

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第6882282号  
(P6882282)

(45) 発行日 令和3年6月2日 (2021. 6. 2)

(24) 登録日 令和3年5月10日 (2021. 5. 10)

|                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| (51) Int. Cl.             | F I              |
| C 1 2 Q 1/6844 (2018. 01) | C 1 2 Q 1/6844 Z |
| C 1 2 Q 1/6869 (2018. 01) | C 1 2 Q 1/6869 Z |
| C 1 2 Q 1/6823 (2018. 01) | C 1 2 Q 1/6823 Z |
| C 1 2 N 15/09 (2006. 01)  | C 1 2 N 15/09 Z  |
| G O 1 N 33/483 (2006. 01) | G O 1 N 33/483 C |

請求項の数 30 (全 37 頁) 最終頁に続く

|                                         |                                                                                                                       |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号 特願2018-522985 (P2018-522985)  | (73) 特許権者 507044516<br>プレジデント アンド フェローズ オブ<br>ハーバード カレッジ<br>アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2<br>1 3 8, ケンブリッジ, クインシー<br>ストリート 1 7 |
| (86) (22) 出願日 平成28年11月3日 (2016. 11. 3)  | (74) 代理人 100079049<br>弁理士 中島 淳                                                                                        |
| (65) 公表番号 特表2019-501635 (P2019-501635A) | (74) 代理人 100084995<br>弁理士 加藤 和詳                                                                                       |
| (43) 公表日 平成31年1月24日 (2019. 1. 24)       | (72) 発明者 ドーハーティー、 エバン アール.<br>アメリカ合衆国 O 2 1 3 8 マサチュー<br>セッツ州 ケンブリッジ カウパースウェ<br>イト ストリート 5                            |
| (86) 国際出願番号 PCT/US2016/060279           |                                                                                                                       |
| (87) 国際公開番号 W02017/079406               |                                                                                                                       |
| (87) 国際公開日 平成29年5月11日 (2017. 5. 11)     |                                                                                                                       |
| 審査請求日 令和1年11月5日 (2019. 11. 5)           |                                                                                                                       |
| (31) 優先権主張番号 62/250, 182                |                                                                                                                       |
| (32) 優先日 平成27年11月3日 (2015. 11. 3)       |                                                                                                                       |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関<br>米国 (US)           |                                                                                                                       |
| 早期審査対象出願                                | 最終頁に続く                                                                                                                |

(54) 【発明の名称】 三次元核酸含有マトリックスの立体撮像のための方法と装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 相対的な 3 D 空間的関係を有する複数の核酸分子を三次元 (3 D) マトリックス内に含む生体試料を提供すること、ここで、前記生体試料は液体試薬を受容するように構成された開放形式フローセルの内部に存在し、前記三次元マトリックスは 5 0 n m 超 5 0 0 n m 未満の孔径を有する；

(b) 前記 3 D マトリックスの内部に複数のアンプリコンを形成するのに十分な条件下で、前記開放形式フローセルの内部に存在する前記生体試料の前記複数の核酸分子を核酸増幅に供すること、ここで、形成された後に、前記複数のアンプリコンは前記 3 D マトリックスに結合させられ、前記相対的な 3 D 空間的関係を有する；

(c) Z 軸リニアモーターを用いて、対物焦点面の前記生体試料を通しての Z 移動を実行すること；

(d) 前記複数のアンプリコンが前記 3 D マトリックスに結合している間に前記複数のアンプリコンを核酸配列決定に供すること、ここで核酸配列決定は

(i) 前記複数のアンプリコンを検出可能な標識に順次接触させること、及び  
(i i) 検出器を使用して、前記検出可能な標識に対応する、前記 3 D マトリックスからのシグナルを取得すること、

を含み、ここで前記シグナルは、前記生体試料の中に焦点を維持するように Z 軸の閉ループ制御を用いて、前記 Z 移動の際に複数の対物焦点面から前記検出器によって取得され、前記複数のアンプリコンは前記核酸配列決定中に温度変化を受け、前記温度変化時に生

成される熱は液体冷却システムによって放熱される；並びに

(e) (d) で前記複数の対物焦点面から前記検出器によって取得された前記シグナルを使用して、前記複数のアンプリコンの 3 D 立体画像を生成すること、ここで前記 3 D 立体画像は前記複数のアンプリコンの前記相対的な 3 D 空間的関係を特定する、を含む、核酸分析の方法。

【請求項 2】

(b) が、前記複数のアンプリコンを前記 3 D マトリックスに結合することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記複数のアンプリコンのうちのアンプリコンが、形成された後に、前記 3 D マトリックスに共有結合させられる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

(a) より前に、(i) 前記生体試料中にマトリックス形成材料を導入すること、及び (i i) 前記マトリックス形成材料を使用して前記 3 D マトリックスを形成すること、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記生体試料が細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 3 D マトリックスは前記細胞の中にあり、(d) において前記シグナルは前記細胞の内部から取得される、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記シグナルが蛍光シグナルである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記生体試料が組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出器は、前記複数の対物焦点面から前記シグナルを、(i) ホログラムとして、(i i) 前記複数の対物焦点面から同時に、又は (i i i) 前記複数の対物焦点面の各対物焦点面から順次、取得する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 3 D マトリックスがポリマー材料を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記 3 D マトリックスに対する共有結合を形成するために前記複数のアンプリコンのうちのアンプリコンが官能化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記シグナルは、前記 3 D マトリックス内部の前記複数の対物焦点面から同時に取得される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記シグナルは、前記複数のアンプリコンが前記検出可能な標識と接触している間に取得される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

40

(e) は (d) で取得された前記シグナルを使用して前記複数のアンプリコンの配列を決定することをさらに含み、前記複数のアンプリコンの前記 3 D 立体画像は前記配列を特定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

(d) は

(i) サブ配列を有する複数の検出プローブに、前記複数のアンプリコンを接触させること、

(i i) 前記検出可能な標識を前記サブ配列の少なくともサブセットに順次結合させること、及び

(i i i) 前記サブ配列の配列を決定することによって前記複数のアンプリコンの少

50

なくともサブセットの配列を決定すること  
をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記生体試料がステージ上の試料ホルダーの中に配置され、前記配列決定の間に前記ステージに対する前記検出器の位置を調整して前記複数の対物焦点面から前記シグナルを取得する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記複数の対物焦点面が前記検出器の複数の焦点面である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

相対的な三次元（3 D）空間的關係を有する複数の核酸分子を 3 Dマトリックス内に含む生体試料を保持するように構成された支持体、ここで、前記生体試料は液体試薬を受容するように構成された開放形式フローセルの内部に存在し、前記三次元マトリックスは 50 nm 超 500 nm 未満の孔径を有する；

前記生体試料からの一つ以上のシグナルを検出するように構成された検出器；

対物焦点面の前記生体試料を通しての Z 移動を実行するように構成された Z 軸リニアモーター；

前記生体試料の中に焦点を維持するための Z 軸の閉ループ制御；

放熱するように構成されている液体冷却システム；及び

前記検出器及び前記 Z 軸リニアモーターに作動可能に接続されたコンピューターを含み、前記コンピューターが

（a）前記 3 Dマトリックスの内部に複数のアンプリコンを形成するのに十分な条件下で、前記開放形式フローセルの内部に存在する前記生体試料の前記複数の核酸分子を核酸増幅に供する、ここで、形成された後に、前記複数のアンプリコンは前記 3 Dマトリックスに結合させられ、前記相対的な 3 D空間的關係を有する；

（b）前記生体試料を通しての対物焦点面の Z 移動を実行するように前記 Z 軸リニアモーターを仕向ける；

（c）前記複数のアンプリコンが前記 3 Dマトリックスに結合している間に前記複数のアンプリコンを核酸配列決定に供する、ここで核酸配列決定は

（i）前記複数のアンプリコンを検出可能な標識に順次接触させること、及び

（i i）前記検出器を使用して、前記検出可能な標識に対応する、前記 3 Dマトリックスからのシグナルを取得すること、

を含み、ここでシグナルは、前記生体試料の中に焦点を維持するように Z 軸の閉ループ制御を用いて、前記 Z 移動の際に複数の対物焦点面から前記検出器によって取得され、前記複数のアンプリコンは前記核酸配列決定中に温度変化を受け、前記温度変化時に生成される熱は前記液体冷却システムによって放熱される；並びに

（d）（c）で前記複数の対物焦点面から前記検出器によって取得された前記シグナルを使用して、前記複数のアンプリコンの 3 D立体画像を生成する、ここで前記 3 D立体画像は前記複数のアンプリコンの前記相対的な 3 D空間的關係を特定する

ように構成されている、核酸分析用のシステム。

【請求項 1 9】

前記検出器を含む光学アセンブリをさらに含み、前記光学アセンブリが 1 つ以上の光軸を含む、請求項 1 8 に記載のシステム。

【請求項 2 0】

前記光学アセンブリが、前記支持体と光学的連結しているように構成された一つ以上の対物レンズを含む、請求項 1 9 に記載のシステム。

【請求項 2 1】

前記対物焦点面の位置を調整するための軌道とエンコーダフィードバックを備えたモーターとをさらに含む、請求項 1 8 に記載のシステム。

【請求項 2 2】

前記生体試料が前記光学アセンブリに対して再現性よく配置されるように一つ以上の動

10

20

30

40

50

作軸に関して前記支持体の表面をマッピングするように構成されたマッピングユニットをさらに含む、請求項 19 に記載のシステム。

【請求項 23】

前記マッピングユニットが、前記光学アセンブリと前記試料との間の一つ以上の距離測定値を取得するように構成されたオートフォーカスユニットを含む、請求項 22 に記載のシステム。

【請求項 24】

前記マッピングユニットが、位置エンコーダーに対する、前記一つ以上の動作軸に沿った一つ以上のずれを計算するように構成されている、請求項 22 に記載のシステム。

【請求項 25】

前記支持体に作動可能に接続されており、前記核酸増幅を容易とするために前記複数の核酸分子を熱サイクリングに供するように構成された、加熱又は冷却ユニットをさらに含む、請求項 18 に記載のシステム。

【請求項 26】

プログラムされた量の試薬を前記生体試料に送達するように構成された流体ディスペンサーをさらに含む、請求項 18 に記載のシステム。

【請求項 27】

前記 Z 軸リニアモーターが前記 Z 移動のためのリニアエンコーダフィードバックを含む、請求項 18 に記載のシステム。

【請求項 28】

前記複数の対物焦点面から前記シグナルを取得するために前記支持体に対する前記検出器の位置を調整可能である、請求項 18 に記載のシステム。

【請求項 29】

前記コンピューターは、(c) において取得された前記シグナルを使用して前記複数のアンプリコンの配列を特定するように構成されており、

前記複数のアンプリコンの前記 3D 立体画像は前記配列を特定する、  
請求項 18 に記載のシステム。

【請求項 30】

前記検出器は、前記複数の対物焦点面から前記シグナルを、(i) ホログラムとして、(i i) 前記複数の対物焦点面から同時に、又は (i i i) 前記複数の対物焦点面の各平面から順次、取得するように構成されている、請求項 18 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願データ

本願は 2015 年 11 月 03 日に出願された米国特許仮出願第 62/250182 号の優先権を主張し、全ての目的のために前記仮出願の全体をここに参照により本明細書に援用する。

政府の権利に関する説明

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所によって与えられた助成番号 P50HG005550 の国庫補助、米国国立衛生研究所によって与えられた助成番号 RC2HL102815 の国庫補助、米国国立衛生研究所によって与えられた助成番号 MH098977 の国庫補助、米国国立衛生研究所によって与えられた助成番号 GM080177 の国庫補助、及び米国国立科学財団によって与えられた助成番号 DGE1144152 の国庫補助によって行われた。政府は本発明にある一定の権利を有する。

本発明の分野

【0003】

本発明は、核酸を含む三次元マトリックスを立体撮像するための方法及び装置に関する。ここで前記核酸は前記マトリックス内部で増幅し、検出し、配列決定されている。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0004】

R N A及びタンパク質などの多数の遺伝子産物は、それらが機能する領域に濃縮されるため、遺伝子産物の位置は機能に対する重要な手がかりを与える。この性質は多くの生物学研究分野においてin situ蛍光ハイブリダイゼーション、免疫組織化学及び組織特異的レポーターアッセイに活用されてきた。大半の光学的配列決定法では、光学的検出に向けて空間的不変性を維持するために、配列決定処理時に二次元固形基材又はマイクロウェル／マイクロチャンバーのどちらかを利用して配列決定鋳型を固定化し、それによって単一の核酸鋳型配列の復元を可能とする。いずれの場合もシグナルの光学的検出は多くても2つの二次元平面で起こる。

10

## 【発明の概要】

## 【0005】

本発明の実施形態は、固定された生体試料などの三次元マトリックス内での核酸の立体撮像、及び固定された生体試料などの三次元マトリックス内での核酸の立体撮像のための装置に向けられている。蛍光シグナルによって、又は光学的にコードされたシグナルが三次元で立体撮像によって検出される。ある態様では、三次元マトリックス内での分子の三次元配置が決定される。ある特定の態様では、立体検出、撮像、及び復元の方法によって任意の立体を撮像するための方法が提供される。例示的立体検出方法には、オプティカルセクションングを活用する光学的切片の立体撮像のための方法（例えば、立体の隅々までの像の二次元的取得）、並びにオプティカルセクションングを活用しない方法（例えば、デジタルホログラフィー及び物理的切片作製）の両方が含まれる。

20

## 【0006】

本開示の態様には、配列決定時に核酸配列決定鋳型の固定化のために三次元マトリックスを使用して、配列決定鋳型間の三次元の空間的關係を維持し、配列と三次元位置情報の両方の検出及び復元を可能にする、in situ核酸配列決定方法が含まれ得る。本明細書に記載される例示的方法はタンパク質及び細胞膜などの三次元生物学的特性を再構築することにも向けられている。例示的立体撮像法には、本明細書に記載される方法、及び、三次元空間の中で光シグナルをシステムティックに、又は他の方式で測定する、当技術分野において知られている方法が含まれる。よって、本開示の態様には、in situ配列決定される核酸の立体撮像のための方法と装置が含まれる。本開示の態様には、in situ配列決定される核酸の立体撮像のための自動化方法と自動化装置がさらに含まれ、それには、in situ配列決定の方法又は装置、試薬の流れを調節し且つ試薬を送達するためのフルイディクス方法又は試薬送達方法若しくは試薬送達装置、及び、in situ配列決定される核酸もしくは他の分子又は目的の構造体からの光シグナルを撮像及び／又は検出するための立体撮像法又は立体撮像装置が含まれる。ある特定の態様では、本明細書に記載される方法及び装置は核酸に限定されない。例えば、蛍光部分及び他の当業者に知られている検出可能部分などの検出可能部分を使用して検出可能な、三次元マトリックス内のあらゆる分子又は構造体が、本明細書に記載される立体撮像法の対象であり得る。そのような分子又は構造体にはD N A、R N A、タンパク質、生体分子、細胞構造体などが含まれ得る。

30

## 【0007】

核酸配列の三次元マトリックスを作製し、核酸配列を増幅し、核酸配列を配列決定し、そして核酸配列を撮像する例示的方法は、参照により全体を本明細書に援用する国際出願P C T／U S 2 0 1 4／1 8 5 8 0号明細書において提供される。かかる方法には共有結合してマトリックスになった核酸、又は共有結合してマトリックス材料になるか、又はマトリックス材料に共有結合した核酸を含む三次元マトリックスを作製することが含まれる。核酸は、前記マトリックス材料と共重合されるか、又は前記マトリックス材料に架橋されるか、又は両方であり得る。ある態様では、ある長さのD N A配列又はR N A配列などの複数の核酸配列が三次元共重合体の一部である。ある態様では、所与の長さのD N A配列又はR N A配列などの核酸がマトリックス材料に共有結合して前記マトリックス内でX軸、Y軸、及びZ軸での空間的配向を保存する。前記三次元マトリックスにはマトリックス

40

50

ス材料が含まれることがあること、及び共重合体、マトリックス、及びマトリックス材料という言葉は互換的に使用されうることを理解すべきである。有用な方法には天然の核酸を自然環境内、例えば、細胞内又は組織試料内で固定化することも含まれる。細胞、組織、又は他のあらゆる複合的生体物質の中で天然の核酸配列の多様性（DNA及びRNA等）と空間的配向を保存するために、細胞内又は組織試料内においてin situで三次元核酸マトリックスを作製することができる。この態様では、核酸の位置及び相対的配置は、三次元構造体として、例えば、細胞内コンパートメント内に、細胞内に、組織内に、三次元核酸集合体として、三次元核酸物質等として特定される。核酸を所望によりin situで増幅及び配列決定することができ、それによって細胞内又は組織内での核酸の位置情報を提供することができる。

