決めされ構成することができる。そのような実施形態では、物理障壁は、細胞によって占有されていない場合に、捕捉部位を経る流体の流動が可能になるように設計することができ、かつ／または捕捉部位は、この流動を容易にするドレン形体を含んでいてもよい。特定の実施形態では、マイクロ流体デバイスは、複数の適切にサイズ決めされ／構成された物理障壁を含有し、それによって複数の個々の粒子はデバイス内に保持され、1つの粒子が各物理障壁によって保持されている。例示的な実施形態では、物理障壁は、マイクロ流体デバイス内の個別のコンパートメント内に、コンパートメント当たり1つの領域に、位置付けることができる。コンパートメントは、例えばFluidigm Corp. (South San Francisco, CA) から入手可能であり本明細書に記述されるマイクロ流体アレイなどのアレイを形成するように配置構成することができる。図16A～Gも参照されたい。

【0169】

ある実施形態では、それぞれ個別の反応容積（即ち、マイクロ流体デバイス内の各捕捉部位）に単一細胞を優先的に捕捉するために、親和性に基づく捕捉を単独でまたは1つもしくは複数のその他の捕捉形体、例えば機械的捕捉と組み合わせて使用する。例えば、粒子または粒子成分の結合パートナーを含有するマイクロ流体デバイス表面の別々の領域は、ただ1つの粒子をその領域に結合できるように、かつ後続の粒子の結合が立体障害により遮断されるように、サイズ決めされてもよい。特定の実施形態では、マイクロ流体デバイスは、複数の適切にサイズ決めされた領域を含有し、それによって複数の個々の粒子が、各領域に1つずつ、デバイス内で保持される。例示的な実施形態では、これらの領域は、マイクロ流体デバイス内の個別のコンパートメント内に、コンパートメント当たり1つの領域で、位置付けることができる。コンパートメントは、例えばFluidigm Corp. (South San Francisco, CA) から入手可能であり本明細書に記述されるマイクロ流体アレイなどのアレイを形成するように、配置構成することができる。

【0170】

親和性に基づく最適化された単粒子捕捉の1つの手法は、アッセイされる粒子に結合した結合パートナーを含む支持体の捕捉に基づく。例示的な実施形態では、支持体は、その表面全体に分布した結合パートナーを有するビーズとすることができます。図15Aを参照されたい。ビーズは、各捕捉部位に単一固定化支持体（例えばビーズ）を生成する、カップ形状の捕捉形体を使用した機械的捕捉により捕捉することができる。支持体の固定化に加え、捕捉形体は、ある実施形態では、結合パートナーを呈示する支持体（例えばビーズ）の表面積を削減することができる。この表面は、結合パートナーを呈示する固定化支持体（例えばビーズ）の面積にただ1つの粒子が結合できるように、十分削減することができる。粒子-支持体結合を容易にするために、いくつかの実施形態では、結合パートナーを呈示する固定化支持体の面積は、粒子の流路に面する。特定の例示的な実施形態では、マイクロ流体デバイスの流動チャネルは、一連の捕捉形体を含有する。結合パートナー（例えば細胞特異的抗体）を持つビーズの懸濁液は、チャネルに入力されて、捕捉部位で一連の固定化ビーズを生成する。次いでチャネルを洗浄して、あらゆる遊離（即ち、非固定化）ビーズを除去する。図15Aを参照されたい。次いで細胞懸濁液をチャネルに入力する。個々の細胞は、結合パートナーを呈示する各ビーズの部分に結合することができる。各結合細胞は、任意のその他の細胞が立体閉塞を経てビーズに結合するのを防止する。チ

10

20

30

40

50

ヤネルの洗浄は、結合していない細胞を除去する。図 15 B を参照されたい。次いで捕捉部位間の弁を閉鎖して、個別の反応容積を生成することができ、それぞれは 1 つの結合細胞を有する 1 つの捕捉部位を含有している。1 つまたは複数の集束形体は、ビーズおよび粒子の流れを各捕捉部位に向けて定めるのに用いることができる。あるいは、またはさらに、捕捉形体は、捕捉形体がビーズによって占有されていない場合に流体を捕捉部位内に流すことを可能にするドレン形体を、それぞれ含むことができる。

【 0 1 7 1 】

(捕捉された粒子の数の決定)

ある実施形態では、それぞれ個別の反応容積内にある粒子の数を決定することが有利である。この決定は、単粒子のみを有するコンパートメントの最も高い割合をもたらす希釈液を特定するのに限界希釈を使用するときに行うことができる。この決定は、ただ 1 つの粒子を含有するような反応容積を特定する任意の捕捉技法の後に行うこともできる。例えば、いくつかの実施形態では、アッセイの結果を、それらが 0 、 1 、 2 個、またはそれ以上の細胞を含有する反応容積から得られたものか否かに基づいて、多数の「 ピン 」に分類することができ、これらのピンの 1 つまたは複数の個別の解析を可能にする。

10

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、それぞれ個別の反応容積にある粒子の数は、顕微鏡方により決定される。例えば、個別の反応容積が、十分に透明なまたは半透明であるマイクロ流体デバイスのコンパートメントにある場合、単純な明視野顕微鏡法を使用して、コンパートメントあたりの粒子、例えば細胞を視覚化しカウントすることができる。実施例 1 を参照されたい。以下に記述され、 Fluidigm Corp. (South San Francisco, CA) から入手可能なるマイクロ流体デバイスは、この明視野顕微鏡法の手法で使用するのに適切である。

20

【 0 1 7 3 】

ある実施形態では、染色剤、色素または標識を用いて、それぞれ個別の反応容積内にある粒子の数を検出することができる。個別の反応容積内で検出することができる任意の染色剤、色素または標識を、使用することができる。例示的な実施形態では、蛍光染色剤、色素または標識を使用することができる。用いられる染色剤、色素または標識は、特定の適用例に合わせて調整することができる。粒子が細胞であり、測定されるパラメーターが細胞表面の形体である場合、染色剤、色素または標識は、細胞に浸透する必要のない細胞表面染色剤、色素または標識とすることができます。例えば、細胞表面マーカーに特異的な標識された抗体を用いて、それぞれ個別の反応容積内にある細胞の数を検出することができる。粒子が細胞であり、測定されるパラメーターが細胞（例えば核酸）の内部形体である場合、染色剤、色素または標識は、膜透過性染色剤、色素または標識とすることができます（例えば二本鎖 DNA 結合色素）。実施例 1 を参照されたい。

30

【 0 1 7 4 】

(粒子アッセイ)

(アッセイ法)

粒子は、定性的および / または定量的であってもよい任意の適切なアッセイ方法を使用して、選択されたパラメーターに関してアッセイされてもよい。適切な検出方法は、数ある中でも分光法、電気的方法、流体力学的方法、撮像方法、および / または生物学的方法を含んでもよく、特に、粒子の解析に適合させたまたは適合可能なものである。これらの方法は、数ある中でも、単一または多数の値、時間依存的または時間非依存的（例えば、定常状態または端点）値、および / または平均されたもしくは（時間的および / または空間的に）分布した値の検出を含んでいてもよい。これらの方法は、アナログおよび / またはデジタル値を、測定および / または出力してもよい。

40

【 0 1 7 5 】

分光法は一般に、光（または波様粒子）の任意の性質、特にサンプルとの相互作用を介して変化する性質の検出を含んでいてもよい。適切な分光法は、数ある中でも、吸収、ルミネセンス（光ルミネセンス、化学ルミネセンス、および電気化学ルミネセンスを含む）

50

、磁気共鳴（核および電子スピン共鳴を含む）、散乱（光散乱、電子散乱、および中性子散乱含む）、回折、円二色性、および光学回転を含んでいてもよい。適切な光ルミネンス法は、数ある中でも、蛍光強度（FLINT：fluorescence intensity）、蛍光偏向（FP：fluorescence polarization）、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET：fluorescence resonance energy transfer）、蛍光寿命（FLT：fluorescence lifetime）、全内反射蛍光（TIRF：total internal reflection fluorescence）、蛍光相關分光法（FCS：fluorescence correlation spectroscopy）、蛍光退色後回復（FRAP：fluorescence recovery after photobleaching）、蛍光活性化細胞分類（FACS：fluorescence activated cell sorting）、およびそれらのリン光およびその他の類似物を含んでいてもよい。

10

【0176】

電気的方法は、一般に、任意の電気パラメーターの検出を含んでいてもよい。適切な電気パラメーターには、数ある中でも電流、電圧、抵抗、容量、および／または電力を含めてもよい。

20

【0177】

撮像方法は、一般に、サンプルまたはその成分を視覚化するための空間に分布したシグナルの検出を含んでいてもよく、数ある中でも光学顕微鏡法および電子顕微鏡法が含まれる。

【0178】

生物学的方法は、一般に、粒子によって実行され、媒介され、かつ／または影響を受ける、いくらかの生物学的活性の検出を含んでいてもよい。

【0179】

（アッセイの部位）

粒子パラメーターは、任意の適切な部位でアッセイされてもよい。マイクロ流体デバイスを用いる実施形態では、粒子パラメーターは、マイクロ流体デバイスの内部および／または外部の部位でアッセイされてもよい。

30

【0180】

マイクロ流体デバイスの内部のアッセイ部位は、チャネル、コンパートメント、および／またはトラップ、ならびにそれらの部分を含んでいてもよい。粒子または粒子特性は、粒子（または放出された成分／アッセイ生成物）が静止している間または移動している間に検出されてもよい。静止粒子は、粒子捕捉後にアッセイされてもよい。移動粒子は、粒子捕捉の前および／または後にアッセイされてもよい。特に粒子は、任意の適切な位置決めメカニズムによって、例えば流体の流れによって、検出部位を通過してもよい（流れに基づく検出）。

【0181】

適切な外部アッセイ部位は、マイクロ流体デバイスから離れてまたは独立して、任意の部位を含んでいてもよい。外部アッセイ部位は、マイクロ流体デバイスから粒子、粒子成分または反応生成物を除去した後に、粒子または粒子特性を検出するように使用されてもよい。これらの外部部位の1つまたは複数は、内部部位の代わりにかつ／または内部部位に加えて使用されてもよく、粒子、粒子成分もしくは反応生成物をさらに処理しかつ／または解析することが可能になる。これらのさらなる処理および／または解析方法は、数ある中でも質量分光法、電気泳動、遠心分離、PCR、核酸配列決定、および／または細胞培養も含めた、マイクロ流体デバイスで行われる処理および／または方法と重複してもよいが、好ましくは相補的である。

40

【0182】

（アッセイされるパラメーター）

アッセイ方法は、直接および／または間接的に（例えば、レポーター分子を介して）粒

50

子の任意の適切なパラメーターを検出しつゝまたはモニターしてもよい。適切なパラメーターには、数ある中でも、粒子の同一性、数、濃度、位置（絶対的または相対的）、組成、構造、配列、および／または活性が含まれてもよい。検出されるパラメーターには、数ある中でも、DNA、RNA、タンパク質、酵素、脂質、炭水化物、イオン、代謝物、オルガネラ、添加された試薬、および／またはこれらの複合体の、存在／不在、濃度、局在化、構造（例えは配列）／修飾、配座、組織形態、活性、数、および／または運動などの、分子または超分子特性が含まれてもよい。検出されるパラメーターには、数ある中でも、組織形態、成長、アポトーシス、壊死、溶解、生／死、細胞周期内の位置、シグナル伝達経路の活性、分化、転写活性、基質結合、細胞間相互作用、翻訳活性、複製活性、形質転換、熱衝撃応答、運動性、伝播、膜一体性、および／または神経突起伸長を含めた、任意の適切な細胞の遺伝子型または表現型などの細胞特性を含めてよい。

10

【0183】

（反応生成物の反応およびアッセイ）

上述のように特定の実施形態では、粒子アッセイは、各粒子ごとに複数の反応生成物が生成されるよう、それぞれの個別の反応容積内で各粒子または粒子成分に対して複数の反応を行うことを必要とし得る。この文脈で使用されるように、「反応」という用語は、2つの結合パートナーの結合、および分子が変化し、生成され、または破壊される反応を含む。次いで反応の生成物を、定性的および／または定量的に解析することにより結果を得ることができ、次いでこの結果を各粒子に関連付ける。ある実施形態では、個別の反応容積の内容物を回収することができ、任意選択で反応生成物をさらなる解析に供することができる。

20

【0184】

例示的な反応には、粒子の内部または粒子に関連付けられた1種または複数種の核酸の様々な処理が含まれる。このタイプの適切な反応には、例えは、DNAの増幅、ヌクレアーゼによるDNAの消化、DNAのライゲーション、1つまたは複数のDNA分子上へのアダプター配列のライゲーション、DNA分子内へのトランスポゾン末端のトランスポザーゼ媒介型組込み、DNA配列決定、RNAの逆転写、RNAの増幅、およびRNaseによるRNAの消化が含まれる。粒子の内部または粒子に関連付けられたDNAまたはRNAの全ての全ゲノム増幅および／または全トランск립トーム増幅はそれぞれ、粒子の全DNAまたは全RNA相補体の呈示をもたらすように実施することができる。これらの用語は、典型的には細胞の全DNAまたはRNA相補体に対して使用されるが、任意の粒子に関係するように本明細書ではより広く使用される（例えは、染色体の「全ゲノム増幅」は、染色全体の増幅を目標とする。）。ある実施形態では、個別の反応容積内で実施される反応は、例えは増幅（以下の「核酸配列を標的核酸に組み込むためのマルチプライマー方法」参照）、ライゲーション（例えは、アダプターのライゲーションとして）を介して、または選択されたトランスポゾン末端を組み込むのにトランスポザーゼを使用して、核酸を標的とするように1つまたは複数のヌクレオチド配列を付加する。

30

【0185】

（試薬）

粒子は、パラメーター測定の前、最中または後に、試薬の1種または複数種に曝してもよい。適切な試薬には、本明細書に記述される方法のいずれかで粒子に直接または間接的に接触する、数ある中でも任意の化学物質、化合物、イオン、ポリマー、材料、複合体、混合物、凝集体、および／または生物学的粒子が含まれる。試薬は、化学的／生物学的モジュレーター、検出／アッセイ試薬、溶媒、緩衝液、媒体、洗浄溶液、および／または同様のものなどとしての動作も含め、粒子解析において役割を演じてもよい。

40

【0186】

化学的モジュレーターまたは生物学的モジュレーターは、粒子との相互作用に関して試験される任意の試薬を含んでいてもよい。相互作用は一般に、粒子との特異的結合、および／または任意の検出可能な遺伝子型および／または表現型の粒子（またはモジュレーター）に対する作用を含む。化学的／生物学的モジュレーターは、受容体（例えは、拮抗薬

50

、作動薬、ホルモンなど)と相互作用する配位子を含んでいてもよい。配位子は、小分子、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質などであってもよい。

【0187】

あるいはまたはさらに、化学的/生物学的モジュレーターは、核酸であってもよい。核酸は、DNA、RNA、ペプチド核酸、修飾核酸、および/またはこれらの混合物であってもよく、一本、二本および/または三本鎖であってもよい。核酸は、化学合成、酵素合成、および/または生合成により生成されてもよく、プラスミド、断片、センス/アンチセンス発現ベクター、レポーター遺伝子、ゲノムの一体化/修飾(核酸/ベクター(ノックアウト/-ダウン/-イン)を標的にするなど)、ウイルスベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、dsRNA、siRNA、ヌクレオザイム、および/または同様のものであってもよい。核酸試薬は、脂質試薬(例えば、リポフェクタミン)、沈殿物形成剤(リン酸カルシウムなど)、DMSO、ポリエチレングリコール、核酸を包むウイルスコート、および/または同様のものなど、細胞による核酸の取り込みを促進させるトランスフェクション試薬を含んでいてもよい。

10

【0188】

化学的/生物学的モジュレーターは、種々雑多な化学材料および/または生物学的実体要素を含んでいてもよい。種々雑多な化学的モジュレーターは、イオン(カルシウム、ナトリウム、カリウム、リチウム、水素(pH)、塩化物、フッ化物、ヨウ化物など)、溶解した気体(NO、CO₂、O₂など)、炭水化物、脂質、有機物、ポリマーであってもよい。いくつかの実施形態では、生物学的モジュレーターは、細胞間相互作用を測定するために、細胞、例えば感染細胞に曝されてもよい。生物学的モジュレーターは、任意の細胞、ウイルス、またはオルガネラを含んでいてもよい。

20

【0189】

粒子が細胞である場合、細胞は、本明細書に記述される方法で使用する前に前処理されてもよく、または任意の適切な加工ステップによるこれらの方法の最もしくは後に処理されてもよい。そのような加工ステップは、モジュレーターの処理、トランスフェクション(感染、注射、粒子衝撃、リポフェクション、共沈殿物トランスフェクションなどを含む)、アッセイ試薬による加工、および/または同様のものを含んでいてもよい。

【0190】

本明細書に記述される方法に用いられる試薬は、検出/アッセイ試薬を含むことができる。検出/アッセイ試薬は一般に、粒子(または成分)の既存のまたは新たに生成されたパラメーターの検出のため粒子(または粒子成分)の加工を容易にるように、粒子に接触する任意の試薬を含む。検出/アッセイ試薬は、数ある中でも、染色剤、色素、標識、酵素、基質、補因子、および/または特異的結合パートナー(SBP: specific binding partner)を含んでいてもよい。適切な標識は、発光団、蛍光団、色素原、発色団、および/または同様のものであってもよい。染色剤、色素、または標識は、SBPと共に役していくてもよくまたはSBPであってもよく；酵素基質として作用してもよく；細胞または細胞構造(例えば、DNA色素、膜色素、輸送色素など)を本質的に標識してもよく；指示薬色素(カルシウム指示薬、pH指示薬など)として作用してもよく；かつ/または同様のものであってもよい。酵素は、標識を生成物に組み込むことによってかつ/または引き続き検出され得る生成物を生成することによって、粒子アッセイで動作してもよい。適切な酵素には、数ある中でも、ポリメラーゼ(RNAおよび/またはDNA)、熱安定性ポリメラーゼ(Taq、VENTなど)、ペルオキシダーゼ(HRPなど)、ホスファターゼ(アルカリホスファターゼなど)、キナーゼ、メチラーゼ、リガーゼ、プロテアーゼ、ガラクトシダーゼ(-ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼなど)、トランスフェラーゼ(クロルアムフェニコールアセチルトランスフェラーゼなど)、オキシドレダクターゼ(ルシフェラーゼなど)、および/またはヌクレアーゼ(DNAse、RNaseなど)を含めてよい。抗体、ジゴキシゲニン、核酸などのSBPは、染色剤、色素、標識、酵素、および/または他のSBPに直接共役されてもよく；色素、標識、および/または酵素に非共有結合されてもよく(追加の曝露ステップで、結

30

40

40

40

50

合前または結合後のいずれかで) ; かつ / または同様の状態であってもよい。

【0191】

(单粒子中の核酸の解析)

特定の実施形態では、本明細書に記述される方法は、1種または複数種の核酸の解析で使用される。例えば、特定の標的核酸の存在および / またはレベルは、標的核酸、例えばヌクレオチド配列の特徴でできるように、決定することができる。例示的な実施形態では、粒子の内部のまたは粒子に関連付けられた1つまたは複数のサンプル核酸を有する粒子の集団は、それぞれが好ましくは单粒子のみ含有する個別の反応容積に捕捉される。DNAのライゲーションおよび / または増幅、またはRNAの逆転写および / または増幅などの反応が実施され、それにより1種または複数種の標的核酸を含有する任意の反応容積に關して反応生成物が生成される。これらの反応生成物は、反応容積内で解析することができる、または反応容積は、DNA配列決定などの後続の解析で別々にまたはプールに回収することができる。

