

(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2015-523568
(P2015-523568A)

(43) 公表日 平成27年8月13日(2015.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/02 (2006.01)	GO 1 N 27/02 D	2 G O 4 3
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 1	2 G O 5 9
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 3 1 K	2 G O 6 0
GO 1 N 21/23 (2006.01)	GO 1 N 21/23	4 B O 6 3
GO 1 N 21/49 (2006.01)	GO 1 N 21/49 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-519468 (P2015-519468)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月2日 (2013.7.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月24日 (2015.2.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/055409
 (87) 国際公開番号 W02014/006561
 (87) 国際公開日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
 (31) 優先権主張番号 12305795.2
 (32) 優先日 平成24年7月2日 (2012.7.2)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 500531141
 セントレ・ナショナル・デ・ラ・レシエル
 シェ・サイエンティフィック
 フランス F-75016 パリ セデック
 クス16 リュ ミッシェル アンジュ
 3
 (71) 出願人 506413937
 アンスティテュート キュリー
 フランス国, 75248 パリ セデック
 ス 05, リュ ダルム 26
 (71) 出願人 500046368
 ユニベルシテ ピエール エ マリー キ
 ユリー
 フランス国, エフ-75252 パリ セ
 デ 05, プラス ジュシウ, 4
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体媒体中のマクロイオンを検出する為の方法及び装置

(57) 【要約】

空間(20)内に含まれる液体媒体中のマクロイオン、例えばDNA、を検出する方法であって、a)上記液体媒体を刺激する電場に掛けて、マクロイオンの塊の形成を誘発する段階であって、マクロイオンの上記形成された塊は好ましくは、何らの追加のラベリング剤を含まない、上記誘発する段階と、b)上記空間の検出ゾーンにおいて、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の、上記液体媒体内の空間的な及び/又は時間的なゆらぎ、例えば電氣的又は光学的、を測定する段階と、c)これらゆらぎに基づいて、上記マクロイオンの存在を決定する段階であって、段階c)は好ましくは、段階b)で測定された上記ゆらぎを、時間依存若しくは空間依存解析により、より好ましくはウェーブレット解析により、又は、自己相関により、処理することを含む、上記決定する段階とを含む、上記方法。

【選択図】 図1C

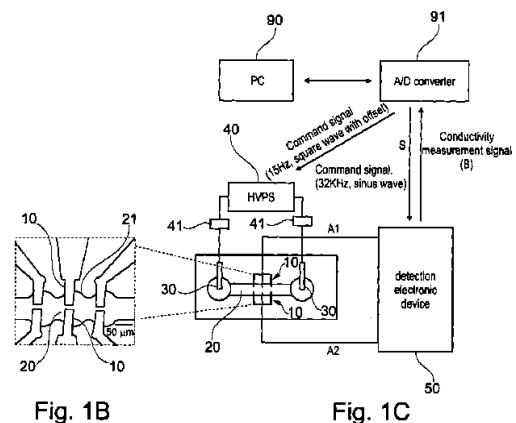


Fig. 1B

Fig. 1C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

空間（20）内に含まれる液体媒体中のマクロイオンを検出する方法であって、

a) 前記液体媒体を刺激する電場に掛けて、マクロイオンの塊の形成を誘発する段階であって、前記塊の形成は、前記液体媒体中の前記マクロイオンの濃度のランダムな空間的ゆらぎを生成し、マクロイオンの前記形成された塊は好ましくは、何らの追加のラベリング剤を含まない、前記誘発する段階と、

b) 前記空間の検出ゾーンにおいて、前記液体媒体中の前記マクロイオンの前記濃度に依存する少なくとも一つの変数の、前記液体媒体内の空間的な及び / 又は時間的なゆらぎを測定する段階と、

c) これらゆらぎに基づいて、前記マクロイオンの存在を決定する段階であって、段階 c) は好ましくは、段階 b) で測定された前記ゆらぎを、時間依存若しくは空間依存解析により、より好ましくはウェーブレット解析により、又は、自己相関により、処理することを含む、前記決定する段階と

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記マクロイオンが多価電解質であり、及び多価電解質の塊が段階 a) で形成され、前記多価電解質が好ましくは、核酸、より好ましくは 5 キロ塩基以上、又は 5 キロ塩基対以上、好ましくは 10 キロ塩基以上、又は 10 キロ塩基対以上、を有する核酸鎖を含み、前記核酸の塊は好ましくは、段階 a) で形成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記多価電解質が、核酸、より好ましくは 5 キロ塩基以上、又は 5 キロ塩基対以上、好ましくは 10 キロ塩基以上、又は 10 キロ塩基対以上、を有する核酸鎖を含み、及び、段階 a) での前記液体媒体中に存在する前記多価電解質は好ましくは、核酸増幅の段階の後に又はその間に得られ、前記増幅は好ましくは、リアルタイム定量増幅であり、又は、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応増幅、核酸等温増幅、ローリング・サークル増幅、分岐ローリング・サークル増幅、サークル - サークル増幅、LAMP、NASBA、TMA、SMART、HAD、RPA、C PA、SMART-AMP、RCA、HRCA、RAM、SDA、NEAR、NEMA、ICA、EXPAR、BAD AMP、若しくは PG-RCA 増幅、又は、Phi29 DNA ポリメラーゼを使用する核酸増幅方法のうちの少なくとも一つを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

段階 b) で測定される前記空間的な及び / 又は時間的なゆらぎが、電気的変数、好ましくは、伝導度又はインピーダンス、複素インピーダンス、複素伝導度、電流又は電圧、より好ましくは伝導度、のゆらぎであり、

又は、

段階 b) で測定される前記空間的な及び / 又は時間的なゆらぎが、光学変数、好ましくは、光学吸収、蛍光、発光、二色性、複屈折、光散乱、又は旋光能の中から選択される光学変数のゆらぎである、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記段階 a) で施与される刺激する電場が、

- 直流の電場又は、1000Hz 以下、好ましくは 100Hz 以下の周波数の交流の電場であり、及び / 又は、

- 50V/cm 以上、好ましくは 100V/cm 以上、より好ましくは 200V/cm 以上の強度を有し、及び / 又は、

- 異なる周波数を有する少なくとも第 1 及び第 2 の電場成分の重畳を含み、前記第 2 の電場成分は前記第 1 の電場成分の振幅よりも低い振幅を有し、及び、前記第 2 の電場成分は、直流であり又は、前記第 1 の電場成分の周波数よりも低い周波数を有する、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

前記変数が電氣的であり、及び、前記電氣的変数の前記ゆらぎが、前記液体媒体と直接電氣接触する少なくとも2つの電極(10)により段階b)で測定される、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記電氣的変数の前記ゆらぎが、前記刺激する電場の方向に対して横である、好ましくは垂直である、軸に沿って、互いに向かい合う、少なくとも2つの電極(10)により段階b)で測定される、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記変数が電氣的であり、及び、前記電氣的変数の前記ゆらぎが、前記電場の方向に対して平行な軸に沿って異なる位置で配置された少なくとも2つの電極により段階b)で測定され、段階a)で施与される前記刺激する電場が好ましくは、前記電氣的変数の前記ゆらぎを段階b)で測定する電極と同じ電極により施与される、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項9】

段階a)で施与される前記刺激する電場が、前記電氣的変数の前記ゆらぎを段階b)で測定する電極(10)と異なる電極(30)により施与される、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記変数が電氣的であり、及び、前記電氣的変数の前記ゆらぎが、段階a)で施与される前記刺激する電場の最高周波数成分と異なる周波数を有する交流分極信号により分極された少なくとも2つの電極(10)により段階b)で測定され、前記分極信号の前記周波数は好ましくは、前記周波数成分よりも大きく、より好ましくは少なくとも10倍、より好ましくは100倍、より好ましくは1000倍大きい、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項11】

前記変数の前記ゆらぎは前記刺激する電場が施与される間に測定され、又は、前記変数の前記ゆらぎは前記刺激する電場が施与されていない間に測定され、前記刺激する電場が好ましくは、第1の期間の間に施与されず、前記第1の期間は、前記刺激する電場がその間に施与される第2の期間と交互に起こる、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項12】

前記核酸が、前記核酸増幅の段階の間、緩衝液を含む媒体中に存在し、及び、段階a)で使用される前記液体媒体がまた、同じ前記緩衝液を含む、請求項3~11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記緩衝液が、1000mS/m以下、好ましくは500mS/m以下、より好ましくは350mS/m以下、特に300mS/m以下、特に275mS/m以下の伝導度を有する、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記緩衝液が、37℃又はそれ未満、好ましくは30℃又はそれ未満、の温度で活性化ポリメラーゼを含む、請求項12及び13のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項15】

前記緩衝液がさらにリガーゼを含む、請求項12~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記ポリメラーゼがDNAポリメラーゼである、請求項14及び15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記空間(20)が複数の検出ゾーン(100a; ... ; 100n)を備えており、前記検出ゾーン(100a; ... ; 100n)のそれぞれが、前記液体媒体中の前記マクロイオンの前記濃度に依存する少なくとも一つの変数の検出器(10a; 10b; 10c)を備えている、請求項1~16

50

のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記液体媒体が、検出されるべきマクロイオン、特に核酸、の種々のタイプを含み、及び、前記マクロイオンと相互作用するように構成された複数の化合物(110a; ... ; 110n)は、前記検出ゾーン(100a; ... ; 100n)のそれぞれに存在し、一つの検出ゾーンに存在する該複数の化合物は、他の検出ゾーンに存在する複数の化合物と異なる、請求項1~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

検出されるべき前記マクロイオンが核酸であり、及び、前記化合物(110a; ... ; 110n)は、前記核酸の種々のヌクレオチド配列と相互作用するように、特にそれにハイブリダイズするように、構成されている、請求項18に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記空間(20)が縦軸(X)に沿って延在し、及び、前記検出ゾーン(100a; ... ; 100n)が前記縦軸(X)に沿って互いに続く、請求項17~19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記空間(20)は、それぞれが検出ゾーンを含む複数のサブチャンネル(20a; ... ; 20n)を備えている、請求項17~20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記液体媒体中の前記マクロイオンの前記濃度に依存する少なくとも一つの変数の前記液体媒体内の前記空間的及び/又は時間的ゆらぎが、前記検出ゾーン(100a; ... ; 100n)のそれぞれの間で同時に測定される、請求項17~21のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記液体媒体中の前記マクロイオンの前記濃度に依存する少なくとも一つの変数の前記液体媒体内の前記空間的及び/又は時間的ゆらぎが、前記検出ゾーン(100a; ... ; 100n)のそれぞれの間で逐次的に測定される、請求項17~21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記液体媒体中の前記マクロイオンの前記濃度に依存する少なくとも一つの変数の前記液体媒体内の前記空間的及び/又は時間的ゆらぎが、前記検出ゾーン(100a; ... ; 100n)のそれぞれの間で測定され、及び、段階c)が、前記複数の検出ゾーン(100a; ... ; 100n)から測定された前記空間的及び/又は時間的ゆらぎを処理することを含む、請求項17~23のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

塊にされ且つ検出されるべき前記核酸、特にDNA、が、挿入剤、特にDNA挿入剤、を含む、請求項3~24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記電極が、表面処理剤を含む少なくとも一つの層で被覆されている、請求項6~25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記表面処理剤が、ヒドロゲル又は界面活性剤である、請求項26に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記刺激する電場がまた、前記液体媒体中の前記マクロイオン塊の移動を誘発する、請求項1~27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

段階b)で測定される前記空間的な及び/又は時間的なゆらぎが非周期的である、請求項1~28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

段階b)で測定される前記空間的な及び/又は時間的なゆらぎがランダムである、請求項1~29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

50

請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法を実行するための装置であって、

- 液体媒体を受ける為の空間 (20) であって、前記空間は好ましくは、複数のマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、前記空間 (20) と、

- 前記液体媒体中のマクロイオン分散物からマクロイオン塊の形成を誘発する為に、刺激する電場を生成する為の少なくとも 2 つの電極 (30) であって、前記電極の対は第 1 の電源 (40) に接続されている、前記少なくとも 2 つの電極 (30) と、

- 前記液体媒体中の前記マクロイオン塊の存在により誘発された電気的変数の空間的及び / 又は時間的ゆらぎを測定する為の複数の電極 (10) を備えている電気的変数の検出器、好ましくは伝導度又はインピーダンス検出器、であって、前記複数の電極は、前記刺激する電場を生成する為の前記電極 (30) と同じであり又はそれと異なり、好ましくは前記第 1 の電源と共通の電位参照を有さない第 2 の電源 (50) に接続されている、前記検出器と、

- 時間依存的若しくは空間依存的解析、好ましくはウェーブレット解析、を、又は、前記電気的変数の変動について、若しくは画像検出器から発行された画像について、若しくは統合的光学検出器の出力について自己相関を実行する為のデジタル・プロセッサ (90) と、

- 前記検出器の前記電極 (10) は、好ましくは前記液体媒体と接触するように構成されており、前記検出器は好ましくは、差分増幅器 (57) の反転入力及び非反転入力にそれぞれ接続されている 2 つの電極を備えており、各電極は好ましくは、前記差分増幅器の個々の入力に及び対応する抵抗器 (56) を介して定電流源に接続されており、前記検出器電極は好ましくは、前記液体媒体中の 1 の場所で前記電気的変数の変動を測定するように構成されており、ここで、前記刺激する電場を誘発する前記電位の絶対値が最小であり、好ましくは実質的にゼロである、

- 前記第 1 の電源は、好ましくは対称の電源 ($V_s, -V_s$) である、

- 前記 2 つの電極は、好ましくは互いに向かい合う、前記 2 つの検出器電極 (10) であって、好ましくは、前記刺激する電場の方向に対して横であり、好ましくは垂直であり、且つ前記検出器の前記電極 (10) は好ましくは、前記電気的変数の変動を測定する場合に、前記刺激する電場の周波数と異なる周波数を有する交流分極信号により分極され、前記分極信号の前記周波数は好ましくは、前記刺激する電場の主成分の周波数よりも大きく、より好ましくは少なくとも 10 倍、より好ましくは少なくとも 100 倍、より好ましくは少なくとも 1000 倍大きく、前記第 2 の電源 (50) は好ましくは、浮動接地を有する、

を備えている、前記装置。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法を実行する為の装置であって、

- 液体媒体を受ける為の空間 (20) であって、前記空間は好ましくは、複数のマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、前記空間 (20) と、

- 前記液体媒体中のマクロイオン分散物からマクロイオン塊の形成を誘発する為に、刺激する電場を生成する為の少なくとも 2 つの電極 (30) であって、前記電極の対は電源 (40) に接続されている、前記少なくとも 2 つの電極 (30) と、

- 光学検出器、好ましくはイメージング検出器、カメラ、又は統合的光学検出器と、

- ウェーブレット解析を、又は、上記変動について、若しくは前記光学検出器、好ましくはイメージング検出器、から発行された画像について、若しくは前記統合的光学検出器の出力について自己相関を実行する為のデジタル・プロセッサ (90) と

を備えている、前記装置。

【請求項 33】

前記空間 (20) が複数の検出ゾーン (100a ; ... ; 100n) を備えており、前記検出ゾーン (100a ; ... ; 100n) のそれぞれが、前記液体媒体中の前記マクロイオンの前記濃度に依存する電気的変数及び / 又は光学的変数の検出器 (10a ; 10b ; 10c) を備えている、請求項 31 及び 32 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 4】

前記空間 (2 0) が縦軸 (X) に沿って延在し、及び、前記検出ゾーン (100a ; ... ; 100 n) が前記縦軸 (X) に沿って互いに続く、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 5】

前記空間 (2 0) が、それぞれが検出ゾーンを含む複数のサブチャンネル (20a ; ... ; 20n) を備えている、請求項 3 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 6】

空間 (2 0) 内に含まれる液体媒体中の荷電種を検出する方法であって、

i . 請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の装置を使用して、前記検出ゾーンにおいて、前記電気的変数の変動、又は、統合的光学検出器の前記出力の変動、又は、イメージング検出器から発行された画像の強度の空間的ゆらぎを測定する段階と、

ii . これらの変動に基づいて、前記荷電種の存在、及び好ましくは、前記液体媒体中の前記荷電種濃度を決定する段階であって、前記段階 ii) は好ましくは、時間依存的若しくは空間依存的解析により、好ましくはウェーブレット解析により、又は、前記段階 i) で測定された前記変動の自己相関解析により、処理することを含む、前記決定する段階と

を含む、前記方法。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法を実行する為の、特に、液体媒体中のマクロイオン分散物からのマクロイオン塊の形成又はイオン分散物中のイオンの移動を誘発する為に、刺激する電場生成器と組み合わせて使用されるべき、伝導度又はインピーダンス検出器であって、

a) 液体媒体を受ける為の空間 (2 0) であって、前記空間は好ましくは、イオン、好ましくはマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、前記空間 (2 0) と、

b) 少なくとも 2 つの電極 (1 0) であって、前記電極は :

- 前記液体媒体と直接的な又は間接的な電気的接続、好ましくは直接的な電気的接続、にあり、及び

- 差分増幅器の (5 7) の反転入力及び非反転入力にそれぞれ接続されている、好ましくは差分増幅器の (5 7) の入力に及び対応する抵抗器 (5 6) を介して定電流源に接続されている、

前記少なくとも 2 つの電極と

を備えている、前記検出器。

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法を実行する観点の方法において R C A 及び / 又は H R C A 増幅において使用されるために構成される緩衝液であって、前記液は、3 7 又はそれ未満、好ましくは 3 0 又はそれ未満、の温度で活性なポリメラーゼを含み、及び、前記液は、1000mS/m以下、好ましくは500mS/m以下、より好ましくは350mS/m以下、特に300mS/m以下、特に275mS/m以下の伝導度を有する、前記緩衝液。

【請求項 3 9】

リガーゼをさらに含む、請求項 3 8 に記載の緩衝液。

【請求項 4 0】

前記ポリメラーゼが、8 0 よりも高い、好ましくは 6 0 よりも高い、温度で活性でない、請求項 3 8 及び 3 9 のいずれか一項に記載の緩衝液。

【請求項 4 1】

前記ポリメラーゼが D N A ポリメラーゼである、請求項 3 8 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の緩衝液。

【請求項 4 2】

前記ポリメラーゼが下記リストの中から選択される、請求項 3 8 ~ 4 1 のいずれか一項

10

20

30

40

50

に記載の緩衝液：AmpliTAQ、Phi29、「Pol」の種々のタイプ、特に、Pol I、Pol II、Pol III、Pol IV、Pol V、Pol B、Pol アルファ、Pol デルタ、Pol エプシロン、Pol カッパ、Pol イオタ、Pol ベータ、Pol シグマ、Pol ラムダ、Pol ミュー、種々のバクテリオファージのポリメラーゼ、例えばバクテリオファージT4のポリメラーゼ、バクテリオファージT7のポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、及び、突然変異生成により得られるその種々の変異体、並びに、それらの混合物。

【請求項 4 3】

前記リガーゼが下記リストの中から選択される、請求項 3 9 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の緩衝液：T4 DNAリガーゼ、Ampligase、CircLigase ssDNAリガーゼ、CircLigase I I ssDNAリガーゼ、E. Coli DNAリガーゼ、Taq DNA リガーゼ、T3 DNA リガーゼ、T7 DNAリガーゼ、9 °NTM DNAリガーゼ、及び、それらの混合物。

10

【請求項 4 4】

空間（20）内に含まれる液体媒体中のマクロイオンを検出する方法であって、

a) 前記液体媒体を刺激する電場に掛けて、マクロイオンの塊の形成及び前記液体媒体中の前記マクロイオン塊の移動を誘発する段階であって、マクロイオンの前記形成された塊は好ましくは、何らの追加のラベリング剤を含まない、前記誘発する段階と、

b) 前記空間の検出ゾーンにおいて、前記液体媒体中の前記マクロイオンの前記濃度に依存する少なくとも一つの変数の前記液体媒体内の空間的な及び/又は時間的なゆらぎを測定する段階と、

c) これらゆらぎに基づいて、前記マクロイオンの存在を決定する段階であって、段階 c) は好ましくは、段階 b) で測定された前記ゆらぎを、時間依存若しくは空間依存解析により、より好ましくはウェーブレット解析により、又は、自己相関により、処理することを含む、前記決定する段階と

20

を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、液体媒体中のマクロイオンを検出する為の方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

DNA又はRNAの非常に少ない量の配列特異的検出は、臨床診断、食品安全性試験、法医学、又は環境微生物学を含む、広範囲の用途のために有用である。

30

【0003】

より一般的には、関心のある最も生物学的な種、特にタンパク質、多糖類、核酸、リン脂質、及びそれらの組み合わせが溶液中で荷電され、すなわちイオン又はほとんどの場合マクロイオンを構成し、それらは荷電の多様性を生じることがを意味する。これはまた、コロイド、又は細胞、又は包括的でない様式において、ウイルス、細胞核、エンドソーム、エキソソーム、ミトコンドリア、バクテリア、小胞を含む細胞小器官についてもまた当てはまる。マクロイオンはまた、例えば、ラテックス、コロイド、ナノ又はマイクロ粒子、ナノロッド、ファイバー、荷電ポリマー、多価電解質、小胞、ミセルとして、化学においてしばしば遭遇する。これら種の荷電は上記種の本質的な特性であり且つラベリングの追加の段階を課さない故に、それは上記種を検出する為の便利な方法である。

40

【0004】

荷電が、電気泳動法、電気クロマトグラフィー、又は等速電気泳動の知られている方法と同じように、種を分離する為の手段として使用されうる。しかしながら、生物学的又は化学的バッファーはまた高伝導度バックグラウンドを生成する多数の小さいイオンを一般的に含む故に、種検出の荷電に基づく知られている方法はあまり感度が良くなく且つまた特異性を欠きうる。

【0005】

酵素増幅方法は感度において途方もない可能性を提供しており、及び、ポリメラーゼ連

50

鎖反応 (PCR) が特には、遺伝解析の為の主要且つルーチン・ツールになっている。

【0006】

数千ユーロの費用が掛かるベンチトップ機械から数千万ユーロの費用が掛かるより精巧且つ高いスループットの定量PCR機械までの多数のシステムが現在存在する。しかしながら、これらシステムのほとんどは、蛍光に基づく検出を使用し、そして幹線からの電源に相変わらず依存する。

【0007】

例えば遠隔環境における病原体検出、バイオセーフティ又は法医学に関して重要な用途が、携帯可能な「ポイント・オブ・ケア」(point of care)又は「ポイント・オブ・サンプリング」(point of sampling)アッセイを要求し、すなわち、過去数十年間に亘る努力が、例えばA. K. White et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108, 2-7に記載されているように、このタイプのアッセイをマイクロ流体システムに統合する為に向けられている。