10

**【0008】**

関連する態様では、目的の核酸又は目的の他の分子は、天然物であれ、合成物であれ、三次元マトリックス材料内に存在することができ、且つ、前記三次元マトリックス材料内で各核酸の相対的位置が固定される、すなわち、不動化されるように前記三次元マトリックス材料に共有結合され得る。このように、あらゆる所望の配列を有する共有結合した核酸の三次元マトリックスを提供する。各核酸は前記マトリックス材料内に独自の三次元座標を有し、各核酸が情報を表す。ある態様では、DNA又はRNAなどの個々の核酸はin situで、すなわち、前記マトリックス内で増幅及び配列決定され得る。

**【0009】**

さらなる態様では、前記核酸を増幅して前記三次元マトリックス材料内でアンプリコンを作製することができる。その後、アンプリコンを、例えば共重合又は架橋によって前記マトリックスに共有結合することができる。これにより構造的及び化学的に安定な核酸の三次元マトリックスが生じる。この態様では、前記核酸の三次元マトリックスによって情報保存及び読み出しサイクルを延長することができる。前記核酸／アンプリコンマトリックスによって、三次元での生体試料及び非生体試料のワイドレンジアレイのハイスループット配列決定が可能になる。

20

**【0010】**

ある特定の態様では、DNA又はRNAなどの複数の核酸分子、アンプリコン又は核酸構造単位がマトリックスへの共有結合により三次元空間で相互に対して固定化されている三次元核酸マトリックスが提供される。ここで核酸分子は前記マトリックス内で座標位置を維持する程度にまで強く固定されている。核酸分子が三次元マトリックス材料に共有結合し得るとしても前記核酸分子自体は前記マトリックスに結合されているとはいえ、例えば核酸配列が前記核酸上の単一の場所で前記マトリックスに結合しているときなどは移くことが可能である場合があることを理解すべきである。

30

**【0011】**

ある態様では、核酸を含む前記三次元マトリックスは多孔性である。ある態様では、核酸を含む前記三次元マトリックスは、増幅法において典型的に使用される試薬が前記マトリックスを通じて拡散するか、又は他の場合では移動して拡散と接触し、それによって適切な条件下で核酸を増幅することができる程度まで、多孔性である。多孔性は前記マトリックス材料を作製するために使用される分子の重合及び／又は架橋から生じ得る。ゲルマトリックス内での拡散性は主に孔径の関数である。増幅と配列決定に使用される酵素、オリゴヌクレオチド、ホルムアミド、及び他の緩衝物の迅速な拡散を可能にするために分子ふるいサイズ（50 nm超）が選択される。大きなDNAアンプリコン又はRNAアンプリコンが前記マトリックス内で容易に拡散しないようにも分子ふるいサイズ（500 nm未満）が選択される。共重合される分岐モノマーの架橋密度、鎖長、及びパーセンテージを当業者に知られている方法に従って変更することにより、多孔性が制御される。

40

**【0012】**

ある態様では、前記三次元マトリックス材料は化学的に不活性であり、且つ、様々な反応条件及び反応温度を許容しうる程度の熱安定性を有する。この態様では、前記三次元マトリックス材料は化学的に不活性であり、且つ、当業者に知られている増幅及び配列決定

50

方法に使用される条件に対して熱安定性を有する。

【0013】

ある態様では、前記三次元マトリックス材料は光学的に透明である。ある態様では、前記三次元マトリックス材料は、当業者に知られている三次元撮像技術が可能になるほど光学的に透明である。

【0014】

ある態様では、前記核酸は、三次元撮像のために十分なレベルのアンプリコンを作製する程度まで増幅される。例えば、前記核酸は、増幅され、且つ、三次元撮像に適合可能な高レベルの蛍光のために十分な標識を含む。

【0015】

ある態様では、核酸分子が天然環境から抽出されることを回避するため、前記マトリックスを形成するために使用される材料は広範囲の生体試料及び非生体試料とin situで適合可能なものである。

【0016】

ある態様では、前記マトリックス材料は、ポリアクリルアミド、セルロース、アルギン酸、ポリアミド、架橋アガロース、架橋デキストラン、又は架橋ポリエチレングリコールから作製され得る半固形媒体であり得る。ある特定の態様では、前記半固形媒体はX軸、Y軸、及びZ軸を有し、核酸は前記三次元マトリックス内で不規則的に又は規則的に存在する。

【0017】

ある特定の態様では、前記半固形媒体は顕微鏡のスライドガラス又はフローセルなどの固形支持体に取り付けられ得る。前記固形支持体は前記半固形媒体の底面に取り付けられ得る。

【0018】

ある態様では、試薬が収容される1つ以上のリザーバー、前記マトリックスに前記試薬を導くためのチャンネル又は導管、及び前記リザーバーから前記チャンネル又は導管を通して前記マトリックスへの前記試薬の押し出し又は引き抜きを行うための1台以上のポンプを含む、フルイディクス装置又はマイクロフルイディクス装置を使用する等により前記マトリックスに試薬を注入するための、自動化方法及び自動化装置が提供される。前記自動化方法及び自動化装置はマイクロプロセッサ及びソフトウェアによって制御され得る。

【図面の簡単な説明】

【0019】

本発明の前述及び他の特徴と利点は、添付図面と併せて以下の例示的な実施形態の詳細な説明により、さらに十分に理解されよう。

【図1】細胞内の核酸のマトリックスをin situで作製し、続いてDNA又はRNAなどの当該核酸をin situで増幅し、アンプリコンをin situで共重合し、アンプリコンをマトリックス材料に共有結合し、アンプリコンのデータを取得し、そして10-7mのオーダーでDNA/RNAアンプリコンを含む復元3D細胞画像に沿ってアンプリコンの撮像を行う過程を模式的に示す図である。

【図2】自動配列決定-三次元立体撮像デバイスの要素の模式的な斜視図である。

【図3】自動配列決定-三次元立体撮像デバイスの要素の模式的な正面図である。

【図4】自動配列決定-三次元立体撮像デバイスの要素の模式的な斜視図である。

【図5】自動配列決定-三次元立体撮像デバイスの試料ホルダーを含むステージの模式的な斜視図である。

【図6】本明細書に記載される実施形態に有用な例示的模式的タイミング図である。

【図7】例示的TTL通信構造の態様を示す例示的模式的ブロック図である。

【図8】配列決定装置フルイディクスサブシステム、撮像サブシステム、及びデュアルステージサブシステムの例示的タイミング、及びリソース利用タイミング図を示す図である。

【図9】デュアルステージサブシステム、フルイディクスサブシステム、及び撮像サブシ

10

20

30

40

50

システムの制御装置構成を示す例示的模式のブロック図である。

【図10】対物レンズの状態及び前記インターフェイスとの接続を管理するための例示的装置システムを示す図である。

【図11】撮像軸に対して相対的に試料を反復可能にXYZ配置するための経時的なフローチャートである。

【図12】固形基材を含む試料ホルダーの表面をマッピングするための例示的システムを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、三次元マトリックス内の複数の核酸等、三次元マトリックス内に存在する分子を分析するための方法及び装置を提供する。ある態様では、三次元マトリックス内の蛍光的又は光学的にコードされた核酸配列決定を評価するために三次元空間の中で光シグナルを測定し、分解し、且つ、所望により光シグナルの位置を明らかにすることができる自動配列決定—三次元撮像デバイス（すなわち、立体撮像システム）が提供される。

【0021】

ある態様では、前記核酸は、光学的に検出可能であるように、当業者に知られている光学的配列決定法を用いて増幅及び配列決定されている。ある態様では、三次元撮像装置、液体交換用装置、温度制御用装置、及び計算分析用装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。前記自動配列決定—三次元撮像デバイスは、蛍光又は光学的にコードされた核酸配列決定、画像データの取得、及び所望によりデータ処理を実行するために生化学的方法を用いる。

【0022】

ある態様では、光学的に検出可能であるように当業者に知られている光学的配列決定法で増幅及び配列決定された三次元マトリックス内の複数の核酸が、立体撮像される。この態様では、蛍光又は光学的にコードされた核酸配列決定の化学反応の検出時に、励起されると三次元内で核酸鋳型分子又は多分子性アンプリコンから光が放出される。点光源を撮影すると、点拡がり関数と呼ばれる放出光の三次元分布が光学系によって作成される。伝統的な広視野顕微鏡観察システムでは、Zの点光源から焦点面の距離が増加するにつれ、前記画像は点状ではなくなる。各焦点はずれ面においての総積分強度は焦点面においてのものと同一であるが、実際には、ある特定の距離の後には前記強度レベルは検出器の感度より下に落ちる。焦点はずれ光も散乱し、強度が焦点はずれ背景よりも高い別の焦点面の物体の解像を可能にする。点拡がり関数のサイズと形状は光学系、特に対物レンズの開口数によって決定される。この様に、立体を撮像するために広視野顕微鏡法を用いることができるが、追加的方法ではより高い軸方向分解能とシグナル・ノイズ比が達成される。

【0023】

本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスにおいて用いられる例示的立体撮像法は、大きく2つのカテゴリー、すなわち、構造化照明法と放出光処理法とに分けられる。追加的方法には放出光の角度成分をコンピューターにより復元し測定することが含まれる。これらの方法によって、三次元空間の中における光の強度と波長をシステムティックに測定する。

【0024】

ある態様では、3D構造化照明法（3DSIM）を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。3DSIMでは空間的にパターン化された光が励起のために使用され、照明パターンと試料の干渉により生じたモアレパターンの干渉縞が三次元で光源を復元するために使用される。視野全体を照明するために複数の空間的パターンを用いて同じ物理的領域を励起する。デジタル処理又はアナログ的方法が最終的な画像の復元のために用いられる。それぞれ参照により全体を本明細書に援用するYork, Andrew G. 著、「Instant super-resolution imaging in live cells and embryos via analog image processing.」Nat

10

20

30

40

50

ure methods誌、第10巻、第11号(2013年):1122~1126頁、及びGustafsson, Mats GLら著、「Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination.」Biophysical journal誌、第94巻、第12号(2008年):4957~4970頁を参照されたい。

#### 【0025】

二光子顕微鏡法又は多光子顕微鏡法は有用な構造化照明顕微鏡法である。参照により全体を本明細書に援用するDenk W., Strickler J., Webb W. 著、(1990年)「Two-photon laser scanning fluorescence microscopy」Science誌、第248巻(第4951号):73~6頁を参照されたい。二光子顕微鏡法は一回の励起事象に2光子を使用することにより試料内を深く撮影することを可能にする一種の顕微鏡法である。これらのシステムは散乱度の低下のために組織の中により効果的に透過する長波長光を励起のために使用することが典型的である。単光子の吸収では蛍光分子による光放射を励起するには不十分なエネルギーしか与えられないので、二光子励起の使用によってもバックグランドシグナルが低下する。走査時に経時的な励起の局在が撮像システムについても知られているので、二光子顕微鏡法は光放射を検出するためにより大規模、又はより効率的な光学的構成及びセンサ構成を利用することも可能である。このモダリティの他の利益としては試料への光損傷が少ないことがある。

#### 【0026】

ある態様では、選択的平面照明顕微鏡法(SPIM)又は光シート顕微鏡法(LSM)などの面状照明方法を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。SPIMでは第三次元の各平面で光学的検出部分が選択的に励起され、一方で照明軸に対して直交する平面において二次元像が取得され、第三次元において分布する物体と物体との間を撮像時間/撮像フレームにわたって効果的に分離する。参照により全体を本明細書に援用するHuisken, Janら著、「Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy.」Science誌、第305巻、第5686号(2004年):1007~1009頁を参照されたい。平面のシステムティックな連続撮影によって立体測定が行われる。ガウスビーム成形及びベッセルビーム成形などのあらゆる数の方法を用いて面状照明光を生成しうる。

#### 【0027】

ある態様では、焦点はずれ光が検出器に到達することを阻止する1つ以上のピンホールがレンズの共焦点平面に配置される共焦点顕微鏡法などの放出光処理法を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。レンズの焦点面が第三次元にわたって体系的にずらされ、立体撮像が可能になる。参照により全体を本明細書に援用するWilson, Tony著、「Confocal microscopy.」Academic Press:London、等、426(1990年):1~64頁を参照されたい。

#### 【0028】

ある態様では、共焦点撮像又は顕微鏡法を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。ある特定の態様では、共焦点撮像又は顕微鏡法はレーザー走査型共焦点モダリティである。別の態様では、前記共焦点モダリティはスピニングディスク型共焦点モダリティである。前記スピニングディスクはニプコー円板であってよい。別の態様では、前記共焦点顕微鏡法は、ミラー式ガルバのメーターを使用する等によって試料の隅々まで2つ以上のピンホールが走査される、並行ビーム走査型レーザーモダリティである。前記共焦点モダリティは、励起光をピンホールアレイに集中する等のために1つ以上のマイクロレンズアレイを含んでもよい。

## 【0029】

ある態様では、開口相関を含む並行共焦点方法を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。参照により全体を本明細書に援用するWilson, Tonyら著、「Confocal microscopy by aperture correlation.」Optics letters誌、第21巻、第23号（1996年）：1879～1881頁を参照されたい。

## 【0030】

ある態様では、明視野顕微鏡法として知られる立体撮像用マイクロレンズアレイを用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。参照により全体を本明細書に援用するBroxtonら著、（2013年）「Wave Optics Theory and 3-D Deconvolution for the Light Field Microscope」Stanford Computer Graphics Laboratory Technical Report、2013-1を参照されたい。この態様では、主要レンズと検出器との間のマイクロレンズアレイによって光が通され、検出される明視野に集中し、そうでなければ中間平面に光が集中する。3D復元アルゴリズムを適用して立体画像を生成する。

## 【0031】

ある態様では、スライスからの立体復元方法を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。任意寸法の立体を撮像するこの態様では、撮像目的のために試料を任意寸法の部分に切り分けてよい。元の立体に対しての、撮影された各部分の相対的位置の情報を用いて、元の立体を復元する。この過程は通常「連続切片の取得」と呼ばれ、拡散のために試料中の深い部分への試薬の浸透が限定される場合がある厚みのある試料の操作と標識に限界があることに加えて、立体撮像法の走査深度が限られていることから、この過程が用いられる。特別な事例では、光の回折限界よりも切片が薄い場合があり、光の回折限界が達成可能な解像度を超える解像度が切片作製軸で可能になる。本明細書に記載される連続切片方法からの3D立体復元によると、3D配列決定ライブラリーの構築前、又は構築後のどちらかで試料を切片に切り分けるが、具体的には切片間の空間的關係が保存されるように切片に切り分ける。例えば、フローセルの各ウェルに一枚の切片を配置し、切片に固有の識別を与える。切片作製時に、具体的には試料マトリックスと固形基材との間に共有結合による架橋を作製することにより、又は新規封入性構造マトリックスを作製することにより、試料を固形支持基材に取り付ける。ある態様では、官能化ガラスに切片を移し、ガラスと試料の3Dマトリックスとの間に共有結合による化学架橋を形成する。ある態様では、官能化ガラスに切片を移し、ガラス表面に共有結合した新規支持マトリックスを形成して試料を封入し、新規支持マトリックスが構造支持を与える。例えば、4%の1：19のアクリルアミド：ビスゲルを生体試料切片の周り及び内部にFISSEQのための一次3Dマトリックスとして形成するか、又は既存のFISSEQゲル（一次3Dマトリックスとしてポリアクリルアミドマトリックスを使用して形成されたものを含む）を切片に切り分け、二次3D安定化マトリックス中に包埋する。

## 【0032】

ある態様では、顕微鏡の光学的要素の影響を取り除くためにデジタル画像データを処理するコンピューターアルゴリズム的方法を含むデコンボリューション顕微鏡法を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。参照により全体を本明細書に援用するBiggs, David SC. 「3D deconvolution microscopy.」Current Protocols in Cytometry（2010年）：12～19頁を参照されたい。光学的顕微鏡法は三次元において存在する点拡がり関数として点光源を検出するので本明細書に記載されるデコンボリューション方法は、多くの場合に光学系の点拡がり関数のモ

10

20

30

40

50

デル又は測定値に用いて、焦点はずれ光を点光源に割り当てし直す。これが三次元での解像度を効果的に上昇させることに役立ち得る。

【0033】

ある態様では、同時に1つ以上のカメラフレームに記録される即席の一連の焦点面の2D広視野画像を作成するためにフーリエ回折光学を用いる、複数の試料平面から画像を同時にキャプチャするための収差補正多焦点顕微鏡法を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。参照により全体を本明細書に援用するAbrahamsen, Saraら著、「Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy.」Nature methods誌、第10巻、第1号（2013年）：60～63頁を参照されたい。マイクロレンズアレイ顕微鏡法では、部分の機械的移動を行わずに全立体撮像を記録する。