10

【0192】

ある実施形態では、反応は、1つまたは複数のヌクレオチド配列を反応生成物に組み込む。これらの配列は、ライゲーション、トランスポザーゼ媒介型組込み、または組み込まれる配列を含む1つもしくは複数のヌクレオチドタグを持った1つもしくは複数のプライマーを使用した増幅を含めた、任意の適切な方法によって組み込まれてもよい。これらの組み込まれたヌクレオチド配列は、本明細書に記述される任意のアッセイを容易にする任意の機能を発揮することができる。例えば、1つまたは複数のヌクレオチド配列を反応生成物に組み込んで、反応生成物の供給源であった反応容積の同一性など反応生成物に関する情報の項目をコード化することができる。この場合、反応は、「コード化反応」と本明細書では呼ぶ。「バーコード」ヌクレオチド配列を標的核酸に付加するためのマルチプライマー方法は、この目的で用いることができ、以下に記述する。特定の実施形態では、核酸増幅は、少なくとも2つの増幅プライマーを使用して実施され、各増幅プライマーはバーコードヌクレオチド配列を含んでおり、バーコードヌクレオチド配列の組合せは、反応生成物の供給源であった反応容積の同一性をコード化する(「組合せバーコード化」と呼ぶ。)。これらの実施形態は、個別の反応容積が、例えばFluidigm Corp. (South San Francisco, CA) から入手可能であるようなかつ以下に記述されるような(「マイクロ流体デバイス」参照)マトリックス型マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメントにある場合に、都合良く用いられる。それぞれ個別のコンパートメントは、コード化反応が実施されたコンパートメントの行および列を特定するバーコードヌクレオチド配列の組合せを含有することができる。反応容積が回収され、バーコードの組合せの検出を含むさらなる解析に供される場合、その結果を特定のコンパートメントに關連付けることができ、それによってコンパートメント内の粒子に關連付けることができる。この關連付けは、粒子の集団に関する单粒子(例えば单一細胞)の解析が可能になるように、单粒子を含有する全てのコンパートメントに關して実施することができる。

20

【0193】

以下のセクションは、適切な核酸サンプルについて論じ、これらの中で、本明細書に記述される方法での解析に適切な標的核酸について論じる。次いで増幅プライマーの設計および例示的な増幅方法について記述する。この後、核酸配列を標的核酸に組み込むマルチプライマー増幅方法について記述する。残りのセクションは、様々な標識の方策と、望ましくない反応成分の除去について論ずる。これらのセクションは、核酸配列を標的核酸に組み込むために増幅を用いる方法、および / またはそれらの解析に關して記述する。しかし当業者なら、本明細書に記述される方法の多くを実施するのに、増幅が極めて重要なものではないことが、本明細書の指針に基づいて理解する。例えば、核酸配列は、ライゲーションなどのその他の手段によってまたはトランスポザーゼを使用して、組み込むことができる。

30

【0194】

40

50

(サンプル核酸)

核酸（「サンプル」）の調製は、生物学的供給源から得ることができ、当技術分野で公知の従来の方法を使用して調製することができる。特に、本明細書に記述される方法で有用なDNAまたはRNAは、細菌、原虫、真菌、ウイルス、オルガネラ、および植物または動物など高等生物、特に哺乳類、とりわけヒトを含めた任意の供給源から、抽出および／または増幅することができる。適切な核酸は、環境源（例えば、池の水）から、人工生成物（例えば食品）から、および法医学的サンプルから得ることもできる。核酸は、細胞、体液（例えば、血液、血液画分、尿など）、または組織サンプルから、様々な標準的技法のいずれかによって抽出または増幅することができる。例示的なサンプルは、血漿、血清、髄液、リンパ液、腹水、胸水、口内液、および皮膚の外側切片のサンプル；気道、腸管、生殖管および尿管からのサンプル；涙、唾液、血球、幹細胞または腫瘍のサンプルを含む。例えば、胎児性DNAのサンプルは、胚からまたは母体血から得ることができる。サンプルは、生きているもしくは死んでいる生物からまたはin vitro培養物から得ることができる。例示的なサンプルは、単一細胞、ホルマリン固定および／またはパラフィン包埋組織サンプル、ならびに針生検を含むことができる。本明細書に記述される方法で有用な核酸は、cDNA、コスミド、YAC、BAC、P1、およびPACライブラリーなどを含めた1つまたは複数の核酸ライブラリーから誘導することもできる。

【0195】

問題となっている核酸は、当技術分野で周知の方法を使用して単離することができ、供給源、核酸の性質、および類似の因子に応じて特定の方法が選択される。サンプル核酸は、純粋な形である必要はないが、典型的には問題となっている反応を行わせるのに十分純粋なものである。標的核酸がRNAである場合、RNAは、当技術分野で公知でありかつ例えばSambrook, J.、Fritsch, E. F.、およびManiatis, T.、Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1、2、3巻(1989)に記載されている標準的な方法によって、cDNAに逆転写することができる。

【0196】

(標的核酸)

本明細書で記述される方法に有用な標的核酸は、上述のサンプル核酸のいずれかから誘導することができる。典型的な実施形態では、少なくともいくらかのヌクレオチド配列情報は、標的核酸に関して知られることになる。例えば、PCRがコード化反応として用いられる場合、十分な配列情報は一般に、適切な増幅プライマーが設計可能なように所与の標的核酸の各端部に関して入手可能である。代替の実施形態では、プライマーの標的特異的配列を、ランダムまたは変性ヌクレオチド配列により置き換えることができる。

【0197】

標的は、例えば、ウイルス、細菌、原虫または真菌などの病原体に関連付けられた核酸；RNA、例えば、過発現または過小発現が疾患を示すもの、組織または発生特異的手法で発現するもの；または特定の刺激によって誘導されるもの；特定の多型性(SNPなど)、対立遺伝子またはハプロタイプであって、例えば遺伝子型判定におけるものに関して解析することができるゲノムDNAを含むことができる。特に関心が持たれるのが、遺伝的疾患またはその他の病理学的状態で変化した（例えば、増幅した、欠失した、再配列した、かつ／または突然変異した）ゲノムDNA；望ましいまたは望ましくない特色に関連付けられた配列；および／または固体を一義的に特定する配列（例えば、法医学的なまたは父性の決定において）である。

【0198】

様々な実施形態では、増幅される標的核酸は、例えば25塩基、50塩基、100塩基、200塩基、500塩基または750塩基とすることができる。本明細書に記述される方法の、ある実施形態では、ロングレンジPCRなどのロングレンジ増幅方法を用いて、増幅混合物からアンプリコンを生成することができる。ロングレンジPCRは、1または

10

20

30

40

50

数キロベース (k b : kilobase) から 50 kb に及ぶ標的核酸を増幅可能にする。様々な実施形態では、ロングレンジ PCR により増幅される標的核酸は、その長さが少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45 または 50 kb である。標的核酸は、端点としてこれらの値のいずれか (例えば、25 塩基から 100 塩基または 5 ~ 15 kb) を有する任意の範囲に包含することもできる。

【 0199 】

(プライマー設計)

核酸増幅に適切なプライマーは、重合用の薬剤の存在下、伸長生成物の合成がプライム処理されるように十分長い。プライマーの正確な長さおよび組成は、例えばアニーリング反応の温度、プライマーの供給源および組成、またプローブが用いられる場合には、プライマーアニーリング部位までのプローブアニーリング部位の近接性、プライマー : プローブの濃度比を含めた、多くの因子に依存することになる。例えば、標的核酸配列の複雑さに応じて、オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には約 15 から約 30 ヌクレオチドの範囲で含有するが、より多くのまたはより少ないヌクレオチドを含有してもよい。プライマーは、そのそれぞれの鎖を選択的にアニールしつつ安定な二重鎖を形成するのに、十分相補的にすべきである。当業者なら、問題となっている標的核酸を増幅するのに、適切なプライマー対をどのように選択するかを理解している。

【 0200 】

例えば、PCR プライマーは、任意の市販のソフトウェアまたはオープンソースソフトウェア、例えば Primer 3 (例えば、Rozen および Skaletsky (2000) Meth . Mol . Biol . 、 132 : 365 ~ 386 ; www . broad . mit . edu / node / 1060 などを参照) を使用することによって、または Roche UPL ウェブサイトにアクセスすることによって、設計することができる。アンブリコン配列は、括弧で閉じられた UPL プローブ配列と共に Primer 3 プログラムに入力されることにより、Primer 3 プログラムが括弧で閉じられたプローブ配列の両側でプライマーを設計することを確実にする。

【 0201 】

プライマーは、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限、または Narang ら (1979) Meth . Enzymol . 68 : 90 ~ 99 のホスホトリエステル法 ; Brown ら (1979) Meth . Enzymol . 68 : 109 ~ 151 のホスホジエステル法 ; Beaucage ら (1981) Tetra . Lett . 、 22 : 1859 ~ 1862 のジエチルホスホラミダイト法 ; および米国特許第 4,458,066 号明細書の固体支持法などの方法による直接的な化学合成を含めた任意の適切な方法によって調製されてもよく、または商業上の供給元から得ることができる。

【 0202 】

プライマーは、Sephadex カラム (Amersham Biosciences, Inc. 、 Piscataway, NJ) または当業者の公知のその他の方法を使用することによって、精製されてもよい。プライマー精製は、本明細書に記述される方法の感受性を改善することができる。

【 0203 】

(増幅方法)

核酸は、例えば、後で行われる解析のために標的核酸の濃度を増大させるため、かつ / または 1 つもしくは複数のヌクレオチド配列を組み込むため、かつ / または 1 種もしくは複数の標的核酸の検出および / または定量および / または配列決定のため、任意の有用な目的で本明細書に記述される方法に従い増幅することができる。増幅は、液滴、エマルジョン、容器、マイクロタイタープレートのウェル、マトリックス型マイクロ流体デバイスのコンパートメントなどで実施することができる。

【 0204 】

(標的核酸の濃度を増大させるための増幅)

10

20

30

40

50

標的核酸の濃度を増大させるための増幅は、反応混合物中の全ての核酸、特定の型の全ての核酸（例えば、DNAまたはRNA）、または特異的標的核酸の増幅を目指す。特定の例示的な実施形態では、全ゲノム増幅は、ゲノムDNAの濃度を増大させるために実施することができ；RNAは、増幅に先立って、任意選択で逆転写ステップを行うことができ；かつ／または一般的もしくは標的特異的な前置増幅を行うことができる。

【0205】

(全ゲノム増幅)

ゲノムDNAを解析するには、サンプル核酸を、全ゲノム増幅 (WGA : whole genome amplification) 手順を使用して増幅することができる。適切なWGA手順には、プライマー伸長PCR (PEP : primer extension PCR) および改善されたPEP (I-PEP : improved PEP)、変性オリゴヌクレオチドプライムPCR (DOP-PCR : degenerated oligonucleotide primed PCR)、ライゲーション媒介型PCR (LMP ; ligation-mediated PCR)、T7に基づくDNAの線形増幅 (TLAD : T7-based linear amplification of DNA)、および多重置換増幅 (MDA : multiple displacement amplification) が含まれる。これらの技法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれかつ特にその記述が単一細胞核酸解析に有用な方法についてである、2010年7月15日に公開された米国特許出願公開第20100178655号明細書 (Hamiltonら) に記載されている。

10

20

20

【0206】

WGA用のキットは、例えば、Qiagen, Inc. (Valencia, CA USA)、Sigma-Aldrich (Rubicon Genomics；例えば、Sigma GenomePlex (登録商標) 単一細胞全ゲノム増幅キット、PN WGA4-50RXN) から市販されている。本明細書に記述されるWGAステップは、製造業者の取扱説明書に従って利用可能なキットのいずれかを使用して実施することができる。

30

【0207】

特定の実施形態では、WGAステップは制限されたWGAであり、即ちWGAは、反応平坦域に達する前に停止される。典型的には、WGAは、2回超の増幅サイクルで行われる。ある実施形態では、WGAは、約10回よりも少ない増幅サイクル、例えば4回から8回の間（末端値を含む）で行われる。しかしWGAは、3、4、5、6、7、8もしくは9サイクル、またはこれらの値のいずれかにより定められた範囲に包含されるサイクル数で行うことができる。

40

【0208】

(RNA増幅)

ある実施形態では、単一細胞または細胞の小集団からのRNAを、1つまたは複数のRNA標的に関して解析することができる。適切なRNA標的には、mRNA、ならびに非コード化RNA、例えば核小体低分子RNA (snorRNA : small nucleolar RNA)、マイクロRNA (miRNA : microRNA)、低分子干渉RNA (siRNA : small interfering RNA)、およびPiwi相互作用RNA (piRNA : Piwi-interacting RNA) が含まれる。特定の実施形態では、問題となっているRNAは、例えば逆転写または増幅によってDNAに変換される。

【0209】

例えば、単一細胞または細胞の小集団のmRNAを解析するには、mRNAを、一般にはmRNA集団のDNAの代表物に変換させる。ある実施形態では、用いられる方法は、好ましくはDNAの集団をもたらし、各cDNAの相対的な量は、サンプル集団中の対応するmRNAの相対的な量とほぼ同じである。

【0210】

50

特定の実施形態では、逆転写は、標準的な技法により逆転写酵素を利用してmRNA鑄型からcDNAを生成するのに用いることができる。細胞のmRNA集団の逆転写は、例えば特異的プライマー、オリゴ-dT、またはランダムプライマーによるプライム処理を受けることができる。細胞mRNAを代表するcDNAライブラリーを合成するには、サンプルの細胞RNAに相補的なcDNAの第1の鎖を、逆転写酵素を使用して合成することができる。これは、市販のBRL Superscript IIキット(BRL, Gaithersburg, Md.)または任意のその他の市販のキットを使用して行うことができる。逆転写酵素は、鑄型としてRNAを優先的に利用するが、一本鎖DNA鑄型を利用することもできる。したがって、第2の鎖のcDNAの合成は、逆転写酵素および適切なプライマー(例えば、ポリ-A、ランダムプライマーなど)を使用して実施することができる。第2の鎖の合成は、E. coli DNAポリメラーゼIを使用して実施することができる。RNAは、第2のcDNAが合成されると同時にまたはその後に、除去することができる。これは例えば、RNAを分解するE. coli RNase HなどのRNaseに、この混合物を処理することによって行われる。

10

【0211】

その他の実施形態では、増幅方法は、mRNA鑄型からcDNAを生成するのに用いられる。のような実施形態では、mRNA集団を代表するcDNAの集団を生成する増幅方法が、典型的には用いられる。

20

【0212】

単一細胞または細胞の小集団からの非コード化RNAの解析は、典型的には、問題となっているRNAからDNAへの変換によっても開始される。この変換は、逆転写または増幅によって実施することができる。ある実施形態では、用いられる方法は、好ましくはDNAの集団をもたらし、各DNAの相対的な量は、サンプル集団中の対応するmRNAの相対的な量とほぼ同じである。標的RNAは、問題となっているRNAに優先的にアニールするプライマーを使用して、選択的に逆転写または増幅することができる。適切なプライマーは市販されており、または当業者例により設計することができる。例えばLife Technologiesは、マイクロRNA(miRNA: microRNA)標的のプライマーのMegaplex(商標)プールを販売している。これらのプライマーは、逆転写(RT: reverse transcription)および特異的標的増幅(STA: specific target amplification)の両方で使用することができる。例えば、実施例2Bを参照されたい。

30

【0213】

(前置増幅)

前置増幅は、一般に、例えば一組のランダムプライマー、存在する複数のもしくは全ての核酸に共通する1つもしくは複数の配列に特異的なプライマー(例えば、ポリ-A尾部をプライム処理するポリ-dT)、または一組のランダムプライマーと特異的プライマーとの組合せを使用して、反応混合物中の核酸配列の濃度を増大させるのに実施することができる。あるいは前置増幅は、問題となっている1種または複数種の標的核酸に特異的な1つまたは複数のプライマー対を使用して、実施することができる。特定の例示的な実施形態では、RNAから生成されたcDNA(例えばcDNA)により生成された増幅ゲノムは、問題となっている1種または複数種の標的核酸に特異的な1つまたは複数のアンプリコンを含む前置増幅反応混合物が生成されるように、前置増幅することができる。前置増幅は、典型的には、前置増幅プライマー、適切な緩衝系、ヌクレオチド、およびDNAポリメラーゼ酵素(例えば、「ホットスタート」条件に合わせて修飾されたポリメラーゼ酵素)を使用して実施される。

40

【0214】

特定の実施形態では、前置増幅プライマーは、サンプルが調製されるが概して濃度を低減させる増幅アッセイで使用されるものと、同じ配列である。プライマー濃度は、増幅アッセイで使用されるプライマー濃度の、例えば約10分の1から約250分の1にすることができる。実施形態は、増幅アッセイにおけるプライマー濃度の約10、20、35、

50

50、65、75、100、125、150、175および200分の1であるプライマーの使用を含む。

【0215】

特定の実施形態では、前置増幅は、少なくとも2サイクル実施される。ある実施形態では、前置増幅は、約20サイクルよりも少なく実施され、例えば8回から18回サイクル（末端値を含む）で実施される。しかし前置増幅は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24サイクルで、またはこれらの値のいずれかにより定められた範囲内に包含されるサイクル数で行うことができる。例示的な実施形態では、前置増幅は、検出されるアンプリコンを約16,000倍増加させるために、約14サイクル実施される。

10

【0216】

（核酸配列を標的核酸に組み込むための増幅）

1つまたは複数のヌクレオチド配列を標的核酸に組み込む増幅は、標的核酸にアニールされる部分に加えて1つまたは複数の核酸配列を含有する、2つ以上のプライマーを使用して実施することができる。これらの部分の1つまたは複数は、核酸配列を、サンプル中の本質的に全ての核酸に組み込むように、ランダム配列を含有していてもよい。あるいはまたはさらに、これらの部分の1つまたは複数は、存在する複数のまたは全ての核酸に共通する1つまたは複数の配列に特異的であってもよい。その他の実施形態では、プライマーは、1種または複数種の特定の標的核酸に特異的な部分を含む。核酸配列は、2つ程度のプライマーを使用して組み込むことができる。しかし様々な実施形態は、以下により詳細に論じられるように、3、4、5もしくは6個、またはそれ以上のプライマーを用いる。

20

【0217】

（3プライマー法）

特定の実施形態では、本発明は、複数の（例えば、少なくとも3つ）の選択されたヌクレオチド配列を1種または複数種の標的核酸に組み込むための増幅方法を提供する。この方法は、いくつかの実施形態では複数のサンプル中で複数の標的核酸を増幅することを必要とする。例示的な実施形態では、同じ組の標的核酸は、2種以上の異なるサンプルのそれぞれで増幅することができる。サンプルは、多少なりとも互いに異なる可能性があり、例えばサンプルは、異なる組織、対象、環境源などからのものである可能性がある。少なくとも3つのプライマーを、各標的核酸を増幅するのに使用することができ、即ち：順方向および逆方向増幅プライマーであって、各プライマーは標的特異的部分を含んでおり、1つまたは両方のプライマーはヌクレオチドタグを含んでいる。標的特異的部分は、適切なアニール条件下で標的に特異的にアニールすることができる。順方向プライマーのヌクレオチドタグは、逆方向プライマーのヌクレオチドタグと同じまたは異なる配列を有することができる。一般にヌクレオチドタグは、標的特異的部分の5'である。第3のプライマーは、バーコードヌクレオチド配列と、第1および/または第2のヌクレオチドタグ特異的部分とを含むバーコードプライマーである。バーコードヌクレオチド配列は、バーコードプライマーが増幅反応に用いられたときに生成されたアンプリコンに関する情報をコード化するよう選択された配列である。タグ特異的部分は、順方向および逆方向プライマーのヌクレオチドタグの1つまたは両方に、特異的にアニールできる。バーコードプライマーは、一般にタグ特異的部分の5'である。

30

【0218】

バーコードプライマーは、典型的には増幅混合物中に、順方向および/または逆方向または（インナー）プライマーよりも多く存在する。より具体的には、バーコードプライマーが順方向プライマー中のヌクレオチドタグにアニールする場合、バーコードプライマーは一般に順方向プライマーよりも過剰に存在する。バーコードプライマーが逆方向プライマー中のヌクレオチドタグにアニールする場合、バーコードプライマーは一般に逆方向プライマーよりも過剰に存在する。それぞれの場合において、増幅混合物中の第3のプライマー、即ち逆方向プライマーまたは順方向プライマーはそれぞれ、例示的な実施形態では