10

【0008】

これを達成する為に、例えばダイオード技術を使用して若しくは免疫凝集のDNA等価物(J. Li, H. Alshammari et al, proc. Microtas 2011, CBMS Publ., pp.1959-1961)を使用して、蛍光に基づくPCR(P. J. Asciello and A. J. Baeumner, Lab on a chip, 2011, 11, 1420-30)の電力消費を減少させること、又は、電気化学による何らかの光学をより徹底的に避けること、のいずれかを目指す種々の方策が提案された。

20

【0009】

蛍光検出器は、感度の観点から今までのところまだ未挑戦である。しかしながら、蛍光検出がラベル剤を要求し、特に発展途上世界の為に、非常に低コストの技術を開発することはまだ挑戦中である(例えば、P. Yager et al., Nature, 2006, 442, 412-8を参照)。

【0010】

従って、ラベル剤又は高価な検出技術を使用すること無しに、核酸増幅、及びより一般的には、生物学的、医学的、環境的、法医学的、又は化学的関心のマクロイオン、を検出し且つモニターする為の方法を提供することが非常に関心のあることであろう。不幸なことに、これは、最先端において可能でない。なぜならば、核酸の増幅は、溶液の全体的な伝導度を変化させないからである。幾つかの電気化学的方法が、例えば、DeFeaver T et al, J Am Chem Soc. 2009 Aug 19; 131(32): 11433-41において引用されているように存在し、しかし、それらは、ラベル剤を要求する。従って、ラベル剤無しに且つ、直接的な電氣的読み込み、例えば伝導度測定、によりマクロイオンを検出する為の方法、特には核酸の増幅をモニターする為の方法、を提供することが、本発明の第1の目的である。

30

【0011】

その上、定量PCRの慣用的な方法が、相対的に短いフラグメント(2kbp未満(例えば、M. Stegger et al., Clinical Microbiology and Infection, 18: 395-400. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03715.xを参照))のみに施与されることができる。ロング・レンジPCR(long range PCR)(例えば、O. Harismendy et al., Genomics, 2009, 10, R32)又は等温増幅を含む、研究において益々使用されている多くの新しい増幅方法が、長い核酸フラグメントを生成する。核酸増幅方法の包括的でないリストが、例えばA. Niemi et al; Trends in Biotechnology, May 2011, Vol. 29, No. 5, pp 240-250において概説され且つリストされる。しかしながら、これらの新しい方法は、それらの複雑さ又はそれらの定量性の欠如のいずれかの理由で、診断又はルーチンにおいて滅多に使用されない。

40

【0012】

巨大な核酸分子はまた、電気泳動によって解析されることができる。巨大な核酸を分離する為使用される周知の方法は、例えば国際公開第W08402001号パンフレット(Schwartz

50

z及びCantor)において記載されているように、ゲルにおけるパルス・フィールド電気泳動である。しかしながら、この方法は、分離の為に非常に時間がかかり(例えば、典型的に24時間)、労働集約的であり、及び、多くの材料を必要とする。

【0013】

これをキャピラリーに電気泳動に置き換える試みがなされている。しかし、Mitnik et al. Science, 1995, 267, 5195, 219-22に示されているように、キャピラリー中のマクロイオン溶液に施与される高い電場は、フィールド線に沿ったイオンの通常の輸送と異なる他の動電学的な現象をもたらす。この現象は、非直線的な電気流体力学的な不安定性であり、それは塊中にDNAを集め、多くのノイズを生成し、そして分離を台無しにする。この現象は、非常に非直線的であり、及び、その開始は、フィールド周波数、フィールド強度、並びに、核酸の濃度及びサイズに依存する。

10

【0014】

キャピラリー電気泳動について強烈に厄介者であるこれらの塊を抑える為の両性バッファを使用する試みが、例えばMagnusdottir et al. Biopolymers, 49, 385-401, (1999)において提案されているが、それでも電場が慣用のキャピラリー電気泳動と比較して減少されていなければならず、且つ、分離時間が余りにも長い。

【0015】

この制限の他に、キャピラリー電気泳動システムは、高価であり、巨大であり、且つ大電力消費を有する、UV吸収に又はレーザー誘起蛍光(LIF: Laser Induced Fluorescence)のいずれかに基づく光学的検出方法を一般的に使用する。それ故に、電気泳動で分離された種は一般的に荷電されている故に、これら検出方法を直接伝導度検出に置換する試みがなされてきている。

20

【0016】

特に、動電学的分離及び解析方法、例えば、キャピラリー電気泳動、マイクロチャンネル、電気泳動又は等速電気泳動、の文脈において伝導度検出の為に多数の方法が、文献において提案されてきている。

【0017】

総括が例えば、V. Solinova et al., J. Sep. Sci. 2006, 29, 1743-1762及びR. M. Guijt et al., Electrophoresis 2004, 25, 4032-4057において見られることができる。伝導度検出が、試験下で上記媒体と電氣的接続において、少なくとも2つの電極を必要とする。典型的に、伝導度検出は、2つの異なるファミリーにおいて実施されることができ、それにおいて上記電極が直接電気接続であり、それらは、溶液を介して直流若しくは交流又は非接触検出を伝導し、それにおいて上記電極は、誘電体層を介して溶液と電氣的関係にあり、従って、それは、交流のみ又は主に交流を伝導することができる。非接触検出測定は、高い励起周波数(典型的に、kHz又はMHz範囲である)及び電極と溶液との間の容量結合に依存する。伝導度が生じる周波数は典型的に、誘電体層の厚さに依存する。この方法は、誘電体を介して溶液の外側の電極を配置すること、(DC)高電場及び接地ループからの干渉を最小化することの有利点を有する。

30

【0018】

接触伝導度が、溶液伝導度を測定する為に、電極溶液接触を使用する。このアプローチは、非接触検出よりもより感度が高い。しかし、関心のある種を動かす為の強電場、特にキャピラリー電気泳動、マイクロチャンネル、電気泳動、を包含する方法において、分離場と検出電子機器との間の相互作用する傾向にあり、望ましくない電気化学的反応、水の電気分解、泡形成、及び増加したノイズを結果として生じる。これを避ける為に、Prest et al., in Analyst, 2002, 127, 1413-1419は、検出に基づく接触を提案する。しかし、それらは、感度を減少させる分離チャンネルから離れた場所にある別個のバイアルにおいて測定電極を有することが必要である。Mo et al., Anal. Commun, 1998, 35, 365-367はまた、電気絶縁性がオプトカプラ(optocoupler)によって実行されシステムを開示し、しかし、全てのこれら電子システムは若干の漏電を有し、且つ感度はmM範囲において低いままである。

40

50

【 0 0 1 9 】

検体が電場において閉じ込められる検出方法を教える書類 米国特許第2002/0070114号明細書及び米国特許第2005/0136466号明細書（以上、MILES）並びに米国特許第2010/0203580号明細書（BRYNING）がまた知られている。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 2 0 】

従って、外部の刺激する場の存在下において伝導度測定検出の感度を改善する為の必要性がある。特に低濃度での検体のための、低コストな、携帯可能な検出技術を得る必要性がまた存在し、「チップ・イン・ラボ」（chip in the lab）から「ラボ・オン・チップ」（lab on a chip）パラダイムへの進化を許す。

10

【 0 0 2 1 】

溶液中のマクロイオン、好ましくは核酸、及び特に新たな増幅方法で得られるようなDNA、の存在のラベル剤不要な直接的読み取りの為の必要性がまた存在する。

【 0 0 2 2 】

マクロイオンを検出する為の、及び特に核酸の上記増幅をモニターする為の、ラベル剤不要な方法を提供する為の必要性がまた存在する。

【 0 0 2 3 】

相対的に伝導性のバッファ且つ高い外部の刺激する場が使用される場合でさえ高い感度を有するマイクロチップにおいて接触伝導度測定を満たすことを保証することが可能な、新規な、簡単な、且つ低コストの電子装置を得る為の必要性がまた存在する。

20

【 0 0 2 4 】

本発明は、上記した必要性の1以上を満たすことを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 5 】

本発明の幾つかの目的及び特徴が、請求項1～44において定義されている。

【 0 0 2 6 】

第一の観点に従うと、本発明は、空間内に含まれる液体媒体中のマクロイオンを検出する方法であって、

a) 上記液体媒体を刺激する電場に掛けて、マクロイオンの塊の形成を誘発する段階であって、マクロイオンの上記形成された塊は好ましくは、何らの追加のラベリング剤を含まない、上記誘発する段階と、

30

b) 上記空間の検出ゾーンにおいて、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の、上記液体媒体内の空間的な及び/又は時間的なゆらぎを測定する段階と、

c) これらゆらぎに基づいて、上記マクロイオンの存在を決定する段階とを含む、上記方法に関する。

【 0 0 2 7 】

「追加のラベリング剤」により、追加の発光性の、特に蛍光性の、ラベリング剤が意味される。

40

【 0 0 2 8 】

好ましい実施態様において、本発明は、マクロイオンの検出を実行する為に、特に核酸を検出し又は核酸増幅をモニターする為に、これまで厄介者として考えられてきた電気流体力学の不安定性現象による塊の形成を使用する（Magnusdottir et al. Biopolymers, 49, 385-401, (1999)を参照）。

【 0 0 2 9 】

本発明は有利に、核酸増幅の終点検出の為の低コストな方法を提供し、ある場合には10 fg/ μ lよりも良い感度に達する。それはまた有利に、核酸増幅のリアルタイムの及び/又は量的なモニタリングの為の低コストな方法を提供する。本発明はまた有利に、マクロイオン、特に生物学的マクロイオン、の検出の為の、特に生物学的、医学的、環境的

50

、法医学的、化学的、又は安全用途の為の、低コストな方法を提供する。

【0030】

好ましくは、上記マクロイオンが多価電解質であり、及び多価電解質の塊が段階 a) で形成され、上記多価電解質が好ましくは、核酸、より好ましくは5キロ塩基以上、又は5キロ塩基対以上、好ましくは10キロ塩基以上、又は10キロ塩基対以上、を有する核酸鎖を含み、及び上記核酸の塊は好ましくは、段階 a) で形成される。

【0031】

本発明は、何らの追加のラベリング剤を使用すること無しに、マクロイオンの検出及びマクロイオンの生産のモニタリングを可能にし、従って相対的に低コストな方法を提供する。

【0032】

好ましい実施態様において、塊にされ且つ検出されるべき上記核酸、特に DNA、が、挿入剤、特に DNA 挿入剤、を含む。

【0033】

挿入剤は、化合物、特に核酸を構成する複数のヌクレオチド間に挿入することができる化合物、に対応する。

【0034】

挿入剤の使用は有利に、核酸の剛性を増加し、且つ、塊の取得を促進する。これは有利に、より良い感度を本発明に従う検出方法に提供する。

【0035】

上記挿入剤は、蛍光でありうる。しかし、好ましくは、上記挿入剤は、非発光性であり、特に、非蛍光である。

【0036】

上記挿入剤は、非制限的に、下記リストの中から選択されうる：臭化エチジウム、SYBR グリーン 1、SYTO-9、SYTO-13、SYTO-16、SYTO-60、SYTO-62、SYTO-64、SYTO-82、POP O-3、TOTO-3、BOBO-3、PO-PRO-3、TO-PRO-3、YO-PRO-1、SYTOX オレンジ (Life Technologiesによって提供される)、QuantiFluor dsDNA システム (Promegaによって提供される)、Quant-iT PicoGreen (Life Technologiesによって提供される)、AccueBlue (Biotiumによって提供される)、DAPI (Life Technologiesによって提供される)、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580 (Life Technologiesによって提供される)、[https://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_\(chemistry\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chemistry)) (その内容は参照によって本明細書中に取り込まれる) において引用される挿入剤、及び、それらの混合物。

【0037】

上記比 (挿入剤の量対塊にされ且つ検出されるべきDNAの量) は、1000~0.01、好ましくは100~0.1で含まれうる。高親和性挿入剤、例えばTOTO又はYOYO、について、それは好ましくは、低親和性を有する剤、例えば臭化エチジウム、ヨウ化プロビジウム、を挿入する為に、20~0.1で含まれ (例えば、MA Marino et al., Anal Chem, 1998 70, 4514-9を参照)、それはより一般的には100~1で含まれる。

【0038】

段階 a) の全て又は一部の間の液体媒体中の上記挿入剤の濃度は、0.01 $\mu\text{mol/l}$ ~ 200 $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは0.1 $\mu\text{mol/l}$ ~ 10 $\mu\text{mol/l}$ 、(例えば、G.T. Irons et al, Cytometry, 15:129 (1994)を参照)、又は1000 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは100 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (例えば、Biorad instructions:<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006020b.pdf>を参照、その内容は参照により本明細書中に取り込まれる) で含まれうる。

【0039】

本明細書の下記において詳細に述べられるように、段階 a) で液体媒体中に存在する核酸は、核酸増幅の段階の後に得られうる。そして、上記挿入剤は、核酸増幅の上記段階の後に液体媒体中に導入されうる。変形として、上記挿入剤は、核酸増幅の段階の間、核酸を含む上記媒体中に存在することができる。

10

20

30

40

50

【0040】

段階b)で測定される上記空間的な及び/又は時間的なゆらぎが好ましくは、非周期的である。段階b)で測定される上記空間的な及び/又は時間的なゆらぎが好ましくは、ランダムである。

【0041】

好ましくは、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の液体媒体内の時間的なゆらぎが、段階b)で測定される。

【0042】

段階b)で測定される上記空間的な及び/又は時間的なゆらぎが好ましくは、電気的変数、好ましくは伝導度又はインピーダンス、複素インピーダンス、複素伝導度、電流又は電圧、より好ましくは伝導度、のゆらぎである。

10

【0043】

簡潔さの為に、語「伝導度」は、電流を輸送する為の媒体の能力の検出の全ての異なる変形、すなわちオーム性伝導度、インピーダンス、複素伝導度、又は複素インピーダンス、を包含すべきである。

【0044】

上記測定は、電気的検出手段によって実行されうる。当該電気的検出手段の例が、下記に記載される。

【0045】

好ましい実施態様の仲間において、上記電気的変数の上記ゆらぎは、上記刺激する電場の方向に対して横である、好ましくは垂直である、軸に沿って、互いに向かい合う、少なくとも2つの電極により段階b)で測定される。

20

【0046】

好ましくは、段階a)で施与される上記刺激する電場は、上記電気的変数の上記ゆらぎを段階b)で測定する電極と異なる電極によって施与される。

【0047】

伝導度測定が、特に好ましい。事実、伝導度測定は、普遍的であり、低コストであり、且つ直接電子検出と互換性があり、従って、それを最小化し且つ統合することを容易にする。

【0048】

変形において、段階b)で測定される上記空間的な及び/又は時間的なゆらぎが、光学変数、好ましくは、光学吸収、蛍光、発光、二色性、複屈折、光散乱、又は旋光能の中から選択される光学変数のゆらぎである。

30

【0049】

段階c)は好ましくは、段階b)で測定される上記ゆらぎを、時間依存若しくは空間依存解析により、好ましくはウェーブレット解析により、又は、自己相関により、処理することを含む。

【0050】

本発明に従う方法は、マクロイオンのサイズに対して、従来技術である量的核酸増幅方法よりもより大きな感度を許す。

40

【0051】

従って、他の観点に従って、本発明はまた、核酸のリアルタイム増幅をモニターする方法であって、

- ・核酸を核酸増幅の段階に掛けること、
 - ・上記増幅の後に又は上記増幅の間に得られた核酸を上記した検出方法に掛けて、検出の結果を取得すること、
 - ・検出の結果の関数として、核酸の増幅のレベルについての情報、又は核酸の初期濃度についての情報を提供すること
- を含む、上記方法に関する。

【0052】

50

上記増幅によって得られた上記核酸は好ましくは、5キロ塩基以上、又は5キロ塩基対以上、好ましくは10キロ塩基以上、又は10キロ塩基対以上、を有する核酸鎖を含む。

【0053】

上記した核酸の上記増幅をリアルタイムにモニターする為の方法は好ましくは、増幅に掛けられたサンプル中の核酸の初期濃度を、巨大な核酸の生産の測定された速度から計ることを含む。

【0054】

「巨大な核酸」により、5キロ塩基以上、又は5キロ塩基対以上、が意味される。

【0055】

本発明はまた、本発明に従う上記方法を実施する為に特に有用な装置を提供する。

10

【0056】

他の観点に従って、本発明は、伝導度又はインピーダンス検出器、特に本発明に従う方法を実行する為の、又は、特に液体媒体中のマクロイオン分散物からマクロイオン塊の形成若しくはイオン分散物中のイオンの移動を誘発する為に、刺激する電場生成器と組み合わせ使用されるべき、伝導度又はインピーダンス検出器であって、

- 液体媒体を受ける為の空間であって、上記空間は好ましくは、複数のマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、上記空間と、

- 少なくとも2つの電極であって、当該電極は、

i . 上記液体媒体と直接的又は非直接的な電氣的接続、好ましくは直接的電氣的接続、にあり、及び、

20

ii . 差分増幅器の入力に且つ対応する抵抗器を介して定電流に接続されている、上記電極と

を備えている、上記伝導度又はインピーダンスに関する。

【0057】

他の観点に従って、本発明は、装置、特に本発明の上記方法を実行する為の装置であって、

- 液体媒体を受ける為の空間であって、上記空間は好ましくは、複数のマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、上記空間と、

- 上記液体媒体中のマクロイオン分散物からマクロイオン塊の形成を誘発する為に、刺激する電場を生成する為の少なくとも2つの電極であって、上記電極の対は第1の電源に接続されている、上記少なくとも2つの電極と、

30

- 上記液体媒体中の上記マクロイオン塊の存在により誘発された電氣的変数の空間的な及び/又は時間的なゆらぎを測定する為の複数の電極を備えている電氣的変数の検出器、好ましくは伝導度又はインピーダンス検出器、であって、上記複数の電極は、上記刺激する電場を生成する為の上記電極と同じであり又はそれと異なる、上記検出器と

を備えている上記装置に関する。

【0058】

好ましくは、上記検出器の上記電極は、上記液体媒体と接触しているように構成される。変形として、それはそうでない。

【0059】

2つの電極は、差分増幅器の反転入力及び非反転入力にそれぞれ接続されており、各電極は好ましくは、上記差分増幅器の個々の入力に及び対応する抵抗器を介して定電流源に接続されている。

40

【0060】

装置、特に本発明の上記方法を実行する為の装置、であって、

- 液体媒体を受ける為の空間であって、上記空間は好ましくは、複数のマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、上記空間と、

- 上記液体媒体中のマクロイオン分散物からマクロイオン塊の形成を誘発する為に、刺激する電場を生成する為の少なくとも2つの電極であって、上記電極の対は電源に接続されている、上記少なくとも2つの電極と、

50

- 上記液体媒体中の上記マクロイオン塊の存在により影響される光学的特性の空間的な及び/又は時間的なゆらぎを測定することが出来る、光学の変数の検出器であって、上記光学的特性は、発光若しくは蛍光強度、光吸収、光偏光、複屈折、回転電源、好ましくは光吸収、複屈折又は回転電源、の間で選択される、上記検出器と

を備えている上記装置を提案することがまた、本発明の目的である。

【0061】

本発明は、生命科学、薬学研究、診断、ポイント・オブ・ケア (point of care)、法医学、バイオセキュリティ、環境又は食品産業における簡単、低コスト、できる限り携帯可能な応用の為のDNA検出器を提供する。

【0062】

その観点の他において、本発明はまた、種を分離し且つ検出する為の装置であって、上記分離が動電学的処理により達成され、及び、上記検出が、上記した装置の1つによって達成される、上記装置に関する。特に、本発明は、改善された感度を有し且つ小さいイオンの解析を許すキャピラリー電気泳動の為の検出器を提供する。

【0063】

本発明は、低コストの、簡単な、且つ携帯可能な検出器を提供する。

【0064】

本発明は、上記刺激する電場と上記検出装置との間で優れた電気的非干渉化を維持しながら、マイクロチップにおいて高感度な接触伝導度測定を保證することが可能な装置を提供する。

【0065】

本発明はまた、伝導度又はインピーダンス検出器、特に本発明の方法を実行する為の伝導度又はインピーダンス検出器、特にイオン分散物中のイオンの移動、及び好ましくは液体媒体中のマクロイオン分散物からマクロイオン塊の形成、を誘発する為に、刺激する電場生成器と組み合わせて使用されるべき伝導度又はインピーダンス検出器、であって、

- 液体媒体を受ける為の空間であって、上記空間は好ましくは、複数のマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、上記空間と、

- 少なくとも2つの電極であって、当該電極は、

i . 上記液体媒体と直接的又は非直接的な電氣的接続、好ましくは直接的電氣的接続、にあり、及び、

ii . 差分増幅器の反転入力及び非反転入力にそれぞれ接続されている、上記電極と

を備えている、上記伝導度又はインピーダンス検出器に関する。

【0066】

本発明の他に観点において、本発明はまた、空間内に含まれる液体媒体中の種を分離する為の方法であって、

- 装置を使用して、刺激する電場を施与することによって上記種を分離すること、

- 上記検出ゾーンにおいて、少なくとも2つの電極を備えている本発明の装置を使用してインピーダンス又は伝導度の変動を測定することであって、上記電極は、

i . 上記液体媒体と直接的又は非直接的な電氣的接続、好ましくは直接的電氣的接続、にあり、及び、

ii . 差分増幅器の入力に且つ対応する抵抗器を介して定電流に接続されている、上記電極と

を備えている、上記方法に関する。

【0067】

本発明の更なる目的は、装置であって、

a) 液体媒体を受ける為の空間と、

b) 電場生成器であって、

i . 第1の電源と、

10

20

30

40

50

i i . 上記液体媒体中の第 1 の刺激する電場を生成する為に、上記第 1 の電源に接続された電極の対と

を備えている、上記電場生成器と、

c) 検出ゾーンにおいて、上記電気的変数の上記液体媒体内の変数を測定する為の電気的変数の検出器であって、上記検出器は、上記第 1 の電源と共通の電位参照を有さない第 2 の電源に接続されている、上記検出器と

を備えている装置である。

【 0 0 6 8 】

本発明の更なる目的は、装置、特に上記方法を実行する為の装置、であって、

- 液体媒体を受ける為の空間であって、上記空間は好ましくは、複数のマクロイオン、好ましくは多価電解質、を含む液体媒体を含む、上記空間と、

- 上記液体媒体中のマクロイオン分散物からマクロイオン塊の形成を誘発する為に、刺激する電場を生成する為の少なくとも 2 つの電極であって、上記電極の対は電源に接続されている、上記少なくとも 2 つの電極と、