10

【0034】

ある態様では、デジタルホログラフィック顕微鏡法を用いて三次元マトリックスを撮影する三次元撮像装置を含む自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。この態様では、デジタルホログラフィック顕微鏡法は映像を記録するのではなく、むしろホログラムとしての光波面情報を記録する。参照により全体を本明細書に援用するManoharan著、「Digital Holographic Microscopy for 3D Imaging of Complex Fluids and Biological Systems」を参照されたい。デジタルセンサを使用して光の振幅と位相を測定する。ホログラムは立体の復元に必要な全ての情報を含んでいる。物体波面が複数の角度から測定されれば、物体の全ての光学的特徴が十分に解明されうる。結像レンズが無いので、光学系のモデルを形成する復元アルゴリズムによって立体が収差無く復元される。

20

【0035】

ある態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスは、1つ以上の立体撮像法を実行する1種類以上の立体撮像装置を含む等によって、1つ以上の立体撮像法を実行することができる。本明細書に記載されるような立体撮像法の組合せを用いて解像度、撮像速度、光効率をさらに向上するか、又はその他の利益を得てもよい。例えば、SIMの原理と共焦点顕微鏡法の原理が組み合わせられて多焦点SIM (mSIM) になっている。参照により全体を本明細書に援用するYork, Andrew G. 著、「Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy.」Nature methods誌、第9巻、第7号（2012年）：749～754頁を参照されたい。また、スライスの立体復元を共焦点顕微鏡法などの他の方法と組み合わせてよく、それは共焦点顕微鏡法が数百ミクロンの深度限界を有しており、一方で任意寸法の三次元マトリックス内で配列決定することが望ましいからである。

30

【0036】

ある態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスは1種類の画像センサを有する撮像法を備える。別の態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスは2種類以上の画像センサを有する撮像法を備える。ある態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスは4種類の画像センサを有する撮像法を備える。ある態様では、前記画像センサは光子増幅管 (PMT) である。別の態様では、前記画像センサは電荷結合素子 (CCD) である。別の態様では、前記画像センサは相補型金属酸化膜半導体 (CMOS) である。ある態様では、前記画像センサは、例えば電気ノイズを減少させる目的のため、又は前記センサの熱作動条件を安定させるために、組み込まれた空冷装置又は液冷装置によって冷却される。さらにこの態様では、ファン等による動作中の空冷と比べて振動の少ない冷却が、液冷装置によって行われる場合がある。前記冷却装置又は冷却ユニットは温度変化時に生成される熱を放熱するために、ファンと併せてヒートシンクを使用してよい。前記加熱冷却装置又は加熱冷却ユニットは、

40

50

温度変化時に生成される熱を放熱するために、放熱器と液体冷却／循環システムを使用してよい。前記加熱冷却装置又は加熱冷却ユニットは、マイクロコントローラー又は作業組込み型電子回路であり得る制御システムに温度フィードバックを提供するために、温度センサ又はサーミスタを使用してよい。

#### 【0037】

ある態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスは、1種類以上の別個の色の光の検出のためにカラーマルチプレクサを備える。1種類以上の蛍光放射体から放射される光は検出器によって検出される。ある特定の態様では、前記検出器はある特定の波長を有する光の光子を検出するように構成されている。別の態様では、前記放出光は、光子検出器によってある特定の波長の光子だけが検出されるようにフィルター処理される。さらに別の態様では、前記装置はある特定の波長の光を導くための1種類以上の検出フィルター、励起フィルター、及び／又はダイクロイックを光学系内に含む。さらにある態様では、前記装置は、ある特定の検出器又は複数の検出器にある特定の波長の光を導くための、1種類以上の音響光学的チューナブルフィルター（AOTF）を含む。ある態様では、複数の色の光シグナルが続けて検出される。別の態様では、2種類以上の区別可能な色の光が1つ以上のセンサによって並行して検出される。

#### 【0038】

ある態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスは、2種類以上の色の光を続けて、又は並行して検出するために、使用される。ある態様では、検出される色の光は電磁スペクトルに沿って一定の間隔を保つことで色と色との間の識別を容易にしている。ある特定の態様では、蛍光シグナルは発光波長について電磁スペクトルに沿って一定の間隔を保つことである特定の蛍光部分の特異的な検出を容易にしている。ある特定の態様では、蛍光シグナルは励起波長について電磁スペクトルに沿って一定の間隔を保つことである特定の蛍光部分の特異的な励起を容易にしている。1つの例示的態様では、複数の色の放出光は約510 nm、約570 nm、約620 nm、及び／又は約680 nmの辺りに分布する。別の例示的態様では、複数の色の励起光は約480 nm、約530 nm、約590 nm、及び／又は約640 nmの辺りに分布する。

#### 【0039】

ある態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスは1つ以上の光源を備える。ある態様では、前記光源は試料による蛍光発光を励起する目的で使用される。別の態様では、前記光源は前記光と試料との間での吸光、ラマン散乱、又は他のモダリティの相互作用を検出する目的で使用される。ある特定の態様では、前記光源は1種類以上の発光ダイオード（LED）から構成される。別の態様では、前記光源は1種類以上のレーザーから構成される。別の態様では、前記光源は水銀ランプ又はメタルハライドランプなどの1種類以上のランプから構成される。ある特定の態様では、前記光源は光無線通信によって前記装置に結合され、光が光源から前記デバイスの光学系までにガス又は真空を通して伝播する。別の態様では、前記光源は光ファイバー又は液体ライトガイドによって前記装置に結合される。例示的態様では、方形コアを有する光ファイバーに沿って光の全体又は一部が伝導される。さらにこの態様では、前記方形コアは正方形の開口部又は正方形の視野絞りと組み合わせられる。さらにこの態様では、前記方形コア及び／又は方形開口部の寸法は光学系内の画像センサの寸法に合致するように設計されてよい。ある特定の態様では、複数の色の光を単一のファイバーにまとめる機構として複数のファイバーが融合される。ある特定の態様では、複数の色の光を単一のファイバーにまとめる機構として複数のファイバーが光学的にまとめられる。ある特定の態様では、光学系への光の伝播、又は光学系を通過する光の伝播を制御するために、励起光がシャッターを通過する。ある態様では、光学系への光の伝播、又は光学系を通過する光の伝播を制御するために、音響光学的チューナブルフィルター（AOTF）を使用する。ある特定の態様では、光学系への光の伝播、又は光学系を通過する励起光の伝播は、前記デバイス内での1つ以上の事象を同期させる目的のために、コントローラー系と機械的、電氣的、又は電気機械的に結合される。

10

20

30

40

50

## 【0040】

ある態様では、本明細書に記載される自動配列決定—三次元撮像デバイスが分析する試料は、複数の核酸が結合した三次元マトリックスである。ある態様では、前記マトリックスは三次元核酸含有ポリマーである。核酸は天然核酸であっても、合成方法を用いて作製された核酸などの非天然核酸であってもよい。前記三次元マトリックス内の核酸は順序付けられても（ordered）順序付けられなくても（unordered）よい。前記三次元マトリックス内の核酸は細胞内、組織内、又は生物内におけるそれらの空間的關係で存在してよい。前記三次元マトリックス内の核酸は例えば規則的なアレイ又は反復アレイを有する前記三次元マトリックス内において行と列に並んで存在してよい。

## 【0041】

ある態様では、前記核酸は前記マトリックスへの結合のための機能性部分を組み込むように修飾される。前記機能性部分は前記マトリックスに共有結合によって架橋されるか、前記マトリックスと共重合するか、又は前記マトリックスに非共有結合で結合され得る。前記機能性部分は架橋剤と反応し得る。前記機能性部分はリガンド・リガンド結合ペアの一部であり得る。dNTP又はdUTPを官能基で修飾することができ、それによって増幅時に前記機能性部分がDNAに導入される。適切な例示的機能性部分にはアミン、アクリダイト、アルキン、ビオチン、アジド、及びチオールが含まれる。架橋の場合では、前記機能性部分を修飾型のdNTP、dUTP又は両方に架橋する。適切な例示的架橋剤反応基にはイミドエステル（DMP）、スクシンイミドエステル（NHS）、マレイミド（Sulfo-SMCC）、カルボジイミド（DCC、EDC）及びフェニルアジドが含まれる。本開示の範囲内の架橋剤はスペーサー部分を含んでよい。そのようなスペーサー部分は官能化されてよい。そのようなスペーサー部分は化学的に安定であってよい。そのようなスペーサー部分は前記マトリックスに結合した核酸の増幅を可能にするほど十分に長くてよい。適切な例示的スペーサー部分としてはポリエチレングリコール、カーボンスペーサー、光切断性スペーサー及び当業者に知られている他のスペーサーなどが挙げられる。

## 【0042】

ある態様では、相互に対して三次元の中で空間的に配置された複数の核酸にマトリックス形成材料を接触させる。

## 【0043】

マトリックス形成材料としてはポリアクリルアミド、セルロース、アルギン酸、ポリアミド、架橋アガロース、架橋デキストラン、又は架橋ポリエチレングリコールが挙げられる。前記マトリックス形成材料に特異的な方法並びに当業者に知られている方法、試薬、及び条件を用いて、前記マトリックス形成材料を重合及び／又は架橋することによって、マトリックスを形成することができる。

## 【0044】

ある態様では、マトリックス形成材料を細胞に注入することができる。細胞をホルムアルデヒドで固定し、後にエタノールに浸漬して脂質膜を破壊する。前記マトリックス形成試薬を試料に添加し、細胞の隅々まで浸透させる。その後、重合誘導性触媒、UV、又は機能性架橋剤を添加してゲルマトリックスを形成させる。組み込まれなかった材料を洗い流し、残っているあらゆる反応基をクエンチする。例示的細胞には疾患細胞及び健常細胞を含むヒト又はその他のあらゆる細胞が含まれる。具体的な細胞としてはヒト細胞、非ヒト細胞、ヒト幹細胞、マウス幹細胞、初代細胞株、不死化細胞株、初代不死化線維芽細胞、HeLa細胞、及び神経細胞が挙げられる。

## 【0045】

ある態様では、マトリックス形成材料を使用して組織試料などの生体試料を封入することができる。スライドガラス上のホルマリン固定包埋組織をキシレンと共に保温し、包埋ワックスを取り除くためにエタノールを使用して洗浄する。その後、それらをプロテイナーゼKで処理して組織を透過処理する。その後、重合誘導性触媒、UV架橋剤、又は機能性架橋剤を添加してゲルマトリックスを形成させる。組み込まれなかった材料を洗い流し

10

20

30

40

50

、残っているあらゆる反応基をクエンチする。例示的組織試料としては、ヒト又は非ヒトの、関心が持たれるあらゆる組織試料が挙げられる。そのような組織試料としては皮膚組織、筋肉組織、骨組織、臓器組織などに由来する試料が挙げられる。例示的組織としてはヒト及びマウスの脳組織切片、胚切片、組織アレイ切片、及び昆虫胚全体と線形動物胚全体が挙げられる。

#### 【0046】

前記マトリックス形成材料は複数の核酸を含む三次元マトリックスを形成する。ある態様では、前記マトリックス形成材料は、複数の核酸を含み、一方で核酸の空間的關係を維持する三次元マトリックスを形成する。この態様では前記マトリックス材料内に複数の核酸が固定化される。前記マトリックス形成材料と前記核酸の共重合によって前記マトリックス材料内に複数の核酸が固定化されてよい。前記核酸の前記マトリックス材料への架橋によるか、又は他の場合として前記マトリックス形成材料との架橋によって、前記マトリックス材料内に複数の核酸が固定化されてもよい。前記マトリックスへの共有結合によって、又は前記マトリックスとのリガンドタンパク質相互作用を介して、前記マトリックス内に複数の核酸が固定化されてもよい。

#### 【0047】

ある態様では、前記マトリックスは多孔性であり、それによって核酸の増幅のために前記核酸の場所において前記マトリックスに試薬を注入することが可能になる。多孔性マトリックスは当業者に知られている方法に従って作製され得る。一例では架橋密度を制御するために適切なアクリルアミド：ビスアクリルアミド比を使用してポリアクリルアミドゲルマトリックスをアクリライト修飾ストレプトアビジンモノマー及びビオチン化DNA分子と共重合する。分子ふるいサイズ及び密度に対するその他の制御は官能化ポリエチレングリコールなどの追加の架橋剤を添加することによって達成される。ある態様では、ちょっとした情報を表し得る前記核酸に対してオリゴヌクレオチド、例えば標識オリゴヌクレオチドプローブ、プライマー、酵素、及び迅速なキネティクスを有する他の試薬が容易に接近する。

#### 【0048】

ある態様では、前記マトリックスは十分に光学的に透明であるか、又はハイスループット情報リードアウトのための標準的な次世代配列決定化学（Next Generation sequencing chemistries）及び高深度三次元撮像（deep three dimensional imaging）に適した光学的特性を有する。蛍光イメージングを活用する次世代配列決定化学として挙げられるABI SOLiD（Life Technologies社）では、鋳型上の配列決定プライマーが、切断可能なターミネーターを含む蛍光標識されたオリゴヌクレオチドのライブラリーにライゲーションされる。ライゲーション後に4カラーチャンネル（FITC、Cy3、テキサスレッド及びCy5）を使用してビーズを撮影する。その後、ターミネーターを切断して、次のライゲーション・エクステンションサイクルに従事するための遊離末端を残す。全てのジヌクレオチドの組合せを決定した後でカラーコードスペースに画像をマップして鋳型当たりの特異的なベースコールを決定する。前記ワークフローは自動化フルイディクス撮像システム（すなわち、SOLiD 5500 W Genome Analyzer、ABI Life Technologies社）を使用して達成される。合成による配列決定（sequencing by synthesis）を使用する別の配列決定プラットフォームでは、DNAポリメラーゼを使用して切断可能なターミネーターを含む一群の単一ヌクレオチドを組み入れる。撮像後、ターミネーターを切断し、サイクルを反復する。その後、蛍光画像を分析してフローセル内の各DNAアンプリコンの塩基をコールする（HiSeq、Illumina社）。

#### 【0049】

ある特定の態様では、当業者に知られている方法によって前記複数の核酸を増幅してアンプリコンを作製しうる。アンプリコンは前記マトリックス内で概ね前記核酸が増幅した場所に固定され、それによって局在化したアンプリコンのコロニーが形成され得る。アン

10

20

30

40

50

プリコンは立体因子によって前記マトリックス内で固定化されてよい。アンプリコンは共有結合又は非共有結合によっても前記マトリックス内で固定化されてよい。アンプリコンはこのようにして前記マトリックスに結合されると考えられる。共有結合又は架橋等によって前記マトリックスに固定化されることにより、元のアンプリコンのサイズと空間的關係が維持される。共有結合又は架橋等によって前記マトリックスに固定化されることにより、アンプリコンは機械的負荷の下で移動しづらく、又はほぐれにくくなる。

#### 【0050】

ある態様では、次にDNAアンプリコンなどの前記アンプリコンを、周囲のマトリックスと共重合し、且つ／又は、周囲のマトリックスに共有結合し、それによりアンプリコンの空間的關係及びアンプリコンに固有のあらゆる情報を保存する。例えば、前記アンプリコンが前記マトリックス内に包埋された細胞内のDNA又はRNAから生成されたアンプリコンである場合、アンプリコンを官能化して前記マトリックスに対する共有結合を形成し、アンプリコンの細胞内での空間的情報を保存し、それにより細胞内局在分布パターンを提供することもできる。

#### 【0051】

本明細書において使用される場合、「結合する (attach)」という用語は共有結合による相互作用と非共有結合による相互作用の両方を指す。共有結合による相互作用とは、一対の電子 (すなわち単結合)、二対の電子 (すなわち二重結合)、又は三対の電子 (すなわち三重結合) の共有によって形成される、2つの原子又はラジカルの間の化学結合である。共有結合による相互作用は当技術分野において電子対相互作用又は電子対結合としても知られている。非共有結合による相互作用としてはファンデルワールス相互作用、水素結合、弱化学結合 (すなわち、近距離非共有結合力による結合)、疎水性相互作用、イオン結合などがあるが、これらに限定されない。非共有結合による相互作用の概説は、全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用する *Molecular Biology of the Cell*、第3版、Garland Publishing、1994年内のAlbertsらの著作で見ることができる。