40

50

バーコードプライマーの場合とほぼ同様の濃度で存在することができる。一般にバーコードプライマーは、かなり過剰に存在する。例えば、増幅混合物中のバーコードプライマーの濃度は、順方向および/または逆方向プライマーの濃度に対して少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも10³倍、少なくとも5×10³倍、少なくとも10⁴倍、少なくとも5×10⁴倍、少なくとも10⁵倍、少なくとも5×10⁵倍、少なくとも10⁶倍、またはそれ以上とすることができる。さらに、バーコードプライマーよりも過剰な濃度は、端点として上記値のいずれかを有する任意の範囲内に包含することができる（例えば、2倍から10⁵倍）。例示的な実施形態では、バーコードプライマーが、順方向プライマーのヌクレオチドタグに特異的なタグ特異的部分を有する場合、順方向プライマーはピコモルからナノモル濃度で存在することができ、例えば約5pMから500nM、約5pMから100nM、約5pMから50nM、約5pMから10nM、約5pMから5nM、約10pMから1nM、約50pMから約500pM、約100pM、または端点としてこれらの値のいずれかを有する任意のその他の範囲（例えば、10pMから50pM）である。順方向プライマーのこれら濃度のいずれかと組み合わせて使用することができるバーコードプライマーの適切な例示的な濃度には、約10nMから約10μM、約25nMから約7.5μM、約50nMから約5μM、約75nMから約2.5μM、約100nMから約1μM、約250nMから約750nM、約500nM、または端点としてこれらの値のいずれかを有する任意のその他の範囲（例えば、100nMから500nM）が含まれる。順方向およびバーコードプライマーのそのような濃度を使用した増幅反応において、逆方向プライマーは、バーコードプライマーと同程度の濃度を有する（例えば、約10倍以内、約5倍以内、または等しい。）。

10

20

30

40

50

【0219】

各増幅混合物を増幅に供することにより、タグ付き標的ヌクレオチド配列を含む標的アンプリコンを生成することができ、それぞれは、標的ヌクレオチド配列を挟む第1および第2のヌクレオチドタグと、標的アンプリコンの5'または3'末端にある少なくとも1つのバーコードヌクレオチド配列とを含んでいる（標的アンプリコンの1本鎖に対して）。ある実施形態では、第1および第2のヌクレオチドタグおよび/またはバーコードヌクレオチド配列は、標的核酸への実質的なアニーリングが回避されるように選択される。そのような実施形態では、タグ付き標的ヌクレオチド配列は、以下の要素：5' - (バーコードヌクレオチド配列) - (順方向プライマーからの第1のヌクレオチドタグ) - (標的ヌクレオチド配列) - (逆方向プライマーからの第2のヌクレオチドタグ配列) - 3'または5' - (順方向プライマーからの第1のヌクレオチドタグ) - (標的ヌクレオチド配列) - (逆方向プライマーからの第2のヌクレオチドタグ配列) - (バーコードヌクレオチド配列) - 3'を有する分子を含むことができる。

【0220】

（4プライマー法）

いくつかの実施形態では、3つを超えるプライマーを用いて、所望の要素を標的ヌクレオチド配列に付加することができる。例えば4つのプライマーを用いることにより、上記にて論じたものと同じ要素に加え、任意選択で追加のバーコード、例えば5' - (バーコードヌクレオチド配列) - (順方向プライマーからの第1のヌクレオチドタグ) - (標的ヌクレオチド配列) - (逆方向プライマーからの第2のヌクレオチドタグ) - (追加のバーコードヌクレオチド配列) - 3'を有する分子を生成することができる。例示的な4プライマー実施形態では、順方向プライマーは、標的特異的部分および第1のヌクレオチドタグを含み、逆方向プライマーは、標的特異的部分および第2のヌクレオチドタグを含む。これら2つのプライマーは一緒になって、「インナープライマー」を構成する。残りの2つのプライマーは、インナープライマーに存在する第1および第2のヌクレオチドタグにアニールされる「アウタープライマー」である。1つのアウタープライマーは、上述の

のようなバーコードプライマーである。第2のアウタープライマーは、第2のタグ特異的部分および追加のバーコードヌクレオチド配列を含むことができ、即ち第2のバーコードプライマーとすることができます。

【0221】

3つを超えるプライマーからの要素を組み込むための増幅は、1つまたは多数の増幅反応で実施することができる。例えば4プライマー増幅は、4つ全てのプライマーが存在する1つの増幅反応で実施することができる。あるいは4プライマー増幅は、例えば2つの増幅反応：インナープライマーを組み込む反応と、アウタープライマーを組み込むための個別の増幅反応とで実施することができる。4つ全てのプライマーは、1つの増幅反応に存在し、アウタープライマーは、一般に反応混合物中に過剰に存在する。順方向および/または逆方向プライマーに対する、バーコードプライマーに関して上記にて示される相対的な濃度の値は、1ステップ、4プライマー増幅反応でのインナープライマーに対する、アウタープライマーの濃度にも当てはまる。

【0222】

(組合せ方法)

4プライマー増幅反応の例示的な実施形態では、アウタープライマーのそれぞれが一意的なバーコードを含有する。例えば、1つのバーコードプライマーは、要素5' - (第1のバーコードヌクレオチド配列) - (第1のヌクレオチドタグ) - 3' で構成される可能性があり、第2のバーコードプライマーは、要素5' - (第2のバーコードヌクレオチド配列) - (第2のヌクレオチドタグ) - 3' で構成される可能性がある。この実施形態では、第1のバーコードプライマーの数値 (J) を、第2のバーコードプライマーの数値 (K) と組み合わせて、 $J \times K$ の一意的増幅生成物を生成することができる。

【0223】

本発明のさらなる例示的な実施形態では、4つを超えるプライマーを单一反応内で組み合わせて、バーコードヌクレオチド配列とヌクレオチドタグとの異なる組合せを付加することができる。例えば、以下の要素：5' - (第1のバーコードヌクレオチド配列) - (第1のヌクレオチドタグ) - 3' , 5' - (第1のバーコードヌクレオチド配列) - (第2のヌクレオチドタグ) - 3' , 5' - (第1のバーコードヌクレオチド配列) - (第1のヌクレオチドタグ) - 3' , 5' - (第1のバーコードヌクレオチド配列) - (第2のヌクレオチドタグ) - 3' を含有するアウターバーコードプライマーを、上述のインナーブラック特異的プライマーと組み合わせて、所望のアンプリコン配列を有するバーコードプライマーの全ての組合せを含有する増幅生成物プールを生成することができる。

【0224】

本発明のその他の例示的な実施形態では、上述の組合せまたは当業者に明らかであると考えられるその他の組合せのいずれかのアウターバーコードプライマーを、同じ第1および第2のヌクレオチドタグ配列を持つ複数対の標的特異的順方向プライマー配列と組み合わせることができる。例えば、最大10個の異なる標的特異的順方向プライマー配列を同じ第1のヌクレオチドタグと組み合わせたものと、最大10個の異なる標的特異的逆方向プライマー配列を同じ第2のヌクレオチドタグと組み合わせたものとを含有するインナープライマーを、最大2個または最大4個のアウターバーコードプライマーと組み合わせて、上述の多数の増幅生成物を発生させることができる。様々な実施形態では、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも2000、少なくとも5000、または少なくとも10000個の異なる標的特異的プライマー対であって同じ第1のヌクレオチドタグおよび第2のヌクレオチドタグを持つプライマー対を、最大2個または最大4個のアウターバーコードプライマーと組み合わせて、多数の増幅生成物を発生させることが可能である。

【0225】

(2方向組合せ方法)

4プライマー増幅反応の例示的な実施形態では、増幅によって、得られるアンプリコンの各端部にバーコードの組合せが生成されるように、インナーおよびアウタープライマー

はそれぞれ一意的なバーコードを含むことができる。この手法は、バーコードの組合せを配列のいずれかの端部から読み取ることができるので、アンプリコンの配列決定をする場合に有用である。例えば、4つプライマーを用いて、以下の要素：5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3'を有する分子を生成することができる。例示的な4プライマー実施形態では、2つのインナープライマーは：

第1のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列、および標的特異的部分を含む順方向インナープライマーと；

標的特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列、および第2のヌクレオチドタグを含む逆方向インナープライマーと

を含むことができる。2つのアウタープライマーは：

第2のバーコードヌクレオチド配列および第1のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向アウタープライマーと；

第2のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーとを含むことができる。上記にて論じたように、インナーおよびアウタープライマーが同じ反応混合物に含まれる場合、アウタープライマーが好ましくは過剰に存在する。

【0226】

要素の類似の組合せは、インナーおよびアウタープライマーに加えて「スタッファープライマーを用いる6プライマー増幅方法で生成されてもよい。したがって例えば、2つのインナープライマーは：

第1のヌクレオチドタグおよび標的特異的部分を含む順方向インナープライマーと；

標的特異的部分および第2のヌクレオチドタグを含む逆方向インナープライマーとを含むことができる。2つのスタッファープライマーは：

第3のヌクレオチドタグ、第1のバーコードヌクレオチド配列、および第1のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向スタッファープライマーと；

第2のヌクレオチドタグ特異的部分、第1のバーコードヌクレオチド配列、第4のヌクレオチドタグを含む逆方向スタッファープライマーと

を含むことができる。2つのアウタープライマーは：

第2のバーコードヌクレオチド配列および第3のヌクレオチドタグ特異的部分を含む順方向アウタープライマーと；

第4のヌクレオチドタグ特異的部分および第2のバーコードヌクレオチド配列を含む逆方向アウタープライマーと

を含むことができる。核酸増幅は、以下の要素：5' - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第3のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第4のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 3'を含むアンプリコンを生成する。増幅は、1つ、2つ、3つの増幅反応で実施することができる。例えば、3つのプライマー対の全ては、1つの反応に含めることができる。

あるいは2つの反応を実施することができ、例えば第1の反応はインナーおよびスタッファープライマーを含み、第2の反応はアウタープライマーのみを含み；または第1の反応はインナープライマーのみを含んでその後にスタッファーよりもアウタープライマーを含む第2の反応を行う。複数のプライマーが存在する場合、上記にて論じたように、他の対に比べて「アウター」対であるプライマー対が好ましくは過剰に存在する。したがって、インナーおよびスタッファープライマーが反応混合物に含まれる場合、スタッファープライマーが好ましくは過剰に存在し、スタッファーよりもアウタープライマーが反応混合物に含まれる場合には、アウタープライマーが好ましくは過剰に存在する。3つのプライマー対の全てが単一反応に含まれる場合、スタッファープライマーは、インナープライマーの濃度とアウタープライマーの濃度との中間の濃度で存在することができる。

10

20

30

40

50

【0227】

(核酸配列を組み込む反応)

核酸配列を標的核酸に組み込むのに、任意の方法を用いることができる。例示的な実施形態では、PCRが用いられる。3つ以上のプライマーを使用する場合、第1および第2のヌクレオチドタグとバーコードヌクレオチド配列とを組み込むのに、増幅が少なくとも3サイクル一般に実施される。様々な実施形態では、増幅は、5、10、15、20、25、30、35、40、45もしくは50サイクル、または端点としてこれらの値のいずれかを有する範囲内に包含される任意の回数のサイクル（例えば、5～10サイクル）が実施される。特定の実施形態では、増幅は、標的全体にわたってかつサンプル全体にわたって標的アンプリコンのコピー数を正規化するのに、十分な回数のサイクルで実施される（例えば、15、20、25、30、35、40、45もしくは50サイクル、または端点としてこれらの値のいずれかを有する範囲内に包含される任意の回数のサイクル）。

【0228】

上述の方法の特定の実施形態は、実質的に均一な増幅を提供し、複数の標的アンプリコンをもたらし、アンプリコンの大多数は、複数の標的アンプリコンに関して計算された平均コピー数に比較的近いレベルで存在する。したがって、様々な実施形態では、標的アンプリコンの少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも91、少なくとも92、少なくとも93、少なくとも94、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98、または少なくとも99パーセントが、標的アンプリコンの平均コピー数の50パーセントよりも高くかつ標的アンプリコンの平均コピー数の2倍未満で存在する。

【0229】

(バーコード化の適用例)

例示的な実施形態では、バーコードヌクレオチド配列は、特定のサンプルを特定する。したがって例えば、一組のT標的核酸はSサンプルのそれぞれで増幅することができる（ここでSおよびTは整数であり、典型的には1よりも大きい。）。そのような実施形態では、増幅を各サンプルごとに個別に行うことができ、この場合、同じ組の順方向および逆方向プライマーを各サンプルごとに使用しあつ同じ組の順方向および逆方向プライマーはこの組の全てのプライマーに共通する少なくとも1つのヌクレオチドタグを有している。異なるバーコードプライマーを各サンプルごとに使用することができ、この場合、バーコードプライマーは異なるバーコードヌクレオチド配列を有するが、共通するヌクレオチドタグにアニュールすることができる同じタグ特異的部分を有する。この実施形態には、複数の標的配列のために生成されたアンプリコン中でサンプル起源をコード化するのに合成する必要があると考えられる、異なるプライマーの数を、低減させるという利点がある。あるいは、異なる組の順方向および逆方向プライマーを各サンプルごとに用いることができ、この場合、各組は、他の組のプライマーとは異なるヌクレオチドタグを有しておりかつ異なるバーコードプライマーは各サンプルごとに使用され、またバーコードプライマーは、異なるバーコードヌクレオチド配列および異なるタグ特異的部分を有している。何れの場合も増幅は、サンプル特異的バーコードを持つ各サンプルから一組のTアンプリコンを生成する。

【0230】

同じ組の順方向および逆方向プライマーが各サンプルごとに使用される実施形態では、各標的ごとの順方向および逆方向プライマーは、サンプルとは別に最初に組み合わせることができ、各バーコードプライマーは、その対応するサンプルから最初に組み合わせることができ。次いで最初に組み合わされた順方向および逆方向プライマーのアリコートを、最初に組み合わされたサンプルとバーコードプライマーとに添加して、S×T増幅混合物を生成することができる。これらの増幅混合物は、増幅に適切な条件に供することができる任意の物品に形成することができる。例えば、増幅混合物は、増幅前にマイクロ流体デバイスの個別のコンパートメントの内部に形成することができまたはこのコンパートメ

10

20

30

40

50

ント内に分布させることができる。適切なマイクロ流体デバイスは、例示的な実施形態では、以下に記述されるようなマトリックス型マイクロ流体デバイスを含む。

【0231】

ある実施形態では、本明細書に記述される方法のいずれかで生成される標的アンプリコンは、増幅混合物から回収することができる。例えば、各反応コンパートメントの内容物を回収するように適合させたマトリックス型マイクロ流体デバイス（以下、参照）は、標的アンプリコンを発生させるために増幅で用いることができる。様々なこれらの実施形態では、標的アンプリコンをさらなる増幅および／または解析に供することができる。ある実施形態では、増幅混合物で生成された標的アンプリコンの量は、増幅中に、例えば定量的リアルタイムPCRにより、または後で、定量することができる。

10

【0232】

単粒子解析で有用な実施形態では、組合せバーコード化を使用して、増幅生成物の供給源であった反応容積、したがって粒子の、同一性をコード化することができる。特定の実施形態では、核酸増幅が少なくとも2つの増幅プライマーを使用して実施され、各増幅プライマーはバーコード配列を含み、バーコード配列の組合せは、反応生成物の供給源であった反応容積の同一性をコード化する（「組合せバーコード化」と称する。）。これらの実施形態は、個別の反応容積が、例えばFluidigm Corp. (South San Francisco, CA) から入手されるようなかつ以下に記述されるような（「マイクロ流体デバイス」参照）マトリックス型マイクロ流体デバイスの個別のコンパートメント内にある場合に都合良く用いられる。それぞれ個別のコンパートメントは、コード化反応が実施されるコンパートメントの行および列を特定するバーコードヌクレオチド配列の組合せを含有することができる。反応容積が回収されて、バーコードの組合せの検出を含む（例えば、DNA配列決定による）さらなる解析に供される場合、結果を特定のコンパートメントに関連付けることができ、それによってコンパートメント内の特定の粒子に関連付けることができる。そのような実施形態は、複数の個別の反応容積からの反応生成物が組み合わされる（「プールされる」）ように個別の反応容積を回収プロセスの最中または後に組み合わせる場合に特に有用である。例えば、マトリックス型マイクロ流体デバイスでは、行内の全てのコンパートメントからの反応生成物、列内の全てのコンパートメント、またはデバイス内の全てのコンパートメントをプールすることができる。行内の全てのコンパートメントがプールされる場合、行内にある各列は、好ましくは一意的なバーコードの組合せを有する。列内の全てのコンパートメントがプールされる場合、列内の各行は、一意的なバーコードの組合せを有する。全てのコンパートメントがデバイスと共にプールされる場合、デバイス内の全てのコンパートメントは一意的なバーコードの組合せを有する。

20

【0233】

（標的核酸の検出および／または定量のための増幅）

核酸を検出しあつ／または定量する任意の方法は、増幅生成物を検出するために、本明細書で記述される方法で使用することができる。一実施形態では、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を使用して標的核酸を増幅しあつ／または定量する。その他の実施形態では、例えば米国特許第7,118,910号明細書（増幅／検出システムのその記述に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる。）に記載されるシステムを含めた他の増幅システムまたは検出システムを使用する。特定の実施形態では、リアルタイム定量方法が使用される。例えば、「定量的リアルタイムPCR」方法は、増幅プロセスそのものの最中に形成された増幅生成物の量を測定することによって、サンプル中に存在する標的核酸の量を決定するのに使用することができる。

30

【0234】

蛍光原ヌクレアーゼアッセイは、本明細書に記述される方法で首尾良く使用することができる、リアルタイム定量方法の1つの特殊な例である。増幅生成物の形成をモニターするこの方法では、二重標識蛍光原オリゴヌクレオチドプローブを使用して、PCR生成物の蓄積の連続測定を行うが、これは「TaqMan（登録商標）方法」として文献で頻繁

40

50

に言及される手法である。蛍光原ヌクレアーゼアッセイの記述に関してその全体が参照により本明細書にそれぞれ組み込まれる、米国特許第5,723,591号明細書；Heidら、1996年、Real-time quantitative PCR Genome Res. 6: 986~94を参照されたい。「TaqMan（登録商標）プローブ」はqPCRで最も広く使用されるが、本明細書に記述される方法はこれらのプローブの使用に限定されず；任意の適切なプローブを使用することができる事が理解される。

【0235】

本発明で用いることができるその他の検出／定量方法には、FRETおよび鑄型伸長反応、分子ビーコン検出、スコーピオン検出、インベーダー検出、およびパドロックプローブ検出が含まれる。

10

【0236】

FRETおよび鑄型伸長反応は、ドナー／アクセプター対の1つの要素で標識されたプライマー、およびドナー／アクセプター対の他の要素で標識されたヌクレオチドを利用する。鑄型依存的伸長反応中に、標識されたヌクレオチドをプライマーに組み込む前に、ドナーおよびアクセプターは、エネルギー移動を引き起こすことができないよう十分に間隔を空けて配置される。しかし、標識されたヌクレオチドがプライマーに組み込まれかつ間隔が十分狭い場合、エネルギー移動が生じて検出することができる。これらの方方法は、単一ヌクレオチド多型性の検出で单一塩基対伸長反応を実行する際に特に有用であり、米国特許第5,945,283号明細書および国際公開第WO97/22719号パンフレットに記載されている。