- 光学検出器、好ましくはイメージング検出器、カメラ、又は統合的光学検出器、とを備えている、上記装置である。

【 0 0 6 9 】

好ましくは、上記装置はさらに、時間依存若しくは空間依存解析、好ましくはウェーブレット解析、を、又は、上記電気的変数の変動について、若しくは画像検出器から発行された画像について、若しくは統合的光学検出器の出力について自己相関を実行する為のデジタル・プロセッサを備えている。

【 0 0 7 0 】

本発明の更なる目的は、空間内に含まれる液体媒体中の荷電された種を検出する方法であって、

上記で定義された装置を使用して、上記検出ゾーンにおいて、上記電気的変数の変動、又は、統合的光学検出器の上記出力の変動、又は、イメージング検出器から発行された画像の強度の空間的ゆらぎを測定すること、

時間依存若しくは空間依存解析により、好ましくはウェーブレット解析により、又は、上記変動の自己相関解析により、これらの変動に基づいて、上記荷電種の存在、及び好ましくは、上記液体媒体中の上記荷電種濃度を決定すること

含む、上記方法である。

【 0 0 7 1 】

本発明の更なる目的は、空間内に含まれる液体媒体中の種を分離する為の方法であって、

a) 刺激する電場を施与することによって上記種を分離すること、

b) 本発明の装置を使用して、上記検出ゾーンにおいて、インピーダンス又は伝導度の変動を測定すること

を含む、上記方法である。

【 0 0 7 2 】

本発明の更なる目的は、上記に定義される方法を実行する観点において R C A 及び / 又は H R C A 増幅において使用される為に構成される緩衝液であり、上記液が、37 又はそれ未満、好ましくは 30 又はそれ未満、の温度で活性なポリメラーゼを含み、及び、上記液が、1000mS/m 以下、好ましくは 500mS/m 以下、より好ましくは 350mS/m 以下、特に 300mS/m 以下、特に 275mS/m 以下の伝導度を有する。

【 0 0 7 3 】

有利な実施態様において、本発明に従うマクロイオンを検出する上記方法において使用され、塊にされるべきマクロイオンを含む上記液体媒体は、本発明に従う緩衝液を含む。

【 0 0 7 4 】

高伝導度を有する緩衝液の使用は、電気分解現象がこの場合において上記刺激する電極近くで生じうる故に、本発明に従うマクロイオンを検出する方法を実行することを複雑に

10

20

30

40

50

しうる。

【0075】

そのため、本発明に従い低伝導度緩衝液を使用することは有利に、電気分解現象を制限することを許し、従ってマクロイオンの検出を簡単にする。

【0076】

有利な実施態様において、上記緩衝液は、本発明に従う検出の上記方法の段階 a) の間に塊にされるべき核酸を得ることを許す予備増幅方法、好ましくは R C A 又は H R C A 増幅方法、の間に緩衝液として使用される。

【0077】

他の有利な実施態様において、上記緩衝液は、上記予備増幅方法において及び本発明に従う検出の方法において使用される塊にされるべき核酸を含む液体媒体においての両方において緩衝液として使用される。

10

【0078】

本発明に従う上記緩衝液は有利に、本発明に従う上記方法を簡単にする。事実、本発明に従う上記緩衝液を使用する場合に、上記予備増幅方法と上記マクロイオンの上記検出との間の脱イオン化段階が、上記電気分解現象を制限する為に必要でない。

【0079】

好ましくは、上記緩衝液はさらに、リガーゼを含む。

【0080】

例えば予備的な R C A 又は H R C A 増幅方法におけるそのような緩衝液の使用は有利に、ライゲーション及び増幅段階を同時に実行することを許す。

20

【0081】

上記ポリメラーゼは、D N A 又は R N A ポリメラーゼでありうる。

【0082】

本発明の特定の実施態様において、上記ポリメラーゼは、下記リストの中から選択される：AmpliTAQ、Phi29、"Pol"の種々のタイプ、特に、Pol I、Pol II、Pol III、Pol IV、Pol V、Pol B、Pol アルファ、Pol デルタ、Pol エプシロン、Pol カップ、Pol イオタ、Pol ベータ、Pol シグマ、Pol ラムダ、Pol ミュー、種々のバクテリオファージのポリメラーゼ、例えばバクテリオファージT4のポリメラーゼ、バクテリオファージT7のポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、及び、突然変異生成により得られるその種々の変異体（例えば、https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_polymeraseを参照：その内容は参照によって本明細書中に取り込まれる）、並びに、それらの混合物。

30

【0083】

特定の実施態様において、上記ポリメラーゼは、80 よりも高い、好ましくは60 よりも高い、温度で活性でない。

【0084】

本発明の特定の実施態様において、上記リガーゼは、下記リストの中から選択される：T4 DNA リガーゼ（例えば、Epicentre(Illumina company), New England Biolab(NEB), Promega, Life Technologies, ThermoScientificによって提供される）、Ampligase（例えば、Epicentre(Illumina company)によって提供される）、CircLigase ssDNA Ligase（例えば、Epicentre(Illumina company)によって提供される）、CircLigaseII ssDNA Ligase（例えば、Epicentre(Illumina company)によって提供される）、E. Coli DNA Ligase（例えば、Epicentre(Illumina company)によって提供される）、Taq DNA Ligase（例えば、New England Biolab(NEB), Life Technologiesによって提供される）、T3 DNA Ligase（例えば、New England Biolab(NEB)によって提供される）、T7 DNA Ligase（例えば、New England Biolab(NEB)によって提供される）、9°NTM DNA Ligase（例えば、New England Biolab(NEB)によって提供される）、並びに、それらの混合物。

40

【0085】

50

本発明の更なる目的は、空間内に含まれる液体媒体中の荷電された種を検出する方法であって、

a) 上記液体媒体を刺激する電場に掛けて、マクロイオンの塊の形成及び上記液体媒体中の上記マクロイオン塊の移動を誘発する段階であって、マクロイオンの上記形成された塊は好ましくは、何らの追加のラベリング剤を含まない、上記誘発する段階と、

b) 上記空間の検出ゾーンにおいて、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の上記液体媒体内の空間的な及び/又は時間的なゆらぎを測定する段階と、

c) これらゆらぎに基づいて、上記マクロイオンの存在を決定する段階であって、段階c)は好ましくは、段階b)で測定された上記ゆらぎを、時間依存若しくは空間依存解析により、より好ましくはウェーブレット解析により、又は、自己相関により、処理することを含む、上記決定する段階と

を含む、上記方法である。

【0086】

好ましくは、上記変数が電気的であり、当該電気的変数の上記ゆらぎが、上記液体媒体と直接電気接触する少なくとも2つの電極により段階b)で測定され、及び、当該塊は、段階b)の全て又は一部の間上記電極に相対的に移動することを引き起こされる。

【0087】

本発明の更なる目的は、空間内に含まれる液体媒体中の核酸を検出する方法であって、

a) 上記液体媒体を刺激する電場に掛けて、核酸の塊の形成を誘発する段階であって、上記核酸は、50キロ塩基以上、又は50キロ塩基対以上、を有する核酸鎖を含み、核酸の上記形成された塊は好ましくは、何らの追加のラベリング剤を含まない、上記誘発する段階と、

b) 上記空間の検出ゾーンにおいて、上記液体媒体中の上記核酸の上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の上記液体媒体内の空間的な及び/又は時間的なゆらぎを測定する段階と、

c) これらゆらぎに基づいて、上記核酸の存在を決定する段階であって、段階c)は好ましくは、段階b)で測定された上記ゆらぎを、時間依存若しくは空間依存解析により、より好ましくはウェーブレット解析により、又は、自己相関により、処理することを含む、上記決定する段階と

を含む、上記方法である。

【0088】

本発明は、下記発明の詳細な説明、及びその実行の為の非制限的な実施例を読むことから、及び添付の図面を吟味することから十分に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1A】図1Aは、上記電場を作成する為に且つ荷電種を検出する為に使用される電圧の構成を示す。

【図1B】図1Bは、関連付けられた検出ゾーンでの接触モード(ECMC)における伝導度測定の為の3対の電極を示す。

【図1C】図1Cは、本発明に従う装置の概略図を示す。

【図2】図2は、本発明に従う装置において使用される検出電子機器の例を示す。

【図2A】図2Aは、本発明において実装される検出電子機器において使用される前置増幅器に対応する上記回路を示す。

【図2B】図2Bは、図2の上記回路において使用されるロー・パス・フィルターに対応する上記回路を示す。

【図2C】図2Cは、上記増幅器のオフセット電圧を最小にする為に使用される回路を示す。

【図2D】図2Dは、増幅回路を示す。

【図2E】図2Eは、電圧制御された電流源に対応する回路を示す。

10

20

30

40

50

【図3】図3は、高圧電源（HVPS）の為に設計された平衡回路の略図を示す。

【図4】図4は、本発明に従う方法を実行した後に得られた伝導度測定信号を示す。

【図5】A)は、双直交のウェーブレット・ファミリーからのbior2.2ウェーブレットを示す。正確な再構成（情報の損失無し）を達成する為に、このウェーブレット・ファミリーは2つのウェーブレットを使用（1つは分解の為、及び1つは上記信号の上記再構成を）；B)概略再スケール。

【図6】A)は、bior2.2分解ウェーブレットを使用して0 j 1 1に対する図4の陽性対照及び陰性対照信号の離散ウェーブレット変換スペクトラム（ $d_s(j, k)$ 係数）を示す。B)は、検出されたDNA塊の対応する重み及び重量差（デルタ重み（ $\delta weight$ ））を示す。

【図7】図7は、0.002よりも大きい振幅についてのカットオフ無し（A）及び有り（B）でのスケール時間 2^{-3} （4番目のモード・レベル）に基づく上記再構成された信号（陽性及び陰性の対照）を示す。

【図8】10kbp DNAの量を増加させる為に、PCR混合物から抽出され、TE（1倍）緩衝液中に懸濁され、そしてSyber Goldでラベル付され、比較が、A)蛍光画像と、B)検出ゾーンにおいて測定された蛍光強度とその時間平均値との比の時間導関数と、C)ウェーブレット解析手順（SE）により抽出されたDNA塊に基づく伝導度信号（SE）との間で示される。（0.002でのカット・オフを有する4番目のモード・レベル（ $j=3$ ）から再構成された）。

【図9A】図9Aは、A)様々な増幅サイクル（10, 20, 26, 32, 38, 41）でのターゲットDNAの様々な量（10fg, 100fg, 1pg, 100pg, 2.5ng）についてのウェーブレット解析手順（QDna）を使用するDNAのラベル剤無しでの数量化。パネル中の各点についての標準偏差が3回、3つの異なるアリコート（aliquots）から計算された。

【図9B】図9Bは、ラベル無し検出の為に使用されるサンプルに対して対照として実行されたゲルの対応する濃度解析を示す。

【図9C】C)ゲルの完全な画像及び濃度測定と考えられる領域を示す。

【図10A】図10Aは、分岐ローリング・サークル増幅（RCA）の原理を示す。

【図10B】図10Bは、分岐ローリング・サークル増幅の為にパドロック・プローブ（padlock probes）及びライゲーション・テンプレートを示す。

【図10C】図10Cは、巨大な且つ分岐したDNA生成物の生成を示す。

【図11A】図11Aは、電気泳動分離の結果を示す。

【図11B】図11Bは、電気泳動分離の結果を示す。

【図12】図12は、動電モードの関数として印加電圧を示す。

【図13】図13は、異なる濃度（A 1mM B 50 μ M）でのRuBipyの動電学的な分離を示す。異なる検出方法が使用された：蛍光（赤）及び伝導度測定（黒）

【図14】図14は、緩衝液の注入と比較した20 μ Mでの K^+ の動電学的な分離を示す。

【図15A】図15Aは、上記検出モジュールから得られた原信号（raw signal）とウェーブレット解析により処理された後に得られた対応する信号との比較を示す。

【図15B】図15Bは、蛍光信号と伝導度測定信号との間の相関を示す。

【図16A】図16Aは、異なるインキュベーション時間（それぞれ、15分及び30分）についてHRCA増幅方法を実行した後に得られる塊の蛍光顕微鏡画像を示す。

【図16B】図16Bは、異なるインキュベーション時間（それぞれ、15分及び30分）についてHRCA増幅方法を実行した後に得られる塊の蛍光顕微鏡画像を示す。

【図17】図17は、異なる増幅持続時間についてウェーブレット解析後のパラメータQDnaの展開を示す。

【図18】図18は、検出が複数の検出ゾーンにおいて実行される本発明に従う方法の他の実施態様素を示す。

【図19】図19は、検出が複数の検出ゾーンにおいて実行される本発明に従う方法の他の実施態様素を示す。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

マクロイオン

【 0 0 9 1 】

1 又複数のタイプのマクロイオンが、上記液体媒体中に存在しうる。マクロイオンは、典型的に、多様な荷電、好ましくはオブジェクト当たり 10 よりも多い荷電、を生じるオブジェクトである。

【 0 0 9 2 】

マクロイオンは、追加のラベリング剤を含み又は除かれうる。好ましくは、上記マクロイオンは、何らの追加のラベル剤を含まない。

【 0 0 9 3 】

従って、上記マクロイオンは、内在的であることができる又は追加のラベリング剤によって与えられることができる特性を有しうる。

【 0 0 9 4 】

追加のラベリング剤は次のリストの間で選ばれうる：SYBR グリーン 1、SYTO-9、SYTO-13、SYTO-16、SYTO-60、SYTO-62、SYTO-64、SYTO-82、POPO-3、TOTO-3、BOBO-3、PO-PRO-3、TO-PRO-3、YO-PRO-1、SYTOX オレンジ (Life Technologiesによって提供される)、QuantiFluor dsDNA システム (Promegaによって提供される)、Quant-iT PicoGreen (Life Technologiesによって提供される)、AccueBlue (Biotiumによって提供される)、DAPI (Life Technologiesによって提供される)、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580 (Life Technologiesによって提供される)、及び、それらの混合物。

【 0 0 9 5 】

段階 a) の全体又は一部の間、上記液体媒体中の上記追加のラベリング剤の濃度は、 $0.01 \mu\text{mol/l} \sim 200 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは $0.1 \mu\text{mol/l} \sim 10 \mu\text{mol/l}$ (例えば、G.T. Irons et al, Cytometry, 15:129 (1994)を参照)、又は $1000 \mu\text{g/ml} \sim 0.01 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $100 \mu\text{g/ml} \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ (例えば、Biorad instructions: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006020b.pdf>を参照、その内容は参照により本明細書中に取り込まれる)で含まれうる。

【 0 0 9 6 】

マクロイオンの上記濃度に関連する全ての光学的量、例えば光学吸収、蛍光、発光、二色性、複屈折、旋光能、又は光散乱、及び好ましくは、刺激する電場により誘発された上記特性のゆらぎ、が本発明において使用され、但し、上記特性の空間的ゆらぎが、幾つかの検出手段、好ましくは光学的手段、によって記録されることができる。

【 0 0 9 7 】

マクロイオンの上記濃度に関する全ての電気又は誘電又は電磁の特性が例えば、例えば、荷電、 pI 、伝導度、電気泳動移動度、分極率、磁気モーメント、及び好ましくは、刺激する電場により誘発された上記特性のゆらぎ、が本発明において使用され、ここで、上記特性の空間的ゆらぎが、幾つかの検出手段、好ましくは光学的手段、によって記録されることができる。

【 0 0 9 8 】

上記マクロイオンは、多価電解質、荷電されたコロイド、又はナノ粒子でありうる。

【 0 0 9 9 】

「コロイド」によって、分離された場合(すなわち、塊状でない)に、 $50\text{nm} \sim 100 \mu\text{m}$ 、好ましくは $50\text{nm} \sim 10 \mu\text{m}$ で構成される平均サイズを有するオブジェクトが意味される。ナノ粒子は典型的に、 $2\text{nm} \sim 100\text{nm}$ の範囲の粒子である。

【 0 1 0 0 】

「平均サイズ」によって、 D_{50} として知られている、集団の半分での統計的粒度分析の次元が意味される。

【 0 1 0 1 】

本明細書において使用される場合に、語「コロイド状オブジェクト」は、細胞、オルガネラ、ウイルス、細胞塊、細胞島、胚、花粉粒、人工又は天然の有機粒子、例えばラテッ

10

20

30

40

50

クス粒子、 dendriマー、小胞、磁気粒子、ナノ粒子、量子ドット、金属マイクロ粒子、金属ナノ粒子、有機金属マイクロ又はナノ粒子、ナノチューブ、人工又は天然の巨大分子、マイクロゲル、高分子塊、タンパク質又はタンパク質塊、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド塊、核タンパク質塊、多糖類、若しくは超分子集合、又は、上記化合物の組み合わせを含む、多種多様の、天然の若しくは人工の、有機又は無機の化合物を表しうる。語「粒子」は、「コロイド状オブジェクト」と同じ意味で、本発明の詳細な説明において使用される。

【0102】

本明細書で使用される場合に、語「コロイド流体」又は「コロイド懸濁液」は、コロイド状オブジェクトを含む流体をいう。

10

【0103】

多価電解質及び核酸

【0104】

多価電解質は、荷電された巨大分子である。ある場合には、上記多価電解質における荷電は、弱い酸性又は塩基性特徴を有し、及び、従って、pHの幾つかの条件において非荷電であることができる。それにもかかわらず、それらが幾つかの溶媒及びpHにおいて又は緩衝液条件で荷電を生じることができる限り、それらは本発明において多価電解質として見なされる。

【0105】

本発明は特に、核酸を解析する為に有利である。上記核酸は、一本鎖又は二本鎖DNA、RNA、メッセンジャーRNA、マイクロRNA、干渉RNA、天然若しくは人工のオリゴヌクレオチドであることができ、及びまた、全ての種類の天然若しくは人工の核酸、例えば非制限的に、リン酸化された又はメチル化されたDNA若しくはRNA、LNA、PNA、蛍光的にラベル付されたDNA、又はオリゴヌクレオチドを包含することができる。

20

【0106】

他の好ましい実施態様において、本発明における多価電解質は、タンパク質、ポリペプチド、多糖類、オリゴ糖、糖タンパク質、リン脂質、脂質、及び、例えば非制限的に、リン酸化、メチル化、グリコシル化によるそれらの修飾物でありうる。

【0107】

段階 a) で上記液体媒体中に存在する多価電解質は、核酸増幅の後に又はその間に得られうる。上記増幅は好ましくは、リアルタイム定量増幅 (a real-time quantitative amplification) であり、又は、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応増幅、核酸等温増幅 (an isothermal nucleic acid amplification)、ローリング・サークル増幅 (a rolling circle amplification)、分岐ローリング・サークル増幅 (a branched rolling circle amplification)、サークル-サークル増幅 (a circle to circle amplification)、ループ媒介性増幅 (a LAMP: loop-mediated amplification)、核酸配列ベース増幅 (NASBA: nucleic acid sequence-based amplification)、転写媒介性増幅 (TMA: Transcription-mediated amplification)、RNA技術のシグナル媒介性増幅 (SMART: Signal-mediated amplification of RNA technology)、ヘリカーゼ依存増幅 (HDA: Helicase-dependent amplification)、リコンビナーゼ・ポリメラーゼ増幅 (RPA: recombinase polymerase amplification)、クロスプライミング増幅 (CPA: Cross-priming amplification)、スマート増幅 (SMART-AMP: Smart amplification)、ローリング・サークル増幅 (RCA: Rolling-Circle Amplification)、超分岐ローリング・サークル増幅 (HRCA: Hyperbranched Rolling-Circle Amplification)、ラミフィケーション増幅 (RAM: ramification amplification)、鎖置換増幅 (SDA: strand displacement amplification)、ニッキング酵素増幅反応 (NEAR: Nicking enzyme amplification reaction)、ニッキング酵素媒介性増幅 (NEMA: Nicking enzyme-mediated amplification)、等温鎖増幅 (ICA: Isothermal chain amplification)、指数関数的増幅反応 (EXPAR: Exponential amplification reaction)、ビーコンで支援された検出増幅 (BAD AMP: Beacon-assisted detection amplification)、若しくはPhi29 DNAポリメラーゼを使

30

40

50

用する核酸増幅方法のうちの少なくとも一つを含む。

【0108】

H R C A 増幅方法が選択的に且つ迅速に D N A を増幅する故に、この方法を実行することが有利である。

【0109】

増幅

【0110】

本発明は特に、核酸の増幅をモニターすることについて関心があり、従って、核酸を増幅する為の方法、特に、非制限的なリストとして、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応増幅、核酸等温増幅、ローリング・サークル増幅、分岐ローリング・サークル増幅、サークル・サークル増幅、a LAMP NASBATMA、SMART、HAD、RPA、CPA、SMART-AMP、RCA、HRCA、RAM、SDA、NEAR、NEMA、ICA、EXPAR、BAD AMP、若しくはPG-RCA増幅、又は、長い核酸フラグメントを導きPhi29 D N A ポリメラーゼ方法を使用する核酸増幅方法、例えばロング・レンジPCR、RCA、分岐RCA、HRCA、C2CA、LAMP、RAM、Smart-AMP、CPA、Smart-AMP、と組み合わせることが特に、本発明の為に適している。

10

【0111】

特定の実施態様において、上記核酸は、核酸増幅の段階の間、緩衝液を含む媒体中に存在し、及び、段階 a) で使用される上記液体媒体はまた、同じ上記緩衝液を含む。

【0112】

特定の実施態様において、上記緩衝液は、1000mS/m以下、好ましくは500mS/m以下、より好ましくは350mS/m以下、特に300mS/m以下、特に275mS/m以下の伝導度を有する。

20

【0113】

特定の実施態様において、上記緩衝液は、37 又はそれ未満、好ましくは30 又はそれ未満、の温度で活性なポリメラーゼを含む。

【0114】

上記緩衝液はさらに、リガーゼ及び/又はD N A ポリメラーゼを含みうる。

【0115】

変形として、上記核酸は、上記核酸増幅の上記段階の間、第1の緩衝液を含む媒体中に存在し、及び、段階 a) で使用される上記液体媒体は、上記第1の緩衝液と異なる第2の緩衝液を含む。

30

【0116】

上記第2の緩衝液は好ましくは、上記第1の緩衝液よりもより低い伝導度である。上記第2の緩衝液は好ましくは、1000mS/m以下、好ましくは500mS/m以下、より好ましくは350mS/m以下、特に300mS/m以下、特に275mS/m以下の伝導度を有する。

【0117】

上記第2の緩衝液は、第1の緩衝液の脱イオン化の後に得られうる。

【0118】

流体システム

【0119】

本発明は好ましくは、マイクロ流体システム、ミリ流体システム、若しくはナノ流体システム、又は等価的に、マイクロ流体装置に適用される。なぜならば、これらシステムは、サンプル及び試薬消費及びジュール加熱を減らすことを許しうるからである。