#### 【0052】

本明細書において使用される場合、「核酸」という用語には複数のヌクレオチドを含む「オリゴヌクレオチド」又は「ポリヌクレオチド」という用語が含まれる。「核酸」という用語には天然核酸及び合成核酸が含まれるものとする。「核酸」という用語には一本鎖核酸及び二本鎖核酸が含まれるものとする。「核酸」という用語にはDNA及びRNAが一本鎖であっても二本鎖であっても含まれるものとする。本発明のヌクレオチドはアデノシン、グアノシン、ウリジン、シチジン、及びチミジンに由来するヌクレオチド等、天然のヌクレオチドであることが典型的である。オリゴヌクレオチドが「二本鎖」と呼ばれるとき、例えばDNAと関係があることが典型的である、水素結合したらせん配列として一対のオリゴヌクレオチドが存在することが、当業者によって理解される。本明細書において使用される「二本鎖」という用語には、100%相補型の二本鎖オリゴヌクレオチドに加えて、バルジ及びループのような構造的特徴を含む形態の二本鎖オリゴヌクレオチドも含まれるものとする (全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用する *Strayer* 著、*Biochemistry*、第3版 (1988年) を参照されたい)。本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は多様なサイズであり得る核酸のストランドを指す。ポリヌクレオチドはオリゴヌクレオチドと同じサイズであっても、オリゴヌクレオチドのサイズよりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、又はそれ以上のサイズであってもよい。

#### 【0053】

オリゴヌクレオチド及び／又はポリヌクレオチドは天然物から単離されたり、商業的供給源から購入されたりする場合がある。オリゴヌクレオチド配列及び／又はポリヌクレオチド配列は、あらゆる適切な方法によって調製され得る。方法としては例えば、両方とも全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用する *Beaucage* 及び *Caruthers* ((1981年) *Tetrahedron Lett.* 誌、第22巻: 1

859頁)によって述べられたホスホラミダイト法又はMatteucciら著、(1981年)J. Am. Chem. Soc. 誌、第103巻:3185頁によるトリエステル法、又は本明細書に記載されており、且つ、当技術分野において知られている業務用自動オリゴヌクレオチド合成機若しくはハイスループット・ハイデンシティーアレイ法のどちらかを用いる他の化学的方法(全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用する米国特許第5602244号、同第5574146号、同第5554744号、同第5428148号、同第5264566号、同第5141813号、同第5959463号、同第4861571号及び同第4659774号を参照されたい)などがある様々な供給業者から合成済みのオリゴヌクレオチドを商業的に入手することもできる。

#### 【0054】

本発明のある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド及び／又はポリヌクレオチドは、当技術分野において知られている様々なマイクロアレイ技術を用いて調製され得る。合成済みのオリゴヌクレオチド配列及び／又はポリヌクレオチド配列は、以下の参考文献に示されるライト・ディレクトッド法、フローチャネル・スポッティング法、インクジェット法、ピンベース法及びビーズベース法を用いて、支持体に結合されてin situで合成され得る:全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するMcGallら著、(1996年)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 誌、第93巻:13555頁;Genetic Engineering、第20巻:111頁のSynthetic DNA Arrays、Plenum Press(1998年);Dugganら著、(1999年)Nat. Genet. 誌、第S21巻:10頁;Microarray Bioinformatics内のMicroarrays: Making Them and Using Them、Cambridge University Press、2003年;米国特許出願公開第2003/0068633号及び同第2002/0081582号;米国特許第6833450号、同第6830890号、同第6824866号、同第6800439号、同第6375903号、及び同第5700637号;及びPCT出願番号WO04/031399号、同WO04/031351号、同WO04/029586号、同WO03/100012号、同WO03/066212号、同WO03/065038号、同WO03/064699号、同WO03/064027号、同WO03/064026号、同WO03/046223号、同WO03/040410号、及び同WO02/24597号。

#### 【0055】

核酸をライブラリー、例えば、ゲノムライブラリー、cDNAライブラリーなどから得ることができる。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において、例えば、全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するDeWittら著、(1993年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌、第90巻:6909頁;Erbら著、(1994年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌、第91巻:11422頁;Zuckermannら著、(1994年)J. Med. Chem. 誌、第37巻:2678頁;Choら著、(1993年)Science誌、第261巻:1303頁;Carrellら著、(1994年)Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 誌、第33巻:2059頁;Carrellら著、(1994年)Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 誌、第33巻:2061頁;及びin Gallopら著、(1994年)J. Med. Chem. 誌、第37巻:1233頁において、見出すことができる。

#### 【0056】

ある特定の実施形態では、核酸は、細胞又は組織などの生体試料において自然に見られる核酸である。

#### 【0057】

さらに他の態様では、固形支持体と併せてマトリックスが使用される。例えば、前記マトリックスの一方の面が固形支持体(例えば、ガラス面)に結合し、前記マトリックスの他方の面が露出するか、又は2つの固形支持体の間に挟まれるように、前記マトリックス

を重合することができる。ある態様では、容器の内部に前記マトリックスを含むことができる。

#### 【0058】

本発明の固形支持体は様々な形に作り上げてられうる。ある特定の実施形態では前記固形支持体は実質的に平面状である。固形支持体の例にはスライドガラス、マイクロタイタープレート、フローセル、カバーガラス、マイクロチップなどのようなプレート、微量遠心管、試験管などのような容器、管類、シート、パッド、フィルムなどが挙げられる。また、前記固形支持体は、例えば、生物性、非生物性、有機性、無機性、又はそれらの組合せであってよい。

#### 【0059】

本発明の実施形態はさらに、前記マトリックス内における核酸配列の増幅、すなわち *in situ* における核酸配列の増幅に向けられている。核酸の増幅方法としては *in situ* でのローリングサークル増幅が挙げられる。ある特定の態様では、核酸の増幅方法は、アンカーPCR又はRACE PCRなどのPCRの使用、あるいはライゲーション連鎖反応(LCR)におけるPCRの使用を伴う(例えば、全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するLandegranら著、(1988年)Science誌、第241巻:1077~1080頁;及びNakazawaら著、(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 誌、第91巻:360~364頁を参照されたい)。代替的な増幅方法としては自続配列複製(全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するGuatelliら著、(1990年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌、第87巻:1874頁)、転写増幅システム(全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するKwohら著、(1989年)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 誌、第86巻:1173頁)、Q-Betaレプリケース(全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するLizardiら著、(1988年)BioTechnology誌、第6巻:1197頁)、リカーシブPCR(全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するJaffeら著、(2000年)J. Biol. Chem. 誌、第275巻:2619頁;及びWilliamsら著、(2002年)J. Biol. Chem. 誌、第277巻:7790頁)、又は当業者に周知の技法を用いる他のあらゆる核酸増幅方法が挙げられる。全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用する米国特許第6391544号、同第6365375号、同第6294323号、同第6261797号、同第6124090号、及び同第5612199号に、様々な増幅方法が記載されている。本発明の実施形態は、核酸を増幅するために充分な適切な反応条件下で前記マトリックス内の核酸をプライマー及びヌクレオチドなどの試薬と接触させることによって前記マトリックス内で *in situ* で核酸を増幅する方法に向けられている。ある態様では、前記マトリックスは、前記核酸と接触するために前記マトリックス中への試薬の移動が可能となるように多孔性である。

#### 【0060】

ある特定の例に準じて、マトリックス内における *in situ* での核酸配列決定の方法を提供する。可逆的ターミネーターを用いる伸長による配列決定(sequencing by extension)、蛍光 *in situ* 配列決定(FISSEQ)、パイロ配列決定、大規模並列処理シグネチャ配列決定(MPSS)など(参照により全体を本明細書に援用するShendureら著、(2004年)Nat. Rev. 誌、第5巻:335頁に記載)の、当技術分野において知られている一般的な配列決定方法が、核酸が中に存在するマトリックスに関して用いるのに適切である。可逆的ターミネーション法では可逆的ターミネーション及び除去可能蛍光を組み合わせた段階的な合成による配列決定生化学(step-wise sequencing-by-synthesis biochemistry)を用いる(Shendureら著、上掲、及び参照により本明細書に援用する米国特許第5750341号及び同第6306597号)。FISSEQは一種類の蛍光標識したヌクレオチド三リン酸を反応に添加し、取り込まれなかったヌクレオチドを洗い流し、蛍光の測定により前記ヌクレオチドの取り込みを検出し、そしてかかるサイクルを反復することにより

10

20

30

40

50

DNAを伸長させる方法である。各サイクルで前のサイクルに由来する蛍光を退色させるか、デジタル的に控除 (s u b t r a c t) し、又は前記ヌクレオチドから蛍光分子を切断し、洗い流す。F I S S E Qのさらなる説明は、全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するM i t r aら著、(2003年) A n a l . B i o c h e m . 誌、第320巻: 55頁にある。パイロ配列決定は、ヌクレオチドの取り込み毎に(すなわち、伸長するポリヌクレオチド配列にヌクレオチドが付加されると) ピロリン酸 (P P i) が放出される方法である。DNAポリメラーゼ触媒反応において放出されたP P iは、画像として検出され得る共役反応においてA T Pスルフリラーゼとルシフェラーゼによって検出される。添加されたヌクレオチドは連続的にヌクレオチド分解酵素によって分解される。最初に添加されたヌクレオチドが分解された後に、次のヌクレオチドを添加することができる。この手順が繰り返されるにつれ、より長い範囲の鋳型配列が演繹される。パイロ配列決定のさらなる説明は、全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するR o n a g h iら著、(1998年) S c i e n c e 誌、第281巻: 363頁にある。M P S Sはマイクロビーズ上でライゲーションに基づくDNA配列決定を同時に活用する。全ての可能なオーバーハングを備える標識アダプターの混合物を4ヌクレオチドからなる標識配列にアニールする。アダプターのライゲーションが成功すると前記標識が検出される。その後、制限酵素を使用してDNA鋳型を切除して次の4塩基を露出させる。M P S Sのさらなる説明は、全ての目的のために参照により全体を本明細書に援用するB r e n n e rら著、(2000年) N a t . B i o t e c h . 誌、第18巻: 630頁にある。

【0061】

ある特定の態様では、蛍光標識されたオリゴヌクレオチド／DNA／RNAのハイブリダイゼーション、標識されたd d N T Pを用いるプライマーエクステンション、ライゲーションによる配列決定 (sequencing by synthesis) 及び合成による配列決定をはじめとする当業者に知られている方法を用いて、前記マトリックス内の前記核酸のデータが取得され得る。L a r s s o nら著、(2004年) N a t . M e t h o d s 誌、第1巻: 227～232頁に記載されるライゲーション済み環状パドロックプローブを使用して、複数の配列標的を並行して検出し、続けてパドロックプローブ中のバーコード配列のライゲーションによる配列決定、合成による配列決定、又はハイブリダイゼーションによる配列決定のいずれかを行って、個々の標的を特定することができる。

【0062】

図1は、細胞内の核酸のマトリックスをin situで作製し、続いてDNA又はRNAなどの核酸をin situで増幅し、アンプリコンをin situで共重合し、アンプリコンをマトリックス材料に共有結合し、アンプリコンのデータを取得し、そして10～7mのオーダーでDNA／RNAアンプリコンを含む復元3D細胞画像と共にアンプリコンの撮像を行う過程を模式的に示す。ある特定の態様では、本明細書に記載される方法の実施において有用なF I S S E Qの方法と材料が、それぞれ参照により全体を本明細書に援用するL e eら著、N a t u r e P r o t o c o l s 誌、第10巻、第3号(2015年) 442～458頁、L e eら著、S c i e n c e 誌、第343巻、1360～1363頁(2014年) 及びS c i e n c e 誌において2014年2月27日に公開されたS u p p l e m e n t a r y M a t e r i a l s、E x p r e s s D O I: 10. 1126/ s c i e n m c e . 1250212において提供される。

【0063】

三次元で分布する光学的シグナルを検出するために、前記自動配列決定—三次元撮像デバイスが使用され得る。蛍光顕微鏡法によって光学的シグナルを検出するために、前記自動配列決定—三次元撮像デバイスが使用され得る。ある特定の態様では、蛍光はシアニンなどの蛍光色素又は蛍光分子によって生成される。ある特定の態様では、蛍光は量子ドット又は他の種類のナノスケール半導体によって生成される。ある特定の態様では、蛍光はG F Pなどの蛍光タンパク質によって生成される。自家蛍光の光学的シグナル、化学発光の光学的シグナル、又は試料の光吸収特性(例えば、色)若しくは試料の光散乱特性、例えばラマン分光及びC A R S、すなわちコヒーレント反ストークスラマン分光などの非蛍

光光学シグナルを検出するために、前記自動配列決定—三次元撮像デバイスが使用され得る。

#### 【0064】

ある態様では、三次元核酸マトリックスを撮像するために立体三次元撮像モダリティを用いる自動配列決定—三次元撮像デバイスが提供される。光学的構成は正立、倒立、サイドビュー、デュアルビュー、マルチビュー、又は三次元での光シグナルの測定を可能にする他のあらゆる配向を有する。前記デバイスは、化学的操作（すなわち、核酸配列決定）のプロトコルと、適切な容器又はステージ内に含まれる三次元核酸含有マトリックスの撮像と、を実行するように機能的に組み立てられた、ハードウェア及びソフトウェアを含む。前記デバイスは、配列決定を自動化するためのハードウェアとソフトウェア、及び立

10

#### 【0065】

三次元配列決定基質は密閉フローセルなどの試料ホルダー内に含まれてもよいし、又は開放ウェル形式で完全に若しくは部分的に露出してもよい。密閉フローセルは、撮像のための光学的に透明な領域と、液体交換を目的として薄層流が確立され得るチャンネルと、を有するあらゆる固形又は半固形の基材を意味するとしてよい。前記フローセルは液体交換を目的として1つ以上の注入口、排出口又はポートを有してよい。これらの物理的インターフェイスはフルイディクスシステムに静的又は動的に連結可能であり、且つ、分注体制又は抽出体制を容易にするための過剰量又は予備量の液体を収容するためのウェル又は他

20

#### 【0066】

前記デバイスは前記試料ホルダーを保持するためのステージを含んでよい。前記ステージは光学的エンコーダーを有するリニアサーボモーターなどの高精度運動制御システムを用いて配置され得る。光学的エンコーダーシステムは絶対形式で設置されても相対形式で設置されてもよい。モーターコントローラーが1台以上の相対エンコーダーを読み取る場合、反復可能な軸の測位を行うためにリミットセンサ及び／又は物理的限度に対して相対的にホーミングルーチン（*hom ing r o u t i n e s*）を実行してもよい。試料又は試料ホルダー（すなわちフローセル）が装置の他の物理的態様と衝突又は干渉することを防ぐため、ソフトウェアリミットが動的に課され得る。モーター制御に参与するモータードライバは、多軸協調ルーチンの目的で、デバイスソフトウェア及びハードウェアの他の態様と、標準的な通信プロトコル（例えば、RS-323、TCP/IP、UDP等）を介してインターフェイス接続してもよい。

30

#### 【0067】

前記ステージは、フルイディクス及び／又は光学系との相互作用のために試料ホルダー／試料を再現性よく配置する保持機構（例えば、板バネ又は磁石）を有するスロット等、試料ホルダーを位置決めし保持するための物理的機構を含んでよい。前記ステージは試料ホルダー及び／又は試料にフルイディクス装置を結合する物理的手段を含んでよい。ステージの構成要素は、試料又は試料ホルダーに物理的変形又は物理的移動を加える熱変化の傾向を最小限にするように選択され得る。ステージの構成要素は、化学プロトコルの実施時に用いられる液体との化学反応性を最小限にするように選択され得る。

40

#### 【0068】

ある特定の態様では、前記デバイスは、参照ID、バーコード、RFIDタグ、又は他の追跡可能な標識を試料ホルダー内に含むこと等による試料ホルダー追跡（*t r a c k i n g*）のための機構を含んでよい。前記追跡可能標識は、RFIDの検出又はバーコードの検出のための光学的センサ等により前記デバイスによって自動的に検出されてもよく、又は前記追跡可能標識はユーザーによってコンピューターソフトウェアシステムに入力されてもよい。試料ホルダーは、試料の物理的構成、試薬の注入／排出、撮像インターフェ

50

イス、及び試料ホルダーの他の態様の点で異なる1種類以上であってよい。試料ホルダーの追跡には、試料ホルダー構成のデータベースにあるインデックスを参照すること等により前記試料ホルダーの構成をデバイスコントローラソフトウェアに示すための機構がさらに含まれる。他の態様では、前記デバイスは、RADAR/LIDARオン・チップシステムを含むRADAR/LIDARの使用、又は、前記試料ホルダーの物理的態様をシステムによって自動的に検出し、構文解析し、前記試料ホルダーとのデバイスインターフェースの構成のために使用するマシンビジョン等の、試料ホルダー構成を自動的に構成するための機構を含んでよい。他の態様では、前記デバイスは、前記試料ホルダーの特徴の物理的ずれを決定するための装備等、前記試料ホルダーとのデバイスインターフェースの構成を目的として参照図又は装備を活用してよい。