20

【0237】

分子ビーコンにより、増幅された生成物の相補的領域にハイブリダイズするときのプローブの配座の変化は、検出可能なシグナルの形成をもたらす。プローブそのものは2つのセクションを含み；1つのセクションは5'末端にあり、もう1つのセクションは3'末端にある。これらのセクションは、プローブ結合部位にアニールするプローブのセクションを挟み、互いに相補的である。一端のセクションは、典型的にはレポーター色素に結合され、他端のセクションは、通常はクエンチャーカラムに結合される。溶液状態で、2つの端部セクションは互いにハイブリダイズしてヘアピンループを形成する。この配座において、レポーターおよびクエンチャーカラムは十分に近接しており、したがってレポーター色素からの蛍光はクエンチャーカラムによって効果的に消光される。対照的に、ハイブリダイズされたプローブは、消光の程度が低減された線形化した配座をもたらす。したがって、2種の色素に関する発光の変化をモニターすることにより、増幅生成物の形成を間接的にモニターすることが可能になる。このタイプのプローブおよびその使用方法は例えばPrivatekら、1998年、Nat. Biotechnol. 16: 359~63；TyagiおよびKramer、1996年、Nat. Biotechnology 14: 303~308；およびTyagiら、1998年、Nat. Biotechnol. 16: 49~53（1998）によりさらに記述されている。

30

【0238】

スコーピオン検出方法は、例えば、Theelwellら、2000年、Nucleic Acids Research 28: 3752~3761およびSolinasら、2001年、「Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications」、Nucleic Acids Research 29: 20に記載されている。スコーピオンプライマーは、PCRストッパーを介してプローブ要素が5'末端に結合している蛍光原PCRプライマーである。これらは均質な溶液状態で、PCR生成物のリアルタイムアンプリコン特異的検出で使用される。2つの異なるフォーマット、「ステムループ」フォーマットおよび「デュプレックス」フォーマットが可能である。共にプロービングメカニズムは分子内にある。全てのフォーマットにおけるスコーピオンの基本的要素は：（i）PCRプライマー；（ii）プローブ要素のPCR読み過ごしを防止するPCRストッパー；（iii）特異的プローブ配列；および（iv）少なくとも1つの蛍光団およびクエンチャーを含有す

40

50

る蛍光検出システムである。スコーピオンプライマーのPCR伸長後、得られたアンプリコンは、プローブに相補的な配列を含有するが、これは各PCRサイクルの変性段階中は、一本鎖のままである。冷却すると、プローブはこの相補的配列に自由に結合し、クエンチャーモノマーは蛍光團の近傍にはないので蛍光の増大がもたらされる。PCRストッパーは、Taq DNAポリメラーゼによってプローブの望ましくない読み過ぎを防止する。

【0239】

インベーダーアッセイ(Third Wave Technologies, Madison, WI)は、SNP遺伝子型判定で特に使用され、標的核酸(DNAまたはRNA)または多型部位に相補的なシグナルプローブと称されるオリゴヌクレオチドを利用する。インベーダーオリゴと称される第2のオリゴヌクレオチドは、同じ5'ヌクレオチド配列を含有するが、3'ヌクレオチド配列はヌクレオチド多型を含有する。インベーダーオリゴは、シグナルプローブと標的核酸との結合を妨害し、その結果、シグナルプローブの5'末端は、多型を含有するヌクレオチドで「フランップ」を形成するようになる。この複合体は、Cleavase酵素と呼ばれる構造特異的エンドヌクレアーゼにより認識される。Cleavaseは、ヌクレオチドの5'フランップを切断する。解放されたフランップは、FRET標識を持つ第3のプローブに結合し、それによって、Cleavase酵素により認識された別の二重鎖構造が形成される。このとき、Cleavase酵素は、クエンチャーモノマーから蛍光團を切り離し、蛍光シグナルを生成する。SNP遺伝子判定では、シグナルプローブは、参照(野生型)対立遺伝子または変種(突然変異)対立遺伝子のいずれかとハイブリダイズするように設計される。PCRとは異なり、核酸の增幅が無い状態でシグナルの線形増幅がある。当業者を導くのに十分なさらなる詳細は、例えば、Neri, B. P. ら、Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis 3826:117~125、(2000)および米国特許第6,706,471号明細書に提示されている。

【0240】

パドロックプローブ(PLP: padlock probe)は、長い(例えば、約100塩基)線形オリゴヌクレオチドである。プローブの3'および5'末端の配列は、標的核酸中の隣接する配列に相補的である。中心の、PLPの非相補的領域には、特異的PLPを特定するのに使用することができる「タグ」配列がある。タグ配列は、普遍的なプライム部位によって挟まれており、それがタグのPCR増幅を可能にする。標的とのハイブリダイゼーションにより、PLPオリゴヌクレオチドの2つの端部は近接した状態になり、酵素性ライゲーションにより接合することができる。得られた生成物は、標的DNA鎖に連結された円形プローブ分子である。任意の非ライゲーションプローブ(即ち、標的にハイブリダイズしなかったプローブ)は、エキソヌクレアーゼの作用によって除去される。PLPのハイブリダイゼーションおよびライゲーションは、両端セグメントが標的配列を認識する必要がある。このようにして、PLPは極めて特異的な標的認識をもたらす。

【0241】

次いで環状化PLPのタグ領域を増幅し、得られるアンプリコンが検出される。例えば、TaqMan(登録商標)リアルタイムPCRを実施して、アンプリコンを検出し定量することができる。アンプリコンの存在および量は、サンプル中の標的配列の存在および量に相関させることができる。PLPの記述に関しては、例えばLandegrenら、2003年、Padlock and proximity probes for *in situ* and array-based analyses: tools for the post-genomic era, Comparative and Functional Genomics 4:525~30; Nilssonら、2006年、Analyzing genes using closing and replicating circles Trends Biotechnol. 24:83~8; Nilssonら、1994年、Padlock probes: circula

10

20

30

40

50

r i z i n g o l i g o n u c l e o t i d e s f o r l o c a l i z e d D N A d e t e c t i o n, S c i e n c e 2 6 5 : 2 0 8 5 ~ 8 を参照されたい。

【 0 2 4 2 】

特定の実施形態では、プローブの検出可能な標識として使用することができる蛍光団には、ローダミン、シアニン3(Cy 3)、シアニン5(Cy 5)、フルオレセイン、Vic(商標)、Liz(商標)、Tamra(商標)、5-Fam(商標)、6-Fam(商標)、およびTexas Red(Molecular Probes)が含まれるが、これらに限定するものではない(Vic(商標)、Liz(商標)、Tamra(商標)、5-Fam(商標)、6-Fam(商標)は全てLife Technologies、Foster City、Californiaから入手可能である。)。 10

【 0 2 4 3 】

いくつかの実施形態では、サンプル中の標的核酸配列の存在を示すのに十分な所定回数のサイクル後、增幅生成物の量を単にモニターすることができる。当業者なら、任意の所与のサンプルの型、プライマー配列、および反応条件に関し、所与の標的核酸の存在を決定するのに何サイクルが十分であるかを容易に決定することができる。その他の実施形態では、検出は、指数関数的增幅の終わりに実施され、即ち「平坦域」相の最中に実施され、またはエンドポイントPCRが実施される。様々な実施形態では、增幅は、約2、4、10、15、20、25、30、35もしくは40サイクル、またはこれらの値のいずれかにより定められる任意の範囲内に包含されるサイクル数で実施することができる。 20

【 0 2 4 4 】

異なる温度で蛍光を獲得することにより、ハイブリダイゼーションの程度を追跡することが可能になる。さらに、PCR生成物ハイブリダイゼーションの温度依存性を、PCR生成物の特定および/または定量に使用することができる。したがって、本明細書に記述される方法は、アンプリコンを検出しあつ/または定量する際の融解曲線解析の使用を包含する。融解曲線解析は周知であり、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれかつ特に增幅生成物の検出および/または定量のための融解曲線解析の使用について記述している米国特許第6,174,670号明細書；第6,472,156号明細書；および第6,569,627号明細書に記載されている。例示的な実施形態では、融解曲線解析は、SYBRグリーン、Picogreen(Molecular Probes, Inc.、Eugene, OR)、EVAグリーン(Biotinum)、および臭化工デジウムなど(Zhur, 1994年、Anal. Chem. 66: 1941~48参照)の二本鎖DNA色素を使用して実施される。 30

【 0 2 4 5 】

ある実施形態では、多重検出が個々の増幅混合物で、例えばマイクロ流体デバイスの個々の反応コンパートメントで実施されるが、これは単一のアッセイで解析することができるサンプルおよび/または標的の数をさらに増大させるために、または比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH: comparative genomic hybridization)などの比較方法を実施するために、使用することができるものである。さまざまな実施形態では、最大2、3、4、5、6、7、8、9、10、50、100、500、1000、5000、10000、またはそれ以上の増幅反応が、それぞれ個々の反応コンパートメントで実施される。 40

【 0 2 4 6 】

ある実施形態によれば、蛍光シグナルにより示された増幅生成物を定量するのに内部標準を用いることができる。例えば、米国特許第5,736,333号明細書を参照されたい。

【 0 2 4 7 】

蛍光色素を含有する組成物を用いて熱サイクル反応を行い、指定された波長の光線を放出し、蛍光色素の強度を読み取り、各サイクル後に蛍光強度を示すことができるデバイスが、開発してきた。熱サイクラー、光線放出器および蛍光シグナル検出器を含むデバイスが、例えば米国特許第5,928,907号明細書；第6,015,674号明細

10

20

30

40

50

書；および第6, 174, 670号明細書に記載されている。

【0248】

いくつかの実施形態では、これら機能のそれぞれは、個別のデバイスで行うことができる。例えば、Q-レプリカーゼ反応を増幅に用いる場合、反応は熱サイクル内で行わなくてよく、特定の波長で放出された光線、蛍光シグナルの検出、ならびに増幅生成物の量の計算および呈示を含むことができる。

【0249】

特定の実施形態では、組み合わせた熱サイクルおよび蛍光検出デバイスを、標的核酸の精密な定量に使用することができる。いくつかの実施形態では、蛍光シグナルを検出し、1回または複数回の熱サイクルの最中および/または後で呈示することができ、したがって反応が実時間で生じたときに増幅生成物をモニターすることが可能になる。ある実施形態では、増幅生成物の量および増幅サイクル数を使用して、どのくらいの標的核酸配列が増幅前にサンプル中にあったのかを計算することができる。

10

【0250】

(DNA配列決定の増幅)

ある実施形態では、増幅方法を用いて、自動化DNA配列決定に適切なアンプリコンを生成する。多くの現行のDNA配列決定技法は、「合成による配列決定」に依拠している。これらの技法は、ライプラリーの創生、ライプラリー分子の大量な並列PCR増幅、および配列決定を必要とする。ライプラリーの創生は、サンプル核酸から適切にサイズ決めされた断片への変換によって開始され、断片端部へのアダプター配列のライゲーション、およびアダプターが適正に付加する分子の選択が行われる。ライプラリー分子の端部でのアダプター配列の存在は、ランダム配列挿入物の増幅を可能にする。スクレオチド配列にタグを付ける上述の方法は、ライゲーションの代わりをすることができ、その結果、以下にさらに詳細に記述されるようにアダプター配列を組み込むことができる。

20

【0251】

さらに、標的スクレオチド配列の実質的に均一な増幅を上述の方法が行うことができることは、良好な適用範囲を有するDNA配列決定ライプラリーを作製する助けになる。自動化DNA配列決定の文脈において、「適用範囲」という用語は、配列決定の際に配列を測定する回数を指す。実質的に均一な適用範囲を有するDNA配列決定ライプラリーは、適用範囲が実質的に均一でもある配列データをもたらすことができる。したがって、様々な実施形態では、本発明に記述されるように調製された複数の標的アンプリコンの自動化配列決定を行うことにより、標的アンプリコンの少なくとも50パーセントの配列は、標的アンプリコン配列の平均コピー数の50パーセント超でありかつ標的アンプリコン配列の平均コピー数の2倍未満で存在する。この方法の様々な実施形態では、標的アンプリコン配列の少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも91、少なくとも92、少なくとも93、少なくとも94、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98、または少なくとも99パーセントが、標的アンプリコン配列の平均コピー数の50パーセント超でかつ標的アンプリコン配列の平均コピー数の2倍未満で存在する。

30

【0252】

ある実施形態では、少なくとも3つのプライマー：順方向、逆方向、およびバーコードプライマーを用いて、DNA配列決定に適切なアンプリコンを生成する。しかし、順方向プライマー、逆方向プライマー、およびバーコードプライマーの1つまたは複数は、少なくとも1つの追加のプライマー結合部位を含むことができる。特定の実施形態では、バーコードプライマーは、第1のスクレオチドタグ特異的部分の上流にある、バーコードスクレオチド配列の上流に少なくとも第1の追加のプライマー結合部位を含む。ある実施形態では、順方向プライマー、逆方向プライマー、およびバーコードプライマーの2つが、少なくとも1つの追加のプライマー結合部位を含む（即ち、増幅により生成されたアンプリコンが、スクレオチドタグ配列、バーコードスクレオチド配列、および2つの追加の結合

40

50

部位を含むように)。例えば、バーコードプライマーが、バーコードヌクレオチド配列の上流に第1の追加のプライマー結合部位を含む場合、特定の実施形態では、逆方向プライマーは、少なくとも第2の追加のプライマー結合部位を第2のヌクレオチドタグの下流に含むことができる。次いで増幅は、以下の要素：5' - 第1の追加のプライマー結合部位 - バーコードヌクレオチド配列 - 順方向プライマーからの第1のヌクレオチドタグ - 標的ヌクレオチド配列 - 逆方向プライマーからの第2のヌクレオチドタグ - 第2の追加のプライマー結合部位 - 3' を有する分子をもたらす。特定の実施形態では、第1および第2の追加のプライマー結合部位には、DNA配列決定プライマーが結合して、上記にて論じたようにサンプル起源を示すことができるバーコードも含めたアンプリコン全体の配列決定を容易にすることが可能である。

10

【0253】

その他の実施形態では、少なくとも4つのプライマーを用いて、DNAに適切なアンプリコンを生成する。例えばインナープライマーは、DNA配列決定プライマーが結合することが可能な第1および第2のプライマー結合部位をさらに含むアウタープライマーと共に使用することができる。増幅は、以下の要素：5' - 第1のプライマー結合部位 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のプライマー結合部位 - 3' を有する分子をもたらす。この分子は、いずれかの端部にバーコードの組合せを含有するので、配列を分子のいずれかの端部から得て、バーコードの組合せを特定することができる。

20

【0254】

同様にして、6つのプライマーを用いることにより、配列決定のためのDNAを調製することができる。より具体的には、上記にて論じたインナーおよびスタッファープライマーを、DNA配列決定プライマーが結合することが可能な第1および第2のプライマー結合部位をさらに含むアウタープライマーと共に使用することができる。増幅は、以下の要素：5' - 第1のプライマー結合部位 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第3のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第1のヌクレオチドタグ配列 - 標的ヌクレオチド配列 - 第2のヌクレオチドタグ配列 - 第1のバーコードヌクレオチド配列 - 第4のヌクレオチドタグ配列 - 第2のバーコードヌクレオチド配列 - 第2のプライマー結合部位 - 3' を有する分子をもたらす。この分子はいずれかの端部にバーコードの組合せを含有するので、配列を分子のいずれかの端部から得ることによりバーコードの組合せを特定することができる。

30

【0255】

本明細書に記述される方法は、任意の利用可能なDNA配列決定方法を使用して、少なくとも1つの標的アンプリコンをDNA配列決定に供するステップを含むことができる。特定の実施形態では、複数の標的アンプリコンは、高スループット配列決定方法を使用して配列決定される。そのような方法は、個々のDNA分子を増幅するのに *in vitro* クローニングステップを典型的には使用する。エマルジョンPCR(emPCR: emulsion PCR)は、油相内の水滴として、プライマーがコーティングされたビーズと共に個々のDNA分子を単離する。PCRはDNA分子のコピーを生成し、このコピーがビーズに結合し、その後、固定化がなされて、後の配列決定に用いられる。emPCRは、Marguliesら(454 Life Sciences, Branford、CTにより商用化されている。)、ShendureおよびPorrecaら(「ポロニー配列決定」としても公知である。)による方法、およびSOLID配列決定(Life Technologies, Foster City, CA)で、使用される。M. Marguliesら(2005)「Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors」Nature 437:376から380; J. Shendureら(2005)「Accurate Multiplex Polony Sequencing

40

50

of an Evolved Bacterial Genome」Science 309(5741):1728~1732を参照されたい。in vitroクローニング増幅は、固体表面に結合したプライマー上で断片が増幅される「プリッジPCR」によって、実施することもできる。Braslavskyらは、この増幅ステップを省略してDNA分子を表面に直接固定する、単分子方法(Helicos Biosciences Corp.、Cambridge、MAにより商用化されている。)を開発した。I. Braslavskyら(2003)「Sequence information can be obtained from single DNA molecules」Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:3960~3964。

【0256】

表面に物理的に結合するDNA分子は、並行して配列決定することができる。「合成による配列決定」は、色素ターミネーション電気泳動配列決定のように、DNAポリメラーゼを使用して塩基配列を決定する。可逆的ターミネーター方法(Illumina, Inc.、San Diego、CAおよびHelicos Biosciences Corp.、Cambridge、MAにより商用化されている。)は、可逆的なタイプの色素ターミネーターを使用し、1つのヌクレオチドを同時に添加し、別のヌクレオチドが重合するように保護基を繰り返し除去することによって、実時間で各位置で蛍光を検出する。「ピロシーケンシング」は、DNA重合も使用し、1つのヌクレオチドを同時に添加し、結合したピロホスフェートの解放によって放出された光を通して、所与の場所に付加されたヌクレオチドの数を検出し定量する(454 Life Sciences、Branford、CTにより商用化されている。)。M. Ronaghiら、(1996)「Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release」、Analytical Biochemistry 242:84~89を参照されたい。

【0257】

(標識方策)

任意の適切な標識方策を、本明細書に記述される方法で用いることができる。アッセイ混合物のアリコートを得て、各アリコートを単一増幅生成物の存在に関して解析する場合、ユニバーサル検出プローブを増幅混合物に使用することができる。特定の実施形態では、リアルタイムPCR検出は、ユニバーサルqPCRプローブを使用して実施することができる。適切なユニバーサルqPCRプローブは、SYBRグリーン、Picogreen(Molecular Probes, Inc.、Eugene、OR)、EVAグリーン(Biotium)、および臭化工チジウムなどの二本鎖DNA色素を含む(Zhurら、1994年、Anal. Chem. 66:1941~48参照)。適切なユニバーサルqPCRプローブは、全ての増幅生成物中に存在するヌクレオチド配列に結合する配列特異的プローブも含む。そのようなプローブに関する結合部位は、増幅中に、タグ付き標的核酸に都合良く組み込むことができる。

【0258】

あるいは、1つまたは複数の標的特異的qPCRプローブ(即ち、検出される標的ヌクレオチド配列に特異的)を増幅混合物に用いて、増幅生成物を検出する。標的特異的プローブは、例えば多数のサンプル中に数種の標的核酸しか検出されない場合に有用と考えられる。例えば、3つの標的のみ検出された場合、各標的ごとに異なる蛍光標識を有する標的特異的プローブを用いることができる。賢明な標識の選択により、単一の反応において異なる波長で異なる標識が励起されかつ/または検出される解析を、実行することができる。例えば、Fluorescence Spectroscopy(Pesceら編)Marcel Dekker、New York(1971); Whiteら、Fluorescence Analysis: A Practical Approach, Marcel Dekker、New York、(1970); Berlman、Han

10

20

30

30

40

50

book of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules、第2版、Academic Press、New York、(1971)；Griffiths、Colour and Constitution of Organic Molecules、Academic Press、New York(1976)；Indicators(Bishop編)、Pergamon Press、Oxford、19723；およびHaugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、Molecular Probes、Eugene(1992)を参照されたい。

【0259】

10

(望ましくない反応成分の除去)

いくつかの反応性ステップが用いられる、核酸の複合混合物を用いる反応は、様々な組み込まれていない反応成分をもたらす可能性があり、様々な清浄化手順のいずれかによるそのような組み込まれていない反応成分の除去またはそれらの濃度の低減は、引き続き行われる反応の効率および特異性を改善できることが理解される。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記述される増幅ステップを実施する前に、前置増幅プライマーを除去またはこのプライマーの濃度を低減させることが望ましいと考えられる。

【0260】

20

ある実施形態では、望ましくない成分の濃度は、単純な希釈によって低減させることができる。例えば、前置増幅したサンプルは、後続の増幅ステップの特異性が改善されるように、増幅前に、約2、5、10、50、100、500、1000倍に希釈することができる。