40

【0120】

本明細書において使用される場合に、「マイクロ流体装置」は、500マイクロン(マイクロメータ)未満の少なくとも一つのそれらの寸法を有するマイクロチャンネルを含む実施態様をいう。同じ「ミリ流体装置」は、少なくとも一つのミリチャンネル、すなわち、5mm未満の少なくとも一つの寸法を有するチャンネル、を含む本質的に厳正な実施態様をいう。同じ「ナノ流体装置」は、1µm未満の少なくとも一つの寸法を有する少なくとも一つのチャンネルを含む本質的に厳正な実施態様をいう。しかしながら、今までのところ、マイクロ流体装置がミリ流体装置又はナノ流体装置よりもより広く使用されており、従っ

50

て、簡潔さの為に、他に特に言及されない場合には、我々は、「マイクロ流体」という一般的な形容詞の下で、下記語、マイクロ流体、ミリ流体、又はナノ流体装置を包含するだろう。

【0121】

本明細書において使用される場合に、我々はまた、マイクロ流体装置、ミリ流体装置、又はナノ流体装置それぞれを含む、装置及び接続要素の集合体を、「マイクロ流体システム」（簡潔さの為に、また、「ミリ流体システム又はナノ流体システム」を包含する）として定義する。典型的に、マイクロ流体（ミリ流体又はナノ流体）システムは、少なくともマイクロ流体（ミリ流体又はナノ流体）装置を備えており、及び、それはまた、サンプル又は試薬を含む容器（reservoirs）、上記容器から上記マイクロ流体（ミリ流体又はナノ流体）装置に流体を能動的に移す為の1つ又は幾つかのポンプ装置、及び流体接続要素を備えうる。任意的に、そのような流体システムはまた、1つ又は幾つかの検出器を備えうる。上記検出器は、上記流体装置内に統合され、又は独立でありうる。

10

【0122】

任意的に、本発明のマイクロ流体システムはまた、バルブ、ホルダー、観察手段、及び、任意の種類のもの異なる成分及び装置を互いにまとめる為の接続具を備えうる。

【0123】

任意的に、本発明のマイクロ流体システムはまた、その成分の上記温度及び機能を制御し、その操作を自動化し、データを記録するなど（非制限的例）の為に、任意の種類のコピュータ、電子、電気若しくは空気圧制御器を備えうる。

20

【0124】

空間

【0125】

上記空間は好ましくは、チャンバにより、好ましくはウェルにより、例えばマイクロタイター・プレートからのウェルにより、又は、チャンネルにより、より好ましくはマイクロチャンネルにより定義される。

【0126】

上記空間は、種々のサイズ、性質、及び形状でありうる。

【0127】

上記空間は好ましくは、1mm以下、好ましくは1 μ m~100 μ m、特に好ましくは5 μ m~50 μ mの少なくとも一つのその寸法を有する。

30

【0128】

本発明は有利には、チャンバ、好ましくはマイクロチャンバ、のアレイにおいて、又はウェルのアレイ、好ましくはマイクロウェル、例えばマイクロタイタープレート、好ましくは、96ウェル若しくは364ウェルのマイクロタイタープレート、及びより好ましくは、プレート当たり1000ウェルよりも多いマイクロタイタープレートのウェル、において、部分的に又は逐次的に実行される。

【0129】

上記空間を定義するチャンバ、好ましくはウェル、の、又はチャンネル、好ましくはマイクロチャンネル、の少なくとも一つの壁が好ましくは、非導体物質を含み、特にそれから構成される。

40

【0130】

上記空間を定義するチャンバ、好ましくはウェル、の、又はチャンネル、好ましくはマイクロチャンネル、の少なくとも一つの壁が好ましくは、透明物質を含み、特にそれから構成される。すなわち、上記ウェルは、透明検出ウィンドウを備えうる。

【0131】

そのような透明物質の使用は、光学的変数のゆらぎ又は変動が測定される場合に、特に好ましい。

【0132】

好ましくは、上記空間は、上記検出ゾーンで拡張を示し、当該空間は好ましくはチャン

50

バ又はチャンネルによって定義される。上記検出ゾーンで示される拡張は有利には、当該検出ゾーンにおける上記電極の配置を容易にする。

【0133】

上記検出ゾーンで示される拡張は有利には、塊形成に有意に影響を与えること無しに、駆動場強度を局所的に減らすことによって上記電極と高電圧電源との間の非干渉化を容易にする。

【0134】

特定の実施態様において、上記空間は複数の検出ゾーンを備えており、当該検出ゾーンのそれぞれが、上記液体媒体中の上記マクロイオンの濃度に依存する少なくとも1の変数の検出器を備えている。

10

【0135】

特定の実施態様において、上記液体媒体は、検出されるべきマクロイオン、特に核酸、の種々のタイプを含み、及び、上記マクロイオンと相互作用するように構成された複数の化合物は、上記検出ゾーンのそれぞれに存在し、一つの検出ゾーンに存在する化合物は、他の検出ゾーンに存在する化合物と異なる。

【0136】

特定の実施態様において、検出されるべき上記マクロイオンが核酸であり、及び、上記化合物は、上記核酸の種々のヌクレオチド配列と相互作用するように、特にそれにハイブリダイズするように、構成されている。

【0137】

特定の実施態様において、上記空間が縦軸に沿って延在し、及び、上記検出ゾーンが上記縦軸に沿って互いに続く。

20

【0138】

特定の実施態様において、上記空間は、それぞれが検出ゾーンを含む複数のサブチャンネルを備えている。

【0139】

特定の実施態様において、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の上記液体媒体内の空間的及び/又は時間的ゆらぎが、上記検出ゾーンのそれぞれの間で同時に測定される。

【0140】

特定の実施態様において、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の上記液体媒体内の空間的及び/又は時間的ゆらぎが、上記検出ゾーンのそれぞれの間で逐次的に測定される。

30

【0141】

特定の実施態様において、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する少なくとも一つの変数の上記液体媒体内の空間的及び/又は時間的ゆらぎが、上記検出ゾーンのそれぞれの間で測定され、及び、段階c)が、上記複数の検出ゾーンから測定された上記空間的及び/又は時間的ゆらぎを処理することを含む。

【0142】

複数の検出ゾーンの使用は有利に、それが例えば上記異なる検出ゾーンから得られた上記ゆらぎ信号を例えば相互に関連付けることを許す故に、種々のマクロイオン、例えばバイオマーカー、を同時に検出すること、及び/又は、検出の品質を同時に改善することを許す。

40

【0143】

特定の実施態様において、異なる検出ゾーンから得られた上記ゆらぎ信号の平均は、段階c)の間、作られることができる。

【0144】

特定の実施態様において、本発明に従う上記装置は、複数の検出ゾーンを含む空間を備えており、上記検出ゾーンのそれぞれは、上記液体媒体中の上記マクロイオンの上記濃度に依存する電気的変数の及び/又は光学的変数の検出器を備えている。

50

【0145】

特定の実施態様において、本発明に従う上記装置は、縦軸に沿って延在された空間を含み、及び、上記検出ゾーンは、上記縦軸にそって互いに続く。

【0146】

特定の実施態様において、本発明に従う上記装置は、それぞれが検出ゾーンを含む複数のサブチャンネルを備えている空間を備えている。

【0147】

液体媒体

【0148】

上記液体媒体は、生物学的液体、例えば血液若しくは血漿、又は血清、尿、胸水、脳脊髄液、又は有機体から抽出される何らかのサンプルでありうる。それはまた、細胞の、培養の生きている有機体からの懸濁液又は再懸濁液であることができる。任意的に、上記液体媒体は、任意の種類の前処置された、例えば非制限的例として、精製、抽出、遠心分離、ろ過、培養、インキュベーション、温度処置など、に掛けられていてもよい。好ましい実施態様において、上記液体は、核酸増幅からの混合物を含む。好ましい実施態様において、それは、1又は幾つかのプライマー、ポリメラーゼ、リガーゼ、酵素などを含みうる。

10

【0149】

他の好ましい実施態様において、上記液体媒体は、人工又は天然のポリマーの懸濁である。他の好ましい実施態様において、それは、有機、無機、若しくは組み合わされた有機-無機のコロイド、又はナノ粒子の懸濁液である。

20

【0150】

変形として、上記液体媒体は、水（脱イオン化された又はそうでない）であり、及び、pH緩衝液を含みうる。

【0151】

上記液体媒体は、可視光に対して透過的でありうる。

【0152】

上記液体媒体は、本発明に従う上記方法の全体又は一部の間に、流れないかもしれない。

【0153】

実施態様に従うと、上記液体媒体は、本発明に従う上記方法の全体又は一部の間に流れしており、上記液体媒体の上記流れのレイノルズ数は、好ましくは10未満である。

30

【0154】

好ましくは、上記液体媒体は、何らの追加のラベリング剤を含まない。

【0155】

塊

【0156】

マクロイオンにおける均一な濃度 c を有する溶液から形成されたマクロイオン塊は典型的に、 c よりも大きいマクロイオンにおける濃度を有し、及び、マクロイオンからのそれらの環境を使い果たし、従ってそのような環境は上記塊の存在において c よりも小さいマクロイオンにおける濃度を有する。

40

【0157】

それ故に、塊形成は、上記刺激する電場の非存在における上記空間的なゆらぎよりも有意に大きいマクロイオンにおける濃度の空間的ゆらぎを生成する。

【0158】

上記液体媒体中の上記マクロイオンの総濃度は好ましくは、塊形成によって変更されない。

【0159】

塊形成は好ましくは、上記液体媒体における上記マクロイオン濃度のランダムな空間的ゆらぎを生成する。

50

【0160】

上記塊は好ましくは、上記検出電極に相対的に特定の配置を有しない。特に、当該塊は、段階b)及び/又はc)の間に上記電極に近接に閉じ込められない。

【0161】

本発明者らは、驚くべきことに、及び、例えば、Magnusdottir et al. Biopolymers, Vol. 49, 385-401 (1999) (その中には、この注目に値する現象の発生への依存を使用することによって、これらゆらぎがDNA解析を阻む)において記載された先行技術と対照的に、適切な特性を有する刺激する電場をDNA溶液上に施与し、そのような塊を産出し、次に、これら塊の形成を記録することによって、それは、DNAを検出すること、及び特に、ラベル無しにDNA増幅をモニターすることが事実可能であった。

10

【0162】

統合的な検出方法による塊の測定

【0163】

マクロイオンを検出する為に知られている伝導度方法と対照的に、本発明の上記方法は、上記媒体の平均伝導度を測定しえないかもしれないが、変数、好ましくは電気的又は光学的変数、の上記ゆらぎにより反映された塊のレベルを使用しうる。上記ゆらぎは、上記刺激する電場を施与する前のマクロイオンの濃度に依存し、且つ上記刺激する電場の特徴に依存する。

【0164】

例えば図8において見られる本発明において使用される塊の観察は、空間、例えばチャンバ又はマイクロチャンネル、において含まれる場合に、それらが空間壁に出くわすまで、それらは一般的には、上記刺激する場の方向に関して横断又は傾いた方向において延在された形状をとり、従って、大体一定のサイズを維持する。

20

【0165】

また、一般に、塊の多様性の存在及びそれらのランダムな性質のために、上記信号を最大化する為に、上記塊の典型的なサイズの次数の大きさを有する容量又は領域要素における上記変数の測定の多様性を作ることによって、上記刺激する電場の活動下での変数、特に電気的又は光学的変数、の上記ゆらぎを記録することが関心のあることでありうる。このように、上記信号の上記振幅は、幾つかの場合において、塊の全体を含み、又は代替的には塊を全く含みえない。

30

【0166】

それ故に、好ましい実施態様において、信号測定の認識がその中で行われる領域Aのサイズ又は容量Vが、上記場に垂直の方向にある、刺激する場がその中に施与される空間の最小次元のそれと同じ次数である。好ましい実施態様において、それは、0.1~10倍の上記最小次元、好ましくは0.1~1倍の上記最小次元、で構成される。

【0167】

例えば、上記変数が電気的変数である幾つかの好ましい実施態様において、上記変数を記録する複数の電極間の上記空間は好ましくは、上記場に垂直の方向にある、上記刺激場がその中で施与される空間の0.02~20倍の上記最小次元、好ましくは0.1~10倍の上記最小空間、好ましくは0.3~3倍の上記空間、好ましくは0.3~1倍の上記空間、で構成される。

40

【0168】

上記変数が光学的変数であり且つこの光学的変数が統合的光学検出器により記録される幾つかの好ましい実施態様において、上記検出器の観察領域のサイズは好ましくは、上記場に垂直の方向にある、上記刺激場がその中で施与される空間の0.02~20倍の上記最小次元、好ましくは0.1~10倍の上記最小空間、好ましくは0.3~3倍の上記空間、好ましくは0.3~1倍の上記空間、で構成される。

【0169】

積分又は統合的光学検出器は、領域又は空間の容量から提供される光を積分し且つ上記積分された光強度を反映する信号(一般的に、電気信号)を運ぶ光学検出器である。典型

50

的な統合的光学検出器は、フォトダイオード、光電子増倍管、アバランシェ（avalanche）・フォトダイオードである。

【0170】

イメージング装置による塊の測定

【0171】

幾つかの好ましい実施態様において、マクロイオンの濃度の空間的ゆらぎは、直接的に記録され、及び、信号を抽出する為に、例えば多くの塊を包含する瞬間的な画像を撮るイメージング装置を使う為に、及び空間的画像解析を実行する為に用いられることができる。

【0172】

上記励起電場に掛けられた、上記空間の領域の画像が、作成され且つ記録される。次に、上記領域において光強度の又は明色のゆらぎを抽出することを目的とする解析が適用される。任意的に、参照として、上記刺激する場の適用の間、上記解析の上記結果が、上記刺激する電場の適用前の上記解析の結果と、又は検出する上記種の非存在において得られる参照値と比較されることが出来る。

【0173】

我々は、観察された領域の空間的解像画像を提供する装置であるイメージング装置又はイメージング光検出器を定義する。典型的なイメージング光検出器は、慣用的なチューブ・カメラ、銀塩カメラ、CCDカメラ、CMOSカメラ、フォトダイオード・アレイなどである。特定の実施態様において、図8及び実施例6に例示されるように、上記イメージング装置は、CCDカメラである。

【0174】

イメージング装置を備えているそのような実施態様において、上記画像は、上記刺激する場の方向に延在された容量において記録され、及び、上記場に垂直な方法において上記場がその中で施与されるチャンバ又はチャンネルの寸法と比較可能な幅を有しうる。次に、複数の塊が同時に記録され、及び、画像解析アルゴリズムが、詳細には下記において説明されているような、上記塊の典型的なサイズに対応する上記画像から上記ゆらぎを抽出する為に使用される。好ましくは、上記画像解析アルゴリズムは、2次元ウェーブレット解析を含む。

【0175】

刺激する電場

【0176】

上記刺激する電場の特性

【0177】

上記刺激する電場の上記特性は、マクロイオン、特にDNAターゲット、の性質、濃度又はサイズに、及び、上記液体媒体の上記伝導度特性に従って変わりうる。

【0178】

本発明の上記方法の段階a)で施与される刺激する電場が好ましくは、

- 直流の電場又は、1000Hz以下、好ましくは100Hz以下の周波数の交流の電場であり、及び/又は、
- 50V/cm以上、好ましくは100V/cm以上、より好ましくは200V/cm以上の強度を有し、及び/又は、
- 異なる周波数を有する少なくとも第1及び第2の電場成分の重畳を含み、上記第2の電場成分は上記第1の電場成分の振幅よりも低い振幅を有し、及び、上記第2の電場成分は、直流であり又は、上記第1の電場成分の周波数よりも低い周波数を有する。

【0179】

上記刺激する電場の上記強度は、上記検出ゾーンで測定されるか、又は、空間又はマイクロチャンネルの2つの側上に電位を与え、そしてラプラスの方程式に従って上記場を計算することによって予め決定されうる。例えば、一定断面積を有する線状のマイクロチャンネルの場合には、当該場振幅は、上記与えられた電位を上記マイクロチャンネル長さで

10

20

30

40

50

割ったものにほぼ等しい。

【0180】

上記刺激する場において異なる周波数を有する少なくとも2つの電場成分の重畳の使用は有利的に、マクロイオン塊を形成すること、及び上記液体媒体中に上記マクロイオン塊を置換することを許す。典型的に、主成分と呼ばれる第1の成分は第1の振幅及び第1の周波数を有し、及び、バイアスと呼ばれる第2成分は、上記第1の振幅よりも小さい振幅を有し、且つ、第2の種は数は、上記第1の周波数よりも小さいか、又は、直流の場成分である。

【0181】

このように、上記場の第1の成分は上記塊を生成し、及び、上記第2成分は上記検出領域を横断してそれらを駆動する。すなわち、2つの電場成分の重畳の使用は有利に、塊の自発的移動のみが使用される場合よりもより高いゆらぎ割合を有する変数の時間的なゆらぎを上記検出ゾーンにおいて生成する。

10

【0182】

このより高いゆらぎ割合は上記ゆらぎの上記統計的解析を簡単にし、それをより正確にし、且つ、より早い検出を許す。なぜならば、上記塊の自発的運動は比較的遅くありうるからである。

【0183】

塊の形成が上記液体媒体中の上記マクロイオン濃度のランダムな空間的ゆらぎを生成する場合に、2つの電場のそのような重畳の使用が特に好ましい。

20

【0184】

より一般的には、上記塊は、流体力学的流れを介して、又はより一般的には、上記空間の2つに地点間の圧力相違のおかげで、移動されることができる。この場合は、1つの電場のみが上記塊を形成する為に使用されうる。これらの塊の上記移動は、圧力相違又は流れのおかげで保証される。

【0185】

上記電気的変数の上記ゆらぎは好ましくは、段階a)で施与される上記刺激する電場の最高周波数と異なる周波数を有する交流分極信号により分極された少なくとも2つの電極により段階b)で測定され、上記分極信号の上記周波数は好ましくは、上記周波数成分よりも大きく、より好ましくは少なくとも10倍、より好ましくは少なくとも100倍、より好ましくは少なくとも1000倍、それよりも大きい。

30

【0186】

上記刺激する電場を生成する電極

【0187】

実施態様の1つの好ましいファミリーにおいて、上記電場を生成する為の上記電極は、検出のために使用される上記電極と異なる。

【0188】

幾つかの実施態様において、上記刺激する場を生成する上記電極は、マクロイオンを含む溶液を含むチャンバ又はマイクロチャンネル中に、且つ、後者との直接接触にあり、他の実施態様において、それらは、チャンバ又はマイクロチャンネルと流体的接続にある個々のリザーバ中にある。好ましくは、それらは、複数の測定電極間の距離と比較してはるかに離れている。

40

【0189】

実施態様の他の好ましいファミリーにおいて、同じ電極が、上記電場を生成する為に且つ上記検出の為に使用されうる。

【0190】

そのような構成が相対的に簡単な装置を使用することを許す故に、当該構成は有利でありうる。

【0191】

事実、そのような構成において、単一の電源が必要とされうる。さらに、上記電極が十

50

分に近い場合には、マクロイオンの塊の形成を誘発することができる刺激する電場が、高圧電源を必要とすること無しに生成されうる。

【0192】

2よりも多い電極、例えば3、4又は何十もの電極、が使用されうる。

【0193】

上記刺激する電場の生成のための電極は、浮動接地を有する1つ又は複数のアンカプレー、好ましくは分離増幅器、を備えている基板に接続されうる。

【0194】

この構成は有利には、施与される上記刺激する電場と上記検出装置との間の干渉を減らすことを許しうる。

【0195】

刺激する電場を生成する為の電力

【0196】

刺激する電場を生成する為に使用される電力は、平衡回路を備えており、特に平衡回路からなりうる。言い換えれば、上記電力は好ましくは、対称の電源でありうる。

【0197】

平衡回路の使用は、干渉を減らすのを助ける。

【0198】

幾つかの実施態様において、上記電源は、少なくとも1の、好ましくは2の、高電圧増幅器を備えている。他の好ましい実施態様において、上記電源は、少なくとも1の、好ましくは2の、DC/DC電圧コンバータを備えている。

【0199】

上記電力は好ましくは、標準的なバッテリー、例えば標準9Vバッテリー、から作動される。

【0200】

検出器

【0201】

測定電極

【0202】

上記電極の構成

【0203】

上記電気的変数の上記ゆらぎが好ましくは、上記液体媒体と直接電気接触する少なくとも2つの電極により段階b)で測定される。

【0204】

他の実施態様において、上記電気的変数の上記ゆらぎは、誘電体層を通じて上記液体媒体と非直接電気接触する少なくとも2つの電極により段階b)で測定される。

【0205】

これらの構成は、施与される上記刺激する電場と上記検出装置との間の干渉を減らすことを許す。

【0206】

上記電気的変数の上記ゆらぎはまた、幾つかの実施態様において、上記電場の方向に対して平行な軸に沿って、異なる位置で配置された少なくとも2つの電極により段階b)で測定される。

【0207】

また、段階a)で施与される上記刺激する電場が、上記電気的変数の上記ゆらぎを段階b)で測定する電極と同じ電極により施与されるうる。

【0208】

このように、単一の電源が必要とされ、及び、上記電極の近接近の故に、塊を生成する為に十分高い刺激する電場が、高圧電源の必要なしに達成されることが出来る。しかしながら、この実施態様において、上記塊は、上記複数の電極間に局在され、統計的解析をよ

10

20

30

40

50

り困難にする。これを補償する為に、2よりも多い電極、例えば3、4又は何十もの電極、を含む複雑な電極構成が良い統計的解析を回収する為に有利でありうる。

【0209】

上記検出器が少なくとも2つの電極を備えている実施態様において、上記検出器電極は好ましくは、上記液体媒体中の1の場所で上記電気的変数の変動を測定するように構成されており、ここで、上記刺激する電場を誘発する上記電位の絶対値が最小であり、好ましくは実質的にゼロである。

【0210】

この構成は、施与される上記刺激する電場と上記検出装置との間の干渉を減らすことを許す。

【0211】

好ましくは、上記第1の電源は、対称の電源である。

【0212】

他の好ましい実施態様において、上記第1の電源が対称の電源でない場合に好ましくは、上記電気的変数の上記ゆらぎ又は変動を測定する為に使用される電極は、上記第1の電源によって生成される電位の絶対値が上記第1の電源の参照の電位に実質的に等しい、好ましくは等しい、上記液体媒体中の位置で配置されうる。

【0213】

好ましくは、上記第1の電源は、基底基準に接続される。好ましくは、上記基底基準はまた、上記電力の参照の電位である。後者は、アーク、不安定な電位、及びユーザの危険を低減しうる。