10

**【0069】**

ある特定の態様では、前記デバイスは、試料ホルダー定義を構成するため、又は他の場合では前記デバイスと前記試料ホルダーとの間のインターフェースを構成するための、コマンドラインインターフェース(CLI)又はグラフィックユーザーインターフェース(GUI)などのソフトウェアインターフェースも備える。前記デバイスは試料ホルダー内の撮影領域の全体スキャンを生成するために、前記試料ホルダーの撮像領域を自動的にスキャンしてよい。ある態様では、前記全体スキャンは配列決定及び／又は撮像のための試料の領域を選択する目的でGUIを介してユーザーに提示される。別の態様では、前記デバイスは、蛍光強度又はエントロピーなどのメトリックの計算等によって配列決定及び／又は撮像のために試料の適切な領域を自動的に決定するためのソフトウェアプログラムを含む。前記デバイスは前記試料ホルダー又は前記構成要素の特徴認識のためのコンピュータービジョンシステム又はマシンラーニングメカニズムをさらに備えてよい。

20

**【0070】**

前記ステージは、核酸ハイブリダイゼーション、増幅、及び配列決定などの用途の熱サイクリングに有用であるようなプログラムされた時間と温度に従って前記ステージを(ペルティエ素子を使用する熱電冷却等を介して)加熱又は冷却し得る、加熱又は冷却装置を含んでよい。加熱もしくは冷却装置又は加熱もしくは冷却ユニットは、急速な温度サイクリングを行い得る。前記加熱もしくは冷却装置又は加熱もしくは冷却ユニットは、温度変化時に生成される熱を放熱するためにファンと併せてヒートシンクを使用してよい。前記加熱もしくは冷却装置又は加熱もしくは冷却ユニットは、温度変化時に生成される熱を放熱するために放熱器と液体冷却／循環システムを使用してよい。前記加熱もしくは冷却装置又は加熱もしくは冷却ユニットは、マイクロコントローラ又は他の電子回路であり得る制御システムに温度フィードバックを提供する手段として温度センサ又はサーミスタを使用してよい。

30

**【0071】**

前記デバイスは、プログラムされた量の液体試薬をステージ上の試料ホルダーに、例えばステージ上のウェル又はフローセルに分注し、且つ、三次元核酸含有マトリックスに分注する、流体ディスペンサー又はフルイディクスユニットを含んでよい。前記流体ディスペンサー又はフルイディクスユニットは、試薬を一定の温度で収容するための(ペルティエ素子を使用する熱電冷却等を介した)温度制御を含んでよく、放熱手段として液体又は水のどちらかによる冷却を実行してよい。前記流体ディスペンサーを介して液体試薬を送達するためにシリンジポンプなどのポンプを使用してよい。ある特定の態様では、記液体及び圧力に基づく液体分注は、液体容器の内外の間での圧力の差によって駆動され得る。例えば、バルブが開くと一点の管類を通して液体が流れ、前記バルブを通して開放ウェル内の試料上又は密閉フローセル内に液体が流れるように、前記管類により前記電気作動式バルブに加圧ボトルを接続してよい。ある特定の態様では、2種類以上の試薬が同一のバルブから試料ホルダーに分注され得る。これらの試薬は別のバルブ(例えば、ロータリーバルブ)又は他の物理的手段によって前記バルブの上流で選択され得る。他の態様では分注と分注との間にバルブを洗い流すか、又はそうでなければ洗浄用の水又は別の液体が1つのラインによって送達され得るように、2つの選択可能なラインによってバルブがアド

40

50

レス指定可能 (addressable) であってよい。予備的 (priming) 操作及び洗浄操作の間に洗浄溶液又は試薬を集めるために、前記バルブの下にリザーバー又は吸収性材料が静的又は動的に配置されてもよい。

#### 【0072】

ある特定の実施態様では、密閉フローセルにおける液体の交換は完全に閉鎖されたループ系の中で起こる場合がある。当該系では管類が前記フローセルに固定されて接続されており、且つ、バルブとポンプ（又は他の圧力生成装置）からなる系が、前記フローセルに送達される試薬の移動と選択を制御する。密閉フローセルは、前記試料チャンネルの外側にあるウェルに試薬を非接触的に分注できるように設計され得る。そのようなウェルは、前記試料含有チャンネルの立体を部分的又は完全に置き換えるために適切な用量を保持するように設計され得る。分注された試薬の前記フローセルへの移動は、前記ウェルに対して発揮される陽圧、又は前記試料チャンネルの反対側の末端にある排出口に対して発揮される陰圧によって、駆動され得る。前記吸引力生成装置と前記フローセルとの間のインターフェイスは一時的であっても固定的であってもよく、且つ、ステッパモーター、サーボモーター、又はソレノイドによって駆動される移動軸のような移動軸によって生成又は調節され得る。前記インターフェイスは前記試料の物理的測位の混乱を最小限にしつつ一貫した密封状態を生成及び維持するように設計された吸盤装置の存在によってさらに規定され得る。

10

#### 【0073】

他の態様では、開放ウェルを有する試料ホルダーは、前記試料をより高レベルの液体流から隔離するように設計されたチャンネル、スロット、又は他の物理的領域を含むことなどによって試薬の分注及び抽出に便宜を図って試料の混乱を最小限にするための特徴を有する設計にしてよい。その他に前記開放ウェルは光学対物レンズの側面外形に合致すること等によって特定の形の光学系インターフェイスを格納するために面取りされるか、他の場合としては先細形状の側面を有してよい。

20

#### 【0074】

前記圧力駆動式フルイディクスブロックのある特定の実施態様では、複数の異なる試薬用チューブが加圧容器の内側に存在し、いずれか1つ以上のバルブが作動されると前記チューブから前記バルブを通して試料に液体が追いやられるように、各々が固有のバルブに接続されている。バルブとしてはソレノイドバルブ、ロータリーバルブ及びマイクロフルイディクスバルブがあるが、これらに限定されない、1種類以上の一般的なタイプのものであり得る。バルブは精度を最大化し、且つ／又はデッドボリュームを最小化するように選択され得る。ある特定の態様では、バルブ体は、できるだけ開口部の近くに作動機構を配置するように、試薬の乾燥に関連する問題を最小限にするように、及び／又は試薬の詰まりに関連する問題を最小限にするように、設計され得る。バルブは上流にフィルター、スクリーン、又は、非液体物質の詰まりやバルブ動作への干渉を防止する他の手段を有してよい。かかる圧力駆動式システムを使用して分注される試薬の量はバルブの内径、液体の粘度、圧力差、及びバルブ作動時間を基に決定され、且つ、経験的に決定される場合があり、且つ、所望の立体をバルブ開放又は作動間の（特定の液体粘度、バルブ内径、及び加圧を有する特定のハードウェア構成を考慮した）時間長に変換するようソフトウェアコントローラーを構成するために使用され得る。ある特定の態様では、前記試薬容器は個々に、又は全体として加圧されてよい。前記加圧媒体は理想的にはアルゴンなどの不活性ガスである。前記フルイディクスシステムはポンプ駆動式フルイディクス構成要素と圧力駆動式フルイディクス構成要素を組み合わせる。前記デバイスはプログラムされた量の液体試薬を混合するためのミキサーを含んでよい。本明細書に記載される吸引システムは、ポンプ又は真空源を使用して液体にたいして吸引力を適用することによりフローセルから液体を除去するために使用される。圧力方式の分注は、チャンネルを通して既存の液体を排水するために上記のように加圧して新しい試薬を導入する、配列決定時の液体交換を行うためにも、使用され得る。圧力方式の分注はフローセル中の液体交換のための吸引と並行して使用され得る。

30

40

50

## 【0075】

ある態様では、前記デバイスはバルク試薬、又は比較的に大量の試薬を収容するためのリザーバーを含んでよい。あるそのような態様では、前記バルク試薬リザーバーは密封容器内に1つ以上の加圧容器を含んでよい。別のそのような態様では、前記バルク試薬リザーバーは加圧密封容器内に1つ以上の容器を含んでよい。ある態様では、前記バルク試薬リザーバーは1種類以上の試薬の寿命と活性を延長する目的でペルティエ素子を使用する熱電冷却等を介して温度制御されている。前記加熱もしくは冷却装置又は加熱もしくは冷却ユニットは、温度変化時に生成される熱を放熱するためにファンと併せてヒートシンクを使用してよい。前記加熱もしくは冷却装置又は加熱もしくは冷却ユニットは、温度変化時に生成される熱を放熱するために放熱器と液体冷却／循環システムを使用してよい。前記加熱もしくは冷却装置又は加熱もしくは冷却ユニットは、マイクロコントローラー又は他の電子回路であり得る制御システムに温度フィードバックを提供する手段として温度センサ又はサーミスタを使用してよい。前記バルク試薬リザーバーはスプリットセプタム等によってコネクタ接続されてよく、それによって個々のリザーバーの簡単な交換が可能になる。他の種類のコネクタとしてはルアーロック、1／4 28、MINSTACK (LEE社)が挙げられるが、これに限定されない。

10

## 【0076】

前記デバイスはフローセルから液体を抽出する機構を含んでよい。ある態様では、開放ウェル又は部分密閉フローセルなどの、フローセルに含まれる液体を吸引するために使用されるメインポンプ又はシリンジポンプなどのポンプによって、真空状態が作られる。ある態様では、液体を抽出する目的で、前記試料ホルダー又はその中の液体に接触させるために、モーター付き吸水管を使用する。さらにこの態様では、前記モーター付き吸水管は、空気圧モーター、サーボモーター、又はステップモーターと、位置エンコーダー及び電気機械的コントローラー系とを備えてよい。前記デバイスは一時的な収容目的で廃液又は抽出された液体が中に導かれる1つ以上の廃液貯留所を含んでよい。ポンプ及びロータリーバルブなどのバルブによって廃液を導いてよい。前記廃液貯留所はある特定の水準に到達するとユーザーに自動的に通知するためのフィードバックシステムを含んでよい。望まれない化学反応を防止するため、又は適用される手順、法、若しくは規制に従った下流での廃棄物処理を容易にするために、試薬の性質に基づいて廃液を1つ以上の貯留所に導いてよい。

20

30

## 【0077】

前記デバイスは空気によって運ばれた粒子が試料中に蓄積することを防ぐ目的、及び／又は液体試薬の蒸発を防ぐ目的で1つ以上のフローセル、ウェル、試料ホルダー、及び／又はステージを被覆する機構を含んでよい。ある態様では、前記デバイスは1つ以上のフローセル、ウェル、試料ホルダー、及び／又はステージの上に気密性カバーを配置するための1つ以上の動作軸を使用するモーター付きフローセルカバーを含む。別の態様では、前記ステージは動的に伸長可能なカバーを含む。別の態様では、前記デバイスは前記ウェル及び／又は試料ホルダーを密封するために、前記モーター付きステージとインターフェイス接続可能な静的カバーを含む。

## 【0078】

40

前記デバイスは1つ以上の光軸を含む光学アセンブリを含んでよい。前記デバイスは前記三次元核酸含有マトリックスの立体撮像のための大面積検出器などの1つ以上の検出器を含んでよい。検出器はカメラであってよく、特にsCMOSカメラのような高速低ノイズ科学的撮像に合わせた物理的特性を有するカメラであってよい。あるそのような実施形態では、試料への焦点を得るため、及び／又は維持するために反射ベースのオートフォーカスシステムによって光軸の閉ループ制御が行われる。別の構成では、参照により全体を本明細書に援用するMario, A. Bueno, Josue Alvarez-Borrego、及びL. Acho著、「Autofocus algorithm using one-dimensional Fourier transform and Pearson correlation.」、第5回イペロアメリカ光学会議及び第8

50

回光学、レーザー、及びそれらの用途に関するラテンアメリカ会議、国際光工学会、2004年に記載されるアルゴリズムのような1種類以上の画像分析アルゴリズムを使用してマイクロコントローラー、FPGA、又は他の計算装置によってソフトウェアフォーカス及び決定位置フィードバックが提供され得る。かかる自動化試料位置決定は、前記撮像システムに連携した1つ以上の動作軸を調整することを含み得る。前記試料位置決定が撮像の過程で試料位置の物理的変化の原因となる場合があり、単一の画像フレーム内にキャプチャされる視野よりも大きな変化に耐える場合がある。前記デバイスはリアルタイムでのオートフォーカスの必要性を不必要にする平面マッピング手段を実装してよい。かかるシステムは反射又はソフトウェアに基づくオートフォーカスシステムを使用して試料面の3点以上の点をサンプリングし、次に前記点を平面方程式にフィットさせるか、又は前記固形基材の表面幾何構造にフィットさせることを含み得る。前記フィッティングプロセスは、オートフォーカスシグナルデータ、回帰分析の結果としての残差、又はデータポイントとしてのフィットネスを表す他の因子に基づいて1つ以上の点を除外することを含み得る。前記フィッティングプロセスは、最終的な表面マップが実際の基材表面においての変化を反映すべく完璧平坦面からの局所的逸脱を含み得るように、試料装着媒体と一致する表面変化 (surface variance) に対する余裕度を含み得る。図12に記載されるように、ある態様では、前記デバイスは、前記撮像システムに対して相対的な試料の再現可能な位置決めを目的とした、1つ以上の動作軸に関して試料ホルダーの表面をマッピングするためのシステムを備え、前記システムは(1)前記光学系と前記試料との間の1つ以上の距離測定値を得るためにレーザー反射オートフォーカス機構などのオートフォーカスシステムを使用する工程、及び(2)1つ以上の動作軸に沿った位置エンコーダーに対する相対的な1つ以上のずれであって、画像取得の際に使用される前記ずれを計算する工程を含む。

#### 【0079】

前記デバイスは試料の位置を決定、調節、補正、及び／又は追跡するための、画像ベースのソフトウェアプログラムを使用してよい。ある態様では、1以上の次元に沿った位置移動を計算する目的で、計算機によって画像データが基準に登録される (registered to a reference)。さらにこの態様では、離散フーリエ変換 (DFT) 又は高速フーリエ変換 (FFT) などのフーリエ変換 (FT) を使用して、2つ以上の画像又は画像ボリューム間の移動を1以上の次元に沿って計算する。ある態様では、スケールアップされたDFTを使用すること等によってサブピクセルシフトが計算される。ある態様では、1以上の次元に沿って移動シフトが計算される。別の態様では、1以上の次元に沿って回転移動が計算される。ある態様では、画像分析を用いる位置追跡を支援する目的で、前記試料ホルダー、フローセル、ウェル、又は試料内に含まれる形状 (features) 又は位置合わせマーカー (fiducial markers) が使用される。形状又は位置合わせマーカーとしては、刻印、レーザー刻印、印刷形状、積層形状、マイクロ接触印刷形状、ビーズ、及び1以上の次元にある他の種類のパターン等、前記試料ホルダー、フローセル、又はウェルの中に製造、又はその上に付加される形状が挙げられる。ある態様では、3Dヒドロゲル中に埋め込む等、試料に位置合わせマーカーを埋め込む。ある態様では、位置合わせマーカーは、蛍光性又は自家蛍光性であってよい顕微鏡観察用ビーズである。ある態様では、形状とは前記試料ホルダーの固形基材形成部分の一方の面の一態様である。ある特定の態様では、前記形状は前記試料ホルダーの試料を含有する面とは異なる面の一態様である。一例では、前記フローセルは、上面に2つ以上の開放ウェルを含有するスライドガラスであって、前記スライドガラスの上面又は底面のどちらかに付着させられた位置合わせマーカーとして機能するビーズを有するスライドガラスである、と理解される。

#### 【0080】

移動システムが試料を光学系に対して相対的に配置し、その位置において、同期した照明を用いて、グローバルシャッターキャプチャ、ローリングシャッターキャプチャ、又は「オールライン・ファイアリング」ローリングシャッターキャプチャによって画像データ

が取得されるよう、マイクロコントローラーシステムは、照明／励起光源及びカメラセンサと共調させながら移動システムをXYZ軸方向に動かす。他の事例では、前記光学系に対しての休止位置まで試料が来る必要が無いように、1つ以上の軸に沿った移動を、カメラセンサに沿ったラインのキャプチャと同期させる。例えば軸移動の開始やカメラ露出の動作開始などのサブシステム間で、協働して機能させるため、低遅延通信プロトコル（例えば、デジタルTTL、I2C、RS-232、UDP、TCP/IP）にソフトウェアハンドシェイクプロトコル及びハードウェアハンドシェイクプロトコルが実装される。