【0261】

いくつかの実施形態では、望ましくない成分を様々な酵素手段によって除去することができる。上述の方法に代えてまたは加えて、望ましくない成分を精製によって除去することができる。例えば精製タグを上述のプライマーのいずれかに(例えば、バーコードヌクレオチド配列に)組み込んで、タグ付き標的ヌクレオチドの精製を容易にすることができます。

【0262】

30

特定の実施形態では、清浄化は、所望の核酸の選択的固定化を含む。例えば所望の核酸を、固体支持体上に優先的に固定化することができる。例示的な実施形態では、ビオチン(例えば、フォトビオチン)などの親和性部分を所望の核酸に結合し、得られたビオチン標識核酸を、ストレプトアビジンなどの親和性部分結合剤を含む固体支持体に固定化する。固定化された核酸は、プローブで照会することができ、ハイブリダイゼーションしていない、かつ/またはライゲーションがなされていないプローブを洗浄によって除去することができる(例えば、国際公開第W003/006677号パンフレットおよび米国特許出願第09/931,285号明細書参照)。あるいは、固定化核酸を洗浄してその他の成分を除去し、次いで固体支持体から解放して、さらなる解析を行うことができる。この手法は、例えば、DNA配列決定のためにプライマー結合部位を附加した後、増幅混合物から標的アンプリコンを回収する際に使用することができる。特定の実施形態では、ビオチンなどの親和性部分は、親和性部分で標識された(例えば、ビオチン標識された)アンプリコンが増幅手順によって生成されるように、増幅プライマーを結合させることができる。したがって例えば、上述のようにバーコードおよびヌクレオチドタグ要素を標的ヌクレオチド配列に附加するのに3つのプライマーが用いられる場合、バーコードまたは逆方向プライマーの少なくとも1つは、親和性部分を含むことができる。4つのプライマー(2つのインナープライマーおよび2つのアウタープライマー)を用いて所望の要素を標的ヌクレオチド配列に附加する場合、アウタープライマーの少なくとも1つは親和性部分を含むことができる。

【0263】

40

(マイクロ流体デバイス)

50

ある実施形態では、本明細書に記述される方法は、マイクロ流体デバイスを使用して実施することができる。例示的な実施形態では、デバイスは、個別の隔てられた反応コンパートメント内で複数の基質溶液と試薬溶液とを同時に組み合わせることが可能になる、マトリックス型マイクロ流体デバイスである。基質溶液は、1種または複数種の基質（例えば、標的核酸）を含むことができ、試薬溶液は、1種または複数種の試薬を含むことができることが理解される。例えばマイクロ流体デバイスは、複数の異なる増幅プライマーおよびサンプルの、同時になされる対合の組合せを可能にすることができる。ある実施形態では、デバイスは、異なるコンパートメントのそれぞれにおいて、プライマーとサンプルとの異なる組合せを含有するように構成される。様々な実施形態で、個別の反応コンパートメントの数は、50超、通常は100超、より頻繁には500超、さらにより頻繁には1,000超、時々5,000超、または10,000超とすることができる。

10

【0264】

特定の実施形態では、マトリックス型マイクロ流体デバイスは、動的アレイ（「D A : Dynamic Array」）マイクロ流体デバイスである。D Aマイクロ流体デバイスは、サンプルと試薬（例えば、増幅プライマー、検出プローブなど）との対合組合せを単離するように設計されかつリアルタイム定量的PCR解析を含めた定性的および定量的PCR反応を実施するのに適切な、マトリックス型マイクロ流体デバイスである。いくつかの実施形態では、D Aマイクロ流体デバイスは、少なくとも部分的にはエラストマーから製作される。D Aマイクロ流体デバイスは、D Aマイクロ流体デバイスについて記述するためのその全体が参照により本明細書に共に組み込まれるPCT公開第WO05107938A2（熱反応デバイスおよびその使用方法）および米国特許出願公開第20050252773（A1）号明細書に記載されている。D Aマイクロ流体デバイスは、デバイス内にかつ層間に対照ラインおよび流体ラインを織り込むように、マイクロ流体デバイスの層間で流体連通バイアを利用する高密度マトリックスのデザインを組み込んでもよい。エラストマー ブロックの多層内の流体ラインにより、高密度反応セル配置構成が可能である。あるいは、D Aマイクロ流体デバイスは、試薬およびサンプルチャネルの全てが同じエラストマー層にあるように、かつ対照チャネルが異なる層にあるように、設計されてもよい。ある実施形態では、D Aマイクロ流体デバイスは、M個の異なるサンプルとN個の異なる試薬とを反応させるのに使用してもよい。

20

【0265】

WO05107938に記載されているD Aマイクロ流体デバイスは、本明細書に記述される方法を実行するのに十分適切であるが、本発明は、任意の特定のデバイスまたはデザインに限定するものではない。サンプルを分配しかつ／または試薬とサンプルとの独立した対合組合せを可能にする、任意のデバイスを使用してもよい。米国特許出願公開第20080108063号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる。）は、Fluidigm Corp. (South San Francisco Calif.)から入手可能な市販のデバイスである、48×48動的アレイIFC: Integrated Fluidic Circuit（集積流体回路）を示す図を含む。例えば48×96；96×96；30×120など、その他の構成が可能であり企図されることが理解される。

30

【0266】

特定の実施形態では、マイクロ流体デバイスは、デジタル増幅を行うように適合されたデジタルアレイマイクロ流体デバイスである。そのようなデバイスは、集積チャネルと、サンプルおよび試薬の混合物をナノリットル体積の反応コンパートメントに分配する弁とを有することができる。いくつかの実施形態では、デジタルアレイマイクロ流体デバイスは、少なくとも部分的にエラストマーから製作される。例示的なデジタルアレイマイクロ流体デバイスは、「デジタルPCRを使用してコピー数のばらつきを決定するための方法および装置（Method and Apparatus for Determining Copy Number Variation Using Digital PCR）」という名称の米国出願第12/170,414号明細書など、Fluidigm

40

50

Corp. (South San Francisco Calif.) が保有する同時係属の米国出願に記載されている。ある例示的な実施形態は、デバイスへの 12 の個別のサンプル入力に対応した 12 個の入力ポートを有する。デバイスは、12 パネルを有することができ、12 パネルのそれぞれは 765 6 nL の反応コンパートメントを含有し、その全体積はパネル当たり 4.59 μL である。マイクロ流体チャネルは、パネル上の様々な反応コンパートメントを流体供給源に接続することができる。圧力は、反応コンパートメントを流体供給源に接続する弁を開閉するために、アキュムレーターに加えることができる。例示的な実施形態では、サンプル試薬混合物を投入するために 12 個の入口を設けることができる。48 個の入口を、圧力がアキュムレーターに加えられたときにチップに供給される試薬の供給源が提供されるように使用することができる。さらに、2 個以上の入口を、チップを水和させるのに設けることができる。

10

【0267】

デジタルアレイマイクロ流体デバイスは、本明細書に記述されるある增幅方法を実施するのに十分適切であり、当業者ならこれらのデバイスの多くの変形例および代替例を理解する。所与のデジタルアレイマイクロ流体デバイスの幾何形状は、特定の適用例に依存することになる。本明細書に記述される方法での使用に適切なデバイスに関連した追加の記述は、デジタルアレイマイクロ流体デバイスの開示のために参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 20050252773 号明細書に提示されている。

20

【0268】

ある実施形態では、本明細書に記述される方法は、反応生成物の回収を行うマイクロ流体デバイスを使用して行うことができる。そのようなデバイスは、2009 年 4 月 2 日に出願された同時係属の米国出願第 61/166,105 号明細書（参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、特に反応生成物の回収を可能にするマイクロ流体デバイスとそれに関連した方法を記述する。）に詳細に記載されており、Fluidigm Corp. から Access Array（商標）IFC（Integrated Fluidic Circuit：集積流体回路）として販売されている。

20

【0269】

このタイプの例示的なデバイスでは、独立したサンプル入力が、M × N のアレイ構成でプライマー入力と組み合わされる。したがって各反応は、特定のサンプルと特定の試薬混合物との固有の組合せである。サンプルは、1 つの実現例では列として配置構成されたサンプル入力ラインを通して、マイクロ流体デバイスのサンプルコンパートメントに投入される。アッセイ試薬（例えば、プライマー）は、列と交差する行として配置構成されたアッセイ入力ラインを通して、マイクロ流体デバイスのアッセイコンパートメントに投入される。サンプルコンパートメントおよびアッセイコンパートメントは、投入中は流体同士が隔離された状態にある。投入プロセスが終了した後、サンプルコンパートメントとアッセイコンパートメントの対の間を通る流体ラインを閉塞するように動作可能なインターフェース弁が開放されて、サンプルおよびアッセイの対合組合せの界面拡散を自由に行うことが可能になる。サンプルとアッセイとの精密な混合物により、様々な対合組合せの間に反応を生じさせ、各コンパートメントで 1 種または複数種の反応生成物が生成される。反応生成物は回収され、次いで後続のプロセスで使用することができる。本明細書で使用される「アッセイ」および「サンプル」という用語は、いくつかの実施形態ではデバイスの特定の使用であることを示している。しかしデバイスの使用は、全ての実施形態において「サンプル」および「アッセイ」の使用に限定するものではない。例えば、他の実施形態では、「サンプル」は「第 1 の試薬」または複数の「第 1 の試薬」を指してもよく、「アッセイ」は、「第 2 の試薬」または複数の「第 2 の試薬」を指してもよい。デバイスの M × N という文字は、第 1 の試薬の任意の組を第 2 の試薬の任意の組と組み合わせた組合せを可能にする。

30

【0270】

特定の実施形態によれば、M × N の対合組合せからの反応生成物を、別々のプールにマイクロ流体デバイスから回収することができ、例えば M 個のサンプルのそれぞれについて

40

50

1つのプールに回収することができる。典型的には、別々のプールはキャリアに設けられたサンプル入力ポートに収容される。いくつかのプロセスでは、反応生成物を、正規化の目的で「アンプリコンごとに」採取してもよい。本発明の実施形態を利用することにより、増幅生成物のコピー数が1つのサンプル内では±25%以内で変動し、かつサンプル同士では±25%以内で変動する結果（サンプルおよびアッセイの同じ入力溶液から組み立てられた複製実験に關し）を実現することが可能になる。したがって、マイクロ流体デバイスから回収された増幅生成物は、特定の公知の遺伝子型の分布によって測定された入力サンプルを表すことになる。ある実施形態では、出力サンプル濃度は2,000コピー／アンプリコン／マイクロリットル超になり、反応生成物の回収は2時間未満で行われることになる。

10

【0271】

いくつかの実施形態では、反応生成物は、拡張ポンプ送出によって回収される。拡張ポンプ送出は、従来の技法を使用して典型的には利用できない利益をもたらす。例えば、拡張ポンプ送出は、マイクロ流体デバイスから反応生成物をゆっくり除去するのを可能にする。例示的な実施形態では、反応生成物は、毎時100μl未満の流体流量で回収される。この実施例では、48時間にわたって反応生成物が各列の反応コンパートメントに分布され、このときの各反応生成物の堆積は約1.5μlであり、約30分間にわたる反応生成物の除去によって、72μl／時の流体流量（即ち、48×1.5／0.5時間）が得られることになる。その他の実施形態では、反応生成物の除去速度は、90μl／時未満、80μl／時、70μl／時、60μl／時、50μl／時、40μl／時、30μl／時、20μl／時、10μl／時、9μl／時、8μl／時未満、7μl／時未満、6μl／時未満、5μl／時未満、4μl／時未満、3μl／時未満、2μl／時未満、1μl／時未満、または0.5μl／時未満の速度で行われる。

20

【0272】

拡張ポンプ送出は、マイクロ流体デバイスに存在する実質的に高いパーセンテージのおよび潜在的に全ての反応生成物の一掃をもたらす。いくつかの実施形態は、マイクロ流体デバイスの反応コンパートメント（例えば、サンプルコンパートメント）に存在する反応生成物の75%超を除去する。例として、いくつかの実施形態は、反応コンパートメントに存在する反応生成物の80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%超を除去する。

30

【0273】

本明細書に記述される方法は、サンプルコンパートメントおよびアッセイコンパートメントを一般に含む複数の「単位セル」を有するマイクロ流体デバイスを使用してもよい。そのような単位セルは、数百ミクロン程度の寸法を有することができ、例えば単位セルは、500×500μm、525×525μm、550×550μm、575×575μm、600×600μm、625×625μm、650×650μm、675×675μm、または700×700μmなどの寸法を有する。サンプルコンパートメントおよびアッセイコンパートメントの寸法は、サンプルおよびアッセイの使用を低減させつつ、所望のプロセスに十分な材料の量を提供するように選択される。例として、サンプルコンパートメントは、幅100～400μm×長さ200～600μm×高さ100～500μm程度の寸法を有することができる。例えば、幅は、100μm、125μm、150μm、175μm、200μm、225μm、250μm、275μm、300μm、325μm、350μm、375μm、または400μmなどとすることができます。例えば、長さは、200μm、225μm、250μm、275μm、300μm、325μm、350μm、375μm、400μm、425μm、450μm、475μm、500μm、525μm、550μm、575μm、または600μmなどとすることができます。例えば、高さは、100μm、125μm、150μm、175μm、200μm、225μm、250μm、275μm、300μm、325μm、350μm、375μm、400μm、425μm、450μm、475μm、500μm、525μm、550μm、575μm、または600μmなどとすることができます。アッセイコンパートメントは同

40

50

様の寸法範囲を有することができ、典型的には、より小さいコンパートメント体積よりも小さい範囲で同様のステップサイズを提供することができる。いくつかの実施形態では、サンプルコンパートメント体積とアッセイコンパートメント体積との比が、約 5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、または 30 : 1 である。列挙された範囲よりも小さいコンパートメント体積は、本発明の範囲内に含まれ、マイクロ流体デバイス製作技法を使用して容易に製作される。

【 0 2 7 4 】

より高い密度のマイクロ流体デバイスは、単位セルの占有面積を低減させるために、典型的にはより小さいコンパートメント体積を利用することになる。非常に小さいサンプルサイズが利用可能な適用例では、コンパートメント体積の低減により、そのような小さいサンプルの試験が容易になる。

10

【 0 2 7 5 】

単粒子解析の場合、マイクロ流体デバイスは、解析がなされる特定の粒子の投入および捕捉が容易になるように設計することができる。図 1 は、哺乳類細胞を解析するための、例示的なマイクロ流体デバイスに関する単位セルアーキテクチャーを示す。各単位セルは、「細胞チャネル」(即ち、サンプルコンパートメント)および「アッセイチャネル」(即ち、アッセイコンパートメント)を有する。細胞チャネルは、哺乳類細胞の投入のために丸みが付けられ、その寸法は直径が 10 ミクロンから長さが数万ミクロン程度である。直径は、解析される細胞のサイズに応じて、約 15 μm 、約 20 μm 、約 25 μm 、約 30 μm 、約 35 μm 、約 40 μm 、もしくは約 45 μm 、またはそれ以上とすることができます、あるいは端点としてこれらの値のいずれかを有する範囲内に包含することができる。長さは、解析される細胞のサイズに応じて、約 60 μm 、約 90 μm 、約 120 μm 、約 150 μm 、約 170 μm 、約 200 μm 、約 230 μm 、約 260 μm 、約 290 μm 、もしくはそれ以上とすることができます、または端点としてこれらの値のいずれかを有する範囲内に包含することができる。Access Array (商標) IFC プラットフォーム(「MA006」)に基づいた例示的なマイクロ流体デバイスでは、哺乳類細胞を投入するための単位セルを、約 30 $\mu\text{m} \times 170 \mu\text{m}$ とすることができます。そのようなデバイスは、細胞を溶解するために、投入後に細胞チャネルに熱が与えられるようにまたは熱を与えるのが容易になるように備えることができる。図 1 に示されるように、デバイスは、核酸增幅などの反応を実行するために細胞チャネルとは隔てられたアッセイチャネルを含むことができる。170 $\mu\text{m} \times 170$ の封じ込め弁を、細胞チャネルを閉鎖するのに使用することができる。

20

30

40

40

【 0 2 7 6 】

2012年2月29日に出願された、「マイクロ流体を使用した多重単粒子または単一細胞処理のための方法、システム、およびデバイス (Methods, Systems, And Devices For Multiple Single-Particle or Single-Cell Processing Using Microfluidics)」という名称の、同時係属の米国出願第 61/605,016 号明細書は、マイクロ流体を利用した多重単粒子または単一細胞処理のための方法、システム、およびデバイスについて記述している。様々な実施形態は、それぞれ個々の粒子または細胞に関連した遺伝情報および/または反応を生成すると共に、粒子または細胞のより大きい集団から個々の粒子または細胞を捕捉し、分配し、かつ/または処理する。いくつかの実施形態は、処理の部分として、個々の粒子もしくは細胞または関連ある反応生成物の撮像のために構成されてもよい。この出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれ、特に、多重単粒子または単一細胞処理のために構成されたマイクロ流体デバイスと、関連あるシステムとを記述するためのものである。

【 0 2 7 7 】

特定の実施形態では、少なくとも 3 枠、より頻繁には少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、または少なくとも 8 枠の動作範囲を有するアッセイを容易にするマイクロ流体デバイスが用いられる。

50

【0278】

エラストマー材料を使用する製作方法およびデバイスおよびそれらの構成要素を設計するための方法は、科学および特許文献に詳細に記載されている。例えば、Ungerら(2000)、Science 288:113~116; 米国特許第6,960,437号明細書(マイクロ流体デバイスを利用した核酸増幅(Nucleic acid amplification utilizing microfluidic devices)); 第6,899,137号明細書(微細加工されたエラストマー弁およびポンプシステム(Microfabricated elastomeric valve and pump systems)); 第6,767,706号明細書(集積能動フラックスマイクロ流体デバイスおよび方法(Integrated active flux microfluidic devices and methods)); 第6,752,922号明細書(マイクロ流体クロマトグラフィー(Microfluidic chromatography)); 第6,408,878号明細書(微細加工されたエラストマー弁およびポンプシステム(Microfabricated elastomeric valve and pump systems)); 第6,645,432号明細書(三次元アレイチャネルネットワークを含むマイクロ流体デバイス(Microfluidic devices including three-dimensionally arrayed channel networks)); 米国特許出願公開第2004/0115838号明細書; 第2005/0072946号明細書; 第2005/0000900号明細書; 第2002/0127736号明細書; 第2002/0109114号明細書; 第2004/0115838号明細書; 第2003/0138829号明細書; 第2002/0164816号明細書; 第2002/0127736号明細書; および第2002/0109114号明細書; 国際公開第WO 2005/084191号パンフレット; WO 05/030822A2号パンフレット; およびWO 01/01025号パンフレット; Quake & Scherer、2000年、「From micro to nanofabrication with soft materials」、Science 290:1536~40; Ungerら、2000年、「Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography」、Science 288:113~116; Thorsenら、2002年、「Microfluidic large-scale integration」、Science 298:580~584; Chouら、2000年、「Microfabricated Rotary Pump」、Biomedical Microdevices 3:323~330; Liuら、2003年、「Solving the “world-to-chip” interface problem with a microfluidic matrix」、Analytical Chemistry 75、4718~23; Hongら、2004年、「A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture」、Nature Biotechnology 22:435~39を参考されたい。

【0279】

(データ出力および解析)

ある実施形態では、本明細書に記述される方法がマトリックス型マイクロ流体デバイスで実施される場合、データを熱マトリックス(「熱マップ」とも呼ぶ。)として出力することができる。熱マトリックスにおいて、DAマトリックス上の反応コンパートメントを表す各正方形には、グレースケールで示すことができる明度が割り当てられているが、より典型的には色で示される。グレースケールにおいて、黒い正方形は、増幅生成物が検出されなかったことを示し、それに対して白い正方形は、最高レベルの増幅生成物を示し、灰色の陰影が付いたものは、その間のレベルの増幅生成物があることを示す。他の態様では、ソフトウェアプログラムを使用して、熱マトリックスで生成されたデータを、読み手