【0214】

上記電極のサイズ

【0215】

上記検出器電極は好ましくは、200 μm以下、好ましくは100 μmよりも小さい、幅を有し、相対的に小さい幅を有する電極は、施与される上記刺激する電場と上記検出装置との間の干渉を減らすことを許す。

【0216】

上記検出器電極の寸法及び/又はそれらの間隔は好ましくは、上記刺激する電場の方向に対して垂直な方向において測定される検出ゾーンの寸法の0.1~10倍、好ましくは0.3~3倍、最大の寸法からなる。

【0217】

好ましい実施態様において、上記電極が、表面処理剤を含む少なくとも一つの層で被覆されている。

【0218】

そのような表面処理剤の使用は有利に、上記電極上の、核酸増幅、例えばHRC A増幅、後に得られた核酸の吸着を減らすことを許す。

【0219】

上記表面処理剤が、ヒドロゲル又は界面活性剤でありうる。

【0220】

特定の実施態様において、上記表面処理剤は下記リストの間で選択される：水溶性セルロース誘導体、例えばヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、置換された又は置換されていないアクリル及びメタクリル誘導体、例えばポリジメチルアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド-アシルグリシジルエーテルポリアクリルアミド、置換された又は置換されていない種々のタイプのアクリルの、アルキルアクリルのモノマーから得られたコポリマー、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレン及びポリプロピレングリコールのコポリマー、特に、商業名Pluronic(登録商標)下で販売されているもの、アクリルの又はメタクリルの誘導体により機能化されたポリマーの重合体の生成物、シラン置換基を有し、好ましくは水溶性のポリマー、オリゴマー又は分子、チ

10

20

30

40

50

オール置換基を有し、好ましくは水溶性のポリマー、オリゴマー又は分子、及び、それらの混合物。

【0221】

光学的検出

【0222】

電極についての上記された実施態様と同様に、光学的変数のゆらぎ又は変動が、例えば統合的光検出器を使用して測定される場合に、上記検出器の上記観測領域は好ましくは、上記刺激する電場の方向に対して垂直の方向に置いて測定された検出ゾーンの最大次元の0.1~10倍、好ましくは0.3~3倍からなる寸法を有する。

【0223】

10

塊の全体（しかし、1つの塊に過ぎない場合）が上記検出ゾーンを包含する場合に、上記信号変動が一般的に最大で或ることが注目されることが出来る。

【0224】

測定タイミング

【0225】

幾つかの好ましい実施態様において、上記変数のゆらぎが好ましくは、上記刺激する電場が施与されていない間に測定され、上記刺激する電場が、好ましくは第1の期間の間に施与されず、上記第1の期間は、上記刺激する電場がその間に施与される第2の期間と交互に起こる。

【0226】

20

この実施態様は、上記刺激する場を生成する為に使用される上記電極が伝導度ゆらぎを検出する為に使用されるものと同じである場合に、特に適切である。

【0227】

濃度の上記ゆらぎは、相対的に急速に、典型的に1~100秒内に、緩和しうる。この緩和は、上記測定されたゆらぎの上記振幅を小さくしうる。

【0228】

それ故に、上記刺激する電場が施与されない期間は好ましくは、100秒以下、好ましくは10秒以下、の持続時間を有する。

【0229】

変形として、上記刺激する電場が施与される間に、上記変数の上記ゆらぎが測定される。

30

【0230】

この場合に、本明細書中に記載された上記溶液の全て又は一部を使用して、上記刺激する電場と上記検出器との間の干渉を減らすことは興味深いものでありうる。

【0231】

また、幾つかの実施態様において、上記電気的変数は、上記刺激する電場中に存在する周波数又は周波数成分を拒絶するフィルタリングを使用し、上記測定電極の分極の周波数で測定される。好ましくは、また、上記測定電極の分極周波数は、上記刺激する電場の上記周波数の倍数でない。

【0232】

40

分極信号

【0233】

好ましくは、上記電気的変数の上記ゆらぎが、段階a)で施与される上記刺激する電場の最高周波数成分と異なる周波数を有する交流分極信号により分極された少なくとも2つの電極により段階b)で測定され、上記分極信号の上記周波数は好ましくは、上記周波数成分よりも大きく、より好ましくは少なくとも10倍、より好ましくは100倍、より好ましくは1000倍大きい。

【0234】

これは、上記刺激する電場と上記検出器との間に、より良い非干渉化を得ることを許す。

50

【0235】

上記分極信号の上記周波数は好ましくは、特に検出器電極が液体媒体と接触している場合に、1kHz～100kHz、好ましくは1kHz～50kHzで構成される。

【0236】

そのような周波数の使用は、上記電極表面での電気化学的反応の回避及びファラデー電流の生成を可能にする。上記非接触検出モードにおいて、上記分極周波数は、1kHz～100MHz、好ましくは10kHz～50MHz、より好ましくは100kHz～10MHzから構成されうる。

【0237】

上記分極信号の上記周波数は好ましくは、上記刺激する電場の周波数のゼロ以外の倍数と異なる。

10

【0238】

電子回路

【0239】

上記電気的変数の変動又はゆらぎが測定される場合に、上記検出器は、複数の検出器電極及び、電子回路を備えうる。上記電極は、上記電子回路に接続される。

【0240】

上記電子回路は好ましくは、上記述べられた分極信号を検出器電極に施与する。

【0241】

上記電子回路は、

- ・少なくとも一つの、好ましくは2つの、より好ましくは3の、アンカプラーであって、上記アンカプラーは好ましくは、分離増幅器である、上記アンカプラー、及び/又は、
- ・少なくとも一つの、好ましくは少なくとも2つの、電圧制御された電流源、及び/又は、

20

- ・抵抗のブリッジ、及び/又は、

- ・差分増幅器、又は、

上記4つのタイプの成分の任意の組み合わせを備えうる。

【0242】

好ましい実施態様において、上記電子回路は、

- ・少なくとも一つの、好ましくは2つの、より好ましくは3の、アンカプラーであって、上記アンカプラーは好ましくは、分離増幅器である、上記アンカプラー、及び、
- ・少なくとも一つの、好ましくは少なくとも2つの、電圧制御された電流源、及び、
- ・抵抗のブリッジ、及び、
- ・差分増幅器

を備えている。

30

【0243】

分離増幅器の使用が好ましい。なぜならば、分離増幅器は特には、感度が良く、直線的であるという利点を有し、且つ、他のタイプのアンカプラーと比較して満足する分離を提供するからである。

【0244】

上記電子回路は、バッテリーで作動される電源を好ましくは備えている電源を備えうる。

40

【0245】

上記第2の電源は好ましくは、浮動接地を有する。

【0246】

上記アンカプラーは好ましくは、浮動接地を有する。

【0247】

好ましくは、上記刺激する電場を生成する為に上記回路において使用されるアンカプラー及び上記検出器の上記回路において使用される上記アンカプラーが、浮動接地を有する。そのような構成は、上記検出器と上記刺激する電場との間の干渉を減らすことを許す。

50

【0248】

上記検出器は好ましくは、差分増幅器の反転入力及び非反転入力にそれぞれ接続されている2つの電極を備えており、各電極は好ましくは、上記差分増幅器の個々の入力に及び対応する抵抗器を介して定電流源に接続されている。

【0249】

上記電子回路は好ましくは、対称である。

【0250】

測定された信号の処理

【0251】

上記処理は、任意のコンピュータ、例えばパーソナル・コンピュータ、マイクロプロセッサ、スマートフォン、又は、微積分を実行することが可能な任意の統合信号処理装置によって実行されることができ、任意のアナログ・デジタル・カードが、上記コンピュータに加えて使用されうる。

10

【0252】

本発明はまた、上記種を検出し又は解析する為に使用される現象の斬新さによりその観点の他において特徴付けられる。上記現象は、濃度の、疑似のアーティファクト及び厄介なものとして従来技術において見なされてきたタイプのランダムなゆらぎであり、それは、本発明において有用な作業を働かせる。このゆらぎの有用な測定はまた、幾つかの特定の解析方法を要求する。従って、特に、その観点の幾つかにおいて、本発明は、信号がその中で記録される方法に関連し、及び当該信号のランダム且つ非周期的なゆらぎ部分のみが種の濃度のレポーターとして使用される。

20

【0253】

この方法はまた、同じく幾つかの特定の信号処理方法を要求する。従って、その実施態様の他において、本発明は、信号からランダム且つ非周期的成分を抽出し、且つ上記成分から当該成分の上記平均された又は統合された振幅を反映する値を抽出するような方法においてプログラミングされたデジタル的又はアナログ的データプロセッサに関する。好ましくは、上記振幅は、上記媒体中の幾つかの選択された種の濃度に依存する。

【0254】

任意の予備処理

【0255】

上記検出器電極又は、上記光学検出器、例えば統合光検出器、から得られた上記信号は好ましくは、時間の関数として記録される。

30

【0256】

幾つかの実施態様において、上記信号は、例えばノイズ減少、フィルタリング、復調、又は統合方法により、及びより一般的に、当分野において知られている信号処理方法（数学的又はアナログ的）により、予備処置されうる。

【0257】

上記検出器電極又は上記光学検出器から得られた信号は、フィルターされうる。

【0258】

上記検出器電極又は上記光学検出器から得られた信号は、振幅において変調されうる。上記信号は好ましくは、上記分極信号と同じ周波数を有する。

40

【0259】

好ましくは、上記検出電極が上記したように上記分極信号によって分極化される場合には、上記フィルタリングは、上記分極信号の周波数と異なる周波数、例えば上記刺激する電場の周波数、を減らし、好ましくは除去しうる。

【0260】

上記検出器電極又は上記光学検出器から得られた上記信号は、記憶ユニット中に、例えば収集カードを介するコンピュータ中に、格納されうる。上記収集カードは、上記検出器及び上記刺激する電場生成器を制御しうる。上記収集カードは、ソフトウェア、例えばLabview Signal Express、或いはMatlab、若しくは他の数学的な若しくは実験ソフトウェア

50

、又は、C、C++、Java（登録商標）のような他のより一般的なソフトウェア、及び当分野のそれらから周知である多種多様なプログラミング・ソフトウェアの、を介して、上記コンピュータによって制御されうる。

【0261】

上記検出器電極又は上記光学検出器から得られた信号は、1kHz未満、好ましくは100Hz未満、及び場合により10Hzよりも低い、及び時々100~1Hz、の周波数で、周波数復調されうる。

【0262】

復調の為のそのような周波数の使用は有利に、上記検出ゾーンにおいて塊の通過をDC信号中で確実に再トレースすることを許す。

10

【0263】

上記変数の上記ゆらぎ又は変動は好ましくは、そのような復調の後に得られる。

【0264】

上記変数のゆらぎ又は変動の解析

【0265】

上記装置は好ましくは、時間依存若しくは空間依存解析、好ましくはウェーブレット解析、を、又は、電気的変数の変動について、又は画像検出器から発行された画像について、又は統合的光学検出器の出力について自己相関を実行する為のデジタル・プロセッサを備えている。

20

【0266】

好ましくは、段階b)は、時間依存若しくは空間依存解析により、好ましくはウェーブレット解析により、又は段階a)で測定された変動の自己相関解析により、処理することを含む。

【0267】

ランダムの上記強度及び/又は非周期的特徴についての情報を上記伝導度信号の又は統合光学信号の上記ゆらぎ又は変動から抽出することを可能にする、及び好ましくは上記特徴の強度を反映する量値を上記情報から抽出することを可能にする、デジタル又はアナログ・プロセッサを使用することが可能である。特に好ましくは、上記成分の上記振幅は、上記液体媒体中の上記荷電種の上記濃度についての情報を提供する。

30

【0268】

幾つかの好ましい実施態様において、上記量的情報は、自己相関関数、例えば平均2乗偏差、の時間での積分である。

【0269】

幾つかの他の好ましい実施態様において、上記量的情報は、自己相関関数、例えば平均2乗偏差、の上記空間の画像での空間積分である。

【0270】

幾つかの更に好ましい実施態様において、上記量的情報は、ウェーブレット・ベースの所与のウェーブレットに対応する係数、又はそのような係数のセット、又はそのような係数の関数であり、上記係数は、上記信号にウェーブレット解析を施与することによって得られる。

40

【0271】

幾つかの他の好ましい実施態様において、上記量的情報は、上記ウェーブレット・ベースの所与のウェーブレットに対応する係数、又はそのような係数のセット、又はそのような係数の関数であり、上記係数は、画像に空間的ウェーブレット解析を施与することによって得られる。

【0272】

そのようなプロセッサの使用は有利に、上記測定された変数のゆらぎ又は変動を、例えば電子ノイズ又はベースライン・ドリフトから区別することを許す。

【0273】

上記ゆらぎ又は変動は、それらの時間的ゆらぎを抽出することを目的とする解析によっ

50

て処理されうる。

【0274】

任意的に、刺激する電場が施与されている間に測定されたゆらぎ又は変動に対して実行されたそのような解析の結果が、上記刺激する電場が施与されていない場合に測定されたゆらぎ又は変動に対して実行されたそのような解析の結果及び/又は検出する種の非存在において得られた参照値と比較される。

【0275】

時間的解析

【0276】

特に好ましい実施態様において、上記変数の上記時間的ゆらぎ又は変動が、ウェーブレット解析によって処理される。

10

【0277】

要するに、ウェーブレット解析は、共通の形状を有し、しかし異なる特徴的な時間スケールを有する、ウェーブレットと呼ばれる関数のセット(ウェーブレット・ベース)とともに、関数、本明細書における変数の時間的なゆらぎ又は変動、を畳み込むことを含む。

【0278】

上記ウェーブレットは、ゼロ平均であり、及び、例えばフーリエ変換と比較して、単一のポイント又は「中心」から距離でゼロに減少するという特性を有する。

【0279】

これらの共通の特性の他に、ウェーブレットは様々な形状をとることができ、従って、複雑且つノイズ信号から、形状又は持続時間の幾つかの特定の特徴を有する特性を抽出するように調整されることができる。

20

【0280】

ウェーブレット解析は特に、本発明を実行する場合に、得られた上記変数のゆらぎの処理に十分に適合されている。

【0281】

ウェーブレットの種々の形状が、上記空間の刺激する電場の特徴に依存して、本発明において使用されうる。幾つかの例示的な且つ非制限的なものが、実施例5において例示される。

【0282】

本発明の上記方法は、ウェーブレット・ベース上に上記信号を分解すること、ブランクの陰性信号と陽性信号との間のウェーブレット振幅の違いが最大になる上記ウェーブレット・ベースのサブセットを選択すること、及び、上記サブセットから上記最終信号を抽出すること、を含みうる。

30

【0283】

好ましい実施態様において、このサブセットからのウェーブレットの上記振幅は、ブランク又は陰性対照に適用された場合に、基本的にゼロであり、及び、(例えば、光学的に検出可能な塊を有する)陽性信号上の上記ウェーブレットの上記振幅は、非ゼロである。

【0284】

1つの実施態様において、上記解析は、自己相関解析を実行することを含む。例示的な及び非制限的な例として、上記自己相関解析は、上記信号の全て又は一部に関して $\langle |I(t) - \langle I(t) \rangle|^2 \rangle / \langle |I(t)|^2 \rangle$ の積分を計算すること、ここで、 $I(t)$ は、時間 t での光の強度であり、及び括弧は時間での平均を表す。

40

【0285】

これは、平均平方解析に対応し、しかし、積分の他の異なるモードが使用されうる。但し、上記積分は、例えばマクロイオン塊の展開に関連した、量的な値又は一連の量的な値をデータから抽出する。

【0286】

空間解析

【0287】

50

上記変数の空間的ゆらぎが、例えば複数の塊を包含する瞬間的な画像を撮るイメージング装置を使用し且つ空間的画像解析を実行して測定され、そして信号を抽出する為に使用されうる。

【0288】

実施態様において、上記イメージング装置は、CCD又はCMOSカメラでありうる。

【0289】

上記刺激する電場に掛けられた上記空間の領域の画像が、図8又は図11Bにおいて例示されているように、撮られ、そして任意的に記録されうる。

【0290】

次に、上記領域における光強度の及び/又は明色のゆらぎを抽出することを目的とする解析が、適用されうる。

10

【0291】

任意的に、刺激する電場が施与されている間に測定されたゆらぎ又は変動に対して実行されたそのような解析の結果が、上記刺激する電場が施与されていない場合に測定されたゆらぎ又は変動に対して実行されたそのような解析の結果又は検出する種の非存在において得られた参照値と比較される。

【0292】

1つの実施態様において、上記解析は、自己相関解析を実行することを含む。例示的な及び非制限的な例として、上記自己相関解析は、上記画像の全て又は一部に関して $\langle (I(r) - \langle I(r) \rangle)^2 \rangle / \langle I(r)^2 \rangle$ の積分を計算すること、ここで、 $I(r)$ は、ポイント r での光の強度であり、及び括弧は上記画像での又は上記画像の選択された領域 A での平均を表す。

20

【0293】

これは、平均平方解析に対応し、しかし、積分の他の異なるモードが使用されうる。但し、上記積分は、例えばマクロイオン塊の展開に関連した、量的な値又は一連の量的な値をデータから抽出する。

【0294】

特に好ましい実施態様において、上記変数の上記空間ゆらぎ又は変動が、ウェーブレット解析によって処理される。

【0295】

この実施態様において、我々が空間依存光強度マップを開始関数として使用することを除き、我々は、時間依存的ゆらぎ又は変動について上記操作をし、且つ、共通の形状を有し、しかし異なる特徴スケールを有する2次元関数又はウェーブレット(ウェーブレット・ベース)のセットとともにそれを巻き込む。

30

【0296】

ウェーブレット解析は、本発明を実行するとき得られた変数のゆらぎの処理に十分に適合される。

【0297】

種々の形状のウェーブレットが、上記刺激する電場の及び上記空間の特徴に依存して、本発明において使用されうる。

【0298】

好ましくは、上記解析がその中で実行される領域 A が、カメラによって視られる総画像の一部のみを包含するように選択され、その中にマクロイオンを含む媒体が存在する。

40

【0299】

好ましくは、また、良い平均効果を有する為に、上記領域 A は、任意の所与の瞬間で、多様な塊を含む為に選択される。

【実施例】

【0300】

検出の原理

【0301】

μ チップ - CEにおける接触伝導度測定又は動電学的ベースの方法が、上記マイクロチ

50

チャンネルにおけるバックグラウンド電解液と直接接触する統合された電極を使用することにより液体において伝導度変化を検出する為の比較的簡単な方法を提供する。

【0302】

上記電場は、異なる外部参照電位を使用することによりHVPS及び伝導度検出器から非干渉化された。これは、本明細書において、下記において特定されるように、浮動参照、分離増幅器のおかげで達成された。

【0303】

検出器電極10が、図1Aに従い、印加電圧に相対的に配置され且つ構成され、及び、検出電子装置50に接続された。電極10は、下記に詳述されるように、Pt平面微小電極でありうる。

【0304】

この図は、平衡電圧(V_s , $-V_s$)が高圧電源40(HVPS)からマイクロチャンネル20の両側面供給されること、及び、平衡伝導度検出電圧(V_d , $-V_d$)が上記検出装置によって横チャンネル電極10上に施与されることを示す。

【0305】

検出器電極10は、主励起場に対して垂直である構成に、且つ、励起電極30の参照システムにおけるゼロ電位に対応するマイクロチャンネル20に沿う場所で配置される。

【0306】

検出器電極10を横切る電位降下がまた、チャンネル寸法から独立してこれら電極を狭くしておくことを維持することによって最小化される。

【0307】

実施例1：伝導度検出モードにおいて本発明において使用されるべきマイクロ流体システムの為の構造及び製造工程

【0308】

上記マイクロチップは、ラピッド・プロトタイピング、下記D. C. Duffy et al, Analytical chemistry, 1998, 704974-84、により製造されたGlass/PDMS(ポリジメチルシロキサン)ハイブリッド・マイクロ流体チップである。

【0309】

それは2つの層：PDMS層及びリフト・オフ(lift-off)によって製造された接触における伝導度測定の為の電極(ECMC: electrodes for conductivity measurement in contact)を支持するガラス基体、からなる。

【0310】

上記PDMS層は、頂上に、溶液注入の為のその2つの先端で2つのリザーバを有するマイクロチャンネル(2.5mmの直径)を含む。接触モードにおける伝導度測定の為の電極(ECMC: Electrodes for conductivity measurement in contact mode)は、上記マイクロチャンネルに垂直で互いに向かい合う、及び50 μ m幅、25 μ mギャップ、及び200nm厚さを有する、2つの平面の且つ小型化されたPt電極からなる。

【0311】

図1Bは、検出ゾーンに関連付けられた、接触モードにおける伝導度測定の為の電極(ECMC)の為の3対の電極10を示す。1つのみが測定の為に使用される。

【0312】

電極が、2 μ m 1813 フォトレジスト層上にスパッタリングする(Emitech, K575)ことにより堆積された200nm Pt層(20nmのCr層が吸着層として使用される)のリフト・オフにより調製される。上記PDS及びガラス層は、30秒の酸素プラズマ処理(Harrick plasma)を使用して、位置合わせされ且つ不可逆的に結合される。

【0313】

上記マイクロチャンネルは、幅が160 μ mであるマイクロチャンネルの上記中央における上記検出ゾーンを除き、5mm長、40 μ m高さ且つ150 μ m幅である。

【0314】

上記に記載されているように、上記検出ゾーンで上記チャンネルを局所的に拡張するこ

10

20

30

40

50

とは、塊形成に有意に影響を与えること無しに上記チャンネルに沿って全てで生じる上記駆動場強度を局所的に減らすことによって、E C M Cと高電圧電源（H V P S）との間の非干渉化を容易にする。加えて、この拡張 2 1 はまた、上記検出ゾーンにおいて E C M C の配置を容易にする。

【 0 3 1 5 】

実施例 2 : 本発明において使用されるべき検出電子機器

【 0 3 1 6 】

上記に記載されているように、H V P S と上記検出電子装置との間の効率的な非干渉化を達成することは、全てのメインに動力を与えられた電子装置において存在する保護的な接地コンダクターを介する残余の漏れ電流の故に、容易な仕事でない。

10

【 0 3 1 7 】

上記 E C M C を介する微細な電氣的漏れ電流は電気分解を生じ得、上記マイクロチャンネル内にガス・バブルの形成を結果として生じる。

【 0 3 1 8 】

例えば 6 個のリチウム・バッテリー (ultralife, 9V) に基づく浮動接地を備えているシステムが、図 2 において示されるように使用された。このシステムは、高感度を有し、全ての電子的、携帯可能な且つ簡易な装置を得る為に、3 個の分離増幅器、例えば ISO124P、2 個の電圧制御された電流源 5 5、抵抗器 5 6 の 1 個のブリッジ、及び 1 個の差分増幅器 5 7 により電源として使用された。