#### 【0081】

前記デバイスは撮像用の1つ以上の対物レンズを含んでよい。ある特定の態様では、前記デバイスは1つの対物レンズを含んでよい。別の態様では前記デバイスは2つの対物レンズを含んでよい。別の態様では前記デバイスは3つ以上の対物レンズを含んでよい。対物レンズは水浸レンズ、油浸レンズ、インビボ観察用水浸レンズ、乾燥レンズ、別の撮像媒体と合致する屈折率を有するレンズ、又は調節可能な屈折率を有するレンズであり得る。ある特定の態様では、前記デバイスは単一の水浸対物レンズを含む。当該レンズは、空気と水との間の境界面又は水とガラスとの間の境界面などの異なる屈折率を有する2種類の媒体間の境界面で生じる屈折率のミスマッチを除外することでより高い画像品質を提供する。

10

#### 【0082】

空気に合致しない屈折率を有する1つ以上の対物レンズを備える態様では、対物レンズは水、油、又は他の撮像緩衝液などの撮像媒体と直面しなくてはならない。これらの態様では、前記デバイスは、対物レンズを浸漬するか、他の場合では前記対物レンズと前記撮像媒体との間にインターフェイスを作成する機構を備えてよい。ある種のレンズ浸漬機構としては、注射器、ニードルバルブ、又は液体試薬の分注技術をよく知る者に知られるその他の機構等によって、撮像媒体にレンズを浸漬するか又はレンズ上に撮像媒体を分注することが挙げられる。ある特定の態様では、前記デバイスは、対物レンズと泡を形成せずに対物に液体を積層するための液体インターフェイスとの間に入射角度をつける目的のウェルにある特定の量の液体を分注する。別の態様では、前記デバイスは、泡を形成せずに、注射器又はニードルバルブを使用すること等により、液滴と対物レンズとの間の入射速度と入射角度を制御して、対物レンズ上にある特定の量の液体を分注する。

20

#### 【0083】

液体撮像媒体中での撮像中に、対物レンズ上、試料内、又は対物レンズと試料との間に泡が生じることがある。それには開放式フローセル内において、及び、密閉フローセル中に存在するガラスインターフェイスを介して撮像する装置内での泡の形成が含まれる。前記デバイスは対物レンズ上に形成された泡、又は対物レンズと試料との間に存在する泡を検出する機構を含んでよい。泡検出機構としては、光散乱を介した検出；画像分析による検出、例えば、泡によって妨害される光学系の点拡がり関数の測定による検出；レンズ上の泡を検出するようにプログラムされたソフトウェアを含むコンピューターシステムに接続された外部マシンビジョン、例えばカメラ又はレンズを観察する他の撮像システム等による検出、が挙げられる。前記デバイスは対物レンズ上に生じた泡を除去する機構をさらに含んでよい。ある態様では、前記デバイスは対物レンズ上に存在する液体を除去する吸引ニードルに対物レンズを接触させる機構を備える。別の態様では、前記デバイスは、対物レンズ上に存在する液体を吸収する吸収性材料に、対物レンズを接触させる機構を備える。前記デバイスは液体を乾燥させる、又は対物レンズから液体を除去するための機構を含んでよい。前記デバイスは、泡を検出したらレンズから液体撮像媒体を除去し交換するためのソフトウェアルーチン及びハードウェアルーチンを実行してよい。前記デバイスは対物レンズ上に、試料内に、又は対物レンズと試料との間に泡を検出したときにユーザーに警告するための機構を含んでよい。

30

40

#### 【0084】

前記デバイスの操作時に前記対物レンズはほこり、ゴミ、析出した塩、又は他の試薬の溶質、又は撮像に干渉する他の種類の物質を蓄積し得る。前記デバイスは、光散乱又は光

50

と干渉物質との間の相互作用の他の特質を介して、かかる干渉を検出するための機構を含んでよい。前記機構は、例えば、干渉物質の存在によって妨害される、光学系の点拡がり関数の測定；レンズ上の泡を検出するようにプログラムされたソフトウェアを含むコンピューターシステムに接続された、例えばカメラ又は他の撮像システム等の、レンズを観察する外部マシビジョンによる、画像分析によるものである。前記デバイスは対物レンズをクリーニングするための機構をさらに含んでよい。ある態様では、前記デバイスはレンズクリーニング試薬を含んでよい。前記試薬はレンズをクリーニングする目的で注射器又はニードルバルブ等によってレンズに分注される。又は、ウェル中若しくは対物レンズを接触させるために作られている非研磨性材料上にクリーニング試薬が分注され、これに対物レンズを浸漬することにより、前記試薬がレンズに分注される。前記デバイスは、対物レンズ上、試料内、又は対物レンズと試料との間に干渉物質を検出したときにユーザーに警告するための機構を含んでよい。

10

#### 【0085】

前記デバイスは1つ以上の光路を備える。前記デバイスは、前記光学系の特定の構成要素と試料又は撮像媒体との間の屈折率のミスマッチを補正するための光学部品を含んでもよい。前記デバイスは、前記光学系内にある他の種類の光学的ひずみ（球面収差又は色収差など）を補正するための光学部品を含んでもよい。前記デバイスは、前記光学系の点拡がり関数の変化又は前記光学系の他の特性の変化を検出するためのソフトウェアと組み合わせられた画像センサを使用すること等によって光学的ひずみを検出する機構を含んでもよい。ある態様では、前記デバイスは1台以上のビーム特性解析カメラを備える。別の態様では、前記デバイスは、その操作の前、操作中、又は操作の後に、前記系の点拡がり関数又は他の光学的特性を測定し、且つ、ユーザーに警告を発し、又は機械的システム、電気機械的システム、若しくは光学的システムを光学的ひずみの補正に従事させるための、自動ルーチン化又は手動ルーチンを含んでよい。ある特定の態様では、前記デバイスは、適応光学系（AO）を含む。AOは波面歪曲の効果を低減することにより光学系のパフォーマンスを改善するために用いられる。適応光学部品は歪みを補償するためにミラーを変形することにより入射波面の変形を補正することができる。前記適応光学系は可変形状ミラー、画像センサ、及びハードウェア及びソフトウェアフィードバックシステムを含んでよい。ある態様では、前記適応光学系はシャックハルトマン波面センサなどの波面センサを含む。前記適応光学系及び他の補正光学系は開ループ系であってよく、その場合は前記補正系によってエラーが補正される前に前記エラーが測定される。前記適応光学系及び他の補正光学系は閉ループ系であってよく、その場合は前記補正系によってエラーが補正された後に前記エラーが測定される。試料内の光学的収差の補正により3D試料内の画像品質を改善するために適応光学部品が利用され得る。

20

30

#### 【0086】

前記デバイスは流体力学的イベント、光学的イベント、及び移動関連イベントのタイミングの制御及び協働を目的とした1つ以上の電気機械的システム、電子的システム、又は完全コンピューター化システムを含んでよい。モーターコントローラー、温度コントローラー、空気圧コントローラー、バルブコントローラー、カメラ、光学的チューニング又はゲーティングシステム、センサ、及び他の電子システムなどのデバイスサブシステムはそのような協働を目的として様々な通信プロトコルにてこ入れ（leverage）し得る。通信プロトコルは待ち時間、相互運用性、電気機械的制約又は他の運用に焦点を当てた考慮事項に基づいて選択され得る。サブシステムは汎用コンピューター又はヒューマン・マシン・インターフェイスから個々に指定され、且つ／又は操作されうるように、前記サブシステムは、一貫した又はよく規定されたアプリケーションプログラムインターフェイス（API）に従い得る。

40

#### 【0087】

カメラ、共焦点光学系、照明装置、AOTF、機械式シャッター等のような光学系及び単軸式又は多軸式の運動制御システムのタイミングは、マイクロコントローラー、モーターコントローラー、電子回路、及び／又はコンピューター化システムによって調整され得

50

る。運動制御の活動がピクセル読み込み／読み出し又はバックグラウンド測定などの非測定センサイベントと重なるように、光学センサ露出タイミングは最適化され得る。光学照明タイミング（例えば、レーザー照明ゲートのタイミング）は、励起光への試料曝露を最小にするためにそのタイミングが特定の光学センサイベント（例えば、読み込み／読み出し）と結び付けて実施され得る。連続的運動アプリケーションのためのセンサ露出用法（例えば、ローリングシャッター露出）のために、光学イメージングを目的とした単軸運動制御又は多軸運動制御はさらに最適化され得る。ある特殊な撮像方法の下、例えば、時間遅延積算（TDI）の下では、撮像データの取得時の連続的な軸移動を実行することが可能である。

#### 【0088】

ある特定の態様では、（光学イメージングと共役されるとき）多軸運動制御の次元順序は、フレームからフレームまでの移動時間を最少にするように選択され得る。例えば、垂直軸（すなわち、Z軸又は光軸）移動時間が最も短く、そのため前記垂直軸が上下に駆動されている間にフレームが取得される一連の「Zスタック」での三次元撮像を実行することが望ましい場合が多い。これらのZスタックは完全三次元立体の画像データを取得するためにX/Y平面又は平面状表面にわたって繰返し実行される。

#### 【0089】

幾つかの事例では、もとより立方形状ではない三次元立体を撮像することが望まれる場合がある。これらの事例では、後に参加運動制御システム及び撮像システムに伝達される任意の三次元撮像位置を規定するために、物理単位又は工学単位に基づく三次元座標システムが用いられ得る。そのようなシステムの採用により、目的の試料ボクセルが存在する三次元マトリックスの領域に専ら限定される撮像が可能となる。特定の空間的サンプリング周波数で立体を撮像することが望ましい場合がある。ある特定の態様では、1つ以上の軸に沿った撮像のサンプリング周波数は、前記光学系のナイキスト周波数と比較して決定される。ある特定の実施態様では、 $40 \times 1.0 \text{ NA}$ の対物レンズを使用して取得される画像データは、Z軸において約500ナノメートルの間隔でサンプリングされる。別の態様では、1つ以上の軸に沿った撮像のサンプリング周波数は、画像データを2回取得すること、又は試料立体の同じ領域を2回サンプリングすること等により、オーバーサンプリングされる。さらにこの態様では、立体のオーバーサンプリングは、立体画像を連結することを目的として隣り合う画像フレームに重複する画像データを提供すること等によって、コンピューターによる立体復元を促進し得る。ある特定の実施態様では、1つ以上の軸に沿って10%の重複を有して、1つ以上の軸に沿って20%の重複を有して、又は1つ以上の軸に沿って30%以上の重複ピクセルデータを有して、画像データが取得され得る。

#### 【0090】

前記デバイスは、複数のシステムが各試料ホルダー及び／又は試料をアドレス指定し得るように、1つより多くのステージ、フルイディクスユニット、及び／又は光学系を含んでよい。そのような体制では、ある特定のハードウェア資源へのアクセスは共有されなくてはならず、したがって物理的リソース割り当て及びスケジューリングシステムが必要である。かかるスケジューリングシステムは受動的でも能動的でもよく、且つ、試料毎の将来の流体工学及び光学イメージングの必要性に基づいてハードウェア資源へのアクセスを予測しスケジューリングする手段として予測モデリングを含み得る。前記スケジューリングシステムのさらなる態様では、前記流体撮像システムの活動を中断するか変更するためにユーザー又は外部コンピューターシステムが実行するイベントなどの外部イベントが可能であり得る。あるそのような態様では、物理的メディアストレージシステムが一杯になり、もはや取得した画像を保存できなくなる場合がある。このイベントが外部ユーザーによる介入の間に前記デバイス上での撮像活動の停止を引き起こす。別の態様では、ユーザーが装置ステージ上のスロットに試料ホルダー中の試料を添加したい場合がある。前記ユーザーはグラフィックユーザーインターフェイスであるHMIを介して、又は物理的ボタンを用いて、前記デバイスの操作状態を一時的に停止するか又は変更して、前記試料ホル

10

20

30

40

50

ダーの添加を可能としうる。

#### 【0091】

前記デバイスは、ネットワーク接続経由でローカルソフトウェアライブラリーを介して公開されるコマンドラインインターフェイス、グラフィックユーザーインターフェイス、又はアプリケーションプログラミングインターフェイス（API）を介して、操作又はプログラムされうる。ユーザーが実施し得る活動としては、前記デバイスの物理的コンフィギュレーション、テストタスク及びキャリブレーションタスク、試料ホルダー定義及び試料定義の生成と改変、流体操作とルーチンの特定、光学的測定とルーチンの特定、配列決定プロトコル開発、並びに一般的なフルイディクス、光学イメージング、及び運動制御に関連する他のタスクが挙げられるが、これらに限定されない。前記デバイスは、三次元画像アラインメント、目標発見、シグナル処理又は測定、並びに配列決定及び光学的試料分析に要求される他の画像分析タスクなどの活動を可能にするGPU上で動作するFPGA又はユーザー空間ソフトウェア等、撮像データのリアルタイム分析を可能にするハードウェア又はソフトウェアを含んでよい。前記デバイスは、画像データをローカルに保存するように設計されているハードウェア及びソフトウェアを含んでよい。前記デバイスは、三次元撮像データと配列決定データを収集、分析、保存、及び画像化するように設計されたデバイスとサービスのネットワークの一部であり得る。このネットワークとしては、物理的に同一の場所に設置されたハードウェア、およびクラウドコンピューティング機能が挙げられる。ある特定の実施形態では、前記ネットワークは、サードパーティーのハードウェア及びソフトウェアとインターフェイス接続するためのオープンスタンダードを実装してよい。

10

20

#### 【0092】

前記デバイスは本明細書に記載されるような増幅と配列決定の手順を自動化するためのソフトウェアを含むことが理解されるべきである。本明細書に記載されるハードウェア構成要素は全体的又は部分的に市販されていることがさらに理解されるべきである。

#### 【0093】

ある態様では、Danaher社製の「I15 Pollinator」と呼ばれる市販の配列決定装置を本明細書に記載される配列決定態様に使用してよく、本明細書に記載される立体撮像のためのハードウェアを含むように改変してもよい。

#### 【実施例】

30

#### 【0094】

以下の実施例により本発明をさらに例示するが、実施例は限定的なものと解釈されるべきではない。本願を通して引用される全ての参考文献、特許、及び特許出願公開の内容は全ての目的のために参照により全体が本明細書に援用される。

#### 実施例1

#### 【0095】

##### 自動配列決定—三次元撮像デバイスの動作関連構成要素

図2は本開示の自動配列決定—三次元撮像デバイスの動作関連構成要素の模式的な斜視図である。筐体要素を含むその他の構成要素が前記デバイスに付け加えられ得ることを理解すべきである。図2に示されるように、前記自動配列決定—三次元撮像デバイスは試料からの光を受け取るためのピンホールアレイとカメラ検出器を含むレーザー共焦点ヘッド格納容器を含む。かかるハードウェア配置によって三次元核酸含有マトリックスの立体撮像が可能になる。前記デバイスはレーザー共焦点ヘッド格納容器に向かう（to）反射ベースのオートフォーカス付きの光路をさらに含む。前記デバイスは、1種類以上の試薬を試料に供給するように機能する加圧フルイディクスブロック上の温度制御フルイディクスヘッドをさらに含む。作動可能に接続されたバルクフルイディクスバルブと試料から液体を除去するための吸引チューブとが配備される。温度制御及びXY移動を行うシステム付きの試料ステージが配備され、スライドガラス試料ホルダーと共に示されている。リニアエンコーダ付きのステージ移動用軌道は、作動可能なように前記ステージに接続されている。無酸素（アルゴン）環境のための格納容器ドアが、図示されていない格納容器の残り