10

20

30

40

50

により馴染みのあるフォーマットにコンパイルしてもよい。

【0280】

(適用例)

特定の実施形態では、本明細書に記述される方法は、例えば粒子の内部または粒子に関連付けられた、1種または複数種の核酸の解析で使用される。したがって、例えばこれらの方法は、特定の多型性(SNPなど)、対立遺伝子、もしくはハプロタイプ、または増幅、欠失、再配列もしくは異数性などの染色体異常の存在を明らかにするのに適用可能である。方法は、遺伝的疾患もしくは障害、癌の診断、薬理ゲノミクス(個別化医療)、農作物の品質管理(例えば、種子または家畜向け)、植物もしくは動物の集団の研究および管理(例えば、農業もしくは漁業管理において、または集団の多様性の決定において)、または父性もしくは法医学的な特定も含め、いくつかの文脈において実施することができる遺伝子型判定に用いられてもよい。本明細書に記述される方法は、生物学的または環境性のサンプルにおける特定の状態または生物を示す配列の特定に、適用することができる。例えば、方法は、ウイルス、細菌および真菌などの病原体を特定するアッセイで使用することができる。方法は、環境またはミクロ環境の特徴付け、例えばヒト腸管における微生物種の特徴付けを狙った研究で使用することもできる。

10

【0281】

ある実施形態では、これらの方法は、DNAまたはRNAコピー数の決定に用いることができる。ゲノムDNAにおける異常なDNAコピー数の決定は、例えば癌などの遺伝的欠陥および疾患の診断および/または予後で有用である。RNA「コピー数」、即ち発現レベルの決定は、例えば、異なる条件下(例えば、異なる外部刺激または疾患状態)および/または異なる発生段階で、異なる個体、組織、または細胞で問題となっている遺伝子の発現モニタリングに有用である。

20

【0282】

さらに、方法は、例えばDNA配列決定などの他の解析用の核酸サンプルを調製するのに用いることができる。

【0283】

さらに、核酸サンプルには、サンプルの誤標識または交差汚染が結果を損なうことになるリスクを低減させるため、後続の解析の前に第1のステップとしてタグを付けることができる。例えば、任意の診療所、研究所、病院は、サンプルを収集した直後にタグを付けることができ、このタグを、解析時に確認することができる。同様に、犯罪現場で収集された核酸を含有するサンプルには、サンプルが確実に誤標識されないようにまたは改ざんされないようにするために、できる限りすぐにタグを付けることができる。1つのグループから別のグループにサンプルが渡されるごとにタグの検出を行うことにより、サンプルの流通管理を確立することができる。

30

【0284】

上記にて論じたように、本明細書に記述される方法は、例えば各粒子の内部または各粒子に関連付けられた1種または複数種のタンパク質の発現レベルなど、核酸の他に粒子のその他のパラメーターの解析で使用することができる。いくつかの実施形態では、各粒子ごとに、1つまたは複数のその他のパラメーターと一緒に、1種または複数種の核酸が解析される。

40

【0285】

多数のパラメーターに関するアッセイ結果を、粒子集団の各粒子に関連付ける能力は、様々な異なるタイプの調査で活用することができる。様々な実施形態では本明細書に記述される方法は、2つ以上のコピー数の変動、2つ以上の突然変異、または少なくとも1つのコピー数の変動、および少なくとも1つの突然変異であって、一緒に表現型に相關するものを、特定するのに用いることができる。表現型は例えば、リスク、存在、重症度、予後、および/または疾患の特定の療法に対する応答性、または薬物に対する耐性とすることができます。本明細書に記述される方法は、ゲノム再配列、特定のスプライス変種の共発現、B細胞での特定の軽鎖および重鎖の共発現を示すことができる、特定の核酸配列の同

50

時出現を検出するのに使用することもできる。方法は、特定の宿主細胞で特定の病原体の存在を検出するにも、例えば病原体特異的であり宿主細胞特異的な核酸（または、その他のパラメーター）が共に同じ細胞で同時出現する場合にも、適用可能である。方法は、例えば異なる癌での突然変異ホットスポットで、循環する腫瘍細胞からの目標にされる再配列決定に用いることもできる。

【0286】

（キット）

本発明によるキットは、本明細書に記述される1つまたは複数のアッセイを実施するのに有用な1種または複数種の試薬を含むことができる。キットは一般に、1種または複数種の個別の組成物としてまたは任意選択で試薬の適合性が可能になる場合には混合物として、試薬（例えば、プライマーおよび／またはプローブ）を保持する1つまたは複数の容器を備えたパッケージを含む。キットは、緩衝液、希釈剤、標準物質、および／またはサンプル処理、洗浄、もしくはアッセイの任意のその他のステップの実行に有用な任意のその他の材料など、使用者の立場から望ましいと考えられるその他の材料を含むこともできる。

10

【0287】

キットは一般に、本明細書で記述される方法の1つまたは複数を実施するための取扱説明書を含む。キットに含まれる取扱説明書は、包装材料に添着することができ、またはパッケージの挿入物として含めることができる。取扱説明書は、典型的には書き留められまたは印刷された材料であるが、それらに限定するものではない。そのような取扱説明書を記憶しそれらを最終使用者に伝達することができる任意の媒体が、本発明により企図される。そのような媒体には、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光媒体（例えば、CD-ROM）、およびRFタグなどが含まれるが、これらに限定するものではない。本明細書で使用される「取扱説明書」という用語は、取扱説明書を提供するインターネットのサイトのアドレスを含むことができる。

20

【0288】

本明細書に記述される実施例および実施形態は単なる例示を目的とし、それに照らした様々な修正または変更が当業者に示唆されることになりかつ本出願の精神および範囲と添付の特許請求の範囲に含まれることが理解される。

30

【0289】

さらに、本明細書に引用された全てのその他の刊行物、特許、および特許出願は、その全体が全ての目的で参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例1】

【0290】

（細胞処理に適合されたAccessArray（商標）IFC（「MA006」）を使用して単一細胞から配列決定用の核酸を調製する方法）

（一般的手法の概要）

MA006と本明細書で呼ばれる「チップ」を、核酸配列決定のために細胞処理とサンプル調製を一体化したMA006を使用する方法のように、AccessArray（商標）プラットフォームを使用して開発した。MA006単位セルアーキテクチャーの概略図に関しては、オンチッププロセスを示す図1を参照されたい。この一体化により、実験を実行するのに必要なステップが簡略化される。さらに、数百個の細胞のみ、チップの投入に必要である。

40

【0291】

MA006チップは、以下の形体を有する：

哺乳類細胞を投入するための、170×30pmの丸みの付いたチャネルを有する単位セル

50

48.48マトリックスフォーマット；

細胞チャネルで細胞を溶解するのに熱を使用；

増幅反応のための個別の反応チャンバー；

細胞チャネルを閉鎖するための $170 \times 170 \text{ pm}$ 封じ込め弁；
 余分なレジスト層：Pour O B - 30 g m の丸みの付いたレジスト；
 チップ製作：現行の AA 48 . 48 プロセスを使用；
 65 pm アライメント許容差；
 130 pm パンチ直径；
 65 \times 85 pm 弁サイズ；および
 3 層設計プロセス。

細胞捕捉形体は MA 006 チップ上にはない。結果は、限界希釈の方策を使用することにより、チャンバー当たり所望の細胞数が得られる。しかし細胞捕捉形体は、チップに設計することができる。それらは物理的（例えば、カップまたは杯構造）、生物学的（例えば、スポット付きペプチド）、または化学的（例えば、荷電イオン）とすることができる。
 10

【0292】

チップ外での細胞処理：解析される細胞を、サンプルチャンバー（図 1 の「細胞チャネル」）当たりで所望の細胞数が得られる密度に調製する。MA 006 チップは限界希釈の方策を使用するので、チャンバー当たりの細胞数は、理論的にも実際にもポアソン分布に従う。第 1 に、単一細胞を含有するチャンバーが最大数望まれるので、最適な細胞密度はマイクロリットル当たり 300 ~ 600 細胞であった。1 から 2 マイクロリットルの最小体積を、入口に適用することができる。したがって、実験は、わずか数百個の細胞で実施することができる。任意の供給源（即ち、生きている生物、組織培養物など）からの任意の細胞型（即ち、哺乳類、細菌など）を使用することができる。調製、洗浄、および／または染色の任意の形態または程度は、下流での適用例に適合する限り使用することができる。
 20

【0293】

チップ内での細胞の追跡：任意のポリメラーゼ／増幅依存的な化学的性質が存在しない場合、チップ内の細胞は、明視野または蛍光顕微鏡法を使用してその位置、同一性、および／または含量に関してモニターすることができる。細胞は、これは下流の適用例に適合する限り、任意の染色剤（即ち、SYT010 などの核酸特異的染色剤； Cy 5 が接合した抗 CD19 などの免疫検出など）で染色することができる。これは例えば、不均質な細胞集団で稀な細胞、即ち癌幹細胞を特定するのに使用することができる。
 30

【0294】

化学的性質：細胞が MA 006 に投入された後、アッセイ物質は、アッセイチャンバー（図 1 の「アッセイチャネル」）に投入され、インターフェース弁を開放してサンプルおよびアッセイチャンバー内の内容物を混合する。チップを、選択された化学的性質に応じて熱サイクリングに供し、化学的性質により必要とされかつ／または支持される場合には実時間でまたは終点で撮像する。この手順は遺伝子特異的増幅に限定されず、即ち非特異的変性プライマーを使用することができ、または RNA 特異的増幅を実施することができる。遺伝子特異的増幅の場合、「多重」方策を使用して複数の遺伝子を同時に標的にすることができる。化学的性質は、出力物質が配列決定用の基質であることを前提として柔軟であり、ポリメラーゼ連鎖反応または増幅にも制限されなければならない。
 40

【0295】

（細胞処理）

（細胞計数：明視野撮像）

R A M O S 細胞を、以下の通り処理した：

- (1) 細胞を採取する。
- (2) 氷冷 Tris 生理食塩液 BSA 緩衝液中で、2 ~ 3 \times 洗浄する。
- (3) 計数し、適切な希釈を行う。様々な細胞密度に関する理論分布（ポアソン分布）を図 2 に示す。
- (4) 細胞を MA 006 チップに押し込む。
- (5) 明視野により撮像する。

10

20

30

40

50

図3 A～Bは、撮像のために明視野を使用した、チップでの細胞計数の結果（A）を、理論分布（B）と比較して示す。明視野撮像に基づいたチップ内の細胞密度は、ポアソン分布に近いがそれよりも低く、この傾向は、細胞密度が高くなると悪化する。これは、部分的にはチップ形体により生成される「シャドウイング」に起因する可能性があり、内部で明視野撮像を使用して細胞を検出することができる測定可能な面積が低減する可能性がある。

【0296】

（細胞計数：ポストPCR蛍光）

細胞を、 $0.15\text{E}6/\text{ml}$ でMA006チップに投入し、Cells-Direct（商標）RT-PCR成分、Rox、およびEVAグリーンを使用してRT-PCRに供した。図4 A～Bは、蛍光細胞「ゴースト」画像（A）によって、プレPCR明視野よりも多くの細胞の検出が可能であり、したがって細胞密度はポアソン分布にさらに密接に近似することを示す（B）。これらの結果に基づけば、MA006チップの入口当たり4000細胞（例えば、 $4\mu\text{l}$ の1000細胞/ μl ）が適用され、全体に分布される場合、2304（ 48×48 ）の約1/3または800のチャンバーが単一細胞を有する。

10

【0297】

（より特異的な手法）

使用することができる、チップ内の細胞を検出するためのより特異的な方法は、例えば、細胞膜透過性核酸染色剤の使用および/または抗体による細胞特異的表面マーカー検出を含む。したがって例えば、RAMOS細胞は以下の通り処理することができる：

20

（1）細胞を採取する。

（2）氷冷Tris生理食塩液BSA緩衝液中で2～3×洗浄する。

（3）Sty010 DNA染色剤による染色および/またはCy5で標識された抗CD19抗体。

（4）氷冷Tris生理食塩液BSA緩衝液中で2～3×洗浄する。

（5）計数し、適切な希釈を行う。

（6）細胞をMA006チップに押し込む。

（7）撮像。

これらのより特異的な手法の結果を、図5で、 $1\text{E}6/\text{ml}$ の細胞密度に関して示す。図6 Aは、プレRT-PCR核酸染色（Sty010 DNA染色）対ポストRT-PCRゴースト画像（細胞ゴースト）の間の比較を示し、図6 Bは、Sty10がGAPDHのR-PCRを阻害しないことを示す。チップ内の細胞検出に関して提示されたワークフローは、DNA染色剤および/または抗体による細胞の染色と、その後のプレRT-PCRの計数、次いでバックアップポストRT-PCRとしての細胞ゴーストの計数を含むことができる。

30

【0298】

（化学的性質：ワンステップ遺伝子特異的RT-PCR）

種々の化学的性質を調査して、細胞内の遺伝子特異的RNAをMA006チップ内のアンブリコンに変換させる効率的な化学的性質を見出した。細胞を、Tris生理食塩液BSA（ $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）中で細胞チャネルに押し込んだ。アッセイチャネルに投入された試薬は：

40

プライマー（ 500nM 最終濃度）

Cells Direct（商標）ワンステップqRT-PCRキット構成要素（Life Technologies, Foster City, CA）

反応ミックス

酵素ミックス：Superscript III+白金Taqポリメラーゼ

緩衝液

Rox

EVAグリーン

投入試薬 - AAまたはGE（Fluidigm Corp., South San Fr

50

ancisco、CAから入手可能)であって、PDMsによる非特異的吸収を防止し(「遮減作用」)かつ細胞を溶解させるものを含んでいた。

GAPDHのRT-PCRを、AAまたはGE投入試薬を用いてまたは用いずに実施した。結果は、両方の投入試薬がRT-PCRを阻害したことを示した。投入試薬は: Prionex(AA)またはBSA(GE)および0.5%Tween-20を含有した。GAPDHのRT-PCRを、PrionexまたはBSAの存在下で実施した。BSAではなくPrionexは、RT-PCRを阻害することがわかった。GAPDHのRT-PCRは、0.5%Tween-20または0.5%NP40(後者は細胞溶解試薬である。)の存在下で実施した。この研究の結果を図7に示す。0.5%Tween-20も0.5%NP40も、GAPDHのRT-PCRを著しく阻害しなかった。
10

【0299】

細胞からのGAPDHのRT-PCRに関して開発された反応条件が、異なるレベルで発現したその他の遺伝子のRT-PCRを可能にすることを決定するために、発現レベル範囲を包含する11遺伝子のRT-PCRを、10ng/μlのRNAおよび上述の試薬を用いて実施したが、例外として0.5%のNP40をAA/GE投入試薬に代えた。熱プロトコルは、50で30分; 55で30分; 95で2分; 次いで: 95で15秒、60で30秒、および72で60秒を45サイクル行った。MA006で実施されたこれら11遺伝子の標準曲線増幅を、図8に示す。これらの結果は、CellisDirect(商標)ワンステップqRT-PCRキットを、0.5%NP40(細胞溶解のため、およびチップ内の遮減作用を防止するため)と共に使用して、細胞の遺伝子特異的RNAをMA006チップ内のアンプリコンに変換できることを実証する。
20

【0300】

(配列決定)

MA006内で発生した遺伝子特異的アンプリコンの配列決定を容易にするために、バーコード化方法を用いて、異なるチャンバー(例えば、セル)からのアンプリコンを区別した。より具体的には、4プライマー組合せバーコード化方法を用いて、2つのバーコードの組合せを各アンプリコンのいずれかの端部に置いた。この方法を、図9に概略的に示す。インナープライマーは、標的特異的部分(順方向プライマーでは「TS-F」、および逆方向プライマーでは「TS-R」)、バーコードヌクレオチド配列(「b c 2」)、および異なるヌクレオチドタグを含む。アウタープライマーは、タグ特異的部分(「CS1」および「CS2」)、異なるバーコードヌクレオチド配列(「b c 1」)、および配列決定プライマー用のプライマー結合部位(「A」および「B」)を含む。図10A~Bは、4プライマーバーコード化を、MA006などのチップ上でどのように実施できるかを示す。増幅は、インナープライマーによりチップ上で実施され、チャンバーの各行は、同じ対のインナープライマーと、同じバーコードとを有する。チャンバーの各列からの反応生成物は、プールとして採取することができ、各プールは、異なるアウタープライマー対を使用する増幅に供される。この増幅は、初期増幅が実施されるチャンバーを一意的に特定する(行および列によって)アンプリコンのいずれかの端部にバーコードの組合せを有するアンプリコンを生成する。反応生成物の配列決定をし、各反応チャンバーごとに各配列を読み取る回数を決定した。この決定は、RAMOS細胞および脾臓RNAに関して実施された。図11は、得られた結果の比較を示し、各遺伝子特異的アンプリコン(赤)ごとに読み取る回数を、全RNAの場合に比較して表される。この図から明らかのように、これらRNAの呈示は、全RNAで観察された場合に比べて個々の細胞で測定された場合には異なる。
30

【実施例2】

【0301】

(サイズに基づくマイクロ流体単粒子捕捉)

マイクロ流体デバイス内を流れときに懸濁液から単一細胞を別々に捕捉する1つの手法は、捕捉部位が単粒子を捕捉するように、単粒子を効率的に捕捉するように(例えば、
40

10

20

30

40

50

捕獲部位近くを通る粒子の捕獲の確率が高い。)、かつ/または残りの懸濁液を捕獲部位に周りに案内するように、捕獲部位上の粒子(細胞またはビーズなど)の懸濁液の流れを案内するマイクロ流体幾何形状を画定することである。提示された幾何形状は、サイズに基づくものとすることができる、即ち捕獲部位は1つの粒子(およびそれ以下)を含有するのに十分大きいだけであるが、それでも適度に低い流体インピーダンスの部位を、粒子を含まない懸濁液が流れることができ、したがって空の捕獲部位は、粒子の流れをその周りにではなくそこに向かって流すようになる。この目的は、ドレインの使用によって達成することができる。さらに提示された幾何形状は、首尾良くなされる捕獲を高い確率にするために、捕獲部位近傍に十分近接して粒子が入ってくる可能性を増大させるよう粒子の流れを集束させることもできる。これら幾何形状の変形例は、捕獲部位およびドレインそのものも含めたドレインを取り囲む流体の流れ抵抗の制御に焦点を当てており、それと共に、捕獲部位の近くに粒子の流れを位置決めしようとする際に集束幾何形状のアパートナーを変化させることにも焦点を当てている。図12A~Bは、捕獲形体およびドレインを備えた捕獲部位を示す。パネルAは、流れを集束させるバッフルがない部位を示し、それに対してパネルBは、バッフルがある部位を示す。追加の捕獲部位のデザインを、図13に示す。

10

【実施例3】

【0302】

(表面マーカーに基づく粒子の捕獲)

マイクロ流体アーキテクチャー内の単一細胞の研究は、個々の細胞を個々の反応パーティション(チャンバー、液滴、粒子)に単離することを必要とする。限界希釈は、この単離を実現するための1つの方法である。細胞は、平均してパーティション当たり細胞1個の濃度で投入され、ポアソン統計により記述されるパターンで、それらのパーティションに分布される。別の手法は、細胞を捕獲するのに機械的トラップを利用することである。これらのトラップは、所与のサイズ範囲の細胞を捕獲するように設計される(実施例2参照)。これは、そのサイズ範囲内にある集団からの細胞の選択が偏向する結果になる。

20

【0303】

いくつかの適用例では、理想的な捕獲方法は、細胞の表面に発現した生物学的マーカーを使用すると考えられる。抗体は、マイクロ流体アレイ上の特定の場所でパターニングすることができるが、この手法は単純ではなく、マイクロ流体アレイの構造に依存する可能性がある。