20

【 0 3 1 9 】

上記装置の測定バンド幅は、上記分離増幅器のそれによって制限される。

【 0 3 2 0 】

このシステムは、図 1 C において提供された一般的な合成スキームに従って、マイクロチップ内に埋められた電極対 1 0 に接続されている。

【 0 3 2 1 】

上記使用された検出装置は、接触における伝導度の検出の間に、電磁妨害に対するキャピラリー電気泳動の上記マイクロ流体システムの非常に高い感度を克服する為に、2 つの分離技術 (第 1 の分離技術は、分離 5 3、5 4 及び測定の増幅器を有し、電氣的であり、第 2 の分離技術は、対称を有し、幾何学的である) を組み合わせる。

30

【 0 3 2 2 】

上記装置は、電気泳動高電圧を有する優れた電氣的デカップリング及び優れた検出感度を保証する。

【 0 3 2 3 】

このシステムの詳細な各部分が以下に記載される。分離増幅器 5 3、5 4 のそれぞれは、1 のゲインを有し、及び、全てのシステムが、二重電源

(干)

を使用する。

【 0 3 2 4 】

分離増幅器

40

【 0 3 2 5 】

分離及び測定増幅器 5 3、5 4 が、コモン・モード干渉に対するそれらの免疫、それらの低コスト、それらの優れた線形性、それらの制限されたサイズ及びそれらの高い測定感度故に選択された。

【 0 3 2 6 】

例えば、ISO124 分離増幅器が使用され、それは、低周波数において 160dB のコモン・モード除去比及び 50kHz のバンド幅を有する。

【 0 3 2 7 】

分離増幅器 5 3、5 4 の存在が、リーク電流に起因して接地ループを取り除く。

50

【 0 3 2 8 】

前置増幅器

【 0 3 2 9 】

上記検出装置入力での前置増幅器 8 0 は、演算増幅器 (OPA : operational amplifiers) OPA2132 (Burr Brown) で作られている。

【 0 3 3 0 】

上記処理チェーンが対称モードにおいて機能するために、前置増幅器は、調整信号振幅の正確な調整を許す。

【 0 3 3 1 】

抵抗器が好ましくは、

10

$\pm 1\%$

の許容量を有する。上記回路は図 2 A で与えられており、下記式が満足される :

【 数 1 】

$$S_1 = -S \frac{R_2}{R_1} \text{ 及び } S_2 = -S_1 \frac{R_5}{R_4}$$

【 0 3 3 2 】

ロー・パス・フィルタ (Low pass filters)

20

【 0 3 3 3 】

上記 ISO124 は、約 5 0 0 kHz 周波数のノイズ信号を届ける。

【 0 3 3 4 】

上記有用な信号のみを得る為に、およそ 5 0 kHz のバンド幅を有する第 2 オーダー・ロー・パス・フィルタが、上記分離増幅器のそれぞれの上記出力に配置された。

【 0 3 3 5 】

このロー・パス・フィルタ 8 1 に対応する上記回路が、図 2 B において示される。

【 0 3 3 6 】

線形領域において、OPA が理想的であると仮定し、且つ $s = j\omega$ であることに注目し、及び、上記ロー・パス・フィルタが下記伝達関数を有する :

30

【 0 3 3 7 】

【 数 2 】

$$H = \frac{V_2}{V_1} = \frac{1}{1 + (R_2 + R_1)C_2p + R_1R_2C_2C_1p^2}$$

【 0 3 3 8 】

この伝達関数 H は、下記カット・オフ波動を有する第 2 のオーダーのロー・パスフィルタの伝達関数である :

40

【 0 3 3 9 】

【 数 3 】

$$\omega_0 = \frac{1}{\sqrt{R_2R_1C_1C_2}}$$

【 0 3 4 0 】

使用された上記装置において、カット・オフ周波数

【 0 3 4 1 】

【数 4】

$$f_0 = \frac{\omega_0}{2\pi}$$

【0342】

は、約50kHzであった。

【0343】

上記ロー・パス・フィルタは、分離増幅器からリップル電圧を抑制する。

【0344】

オフセット制御

10

【0345】

上記処理チェーンの上記増幅器の上記オフセット電圧を最小化する為に、グローバル・オフセット制御 82 が使用された。

【0346】

上記回路は、1 に等しいゲインを有する加算非インバータ OPA を使用する (図 2 C)

。

【0347】

【数 5】

$$V_{out} = (V_{in} + V_{offset}) \frac{R_6}{R_5}$$

20

【0348】

オフセット信号 V_{offset} は、デバイダ・ブリッジ (divider bridge) R_1 、 R_2 及び P_a (potentiometer cursor) によって設定される。

【0349】

上記電位差計カーソルが A である場合には、

【0350】

【数 6】

$$V_{offset} = \frac{V_{s2}}{3}$$

30

【0351】

であり、及び、それが B である場合には、

【0352】

【数 7】

$$V_{offset} = \frac{-V_{s2}}{3}$$

【0353】

であり、及び、それが C である場合には、 $V_{offset} = 0$ である。当該信号 V_{OUT} は、入力信号 V_{IN} を有するオフセット信号の合計である。

40

【0354】

使用された上記回路において、 V_{s2} 及び $-V_{s2}$ は、 $\pm 9V$ バッテリである。従って、上記オフセット制御の上流の上記処理チェーンのグローバル・オフセットを $+3V \sim -3V$ で制御することが可能であり、従って高制御原動力を構成する。

【0355】

電圧制御された電流源 (VCCS)

【0356】

負荷 (すなわち、複数の検出器間の溶液) の上記インピーダンスは、CE におけるほと

50

んどのバッファについて、約数十Mオーム（例えば、TE1Xについて、30Mオーム～50Mオーム）であり、上記分離増幅器の上記出力インピーダンスは、低周波数において約数Mオームであり、及び高周波数で減少する。

【0357】

ソースの上記出力インピーダンスが負荷の上記インピーダンスよりも少なくとも10倍大きいならば、当該ソースは上記負荷内に電流を適切に伝導しうる。

【0358】

分離増幅器、例えばISO124、は、数kHzから500kオームよりも多い負荷において電流を送りえない。

【0359】

従って、電圧制御された電流源55（VCCS）が使用された。電流源は事実、外見上無限大の出力インピーダンスを有し、従って、非常に高いインピーダンス負荷において電流を送ることができる。

【0360】

使用される上記回路は、図2において示されており、及び、線形領域において、下記関係を満たす。

【0361】

【数8】

$$i_2(t) = -\frac{R_2}{R_3 \times R_1} V_1(t)$$

10

20

【0362】

電圧 $V_1(t)$ が形状、振幅、及び周波数において設定される場合には、その結果、上記電流 $i_2(t)$ は形状、振幅、及び周波数において設定される。

【0363】

従って、上記制御された電源により送られる上記電流の特性は、上記制御電圧にのみ依存する。従って、使用される上記回路において、上記2つの電源により送られる上記電流は、上記分離増幅器の制御電圧と対称である。

【0364】

抵抗器のブリッジ及び伝導度測定

【0365】

複数の検出器間の上記溶液の上記伝導度の上記測定は、入力として、制御された二重の電流源の上記出力を有する抵抗器ブリッジを介して実行される。

【0366】

上記抵抗器ブリッジは、電流分割の役割を果たす。当該2つのVCCSは、二極の電流生成器の役割を果たす。

【0367】

図2の上記等価回路は、下記である（上記抵抗器ブリッジの上記回路上流は、二極の電流生成器によりモデル化される）（図2E）。

【0368】

【数9】

$$i_1 = i_0 \times \frac{G_2 + G_{ch} + G_3}{G_2 + G_{ch} + G_3 + G_1} \text{ 及び } i_2 = i_0 \times \frac{G_1}{G_2 + G_{ch} + G_3 + G_1}$$

$$(G_x = \frac{1}{R_x} \text{ は、} R_x \text{ の伝導度である})$$

30

40

50

【0369】

を伴う、 $i_0 = i_1 + i_2$

【0370】

負荷 R_{ch} (複数の検出器間の溶液) 終点での電圧 V_{ch} は、下記を満たす：

【0371】

$$V_{ch} = R_{ch} \times i_1$$

【0372】

上記差分増幅器の上記出力での電圧 V_{diff} は、下記である：

【0373】

$$V_{diff} = V_{ch} \times \text{ゲイン}$$

10

【0374】

i_0 の特徴 (形状、強度及び周波数) は、上記源により設定され、及び、上記測定の間変化しない。

【0375】

従って、上記負荷終点 (上記複数の検出器間の溶液) での上記電圧の何らかの変動が、上記負荷の上記抵抗の上記変動 (上記複数の検出器間の上記溶液の上記伝導度の変動) にリンク付けされる。

【0376】

我々は、上記負荷の上記インピーダンスの上記変動がまた、電流 i_1 及び i_2 の上記ゆらぎ、例えば $i_0 = i_1 + i_2 = \text{一定}$ 、を導くことに注目することができる。

20

【0377】

負荷終点での電圧 V_{ch} の上記変動は、下記式を満たす：

【0378】

【数10】

$$\Delta V_{ch} = \Delta R_{ch} \times i_1 + \Delta i_1 \times R_{ch}$$

【0379】

上記統合された差分増幅器は、電流 i_1 と干渉すること無しに、上記ノイズの抑制及び上記有用な信号を増幅することを許す。

30

【0380】

上記分離増幅器の上記入力、上記差分増幅器の上記差動出力電圧である。上記分離増幅器は、解析の為に周囲のデータ取得に対する信号の送信 (分離モードにおける) を保証する。上記フィルタは、上記分離増幅器の上記ゆらぎに対する内部雑音 (noise inherent) を抑制する。

【0381】

実施例3：高圧電源 (HVPS ; Highvoltage power supply)

【0382】

この電源はまた、平衡回路である。それは例えば、コンバータEMCO FS05CT-15 (Condatas AG、スイス) によって動く、低コストの二重高電圧増幅器PA242/APEX (Farnell、フランス) に含まれる2個の高電圧増幅器からなる。当該コンバータの中心リード線が上記接地に接続され (図3)、外部場に関してシステムの安定性及びユーザ安全性を保証する。

40

【0383】

50オーム抵抗減衰器41が好ましくは、HVPSを介するアライメンテーション線 (50オーム) と上記検出電子装置との間の上記インピーダンス・ミスマッチに起因する干渉を防ぐ為に、上記ECMCと上記電子検出電子装置との間で使用される。

【0384】

このシステムは、実施例1において記載されているように、上記マイクロチャンネルの入口及び出口の壁において配置された刺激する電極30に接続される。上記刺激する電極

50

は、Ptワイヤで作られうる。

【0385】

実施例4：ロング・レンジPCRによるDNA増幅の検出の為のDNAサンプルの準備

【0386】

DNA配列 - 上記PCRプライマーは、位置22179~32161に基づくDNAラムダのターゲット領域についてのパール・プライマー (PerI Primer) により設計された。上記フォワード・プライマーは5'-GACCATCGGGTAAAACCGTCTATGAC-3' (配列ID: No. 1) であり、及び、上記リバーズ・プライマーは、5'-ATGACGACTTATTGCCGCTCTGTTCCC-3' (配列ID: No. 2) である (Sigma Aldrich、フランス)。

【0387】

PCRプロトコル - DNAラムダが、lambda cl857 Sam7 (Roche、フランス) から得られ、そして様々な濃度でDNase/RNase無しの水 (Gibco、フランス) 中で再構成された。当該PCR混合物 (50 µl) は、1倍のロング・レンジPCRバッファ (QIAGEN、フランス)、400nmolのフォワード及びリバーズ・プライマー、様々な量のラムダDNA、2ユニットのロング・レンジPCR酵素ミックス (QIAGEN、フランス) からなる。

【0388】

上記温度サイクリングは、3分間、93 °Cでの初期変成、引き続き2回の増幅順序に関与する。最初の10サイクルが下記熱順序で実行される：15秒で93 °C (変成)、30秒で62 °C (アニーリング)、そして10分間で68 °C (伸長)。下記サイクルが設定された：15秒で93 °C (変成)、30秒で62 °C (アニーリング)、10分 + (n - 10) × 20秒で68 °C (伸長)、ここで、nは、サイクル数である。熱サイクリングが、Biom etra T-プロフェッショナル・サーモサイクラーにおいて実行された。

【0389】

幾つかの検証 (相関測定、結果の項を参照) の為に、上記PCR混合物からの上記生産されたDNAを分離することが有用であった。その為に、我々は最初に500 µlのTE (1倍) バッファにおける温度サイクリング後に、生の (raw) PCR混合物を懸濁し、次に、12分間、12000 gで、100K膜 (centrifugal filter, Millipore、フランス) を使用することによって、この懸濁液から10Kpb DNAを分離した。

【0390】

もちろん、上記配列、DNA源、増幅キット、サーモサイクラー及びサイクル・プロトコルは、一例に過ぎず、且つ制限するものでない。

【0391】

上記方法は、十分に一般的であり、且つ、多くの異なるサンプル及びキットに適用されることができる。また、本明細書に記載された実施例において、上記増幅はチップ外で実行され、次に、上記生成物が上記検出チップ内にロードされる。10kpb PCR反応からの10 µLのDNA溶液が、上記マイクロチップの上記リザーバの1つ内に導入され、そして、圧力によって上記マイクロチャンネルを通じて流される。次に、上記リザーバ内の駆動電極を備え且つ上記検出マイクロ電極に接続された上記関連付けられた機器が、図1Cに従って上記マイクロチップに接続される。

【0392】

幾つかの他の好ましい実施態様において、上記増幅は、熱制御モジュールにおいてそのようなチップを置くことによって、チップ上で直接的に実行される。

【0393】

実施例5：伝導度ゆらぎ検出モードを使用して本発明に従う伝導度データの解析の例

【0394】

最初に、サイクル数依存Q-PCR戦略をロング・レンジPCRに展開する為に本発明に従う上記方法を使用する可能性が試験された。

【0395】

本発明に従う上記方法を検証する為に、上記PCRがチップ外で実行され、上記生成物が、慣用的なゲル電気泳動によりチェックされ、及び、上記反応の上記生の生成物が上記

10

20

30

40

50

マイクロ流体チップ内に注入された。

【0396】

図1Cは、セットアップの概略図を示す。10kbp PCR反応からの10 μ LのDNA溶液が、上記マイクロチップの上記リザーバの1つ内に導入され、そして、圧力によって上記マイクロチャンネルを通じて流される。

【0397】

次に、上記リザーバ内の駆動電極を備え且つ上記検出マイクロ電極に接続された上記関連付けられた機器が、図1Cに従って上記マイクロチップに接続される。

【0398】

DNA塊を生成し且つモニターする為に、上記DNA溶液が、低周波数、小さい直流電流(DC-オフセット)信号(40V/cm)を有する高電圧交流電流(AC)信号(方形波、20V/cm 最大振幅、15Hz周波数)に掛けられた。上記AC信号が、そのDNA含有物からマイクロチャンネルをあまりに早く使い果たすこと無しに最大の効率でDNA塊を生成する為に使用され、及び上記DCオフセットが、一定速度で上記検出電極を横切って塊を塊を駆動し且つ上記電極領域における上記溶液を一定に新しくすることによって、モニタリングを容易にする。

【0399】

伝導度測定について、上記ECMC上に、電子検出装置の測定出力Bで1~2V範囲の最大振幅を有する32kHzでの均衡されたAC信号(正弦波)からなる分極信号が適用された。

【0400】

この周波数で且つ接触モードにおいて、上記インピーダンスは本質的に伝導性である。全ての電子装置はアナログ-デジタル-コンバータ-カード91、例えばNI-USB 6380X、及びNI信号表現ソフトウェア(National Instruments、フランス)を介してコンピュータ90によって制御された。

【0401】

上記サンプリング周波数は、320kサンプル/秒で設定され、及び、伝導度測定からのデータが、周波数復調の前にコンピュータ上に格納された。上記周波数復調は、NI信号表現ソフトウェアのトーン抽出関数を使用して、10Hzの有効な収集割合を与える為にフーリエ変換によって32000サンプルの各セットを処理した。下記において、この10Hz復調信号が伝導度信号として言及される。

【0402】

当分野において知られているように(例えばH. Isambert, et al, Physical Review Letters, 1997, 78, 971-974を参照)、溶液中のDNA塊が、バルクよりも高いイオン密度を有し、これら塊が上記検出ゾーンを横切る際に、上記伝導度信号の振幅の変化を生じる。この検出原理は、ラベル剤無しの有利点を有する。

【0403】

図4は、増幅の38サイクルサイクル後に実施例4において調製された陰性(DNAなし)及び陽性(DNAターゲットあり)対照の生のPCR溶液から得られた32kHz伝導度測定10Hz周波数復調に基づく伝導度信号の例を示す。

【0404】

陽性サンプル及び陰性対照の両方について、単調なベースライン・ドリフト、及び一様でない、おおざっぱな周期的なパターンを有する高周波数ノイズが観察された。これらのアーチファクトの故に、上記信号の堅牢な抽出が特定の信号処理ツールを必要とする。

【0405】

ウェーブレット変換に基づく解析が使用された(下記結果及び議論の項を参照)。

【0406】

ウェーブレット解析の手順

【0407】

現在の検出スキームにおいて、10Hzの伝導度信号 $S(t)$ が時点 $t \in \{0, t_0, 2t_0, \dots, T = N \cdot t_0\}$ でサンプリングされ、及び、DNA塊の流れが、トラン

ジエント・ジャンプのランダム列として現れる（図4）。

【0408】

これらジャンプは、高周波数ノイズ、低周波数ベースライン・ドリフト、巨大な振幅トランジエント上に重畳される。これらの種々の成分を分離し且つ物理的に有意なもののみを維持する為に、ウェーブレット解析が使用された。上記入力信号は、関心のあるトランジエント・イベントに最も合致する適切なローカル関数パターンから生成される一組の関数（ウェーブレット・ベース）で巻き込まれた。試行錯誤によって、「bior2.2」と呼ばれる双直交のウェーブレットが選択された。このウェーブレットは、基本的なリアル分解関数（ t ）及び再構成関数（ t ）によって定義される（図5A）。上記ベースが、下記の時間トランスレーション及び再スケーリング（ t ）により2Dセットの関数{
（ t ）}として生成される（図5B）。

10

【0409】

【数11】

$$\psi_{a,\delta}(t) = \frac{1}{\sqrt{a\tau_0}} \psi\left(\frac{t-\delta}{a\tau_0}\right)$$

【0410】

$a \{2^j\}_j$ N 及び a_0 は、尺度であり、しかしそれはさらに、無次元スケール a と呼ばれる。

【0411】

この基礎において、 $S(t)$ は、個別のウェーブレット変換、すなわち下記置み込みにより得られた一組の係数 $d_s(j, k)$ により表される。

20

【0412】

【数12】

$$d_s(j, k) = \int_0^T S(u) \psi_{2^j, k\tau_0}(u) du$$

【0413】

典型的な信号について、上記分解が、図6Aにおいて示されるように、色分けされたスペクトラムとして表され、時間（ k ）の関数としてモード・レベル（ j ）の観点において係数 $d_s(j, k)$ を示す。この表現から、及び、フーリエ解析において計算されたパワースペクトラムを有する類推により、各モデルレベルについての重み 2^{-j_0} が下記で計算される：

30

【0414】

【数13】

$$W(j_0) = \frac{1}{T} \sum_{k=1}^T |d_s(j_0, k)|$$

40

【0415】

重み関数が、DNAの有り又は無しで得られたスペクトルから計算され（図6A）、次に、比較された（図6B）。DNAトランジエントは、4番目のモードレベル（ $J_0 = 3$ ）に対応する時間スケール $2^3 \tau_0$ で最大の信号対ノイズ比に一貫して貢献した。それ故に、当該信号は、下記によってこのスケールで再構成された。

【0416】

【数 1 4】

$$S_{j_0}(t) = \sum_k d_s(j_0, k) \phi_{2^j, k\tau_0}(t)$$

【0 4 1 7】

ここで、 $\phi_{2^j, k\tau_0}(t)$ は、変換され、且つ τ_0 から再スケールされる。

【0 4 1 8】

上記再構成された信号 $S_3(t)$ は、DNA 塊の存在を反映することを期待される (図 7 A)。

10

【0 4 1 9】

$S_3(t)$ は、ほとんどの時点で変化しない $S_3(t)$ を残す 0.002 でのカット・オフで切られた。この閾値は、最大 DNA 濃度 (4 1 増幅サイクル後) で、時間平均の $|S_3(t)|$ を超え、及び、上記関連ある伝導度ゆらぎのほとんどが、上記カット・オフよりも低いままである (図 7 B)。

【0 4 2 0】

DNA の量 Q_{Dna} は、

【0 4 2 1】

【数 1 5】

20

$$\widehat{S_3}(t)$$

【0 4 2 2】

の上記時間平均により相対期間において最終的に評価され、当該信号は、4 番目のモード ($j_0 = 3$) から再構成され、且つ 0.002 でカット・オフされた。同じカット・オフが、全てのサンプルに適用される。

【0 4 2 3】

【数 1 6】

$$Q_{Dna} = \langle |\widehat{S_3}(t)| \rangle$$

30

【0 4 2 4】

実施例 6 : 光学的イメージング検出モード、及びイメージング検出モードと電気的検出モードとの間の比較を有する本発明の実施

【0 4 2 5】

顕微鏡検査

【0 4 2 6】

マクロイオンの塊は、イメージング蛍光顕微鏡検査を使用してモニターされる。

【0 4 2 7】

上記方法を検証する為の DNA 塊の独立したモニタリングを有する為に、幾つかの実験において、実施例 1 で準備された上記チップが、落射蛍光モードにおいて、10 倍の対物レンズ (ニコン) を有する倒立顕微鏡 Aviovert 135TV (Zeiss) の頂上に置かれた。DNA は、実施例 4 において調製され、及び、引き続き Sybergold により蛍光的にラベル付けされ、蛍光及び伝導度による同時検出を許す。1 倍下での蛍光染料濃度について、伝導度検出に対する上記ラベルの有意な影響が観察されなかった。

40

【0 4 2 8】

相関観察

【0 4 2 9】

DNA 塊を選択的に検出する為の本発明の能力は、上記複数の電極間の上記ギャップにおける、上記伝導度信号、蛍光画像及びローカルな蛍光信号を同時に記録することによ

50

てテストされた。

【0430】

これらの実験は、PCR混合物から以前に抽出され（実施例4を参照）、TE（1倍）内に懸濁され、そしてSybrGoldでラベル付けされた（図8）、PCR反応からの10kbp DNAの種々の濃度について実行された。各測定は、130秒の間実行され、上記信号の最初の30分間は、上記システムがその安定な状態（典型的に、塊が、初期の均一溶液から数秒内にそれらの最大サイズ及び強度に到達する）に到達するために捨てられた。10Hz伝導度信号は、実施例5において記載された時間依存のウェーブレット解析手順に従って処理された。