40

50

の部分と共に配備される。前記デバイスは防振基部の上に設置されている。

#### 【0096】

図3は本開示の自動配列決定—三次元撮像デバイスの動作関連構成要素の模式的な正面図である。前記デバイスはレーザー反射ベースのオートフォーカスを含む光路及びレーザー共焦点ヘッドを含む。バルク試薬分注のためのバルク試薬バルブアレイが示されている（加圧バルク試薬貯蔵庫は図示されていない）。試薬ブロックの温度制御とヒートシンク（図示）又は液体冷却のためのペルティエ素子は、圧力方式のフルイディクス分注のためのフルイディクスブロックに接続されて示されている。フローセルから液体を除去するための浸漬吸引チューブが示されている。バルブ作動、フルイディクスブロックの温度と圧力の制御、及びフィードバックのため、電子装置が配備される。バルブアレイがフルイディクスブロックに接続されて示されている。ペルティエ素子及びヒートシンク（図示）又は液体冷却によって温度制御しながら試料を保持するためのステージが配備される。ステージ移動と、温度制御及びフィードバックのための電子装置が配備される。位置のフィードバックのためのリニアエンコーダが付いたステージ移動用軌道が配備される。顕微鏡対物レンズを含む光軸が示されている。開放式フローセル用の液浸対物レンズが示されている。無酸素（アルゴン）環境のための格納容器ドアが配備される（格納容器の残りの部分は図示されていない）。前記デバイスは制振剛性基部を含む。図3に見られるように、3D配列決定マトリックスの立体撮像のための前記デバイスは、画像取得用の単一の光軸に沿って、2つの独立したステージと2つの独立したフルイディクスシステムを活用する。画像取得は、実際には、時間が限定されたステップである。配列決定のための生化学反応（biochemistry）とフルイディクスが塩基当たりでどれほどの長さであるかに関わらず、これは塩基当たりで固定された時間（例えば2時間）であるが、撮像時間は撮像されている立体のサイズに比例する。独立したフルイディクスを使用して、それぞれ独立に動作する2つのステージを使用することにより、一方のステージが生化学／フルイディクスを継続して行うことができ、一方で他方のステージが撮像を継続する。したがって、前記システムは常に効果的に撮像のために待機しており、次のステップに移るためにフルイディクスの完了を決して待つことが無いが、撮像の完了を常に待っているので、固定された生化学反応の時間は事実上0である。走査時間は2D走査時間では走査領域の2乗で増加するが、3D走査時間では走査体積の3乗で増加するので、走査時間は3D光学的走査と2D光学的走査との間の問題であろう。移動／温度制御ステージ付きのステージとフルイディクスサブシステムは、高価な光学部品、カメラ検出器、データ取得電子機器（例えばカメラから画像データをキャプチャするためのフレームグラバハードウェア）、及び蛍光励起用のレーザー源を必要とする光学的サブシステムと比べれば相対的に安価であるので、画像取得用の単一の光軸に沿った2つの独立したステージと2つの独立したフルイディクスシステムという構成は、費用効率も良い。

#### 【0097】

図4は本開示の前記デバイスの斜視図である。レーザー走査共焦点ヘッド及びカメラ検出器が配備される。共焦点ヘッドへの光路光カーブが配備される。顕微鏡対物レンズ、例えば、高精度撮像のために屈折率を完全に試料に合致させた液浸対物レンズが示されている。反射ベースのオートフォーカスシステムのフィードバック光シグナルを捕捉するためのミラーが備えられている。開放式フローセルがステージに挿入されて示されている。Z軸移動（Z motion）と試料を通過する対物焦点面のZ軸走査（Z scanning）のためのリニアエンコーダフィードバックを備えたZ軸リニアモーターが配備される。Z軸リニアモーターの後ろに反射ベースのオートフォーカスシステム（図では不可視）が位置する。加圧・温度制御フルイディクスブロック（pressurized and temperature controlled fluidic block）が示されている。流体分注のためのバルブが配備される。分注用の試薬保持チューブが加圧フルイディクスブロックの内側に示されている。

#### 【0098】

図5は本開示に係るステージの斜視図である。ステージ温度制御のためにペルティエ冷却器用のヒートシンクが配備される。フローセル基部は、3D配列決定ライブラリーマト

リックスが取り付けられた、1×3インチ、厚さ1mmの標準的な顕微鏡観察用スライドガラスとして示されている。3D配列決定ライブラリーマトリックスがウェルの内部に取り付けられている。開放形式フローセルのフルイディクスウェルコンポーネント（fluidic well component）が2ウェル形式のものとして示されている。開放形式フローセルは、3D配列決定ライブラリーマトリックスへの、及び前記マトリックスからの試薬の不均一な拡散の原因となる不規則な3Dマトリックス上の泡と薄層流の問題を免れる。スライド配置を再現可能とするためのバネ搭載位置合わせポイントが配備される。前記フローセルは熱サイクリングステージの頂部と接触する。スライドに2D方向の力を（下方、及び、スライドの長軸方向の縁の一方に沿って）加え、試料を固定する、再現可能なスライド配置のためのルールシステムが備えられる。スライド配置を再現可能とするための位置合わせポイントが備えられる。ある実施態様では、前記フローセルは一連の開放チャンバー又はウェルから構成される。試薬が前記フルイディクスシステムにより頂部からウェルに分注され、且つ、吸引チューブにより除去される。上と下が密封された形式では、不規則な形状の3Dマトリックス上の不均一な薄層流、及び流体場において生じた渦による泡の混入又は捕え込みなどの流体力学に関連する問題が起こる場合があるため、3Dマトリックス試料にとっては開放ウェル形式が好ましい。開放ウェル形式は、対物レンズが物理的に撮像緩衝液などの撮像媒体に浸漬され、光学系と試料との間（例えば空気／ガラス境界面）の屈折率のミスマッチが最小化又は除去される、1つ以上の光軸による正立（頂部から）の顕微鏡法に適している。

10

**【0099】**

20

図6は、最適な撮像フレーム速度を達成することを目的とした光学イメージング系、照明系、運動制御系、及び画像取得系の間における協働の一例を示す模式的タイミング図である。

**【0100】**

図7は光学イメージング系、照明系、運動制御系、及び画像取得系の最適なリアルタイム協働を目的としたTTL通信構造の一例を示す模式的ブロック図である。

**【0101】**

図8は配列決定装置フルイディクスサブシステム、撮像サブシステム、及びデュアルステージサブシステムのタイミング及びリソース利用タイミングを図示する。この図は試料ホルダーを格納する2つの独立した移動ステージ、すなわち「左」及び「右」と示された2つの管理フルイディクスシステム、及び、単一の撮像軸を有する装置を表す。時間＝0のときに両方のステージがフルイディクスルーチンに従事するようにコントローラーがステージの移動を管理する。時間＝1のときにステージ1上で画像データが試料から取得され、一方でステージ2はフルイディクスルーチンに従事する。時間＝2のときにステージ1からの画像データの取得が完了し、ステージ2のフルイディクスルーチンが完了する。時間＝3のときにステージ2上で画像データが試料から取得され、一方でステージ1はフルイディクスルーチンに従事する。時間＝4のときにステージ2からの画像データの取得が完了し、ステージ1のフルイディクスルーチンが完了する。

30

**【0102】**

図9は模式デュアルステージサブシステム、フルイディクスサブシステム、及び撮像サブシステムの制御装置構成を例示するブロック図を示す。図8に示されているタイミングのようなイベントタイミングがコントローラーによって同期される。

40

**【0103】**

図10は対物レンズの状態及び前記インターフェイス接続を管理するための装置システムを示す。サブパネル100は、乾燥対物レンズ（105）と、一滴の撮像媒体（115）を含む対物レンズである液浸対物レンズ（110）とを描写する。撮像媒体としては水及び退色防止試薬などの撮像緩衝液、並びに油及び他の種類の撮像液体が挙げられる。サブパネル200は、対物レンズから泡を除去するための装置、又は対物レンズをクリーニングするための装置などの、対物レンズの浸漬及び乾燥のための装置構成を表す。前記デバイスの装備であっても消耗品の挿入物であってもよい担体（220）は、対物レンズに

50

試薬（２３５）を積層するためのウェル又は試薬分注装置などのモダリティ（２３０）を備え、対物レンズから液体を除去するための非研磨性吸収性材料又は吸引ポートなどのモダリティ（２４０）をさらに備える。サブパネル３００は対物レンズ上に液体を積層するためのルーチンを表す。当該ルーチンは、液体浸漬モダリティの上に液体インターフェイスを形成するステップ（３１０）、対物レンズ又は対物レンズ浸漬モダリティを移動すること等によって液体インターフェイスに対物レンズを接触させるステップ（３２０）、そして対物レンズを浸漬するステップ（３３０）を含む。サブパネル４００は対物レンズ（４１０）から液体を除去するためのルーチンを表す。当該ルーチンはインターフェイスを形成している液体に乾燥モダリティが接触するように対物レンズ又は乾燥モダリティを移動するステップ（４２０）、乾燥モダリティによって液体が吸収されるかもしくは吸引され、それによって液滴の無い対物レンズが生じるステップ（４３０）を含む。

10

#### 【０１０４】

図１１は再現可能に撮像軸に対してXYZ方向に試料を配置する（repeatable XYZ positioning of the sample relative to the imaging axis）ための経時的フローチャートである。固形基材が経時的に移動し得る場合、試料ホルダーの移動を決定するためのこのシステムによって、試料と撮像システムとの間の経時的なXYZ位置の再現性の精度を向上させることができる。撮像開始時に前記デバイスは撮像軸の下でポジション１に移動し、最初の画像データを取得し、画像データがコンピューターシステムに伝達される。コンピューターシステムは基準画像データセットと比較して物理的ずれ（physical offset）を計算し、当該物理的ずれが配列決定装置に伝達され、保存される。ループ５１０に示されているように、コンピューターシステムが受信した物理的ずれが閾値よりも低くなるまで、例えば、配列決定装置に保存されたポジション１に対応する物理的位置情報が基準位置状態と比較した所与の物理的变化以内であることがコンピューターシステムによって確認されるまで、前記デバイスはこれらのステップを反復する場合がある。

20

#### 【０１０５】

図１２は固形基材を含む試料ホルダーの表面をマッピングするためのシステムを示す。前記固形基材が経時的に移動する可能性があり、且つ、特定のオートフォーカスシステムがある特定の失敗率を有する可能性がある場合では、試料ホルダーの表面をマッピングするこのシステムは、オートフォーカスシステムが決定するZ軸上のずれの異常値を捨てること等により、試料と撮像システムとの間で経時的なZ位置再現性精度を向上することができる。それぞれの潜在的な撮像位置においてリアルタイムでオートフォーカスに物理的ずれを決定させるよりも、移動システムの物理的ずれを予め計算するほうがかなり速い場合があるため、このシステムは画像取得スピードも増加させうる。サブパネル６１０、６５０、及び７００を含むパネル６００は装置状態の図を表す。サブパネル６１０では、F I S S E Qヒドロゲルなどの搭載試料（mounted sample）を固定することが理解される、ガラス、シリコン、金属、プラスチック、又は別の固形材料などの固形基材（６３０）に対して、対物レンズ（６２０）を相対的に配置する。この図では、表面からのレーザー光の反射を分析すること等により対物レンズと固形基材との間の距離を決定するために前記固形基材の上にレーザー（６４０）を当てる、レーザーベースのオートフォーカス装置が含まれる。サブパネル６５０はサブパネル６１０の側面図である。対物レンズの焦点を固形物表面上に合わせることが定められているとき、前記対物レンズと固形基材との間の距離６８０は、前記対物レンズの焦点距離などの既知の値に対応する。サブパネル７００は、各走査位置（７３０）においてZオートフォーカスのずれを測定する、固形基材（７２０）上の１つ、２つ、又は３つの軸（７１５は可能な３つの動作軸を表す）方向の対物レンズ（７１０）の走査を表す。サブパネル９００は表面走査時の前記デバイス及びコンピューターシステムの挙動のフローチャートを表す。アレイ形式のように対物レンズがポジションkに配置され、Z軸上のずれ（Z o f f s e t）が決定され、保存される。ある数の位置をサンプリングするとZ軸上のずれがコンピューターシステムに伝達され、コンピューターシステムがオートフォーカスのずれを平面にあてはめること等により物理的ずれを計算する。物理的ずれが配列決定装置に返信され、配列決定装置が先

30

40

50

に進んで正確なZ軸上の物理的ずれを伴い3D撮像データを取得する。サブパネル800は、正確な物理的なZ軸上のずれを決定する目的でオートフォーカスZ軸上のずれを平面にあてはめる図を表す。

#### 【0106】

本明細書において開示された方法の実施には、従来の生物学的方法、ソフトウェア、コンピューター、及びコンピューターシステムが用いられる。よって、本明細書に記載される方法は、全体的又は部分的にコンピューターにより実施される方法（computer implemented method）であり得る。本開示の方法において利用されるコンピューターソフトウェアは、本発明の方法におけるロジックステップを実施するための、コンピューターに実行可能な命令を担持したコンピューター読み込み可能な媒体を含む。適切なコンピューター読み込み可能媒体としてはフロッピーディスク、CD-ROM/DVD/DVD-ROM、ハードディスクドライブ、フラッシュメモリー、ROM/RAM、磁気テープ、及び開発可能である他のものが挙げられる。コンピューターに実行可能な命令は、適切なコンピューター言語又は幾つかのコンピューター言語の組合せで書かれていてよい。光強度の取得とデータ値への加工処理、試薬送達の自動化、熱サイクリングなどの反応条件の自動化、試料ホルダーと試料を含むステージの移動の自動化、及び光強度データの加工処理と保存、並びに本明細書に記載される他の方法及び態様をはじめとする様々な目的のために、本明細書に記載される前記方法は、様々な市販のコンピューター及びコンピュータープログラム製品及びソフトウェアも使用し得る。

#### 【0107】

本開示の態様は、三次元重合マトリックス内で複数の核酸を増幅してアンプリコンを作製すること、前記アンプリコンを前記マトリックスに共有結合すること、検出可能な標識で前記複数のアンプリコンが標識される光学的配列決定法を用いて、前記複数のアンプリコンを配列決定すること、及び前記複数のアンプリコンを立体撮像して前記複数のアンプリコンの三次元撮像データを作成すること；ここで、光強度データは三次元立体画像に加工されることを含む、三次元重合マトリックス内の複数の核酸を分析する方法に向けられている。ある態様では、前記複数の核酸が生体試料に含まれており、前記マトリックスを形成する材料が前記生体試料に導入される。ある態様では、前記複数の核酸が細胞に含まれており、前記マトリックスを形成する材料が前記細胞に導入される。ある態様では、前記複数の核酸が組織試料に含まれており、前記マトリックスを形成する材料が前記組織試料に導入される。ある態様では、前記細胞内の前記複数のアンプリコンの相対的位置を前記三次元撮像データによって特定する。ある態様では、蛍光in situ配列決定法を用いて前記複数のアンプリコンを配列決定する。ある態様では、前記複数の核酸が、3D構造化照明法、選択的平面照明顕微鏡法、光シート顕微鏡法、放出光処理法、ピンホール共焦点顕微鏡法を用いる立体撮像、開口相関共焦点顕微鏡法を用いる立体撮像、スライスからの立体復元を用いる立体撮像、デコンボリューション顕微鏡法を用いる立体撮像、収差補正多焦点顕微鏡法を用いる立体撮像、及びデジタルホログラフィック顕微鏡法を用いる立体撮像のうちの1つ以上を用いて立体撮像される。

#### 【0108】

各参照文献は全ての目的のために全体が参照により本明細書に援用される。

Drmanac, R., Sparks, A.B., Callow, M.J., Halpern, A.L., Burns, N.L., Kermani, B.G., Carnevali, P., Nazarenko, I., Nilsen, G.B., Yeung, G., et al. (2010). Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* 327, 78-81.

Islam, S., Kjallquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.B., Lonnerberg, P., and Linnarsson, S. (2011). Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 21, 1160-1167.

Larsson, C., Grundberg, I., Söderberg, O., and Nilsson, M. (2010). In situ detection and genotyping of individual mRNA molecules. *Nature methods* 7, 395-397.

10

20

30

40

50

Larsson, C., Koch, J., Nygren, A., Janssen, G., Raap, A.K., Landegren, U., and Nilsson, M. (2004). In situ genotyping individual DNA molecules by target-prime d rolling-circle amplification of padlock probes. *Nature methods* 1, 227-232.

Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., and Church, G.M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728- 1732.