30

【0304】

この実施例は、マイクロ流体デバイスの特定の場所での、単一の親和性試薬でコーティングされたビーズの初期捕獲に基づいた、単粒子(例えば細胞)を捕獲するための方法について記述する。捕獲部位の開口でのこのビーズにより提示される表面積は、細胞結合のためにアクセス可能な親和性試薬の、定められた表面を提供する。ビーズのサイズおよび捕獲部位は、単一細胞がビーズに結合すると、ビーズのアクセス可能な表面積の残りが最初に結合した細胞によって立体的に遮断されるように、選択/設計することができる。適切にサイズ決めされたビーズの捕獲部位を選択することにより、広範囲にわたる細胞サイズの捕獲も行うことができる。細胞が、露出した捕獲面積よりも大きい限り、かつ親和性試薬の適切な表面マーカーまたは結合パートナーを発現する限り、その細胞を捕獲することが可能であるべきである。

40

【0305】

捕獲アーキテクチャーは、細胞が表面マーカーに接触するようになる確率を最大限にするように設計することができる。例えば、1つまたは複数のチャネル壁にあるバッフルは、ビーズを捕獲形体に向けて定めるのに使用することができる。例示的な捕獲形体/バッフルの組合せに関しては、図14を参照されたい。捕獲形体の性能は、バッフルの角度、捕獲部位からのバッフルの距離、バッフルの長さ、捕獲形体のサイズおよび形状、捕獲形体内のドレインのサイズ(存在する場合)を含めた1つまたは複数の変数を調節することによって、調節することができる。捕獲形体/バッフルの組合せに関する変数、およびそ

50

の組合せの性能を示す、図14BおよびCを参照されたい。図14Bでは、チャネル壁にあるバッフルを使用して、ビーズを捕捉形体に向けて定める。図14Cでは、捕捉形体がチャネル壁のバッフルに連結され；個々の捕捉形体／バッフルの組合せを、交互に配された壁に位置付けて、隣接する捕捉形体／バッフルの組合せに向かって流れを集束させることができる。これらの組合せは、個別の反応チャンバーが形成されるように使用中は分離可能である（例えば、弁を使用して）部位に、位置付けることができる。

【0306】

図15AおよびBは、単一の親和性試薬でコーティングされたビーズが捕捉され、次いで親和性試薬（例えば、抗体）が示されて単粒子（例えば、細胞）が捕捉されるように、捕捉形体を使用するための方策を示す（単純化された形で、バッフルなし）。図15A-1では、流れは、捕捉形体を含有するチャネル内で開始される。パネルA-2では、抗体が結合したビーズが、パネルA-3に示されるように捕捉形体に留まるまで、捕捉形体に向かって流れる。次いでチャネルを洗浄して、捕捉されていないビーズを除去する。その後、図15B-1に示されるように、抗体が結合する細胞表面マーカーを持つ細胞は、捕捉されたビーズを含有するチャネル内に流入する。パネルB-2は、マーカーを持つ細胞が、捕捉ビーズによって示される抗体とどのように相互作用し結合するのかを示す。呈示面積は、結合した細胞によって、その他の細胞と捕捉されたビーズとの相互作用を立体閉塞により阻害するようにサイズ決めされ、したがってただ1つの細胞が、それぞれ捕捉されたビーズに結合するようになる。次いでチャネルを洗浄して、パネルB-3に示されるように、結合していない細胞を除去し、1つの細胞が各捕捉部位に固定化された状態にする。

10

20

30

40

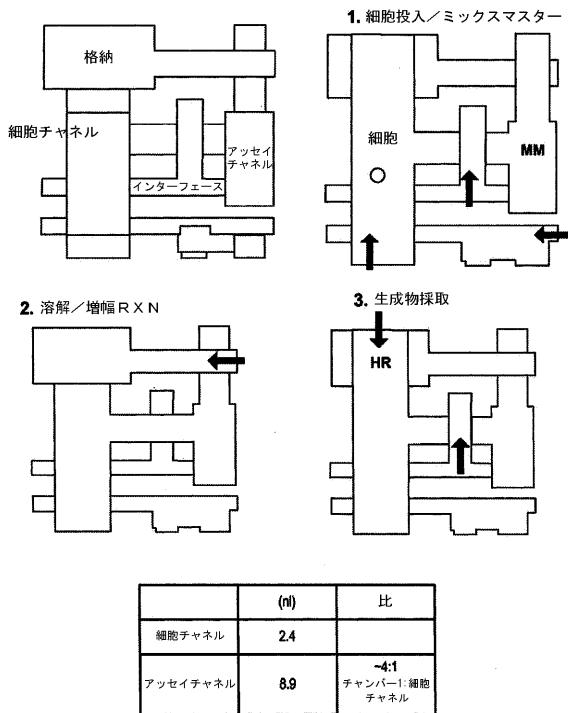
【実施例4】

【0307】

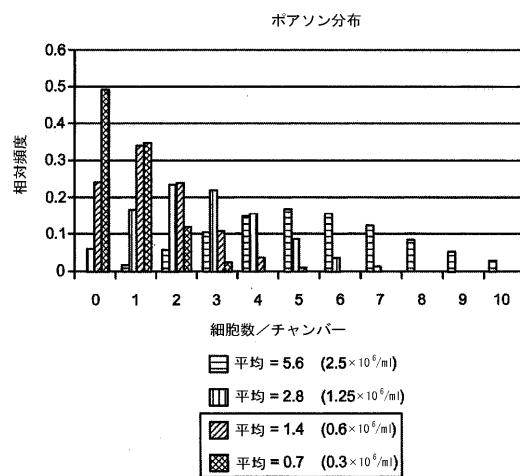
（細胞捕捉（「CCap：Cell Capture」）のためのマイクロ流体デバイス）

図16Aは、別々の場所（ニッチ）で単一細胞を捕捉するように設計されたマイクロ流体デバイスの概略を示す。流れは、オーバーフローチャネル内よりもニッチ上で強くなるように設計される。ニッチは、小さい隙間（約3μmの高さ）を含有する。図16Bを参照されたい。細胞がニッチに進入すると、細胞がニッチを遮断し、ニッチ内にこれ以上流れないようにする。流れは、隣の占有されていないニッチ内を、やはり細胞により遮断されるまで通過する。理論上は、細胞がオーバーフローチャネル内を通過しかつ外に出て廃棄物になる前に、全てのニッチが1つの細胞を捕捉すべきである。図16C～Fをより詳細に参照すると、緩衝液の入口は細胞入口と一緒になり、一連の横断細胞捕捉チャネルに最も近いフィーダーチャネルの側面に細胞が押し遣られるようになる。図16Dを参照されたい。横断細胞捕捉チャネルの抵抗力は、細胞オーバーフローチャネル内よりもニッチ内への細胞の優先的な流れが誘導されるように、細胞オーバーフローチャネルの場合よりも低い。図16Eを参照されたい。図16Fに示されるように、各ニッチは、ただ1つの細胞を捕捉するよう十分大きい。ニッチの隙間は、動作可能な圧力／流動レベルで細胞が捕捉されるように、十分小さい。後者が非常に高くかつ／またはニッチの隙間が非常に大きい場合、細胞は、変形してニッチの隙間の中に押し込まれる可能性がある。ニッチ内の細胞の存在は、その特定の回路の抵抗性を上昇させ、したがって流れは、細胞のない回路に向けられる。図16Gは、ニッチに位置付けられた、捕捉されたヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVVEC：human umbilical vein endothelial cell）を有する実際のデバイスを示す。

【図1】

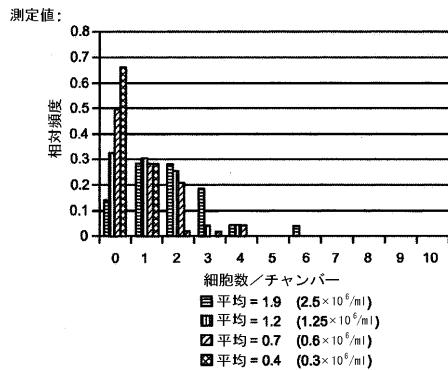


【図2】

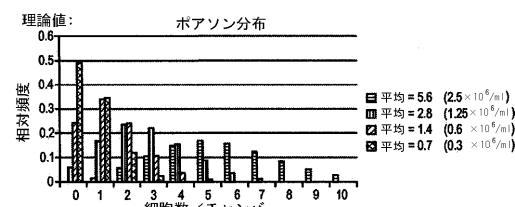
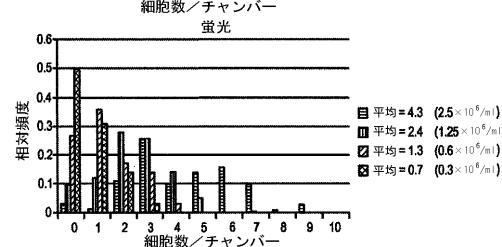
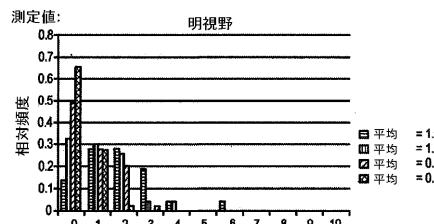


単一細胞に関する「最良」の理論的な細胞密度：
平均してチャンバー当たり約1=1/2.4n=約 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$