【0431】

上記蛍光信号が、上記マイクロチャンネル外部のそれに対する上記検出ゾーンにおいて測定された上記蛍光強度の割合の時間導関数として処理された。このバッファにおいてDNA塊を生成する為の濃度閾値は、200ng/ μ lであった。良好な相関が、塊の外観、上記処理された蛍光信号、及び上記処理された伝導度信号の間で観察された。

【0432】

図8において与えられた上記画像の2次元ウェーブレット解析がまた、2次元ウェーブレットの現在一組であるウェーブレットベースを除いて、実施例5において記載されたように上記同じウェーブレット解析を使用して処理されることができる。

【0433】

実施例7：ラベル剤無しの量的なロング・レンジPCRを実施する為の本発明の使用

【0434】

PCRにおいて、nサイクル後のDNAの濃度は、ターゲットDNAの量に及びサイクルnの数に依存する。固定値nについて初期のDNA量で直線的に増加することが予想される。nの関数として、この量は、最初の相において指数的に増加し（対数期と呼ぶ）、次に、上記初期のDNAの濃度と独立的に有限値を飽和することが予想される。

【0435】

定量PCR（qPCR）において、DNA濃度のプロットの変曲点对サイクルの数（又は、幾つかの他の処理アルゴリズムについて、上記強度が所定の閾値に到達する時点）が、上記初期DNA濃度を定量化する為の信頼する様式と見なされる。

【0436】

上記検出方法の上記感度は、それをロング・レンジPCR増幅生成物の定量化に適用することによって評価された。実施例4において記載された上記プロトコルに従い調製され、ロング・レンジPCR反応からの10kbp DNA溶液が、上記PCR混合物からの分離無しに且つラベル剤無しにロードされた。様々な混合物が、DNAラムダの種々の初期量（0~2.5ngまで）及び増幅サイクルの種々の数（0~41サイクル）で調製された。各測定の総持続時間は、530秒であった。

【0437】

DNA増幅が、ウェーブレット解析により定量化された（図9A）。10fg/ μ lよりも多いDNAを初期に含む全てのサンプルについて、DNAの量 Q_{DNA} （実施例5を参照）は、サイクル数を有意に増加し、本発明の方法の検出の制限（LOD：limit of detection）が初期DNAの10~100fg/ μ lにあることを示す。

【0438】

この検出感度は、上記同じサンプル上で対照として実行されるゲル電気泳動に引き続く蛍光検出によって得られたそれよりも約一桁大きく良い（図9B）。

【0439】

追加的に、上記チップ中の溶液の全容積は、PCR生成物の上記初期50 μ lからの1 μ lのみである。従って、上記チップ中のPCRの完全統合とともに、これが100ラムダDNAコピーよりも少ない生成物に対応する故に、この技術は初期DNAの数fgの感度を容易に生成するべきである。

【0440】

10

20

30

40

50

バンドが、上記ローディング・ウェル中に残り、ほとんどの巨大なDNA（上記ラダー中の上記DNAよりもはるかに大きい）は、上記反応において成功裡に生成される。

【0451】

次に、上記増幅生成物の他のアリコットが、実施例1に従い調製されたマイクロチャンネル内にロードされ、実施例4において使用されたそれに類似する刺激する場に掛けられる。上記場により誘発される濃度の上記ゆらぎは、実施例6において記載された上記イメージング・モードにおいて、時間の関数として記録される。上記観察領域において異種の光強度の当該記録された画像（図11B）は15～30秒の時間内における様子を示し、塊の存在、及び等温増幅に引き続く本発明の成功裡の操作を示す。図11Bにおける4番目のパネルは、DNAが上記チャンネルから使い果たされる場合に、一様な且つ暗いバックグラウンドが回復されることを示す。

10

【0452】

他の実施態様において、上記反応は、直接の伝導度読み込みによる上記増幅を検出する為に、上記電極を含む上記マイクロチャンネルにおいて等温的に直接的に実行され、引き続き、実施例5において見られるような同じプロトコルが実行されうる。

【0453】

実施例9：無機イオン検出への応用

【0454】

チップ構造

【0455】

上記マイクロチップは、ガラス/PDMS（ポリジメチルシロキサン）ハイブリッドであり且つ2つの層からなる。上記PDMS層は、頂上で、溶液注入の為にその2つの先端で2つのリザーバ（2.5mmの直径）を有するマイクロチャンネルを備えている。接触モードにおける伝導度測定の為に電極は、上記マイクロチャンネルに垂直に互いに向かい合う、50 μ m幅、25 μ mギャップ、及び200nm厚さを有する2つの平面のPt電極からなる。電極が、2 μ m 1813フォトレジスト層上にスパッタリングする（Emitech, K575）ことにより堆積された200nm Pt層（20nm Cr層が接着層として使用される）のリフト・オフにより調製される。上記PDS及ガラス相は、30秒の酸素プラズマ処理（Harrick plasma）を使用して、位置合わせされ且つ不可逆的に結合される。上記マイクロチャンネルは、幅が160 μ mである上記検出ゾーンを除き、40 μ m高さ且つ150 μ m幅である。他のマイクロチップ寸法は、図12において報告される。蛍光及び伝導度検出についての両方の有効長は、2cmである。

20

30

【0456】

検出電子機器

【0457】

図1Cに関連して記載された上記システムは、高感度を有し、全ての電子的、携帯可能な且つ簡易な装置を得る為に、6個のリチウムバッテリー（ultralife, 9V）に基づく浮動接地、3個の低コスト分離増幅器ISO124Pによる電源、2個の電圧制御された電流源、抵抗の1個のブリッジ、及び1個の差分増幅器で使用された。上記装置の上記測定バンド幅が、上記分離増幅器のそれ（すなわち、50kHz）により制限される。

40

【0458】

高压電源

【0459】

実施例3において見られる同じ電源が使用された。

【0460】

異なる動電モードが実行され、このHVPSを使用して施与された電圧が図12において報告される。

【0461】

バックグラウンド電解液（BGE；Background Electrolyte）

【0462】

50

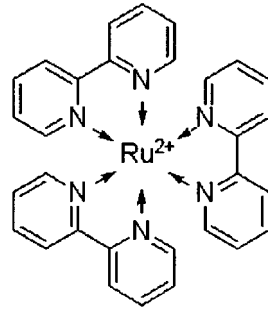
バックグラウンド電解液は、MES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)/His(ヒスチジン)バッファからなる。

【0463】

サンプル：トリス(2.2'-Ru(bipy)₃²⁺リジル)ジクロロルテニウム(II) (Tris(2.2'-Ru(bipy)₃²⁺ridyl)dichlororuthenium(II)：下記構造を参照)は、それが伝導度測定により並びに蛍光(FITCフィルタ)により検出されることができるようモデル化合物として最初に使用された。

【0464】

【化1】



10

20

【0465】

トリス(2.2'-Ru(bipy)₃²⁺リジル)ジクロロルテニウム(II)構造

【0466】

RuBiPyは、それが伝導度測定及び蛍光の検出により検出されることができるようモデル化合物として最初に使用された。

【0467】

ローディング及び分離の両方について施与される上記電圧が、図12において報告される。これらの実験は、その疑似の等電特性故にそれが低い伝導度バッファであるようにMES/Hisバッファ中で実行された。

30

【0468】

蛍光及び伝導度測定の検出で達成された感度を比較する為に、Rubipyの異なる濃度が50 μM(図13B)~1mM(図13A)の範囲で注入された。

【0469】

これらの結果は、このモデル陽イオンの低電気泳動移動度にもかかわらず、上記信号対ノイズ比が、蛍光検出でのものよりも伝導度測定による検出を使用して10倍高いことを、低いサンプル濃度で示した。

【0470】

その後、関心のある無機陽イオン、K⁺、が、20 μMで個々に最初に注入され(図14)、そして、上記サンプルを上記バッファにより置換する場合のブランクと比較された。

40

【0471】

この低濃度においてさえ、上記信号対ノイズ比は、本発明に従う方法で非常に高く、従って、我々はそのような無機陽イオンについて低い感度を予期する。

【0472】

実施例10：ウェーブレット解析による伝導度測定法信号処理

【0473】

図15Aは、上記検出モジュールから取得された原信号の及びウェーブレット解析による処理後に取得された上記対応する信号の比較を示す。上記信号は、レベル4ウェーブレットにより処理された(0.8秒の時間的サポート)。

50

【0474】

1.842Vのオフセットは、原信号と同じレベルで表示されるようにする為に、それに対して上記処理された信号に追加された。上記原信号は、69 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でラムダ - DNA溶液 (5kbp) から得られた塊の検出後に取得された。

【0475】

電氣的パラメータは下記の通りであった：

刺激する電圧： 440V/cm

刺激する電圧の周波数： 15Hz

媒体伝導度： 約50mS/m

【0476】

実施例11：蛍光信号と伝導度測定法信号との間の相関

10

【0477】

図15Bは、レベル4ウェーブレットにより処理された蛍光信号と伝導度測定法信号との間の相関を示す。当該ユニットは、任意である。

【0478】

上記信号は、インキュベーションの30分で分岐RCA溶液から得られた塊の検出から得られた。上記DNAは、0.25倍濃度でSyBrグリーンを添加することにより蛍光にされた。

【0479】

電氣的パラメータは下記の通りであった：

刺激する電圧： 440V/cm

刺激する電圧の周波数： 10Hz

媒体伝導度： 500mS/mよりも多く、又は100mS/mよりも少ない。

20

【0480】

図15Bの為に使用されるバッファは、下記に詳述される実施例12の第2の緩衝液である。

【0481】

実施例12：緩衝液

【0482】

下記詳細な組成物を有する緩衝液は、本発明に従う方法を実行することを考慮して、H RCA増幅方法において使用されることが出来る。

30

【0483】

第1の緩衝液は、20 μL について、

ロング・レンジPCR酵素ミックス 10倍 (QIAGEN)： 1.75 μL 、及び、

精製水：18.25 μL

を含む。

【0484】

上記第1の緩衝液は、下記詳細な濃度で下記成分をさらに含む：

ウシ血清アルブミン (BSA)： 0.1mg/mL、

トリスHCl： 6mM、

MgCl₂： 1.25mM、

(NH₄)₂SO₄： 1.25mM、及び

ジチオスレイトール (DTT)： 0.5 mM

40

【0485】

第2の緩衝液は、20 μL について、

ロング・レンジPCR酵素ミックス 10倍 (QIAGEN)： 2 μL 、及び

精製水： 18.25 μL

を含む。

【0486】

上記第2の緩衝液は、0.1mg/mLの濃度で、ウシ血清アルブミン (BSA) をさらに含む。

50

【0487】

上記第1の緩衝液は、630mS/mよりも多く又は100mS/mよりも少ない伝導度を有し、及び、好ましい実施態様に対応する。第2の緩衝液は、400mS/mよりも多く又は100mS/mよりも少ない伝導度を有する。

【0488】

実施例13：HRC AによるDNAの増幅と併用しての本発明の使用

【0489】

この実施例において、上記検出マイクロ流体チップの外側で、エクス・シチュー(ex situ)で得られたHRC A生成物の検出の試験が報告される。

【0490】

オフ・チップHRC Aの為に使用されるプロトコルが、下記において詳述される。

【0491】

HRC Aプロトコル

【0492】

Nilsson (M. Nilsson, M. Gullberg, F. Dahl, K. Szuhai, and A. K. Raap. Real-time monitoring of rolling-circle amplification using a modified molecular beacon design, *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 14 e66, pp. 1-7, 2002)の環状化プロトコルが実行された。陽性対照として、我々は、上記ターゲット及び下記に記載される配列を有するプローブ(Eurogentec, Belgiumによって提供された)を採用した。陰性対照として、上記ターゲットは、上記環状化反応の上記バッファにより置換された。

プローブ(ppWT) : P-CTGCCATCTTAACAAACCCTTTCCTCTATGATTACTGACCTACGACCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTCTTCTATGCGATTACCGGGCT

【0493】

ターゲット(tWT) : GTTTGTTAAGATGGCAGACCCGGTAATCG

【0494】

上記プローブ(200nM)が、600nMのライゲーション・テンプレートで、30分間、37で、10mM トリスアセテート pH7.5、10mM 酢酸マグネシウム、50mM 塩化ナトリウム、1mM ATP、1µg/µl BSA、及び0.2U/µl T4 DNAリガーゼ(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, スウェーデン)中でリガチュレートされた(ligatured)。

【0495】

上記増幅は、ランダム・プライマー(ランダム・ヘキサマー)を有するPhi29ポリメラーゼを使用し、且つ、先行の工程で得られた環状DNAを入力として採用する。この増幅は、増幅キットIllustra Templphi(GE-Healthcare Life sciences)を使用して実行され、及び、分岐二重鎖DNAを得ることを許す。上記増幅キットは、サンプル・バッファ、反応バッファ、及び酵素混合物を含む。上記反応バッファは、塩、デオキシヌクレオチドを含み、DNA合成の為に都合の良いpHに調整され、及び、0.02mg/mLの最終濃度でランダム・プライマーを含む。

【0496】

非常に簡単には、入力DNAの0.5µlの容量がサンプル・バッファの5µlに添加され、そして結果として得られた容量が、二重鎖DNAの変性を得る為に、3分間、95で加熱された。一旦冷やされたこの容量が、5µlの反応バッファと混合され、そして当該混合物が異なる持続時間(10分~2時間と変わる)の間、30でインキュベーションされた。上記反応は、サーモサイクラー中で行われ、そして当該酵素は、当該反応の終わりに65で不活性化された。

【0497】

最初の実験において、1,7S/mの伝導度を有する食塩バッファが、塊にされるべきDNAを含む液体媒体中で使用された。これは、本発明に従う検出方法の正確さを減少させる刺激する電極の周りで電気分解現象をもたらした。

【0498】

10

20

30

40

50

しかしながら、ロング - レンジ P C R バッファ (Qiagen) 及び 0.1mg/ml での BSA からなる本発明に従う緩衝液 (上記実施例 1 2 の第 2 のバッファ溶液に対応する) の使用は、増幅効率に影響を与えること無しに、0.25S/m まで溶液の伝導度の減少をもたらした。このバッファは、刺激する電極の周りに電気分解現象を生成すること無しに不安定の生成を許す (図 1 6 A 及び図 1 6 B)。

【0499】

小さい塊は、増幅の 15 分から可視可能である。それらは、およそ 30 分で最適なサイズに到達する。

【0500】

ウェーブレット・モード 3 及び 4 を用いて、30 分よりも多い増幅持続時間後に得られた H R C A 生成物の塊の存在を検出することが可能である (図 1 7)。上記検出は、H R C A 生成物の上記塊がそれらの増幅バッファ中に存在していた間に実行された。誤差バーは、行われた測定の標準偏差に対応する。

10

【0501】

パラメータ Q はウェーブレット解析後に得られた再構成信号の時間平均に対応し、及び、このパラメータは、上記装置における D N A 濃度の量測定をする為に使用されることができる。

【0502】

上記測定は、20 分のインキュベーション後に、上記測定された信号の明かな増加を伴う量的である。

20

【0503】

実施例 1 4 : 複数の検出ゾーンの使用

【0504】

図 1 8 は、マイクロチャンネル 20 が縦軸 X に沿って延在し、複数の検出ゾーン 100a、100b 及び 100c が当該縦軸 X に沿って続くところの本発明の実施態様を示す。

【0505】

電極 10a、10b 及び 10c の組が、上記液体媒体中の核酸の濃度に依存する電気的変数の当該液体媒体内のゆらぎを測定する為に、検出ゾーン 100a、100b 及び 100c のそれぞれに存在する。

【0506】

検出ゾーン 100a、100b 及び 100c のそれぞれは、種々の化合物 110a、110b 及び 110c を含み、当該化合物は例えば、検出されるべき核酸のヌクレオチドの種々の配列と相互に作用することが可能なプライマーである。

30

【0507】

化合物 110a、110b 及び 110c は、マイクロチャンネル 20 の壁に及び / 又は入力チャンネル 22a、22b 及び 22c の壁に及び / 又は出力チャンネル 23a、23b 及び 23c の壁に結合され、例えば固定されることができる。

【0508】

交流の電場が、検出の為に適切な持続時間の間に、マクロイオンを検出ゾーンに滞在させるために施与されることができる。

40

【0509】

図 1 9 は、検出ゾーン 100a、100b、及び 100c が、流体路中に存在しない異なるサブチャンネル 20a、20b、及び 20c において存在する変形を示す。

【0510】

表現「を (一つ) を含む」は、「を少なくとも一つ含む」として理解されるべきである。

【0511】

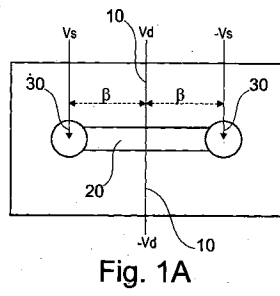
表現「・・・～・・・を含む」は、両末端が含まれることを理解されるべきである。

【0512】

表現「を含む」は「を少なくとも含む」として理解されるべきである。

50

【図1A】



【図1B】

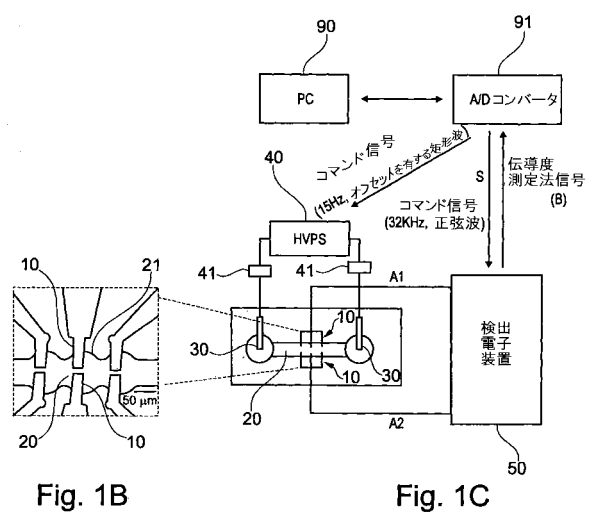
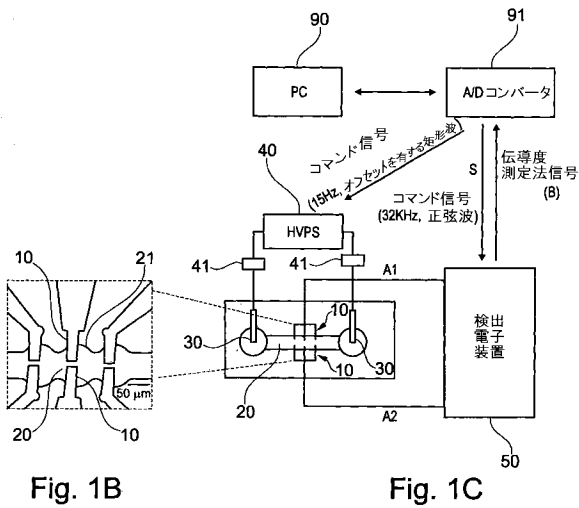
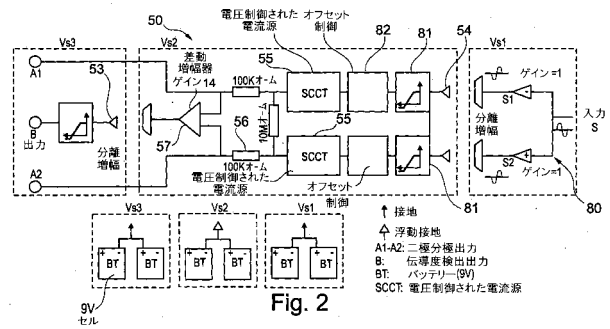