本発明の例示的な態様を以下に記載する。

< 1 >

三次元重合マトリックス内で複数の核酸を増幅してアンプリコンを作製すること、

前記アンプリコンを前記マトリックスに共有結合すること、

検出可能な標識で前記複数のアンプリコンが標識される光学的配列決定法を用いて、前記複数のアンプリコンを配列決定すること、及び

前記複数のアンプリコンを立体撮像して前記複数のアンプリコンの三次元撮像データを作成すること；ここで、光強度データは三次元立体画像に加工されることを含む、三次元重合マトリックス内の複数の核酸を分析する方法。

10

< 2 >

前記複数の核酸が生体試料に含まれており、前記マトリックスを形成する材料が前記生体試料に導入される、< 1 >に記載の方法。

< 3 >

前記複数の核酸が細胞に含まれており、前記マトリックスを形成する材料が前記細胞に導入される、< 1 >に記載の方法。

20

< 4 >

前記複数の核酸が組織試料に含まれており、前記マトリックスを形成する材料が前記組織試料に導入される、< 1 >に記載の方法。

< 5 >

前記細胞内の前記複数のアンプリコンの相対的位置を前記三次元撮像データによって特定する、< 1 >に記載の方法。

< 6 >

蛍光in situ配列決定法を用いて前記複数のアンプリコンを配列決定する、< 1 >に記載の方法。

30

< 7 >

前記複数の核酸が、3 D構造化照明法、選択的平面照明顕微鏡法、光シート顕微鏡法、放出光処理法、ピンホール共焦点顕微鏡法を用いる立体撮像、開口相関共焦点顕微鏡法を用いる立体撮像、スライスからの立体復元を用いる立体撮像、デコンボリューション顕微鏡法を用いる立体撮像、収差補正多焦点顕微鏡法を用いる立体撮像、及びデジタルホログラフィック顕微鏡法を用いる立体撮像のうちの1つ以上を用いて立体撮像される、< 1 >に記載の方法。

< 8 >

三次元核酸含有マトリックス用の試料ホルダーを含む、多軸ステージ又は位置決めシステム；

40

前記ステージに作動可能に接続されており、増幅及び配列決定のための熱サイクリングに有用な時間及び温度をプログラムすることができる、加熱又は冷却装置；

1種類以上の試薬を収容するための1つ以上のリザーバーと流体連結しており、プログラムされた量の液体試薬の前記試料ホルダーへの分注をプログラムすることができる、前記試料ホルダーに1種類以上の試薬を分注するために配置された流体ディスペンサー；

前記流体ディスペンサーに作動可能に接続されており、前記流体ディスペンサーを介して前記1つ以上のリザーバーから1種類以上の試薬を押し出す又は引き抜くポンプ；

1つ以上の光軸を含む光学アセンブリ；

受光できるように前記試料ホルダーに通じて配置されており、前記核酸試料の三次元立

50

体画像へと加工される光強度シグナルを受光する、1つ以上の検出器；並びに  
前記試料ホルダーへの試薬の導入、前記試料ホルダーの熱サイクリング、並びに画像の  
検出及び取得を、自動化し制御するための、ソフトウェアを備えた1つ以上のマイクロプ  
ロセッサ  
を含む、自動配列決定及び立体撮像デバイス。

#### 【0109】

各参照文献は全ての目的のために全体が参照により本明細書に援用される。

Drmanac, R., Sparks, A.B., Callow, M.J., Halpern, A.L., Burns, N.L., Kermani, B.G., Carnevali, P., Nazarenko, I., Nilsen, G.B., Yeung, G., et al. (2010). Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* 327, 78-81.

Islam, S., Kjallquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.B., Lonnerberg, P., and Linnarsson, S. (2011). Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 21, 1160-1167.

Larsson, C., Grundberg, I., Söderberg, O., and Nilsson, M. (2010). In situ detection and genotyping of individual mRNA molecules. *Nature methods* 7, 395-397.

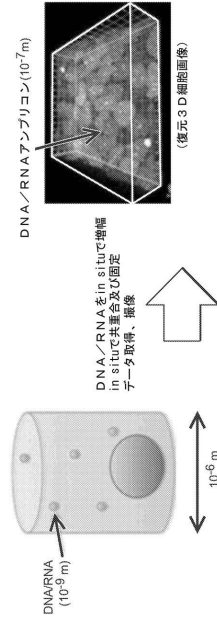
Larsson, C., Koch, J., Nygren, A., Janssen, G., Raap, A.K., Landegren, U., and Nilsson, M. (2004). In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nature methods* 1, 227-232.

Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., and Church, G.M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728-1732.

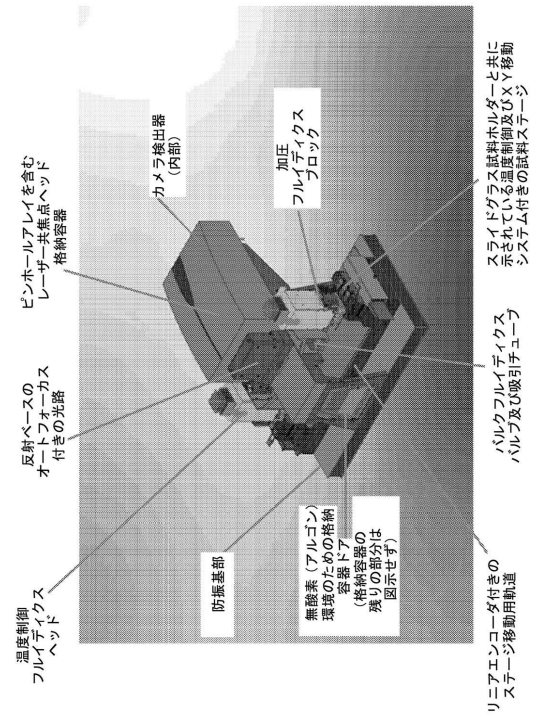
10

20

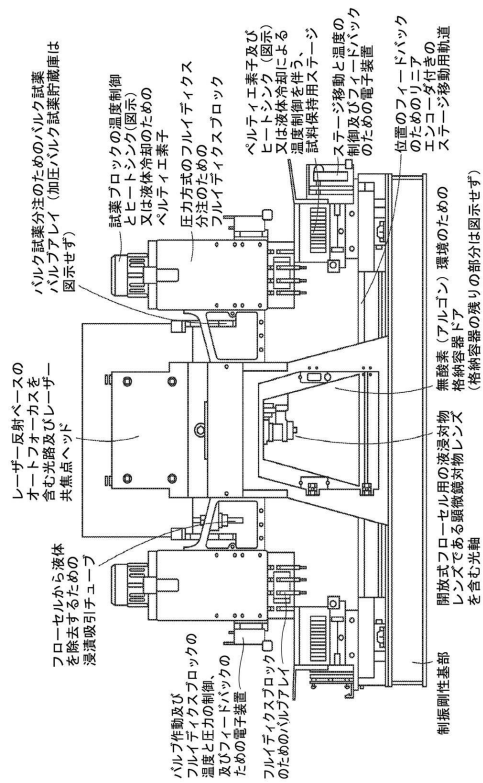
【図 1】



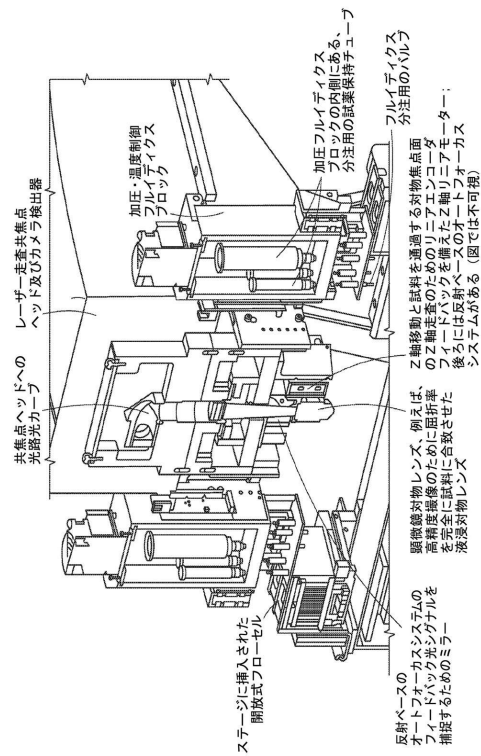
【図 2】



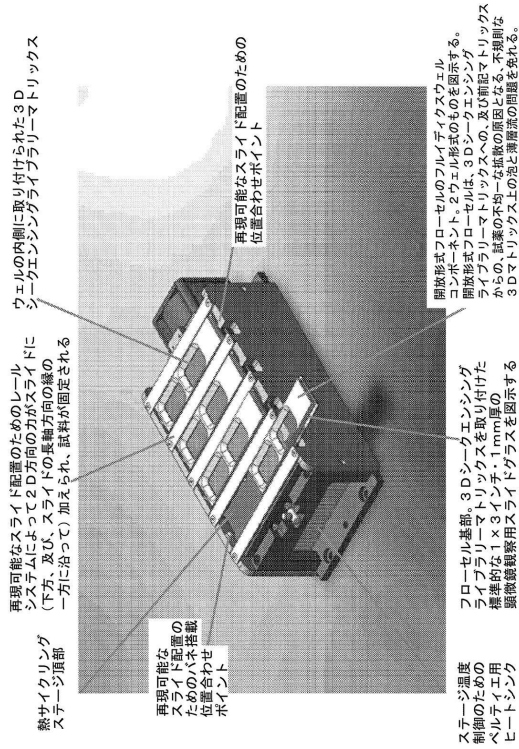
【図 3】



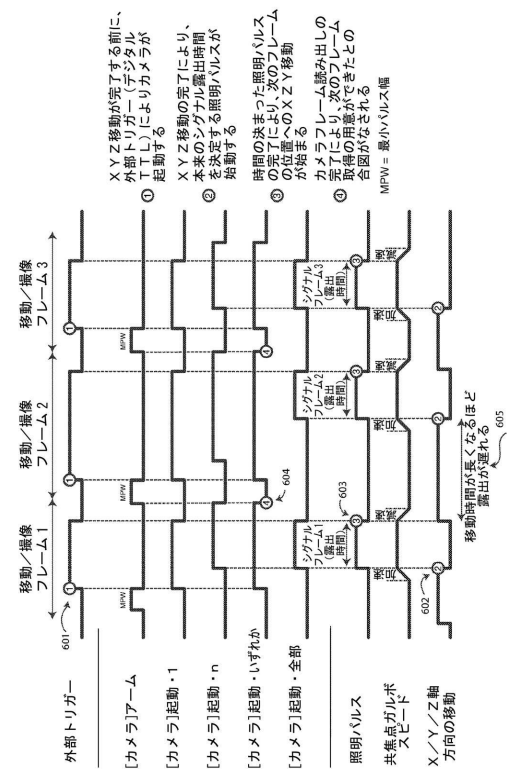
【図 4】



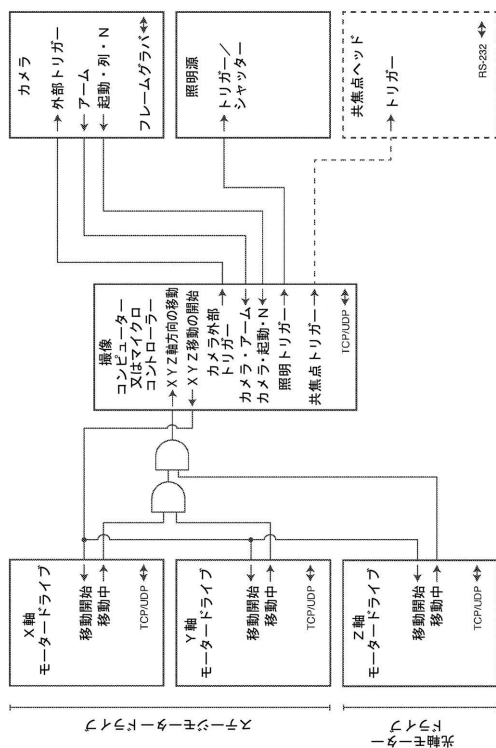
【図 5】



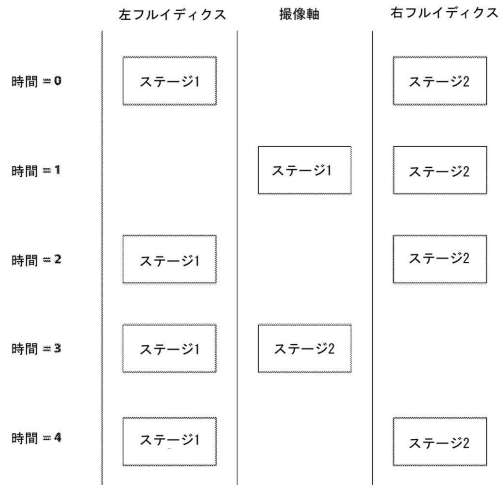
【図 6】



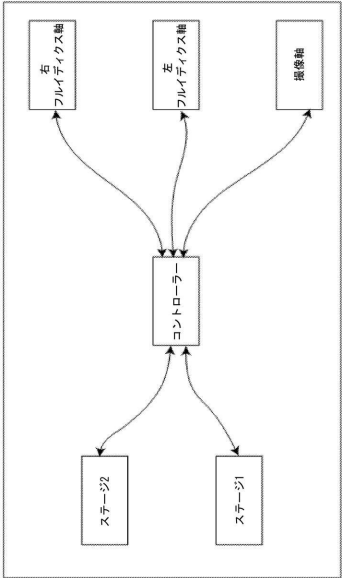
【図 7】



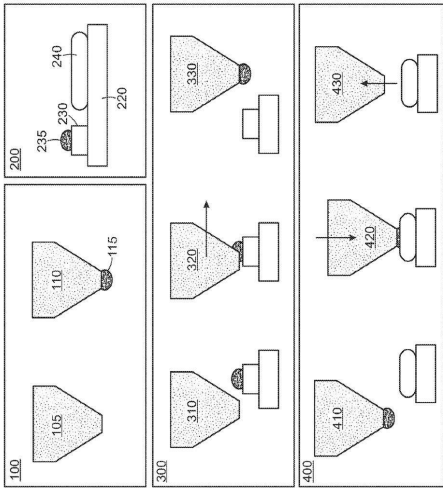
【図 8】



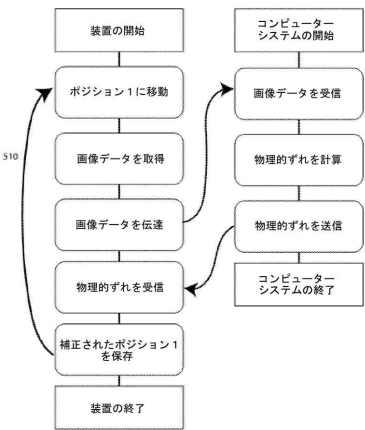
【図 9】



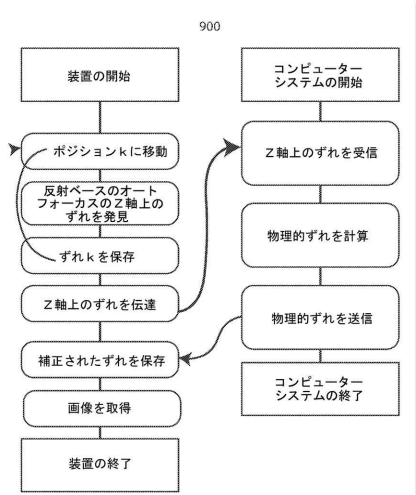
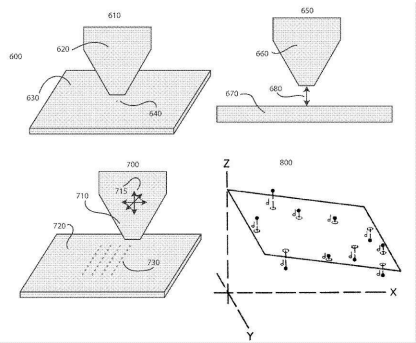
【図 10】



【図 11】



【図 12】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 33/50 (2006.01)** G 0 1 N 33/50 P  
**C 1 2 M 1/00 (2006.01)** C 1 2 M 1/00 A

(72)発明者 テリー、 リチャード シー、  
 アメリカ合衆国 0 1 7 4 1 マサチューセッツ州 カーライル ネイサン レーン 1 0 0

(72)発明者 イ、 ジェヒョク  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 4 マサチューセッツ州 オールストン アパート 5 1 3 ブレイナ  
 ード ロード 5 0

(72)発明者 チャーチ、 ジョージ エム、  
 アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州 ブルックライン ケント ストリート 2 1  
 8

(72)発明者 プルーイット、 ベンジャミン ダブリュー、  
 アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州 ブルックライン ロベス ストリート 4 2

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 6 3 8 8 6 (WO, A 1)  
 PI: Piezo Nano Positioning., 2 0 0 8 年, pp.1-6, URL, [https://www.pi-usa.us/fileadm  
 in/user\\_upload/pi\\_us/files/product\\_datasheets/N725\\_Piezo\\_Focus\\_Positioner.pdf](https://www.pi-usa.us/fileadmin/user_upload/pi_us/files/product_datasheets/N725_Piezo_Focus_Positioner.pdf)  
 Science, 2 0 1 4 年, vol.343, no.6177, pp.1360-1363  
 Nat. Protoc., 2 0 1 5 年, vol.10, no.3, pp.442-458

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 1 2 Q 1 / 6 8 - 1 / 6 8 9 7  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S /  
 W P I D S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 P u b M e d