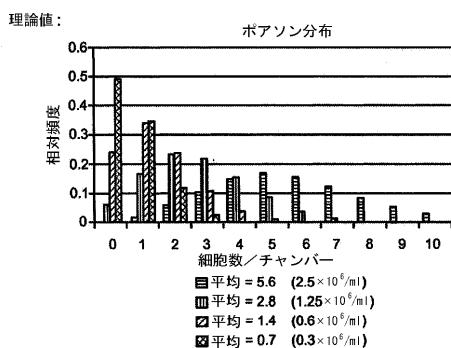
【図3 A】



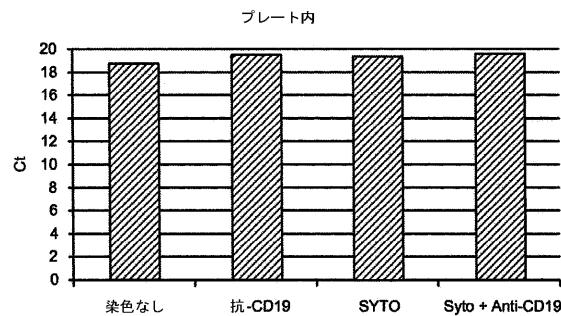
【図4 B】



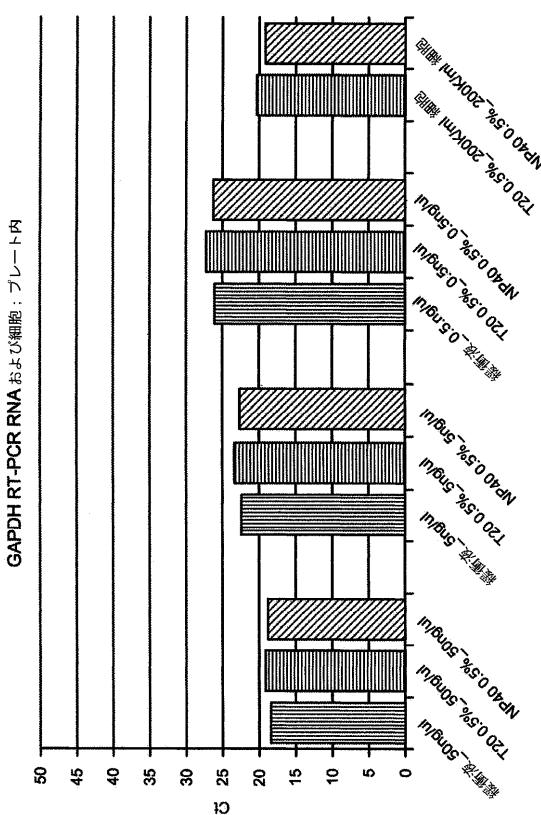
【図3 B】



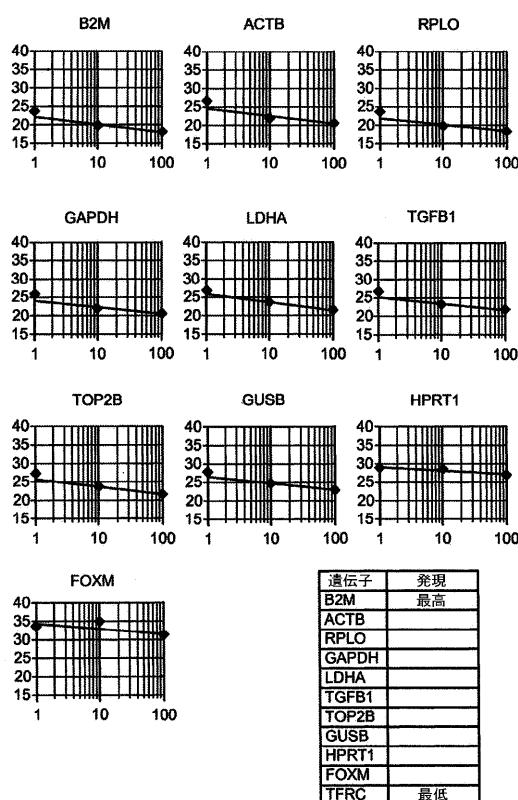
【図 6 B】



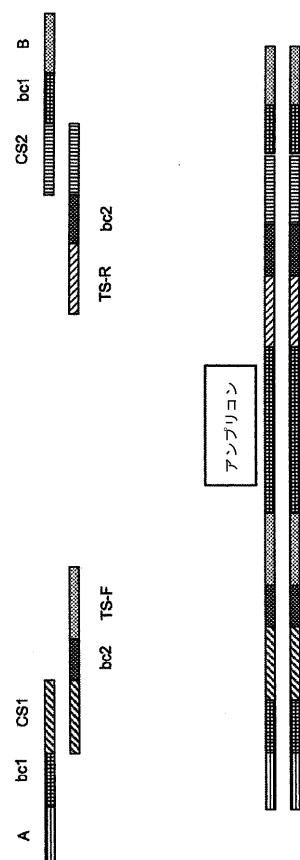
【図 7】



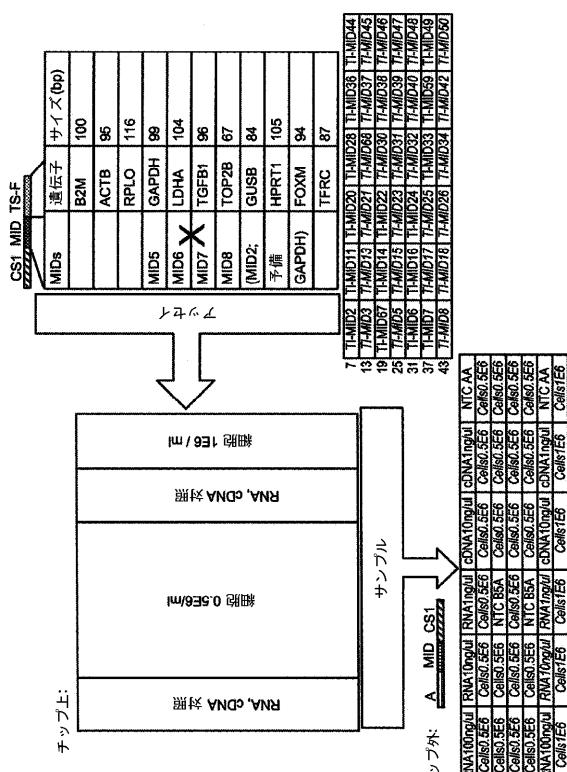
【図 8】



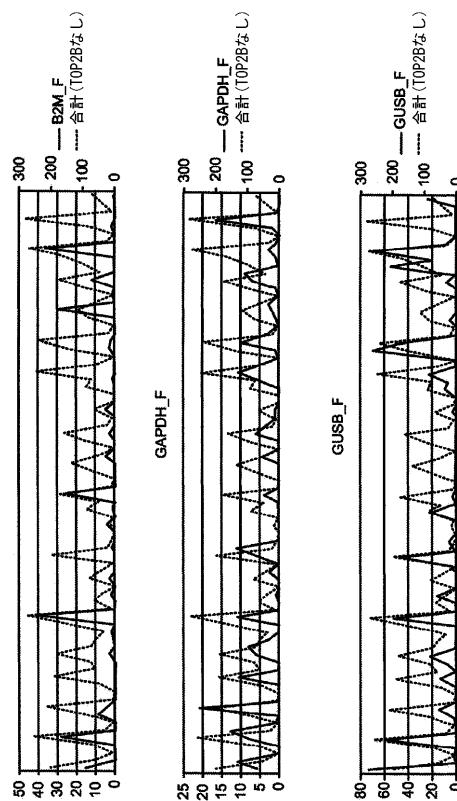
【図 9】



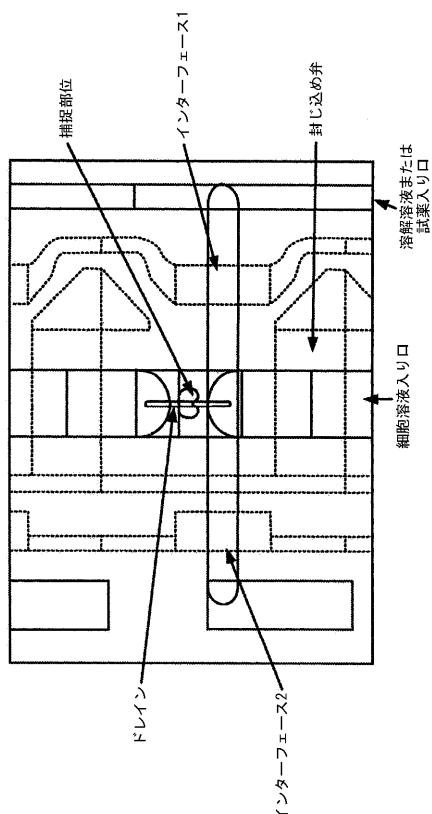
【図 10 B】



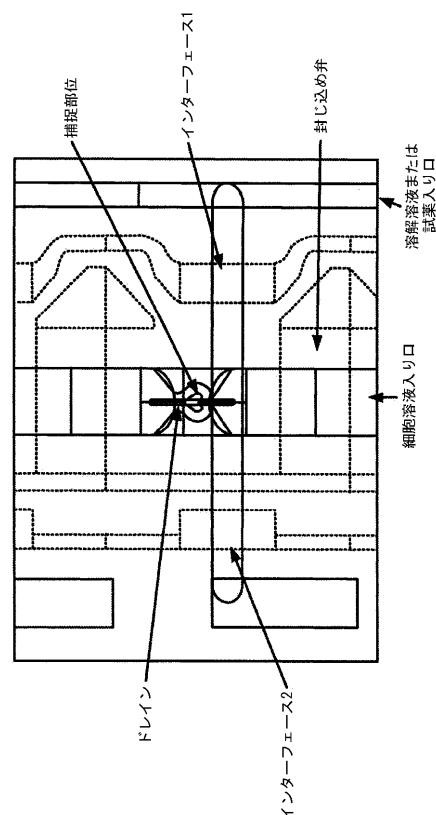
【図 11】



【図 12 A】



【図 12 B】



【図 13】

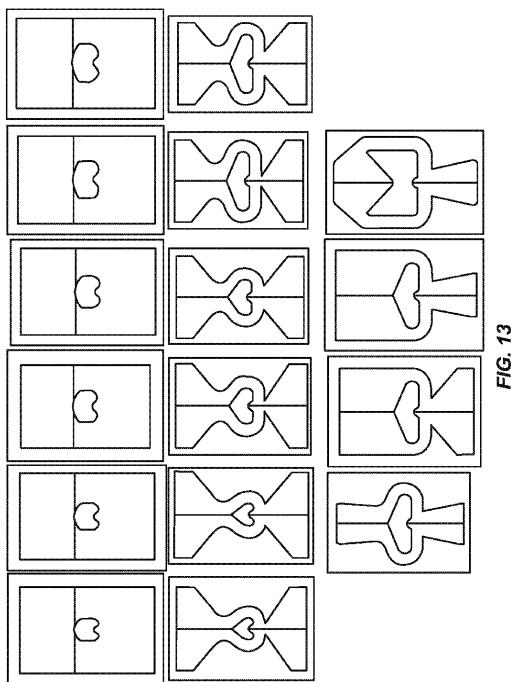


FIG. 13

【図 14 A】

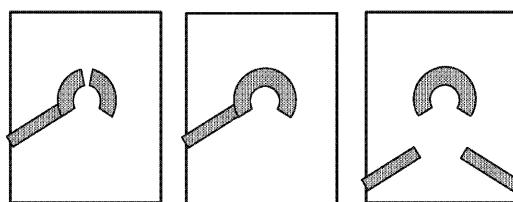


FIG. 14A

【図 14 B】

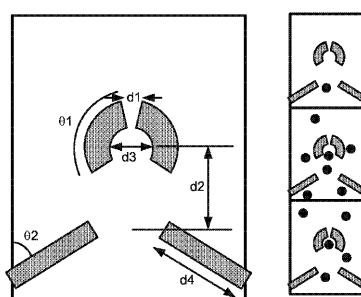


FIG. 14B

【図 14 C】

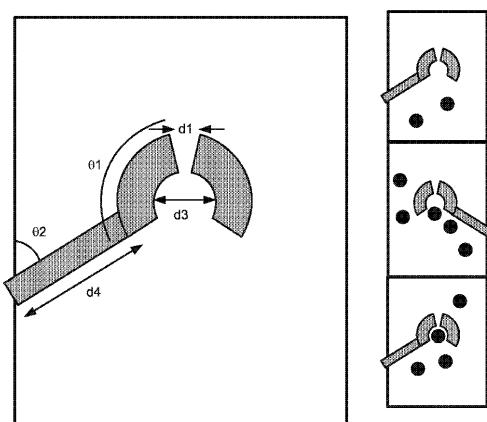


FIG. 14C

【図 15 B】

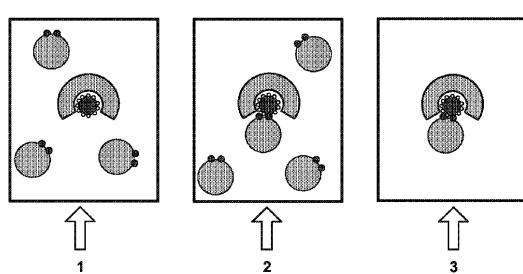


FIG. 15B

【図 15 A】

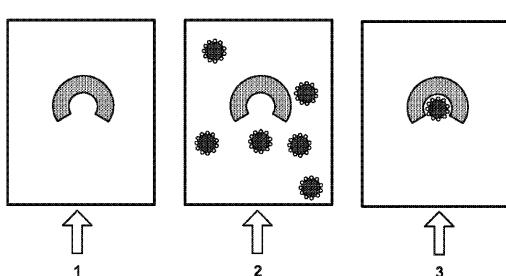
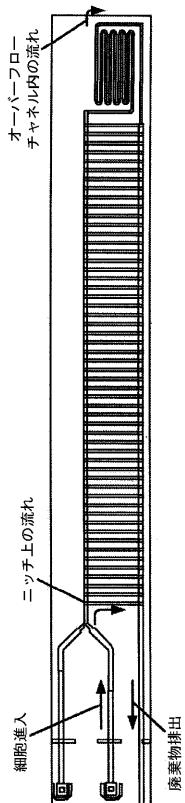
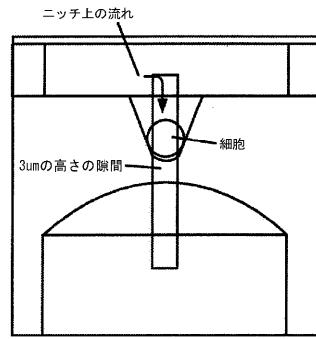


FIG. 15A

【図 16 A】



【図 16 B】



【図 16 C】

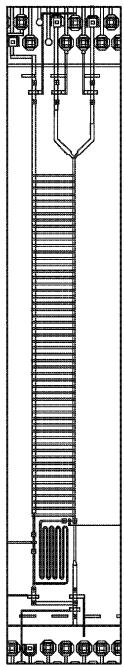
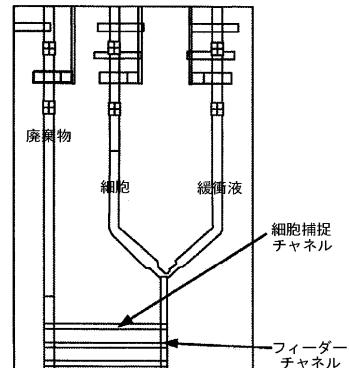
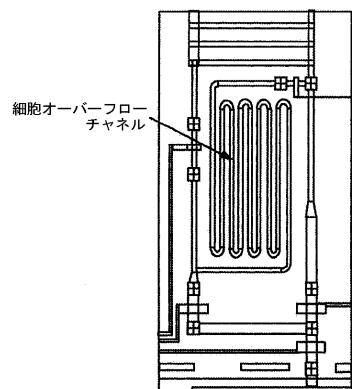


FIG. 16C

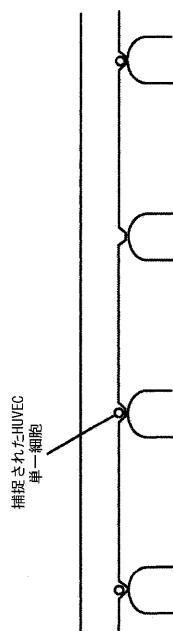
【図 16 D】



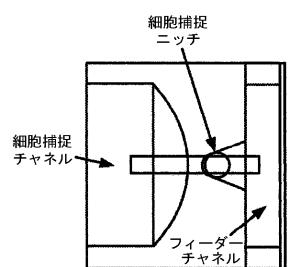
【図 16 E】



【図 16 G】



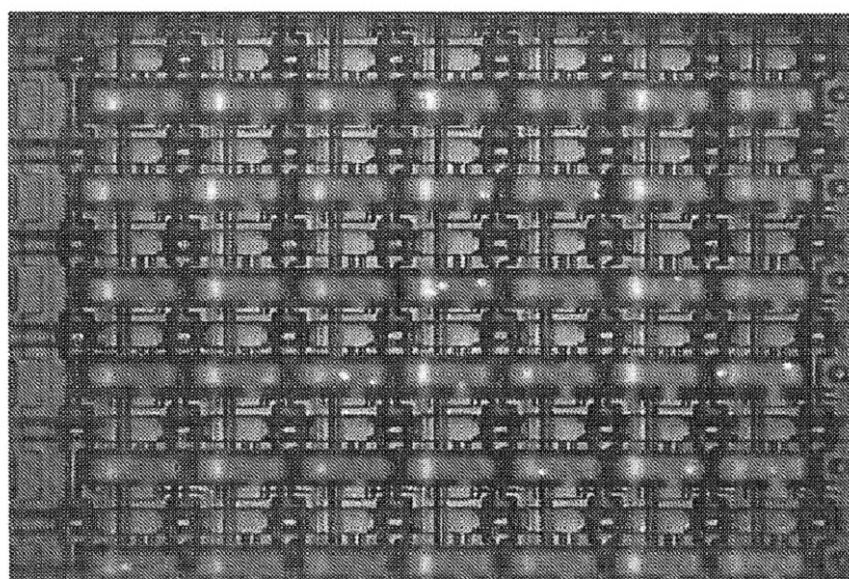
【図 16 F】



【図 4 A】

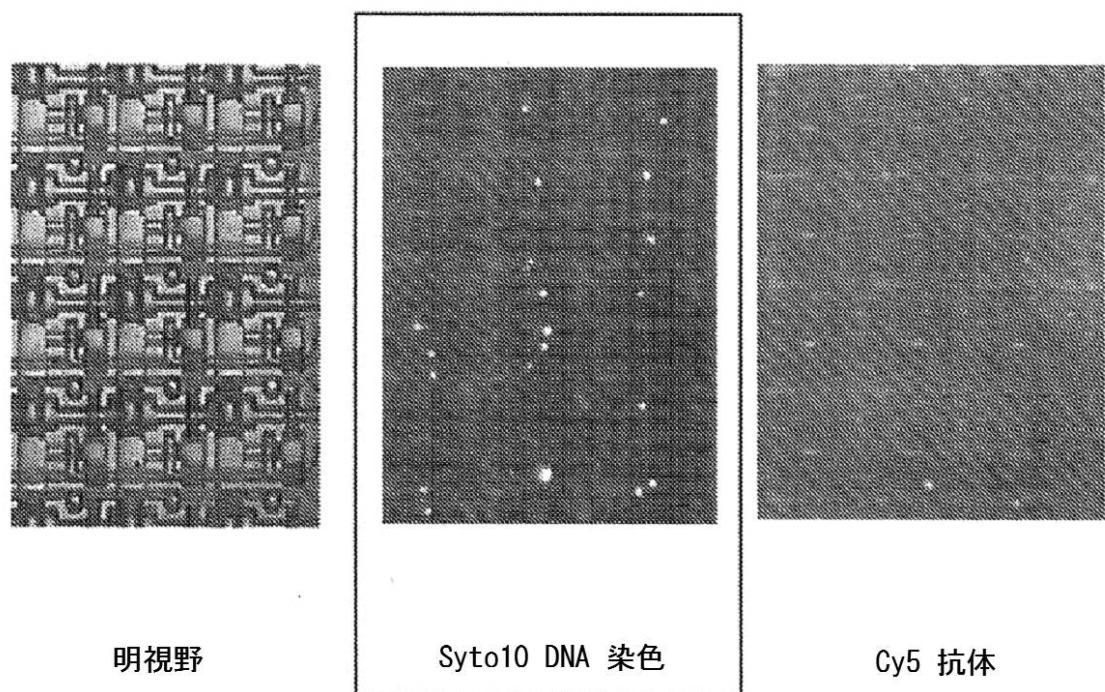
$0.15 \times 10^6 / \text{ml}$

0-1
チャンバー
以外

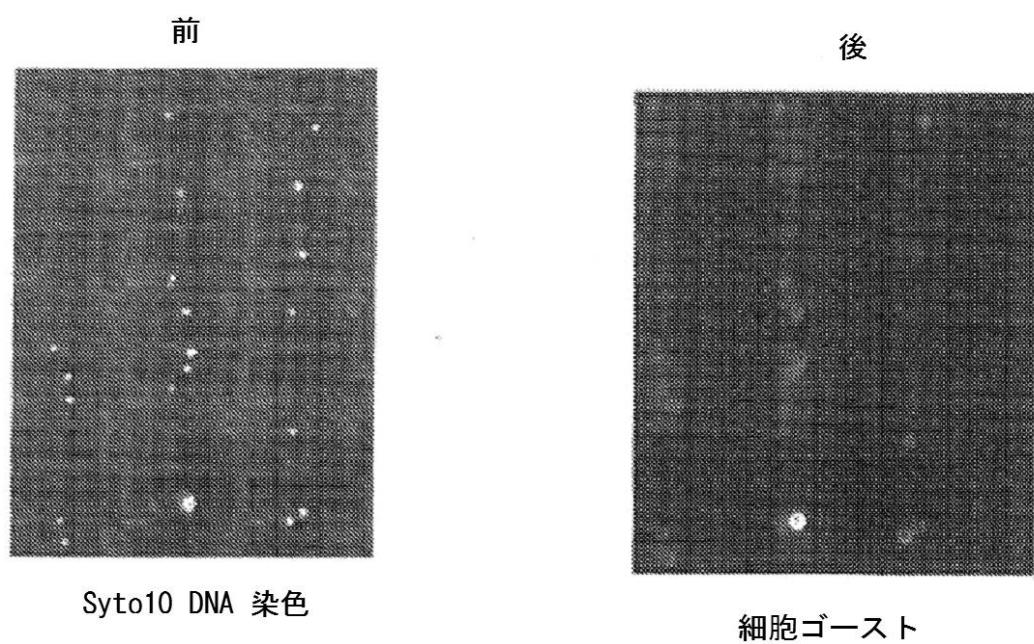


	明視野	蛍光
平均細胞／ チャンバー	0.29	0.52

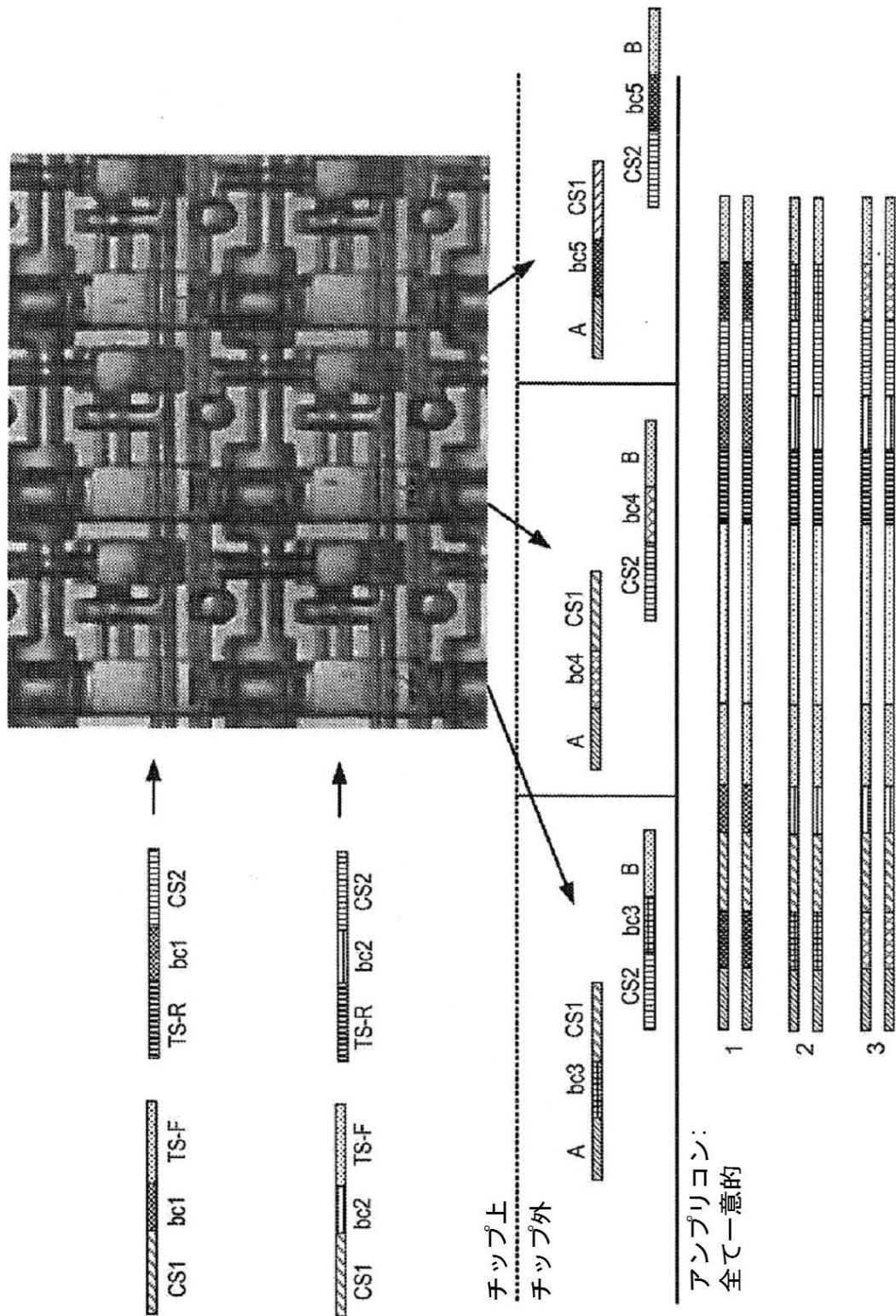
【図 5】



【図 6 A】



【図 10 A】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2013/042086
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
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) C12Q		
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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SANDRA L. SPURGEON ET AL: "High Throughput Gene Expression Measurement with Real Time PCR in a Microfluidic Dynamic Array", PLOS ONE, vol. 3, no. 2, 27 February 2008 (2008-02-27), page e1662, XP055081348, DOI: 10.1371/journal.pone.0001662 abstract; figure 1 page 1 - right-hand column Materials and Methods ----- - / --	1-64
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 September 2013		Date of mailing of the international search report 11/12/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barz, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/042086

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/044091 A2 (FLUIDIGM CORP [US]; HEID CHRISTIAN A [US]; DARIDON ANTOINE [US]) 19 April 2007 (2007-04-19) abstract examples 1-4 claims 11-16; figures 2-4 -----	1-64
X	US 2010/178655 A1 (HAMILTON A; LIN M; MIR A; PIEPRZYK M) 15 July 2010 (2010-07-15) abstract; examples 2-3 claims 24-27 -----	1-64
A	US 2011/143955 A1 (WEINER MICHAEL P [US]) 16 June 2011 (2011-06-16) abstract; figure 2b claims 7-12 -----	1-64
A	US 2005/019792 A1 (MCBRIDE LINCOLN [US] ET AL) 27 January 2005 (2005-01-27) abstract; figures 1-3 claims 7-13 -----	1-64
X	YINA KUANG ET AL: "Simultaneously Monitoring Gene Expression Kinetics and Genetic Noise in Single Cells by Optical Well Arrays", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 76, no. 21, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 6282-6286, XP055080832, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac049053f abstract -----	1
X	S. HOLLANTS ET AL: "Microfluidic Amplification as a Tool for Massive Parallel Sequencing of the Familial Hypercholesterolemia Genes", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 58, no. 4, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 717-724, XP055080574, ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/clinchem.2011.173963 the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2013/042086

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2007044091	A2 19-04-2007	EP 1915618	A2	30-04-2008
		EP 2477029	A1	18-07-2012
		US 2009317798	A1	24-12-2009
		US 2011129841	A1	02-06-2011
		US 2011143949	A1	16-06-2011
		WO 2007044091	A2	19-04-2007
US 2010178655	A1 15-07-2010	CN 102348811	A	08-02-2012
		EA 201170933	A1	28-02-2012
		EP 2379753	A2	26-10-2011
		KR 20110106922	A	29-09-2011
		SG 172965	A1	29-08-2011
		SG 183029	A1	30-08-2012
		US 2010178655	A1	15-07-2010
		WO 2010083250	A2	22-07-2010
US 2011143955	A1 16-06-2011	NONE		
US 2005019792	A1 27-01-2005	US 2005019792	A1	27-01-2005
		US 2009176230	A1	09-07-2009
		US 2011189678	A1	04-08-2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2013/042086
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-64

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2013/ 042086

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-64

Methods of assaying single particles in a plurality of particles, said method comprising capturing the particles in separate reaction volumes, assaying a plurality of parameters for each particle, and associating results of the assay with each particle to produce a data set comprising a plurality of parameters for each particle in said plurality.

2. claims: 65-71

Method of isolating a single particle, said method comprising capture of a support comprising binding partner at a capture site on a substrate to produce an immobilized support at the capture site, wherein the binding partner binds a particle component, and the immobilized support displays the binding partner in a manner that permits binding of only one particle to each immobilized support.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I C 1 2 M 1/00	テーマコード(参考) A
--------------	--------------------------	-----------------

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72) 発明者 メーガン アンダーソン
アメリカ合衆国 ワシントン ディストリクト オブ コロンビア 20037 エム ストリー
ト ノースウェスト 2400 アパートメント 439

(72) 発明者 ペイリン チェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94806 リッチモンド ランドマーク サークル 10
23

(72) 発明者 ブライアン ファウラー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94403 サンマテオ ロス プラドス ストリート 3
362

(72) 発明者 フィオナ ケイパー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92075 ソラーナ ビーチ サンタ アリシア 468

(72) 発明者 ロナルド リボフスキ
カナダ国 オンタリオ エム8ワイ 3アール7 エトビコ エルスフィールド ロード 79

(72) 発明者 アンドリュー メイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94121 サンフランシスコ トゥエンティナインス ア
ベニュー 564

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA08 AA09 AA27 BB11 BB20 CC04 FA04 FA15 GB10
4B063 QA01 QA12 QA13 QA17 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR62 QR66
QS12 QS25 QS39 QX02
4B065 AA90X AA94X BD14 CA46 CA60