Fig. 1C

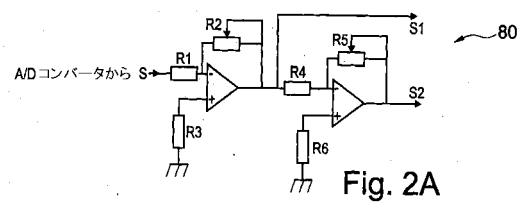
【図1C】



【図2】



【図2A】



【 図 2 B 】

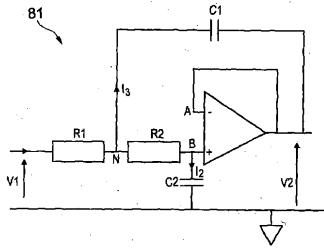


Fig. 2B

【 図 2 D 】

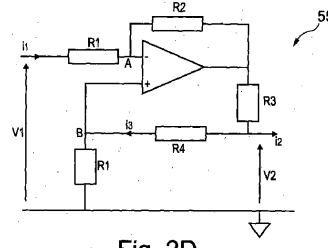


Fig. 2D

【 図 2 C 】

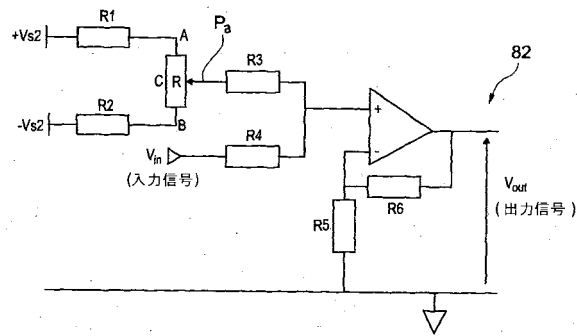


Fig. 2C

【 図 2 E 】

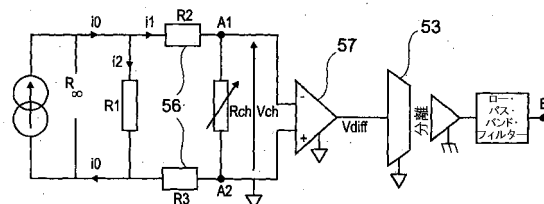


Fig. 2E

【 図 3 】

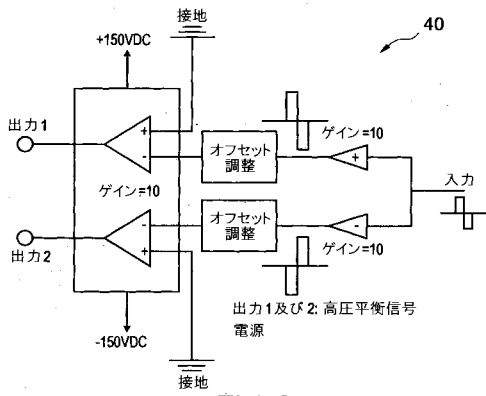


Fig. 3

【 図 4 】

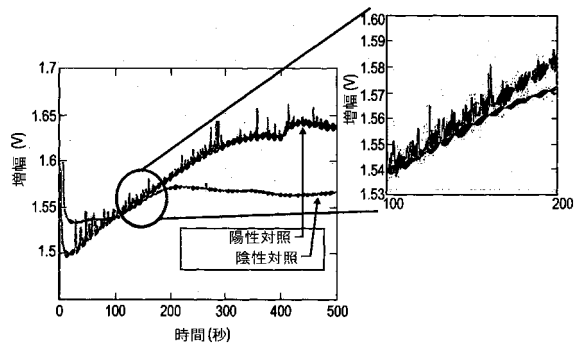


Fig. 4

【 図 5 】

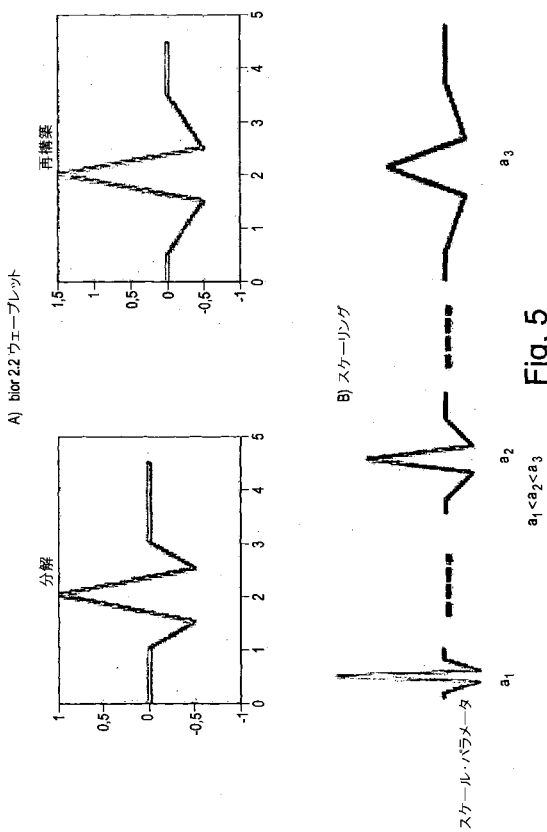


Fig. 5

【 図 6 】

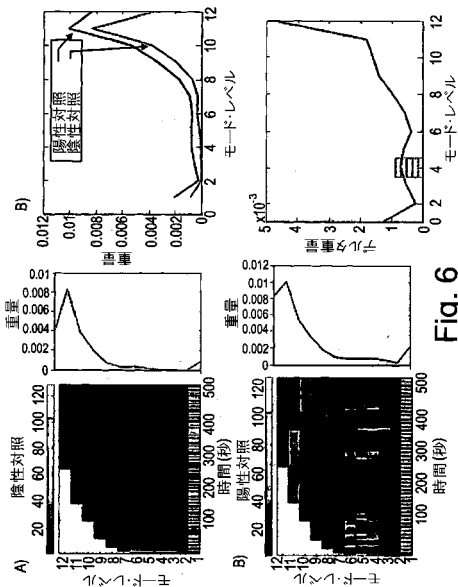


Fig. 6

【 図 7 】

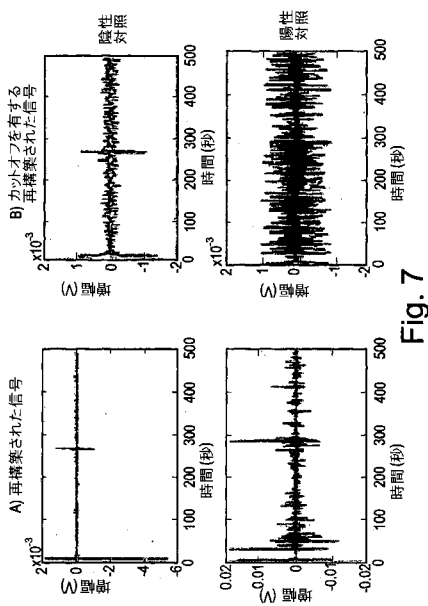


Fig. 7

【 図 8 】

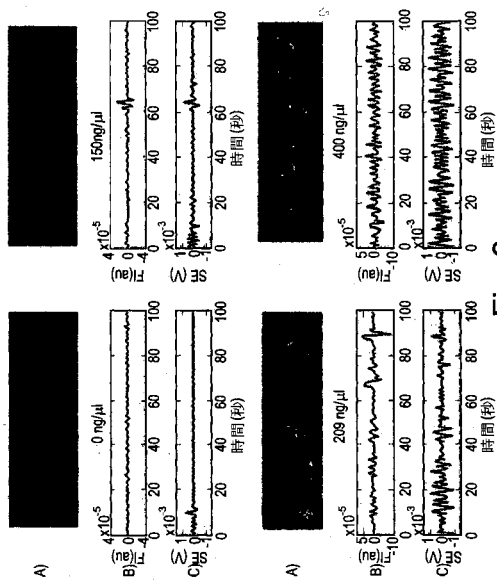


Fig. 8

【 図 9 A 】

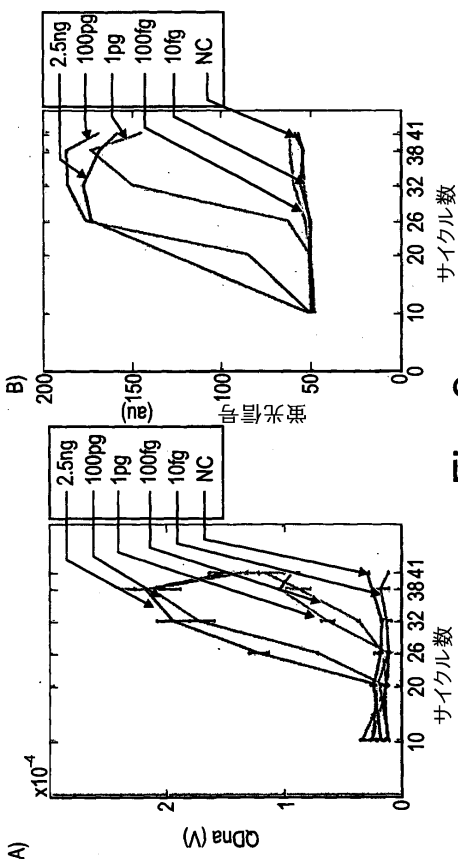


Fig. 9

【 図 9 B 】

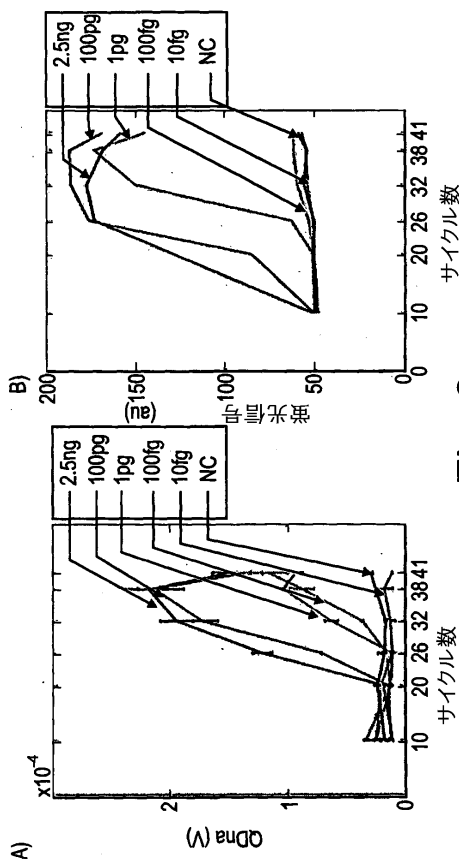
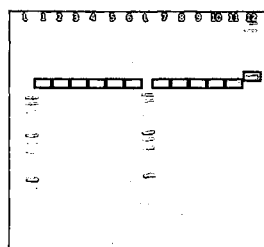


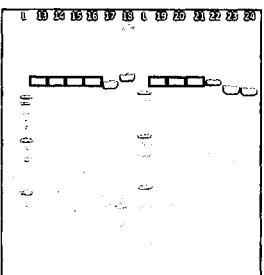
Fig. 9

【 図 9 C 】

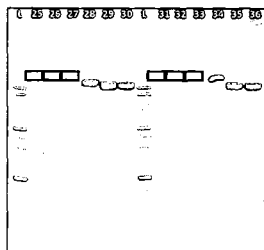
サンプル準備 : 1/10ロング・レンジPCR生成物 (7 μ l)+SYBRGreen 100x(1 μ l)+ ローディング染料6x(2 μ l)
 電気泳動条件 : 0.7%アガロース・ゲル(90分, 100V, 77mA)
 □濃度領域 (145平方インチ)



L:1Kb DNA ラダー
 1 to 6:10 増幅のサイクル
 -x10 (01)-DNA:陰性対照
 -x10 (02)-DNA:10 fg
 -x10 (03)-DNA:100 fg
 -x10 (04)-DNA:1 fg
 -x10 (05)-DNA:100 pg
 -x10 (06)-DNA:2.5 ng



L:1Kb DNA ラダー
 7 to 12:20 増幅のサイクル
 -x20 (07)-DNA:陰性対照
 -x20 (08)-DNA:10 fg
 -x20 (09)-DNA:100 fg
 -x20 (10)-DNA:1 fg
 -x20 (11)-DNA:100 pg
 -x20 (12)-DNA:2.5 ng



L:1Kb DNA ラダー
 13 to 18:26 増幅のサイクル
 - (13)-DNA:陰性対照
 - (14)-DNA:10 fg
 - (15)-DNA:100 fg
 - (16)-DNA:1 fg
 - (17)-DNA:100 pg
 - (18)-DNA:2.5 ng



L:1Kb DNA ラダー
 19 to 24:32 増幅のサイクル
 - (19)-DNA:陰性対照
 - (20)-DNA:10 fg
 - (21)-DNA:100 fg
 - (22)-DNA:1 fg
 - (23)-DNA:100 pg
 - (24)-DNA:2.5 ng

Fig. 9C

【 図 10 A 】

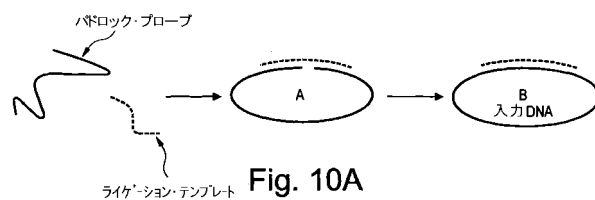


Fig. 10A

【 図 10 B 】

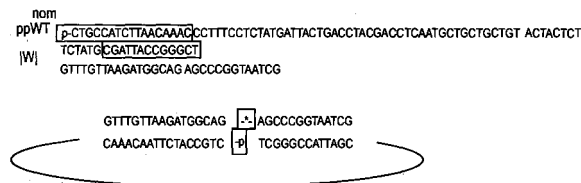


Fig. 10B

【 図 1 0 C 】

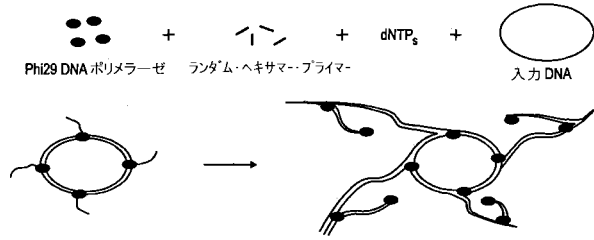


図10C. TemplPhi処理の概念図。多重部位の29DNAポリメラーゼで環状テンプレートDNAに対するランダム・ヘキサマープライマー・アニールが、これらプライマーのそれぞれに延在する。当該DNAポリメラーゼが、下流の延在したプライマーに到達する場合に、鎖置換合成が生じる。当該置換された鎖は、単一ストランドを与えられ、且つ、多くのヘキサマー・プライマーによりプライムされる為利用可能である。当該処理は継続し、指数関数的な、等温増幅を生じる。

Fig. 10C

【 図 1 1 B 】

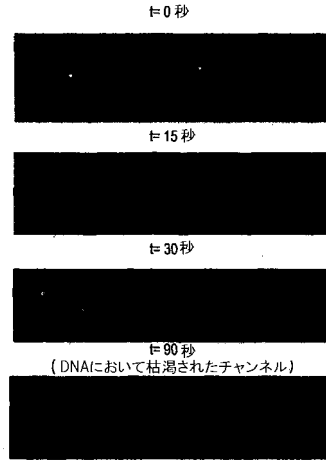


Fig. 11B

【 図 1 1 A 】

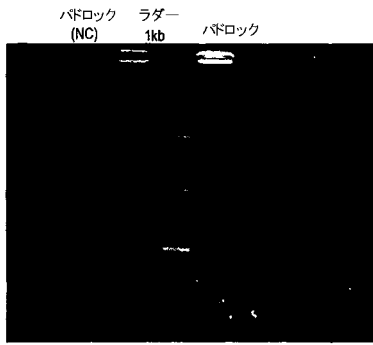


Fig. 11A

【 図 1 2 】

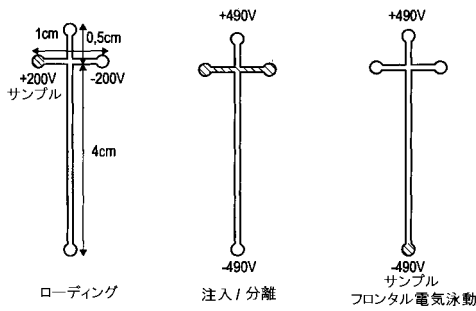


Fig. 12

【 図 1 3 】

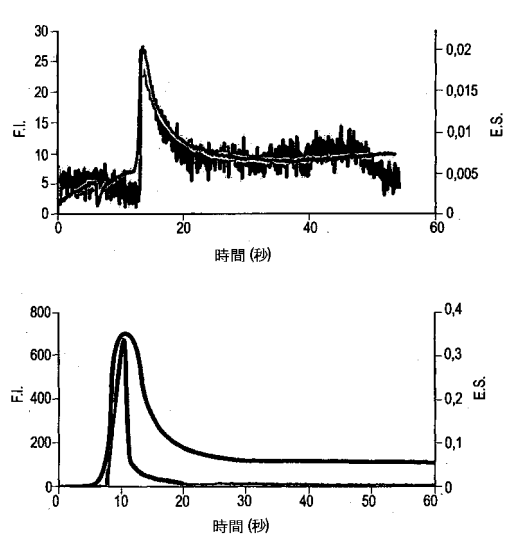


Fig. 13

【 図 1 4 】

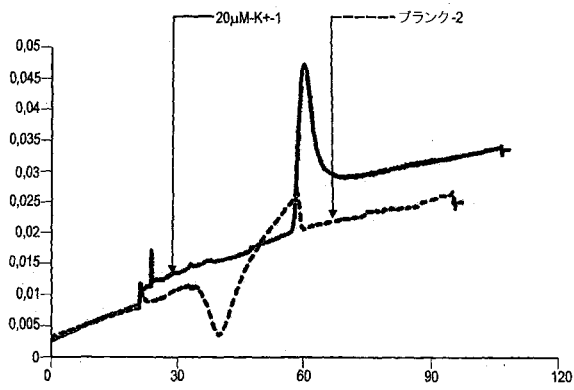


Fig. 14

【 図 1 5 A 】

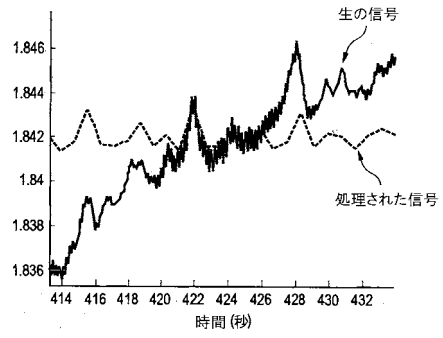


Fig. 15A

【 図 1 5 B 】

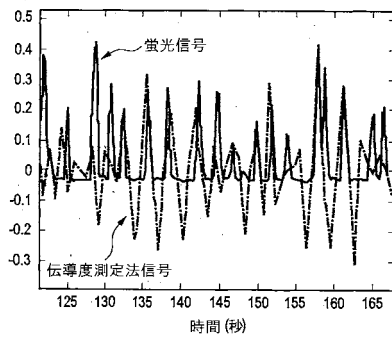


Fig. 15B

【 図 1 6 B 】

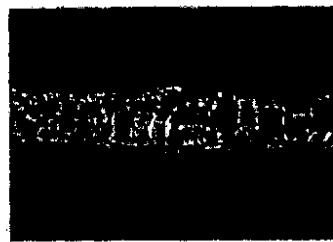


Fig. 16B

【 図 1 6 A 】

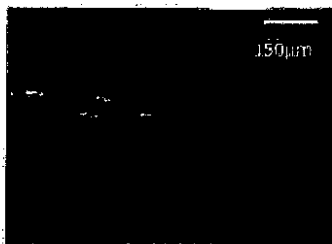


Fig. 16A

【 図 1 7 】

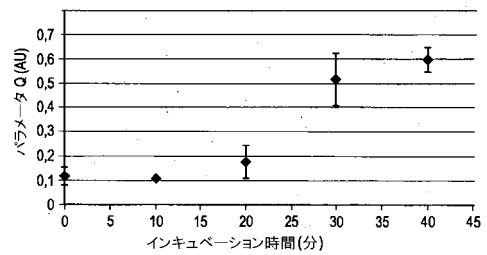


Fig. 17

【 図 1 8 】

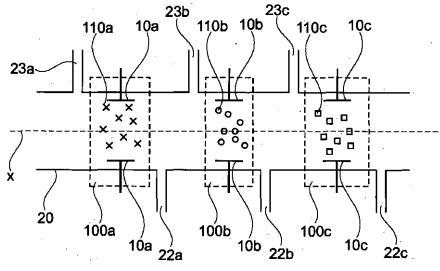


Fig. 18

【 図 1 9 】

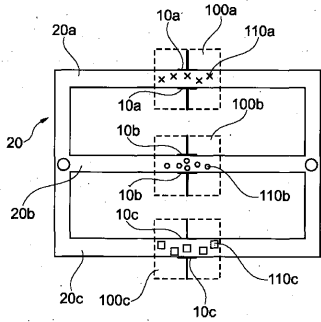


Fig. 19

【 配 列 表 】

2015523568000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/IB2013/055409
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 G01N33/487 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 G01N		
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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/070114 A1 (MILES ROBIN R [US]) 13 June 2002 (2002-06-13) abstract; figures 1,3 paragraph [0003] - paragraph [0025] -----	1-8, 10-24, 28-31, 33-35, 37,38, 40-42,44
X	US 2005/136466 A1 (MILES ROBIN R [US] ET AL) 23 June 2005 (2005-06-23) claim 1; figure 2 ----- ----- -/--	1,31,37, 38,44
<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		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 6 December 2013		Date of mailing of the international search report 13/01/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klein, Marc-Oliver

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/055409

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ASBURY C L ET AL: "Trapping of DNA by Dielectrophoresis", ELECTROPHORESIS, WILEY INTERSCIENCE, DE, vol. 23, no. 16, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 2658-2666, XP003009262, ISSN: 0173-0835, DOI: 10.1002/1522-2683(200208)23:16<2658::AID-LPS2658>3.0.CO;2-0 abstract; figures 3,7 -----	1,36,44
X	US 2010/203580 A1 (BRYNING ZBIGNIEW T [US] ET AL) 12 August 2010 (2010-08-12) abstract; figure 2a paragraphs [0039], [4578]; claims 48-50 -----	1-11,31, 32,36, 37,44
X	L MITNIK ET AL: "Segregation in DNA solutions induced by electric fields", SCIENCE, vol. 267, no. 5195, 13 January 1995 (1995-01-13), pages 219-222, XP055043197, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.7809626 the whole document -----	1-5, 10-14, 17-25, 28-30, 32-36,44
A	ASBURY C L ET AL: "Trapping of DNA in Nonuniform Oscillating Electric Fields", BIOPHYSICAL JOURNAL, BIOPHYSICAL SOCIETY, US, vol. 74, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 1024-1030, XP003009260, ISSN: 0006-3495 page 1026; figure 4 -----	1,32,36, 44
T	MOHAMED LEMINE YOUBA DIAKITÉ ET AL: "A low-cost, label-free DNA detection method in lab-on-chip format based on electrohydrodynamic instabilities, with application to long-range PCR", LAB ON A CHIP, vol. 12, no. 22, 16 October 2012 (2012-10-16), page 4738, XP055043156, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c2lc40372b the whole document -----	1-44
X	US 2002/039743 A1 (HASHIMOTO KOJI [JP] ET AL) 4 April 2002 (2002-04-04) paragraph [0044]; figure 1 ----- -/--	1-10,12, 13, 17-31, 33-35, 37,44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/055409

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THIBAUT DEFÉVER ET AL: "Real-Time Electrochemical Monitoring of the Polymerase Chain Reaction by Mediated Redox Catalysis", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 131, no. 32, 19 August 2009 (2009-08-19), pages 11433-11441, XP055043151, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja901368m	38-43
A	the whole document -----	12-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2013/055409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002070114	A1	13-06-2002	NONE

US 2005136466	A1	23-06-2005	NONE

US 2010203580	A1	12-08-2010	AT 289065 T 15-02-2005
		AU 4555801 A 24-09-2001	
		CA 2402189 A1 20-09-2001	
		DE 60108848 D1 17-03-2005	
		DE 60108848 T2 09-02-2006	
		EP 1261863 A2 04-12-2002	
		JP 2003527601 A 16-09-2003	
		US 6537433 B1 25-03-2003	
		US 2003057094 A1 27-03-2003	
		US 2006081474 A1 20-04-2006	
		US 2010203580 A1 12-08-2010	
		WO 0169230 A2 20-09-2001	

US 2002039743	A1	04-04-2002	EP 1211507 A2 05-06-2002
			EP 2040068 A2 25-03-2009
			US 2002039743 A1 04-04-2002
			US 2005048558 A1 03-03-2005
			US 2005095637 A1 05-05-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N	21/64		Z
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68		Z N A
G 0 1 N 27/06 (2006.01)	G 0 1 N	27/06		Z

(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, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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

(74) 代理人 100085545

弁理士 松井 光夫

(72) 発明者 ヴィオヴィ, ジャン - ルイ

フランス国, 7 5 0 1 3 パリ, リュ ド レスぺランス 2 6

F ターム (参考) 2G043 BA16 CA04 EA01 EA13 EA14 EA15 FA01 FA02 FA03 NA01
 2G059 BB06 BB12 CC16 EE01 EE02 EE04 EE07 FF01 FF03 FF04
 MM01 MM03
 2G060 AA07 AA15 AD06 AE17 AF06 AF08 AG08 AG10 HC09 HC13
 4B063 QA05 QQ42 QQ52 QX05