

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6440627号
(P6440627)

(45) 発行日 平成30年12月19日(2018.12.19)

(24) 登録日 平成30年11月30日(2018.11.30)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 Q	1/00	(2006.01)	C 1 2 Q	1/00	Z
C 1 2 Q	1/6806	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6806	Z

請求項の数 25 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2015-543539 (P2015-543539)	(73) 特許権者	513014477
(86) (22) 出願日	平成25年11月26日 (2013.11.26)		ジェンセル バイオシステムズ リミテッド
(65) 公表番号	特表2015-535429 (P2015-535429A)		ド
(43) 公表日	平成27年12月14日 (2015.12.14)		アイルランド国 カウンティ リムリック
(86) 国際出願番号	PCT/IB2013/003145		, ラヒーオン, ラヒーオン ビジネス パーク
(87) 国際公開番号	W02014/083435		, バリーカミン アベニュー
(87) 国際公開日	平成26年6月5日 (2014.6.5)	(74) 代理人	100114557
審査請求日	平成28年10月13日 (2016.10.13)		弁理士 河野 英仁
(31) 優先権主張番号	61/730, 336	(74) 代理人	100078868
(32) 優先日	平成24年11月27日 (2012.11.27)		弁理士 河野 登夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	カラン, キーラン
			アイルランド カウンティ リムリック,
			バリークラフ, リスナルティ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体試料の処理

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

内面及び外面を有する少なくとも1つの毛細管であって、前記外面は前記毛細管の外壁、前記毛細管の基端部及び前記毛細管の末端部を有して、略疎水性であり、前記内面は、前記毛細管の前記末端部に隣り合う略親水性の計量領域と前記計量領域に近位に隣り合う略疎水性の制限領域とを有する前記毛細管と、

該毛細管の前記基端部と流体連通している圧力源と、

該圧力源と動作可能に連結されており、前記毛細管の前記末端部から水溶液を吐出させるべく前記圧力源によって前記毛細管の前記基端部に十分な正圧を印加させるようにプログラムされている毛細管制御部と、

前記毛細管の外部に設けられて、前記毛細管に外部から外気流を加えるエアーストを備えていることを特徴とする毛細管システム。

【請求項 2】

前記計量領域は略親水性のエッチングされたフルオロポリマを含み、前記制限領域及び外面の両方は略疎水性のフルオロポリマを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の毛細管システム。

【請求項 3】

前記計量領域の長さ及び断面積により所定の容積が定められていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の毛細管システム。

【請求項 4】

前記毛細管はガラス基材を有することを特徴とする請求項 1 に記載の毛細管システム。

【請求項 5】

前記計量領域は、前記ガラス基材の露出した親水性表面を有することを特徴とする請求項 4 に記載の毛細管システム。

【請求項 6】

前記毛細管はガラス基材を有し、

前記計量領域は前記ガラス基材の露出した親水性表面を有し、

前記制限領域は前記ガラス基材のコーティングされた疎水性表面を有することを特徴とする請求項 1 に記載の毛細管システム。

【請求項 7】

前記毛細管を複数の位置に動かすように構成され、前記毛細管制御部に動作可能に連結されたアクチュエータを更に備えており、

前記毛細管制御部は、

前記アクチュエータによって前記毛細管を動かして前記末端部を水性試料と接触させ、該水性試料を毛細管作用によって前記計量領域に引き込み、

前記アクチュエータによって前記毛細管を分注位置に動かし、

前記圧力源によって前記毛細管の前記基端部に十分な正圧を印加し、前記水性試料を前記毛細管の前記末端部から排出させる

ようにプログラムされていることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の毛細管システム。

【請求項 8】

前記毛細管制御部は、前記毛細管の前記基端部に十分な正圧を印加して、毛細管力を前記正圧の力と平衡させて前記計量領域における毛細管作用を停止させるように更にプログラムされていることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の毛細管システム。

【請求項 9】

前記計量領域の容積が 10 ナノリットル ~ 10000 ナノリットルの範囲内であることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の毛細管システム。

【請求項 10】

複数の毛細管と圧力導管とを更に備えており、

前記複数の毛細管は夫々基端部を有し、

夫々の基端部は前記圧力導管と流体連通しており、

前記圧力源から印加される圧力が前記複数の毛細管の全てに印加されるように、前記圧力導管は前記圧力源と流体連通していることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の毛細管システム。

【請求項 11】

容器と熱接触するように担体液体の槽を受ける高熱伝導性の前記容器と、前記担体液体の表面上に複合液体セルを安定させるように構成された少なくとも1つの安定化装置を有し、前記容器に固定されているトレーと、前記安定化装置と熱接触しており、前記容器及び前記トレーの両方に固定されている加熱要素とを備えている再利用可能デバイスを使用して試料を処理する方法であって、

前記容器に担体液体の槽を置くステップと、

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の毛細管システムを用いて前記安定化装置の1つに第1の試料液体及び第1の封入液体を置いて第1の複合液体セルを作成し、前記第1の試料液体、第1の封入液体及び担体液体は全て互いに不混和性であるステップと、

前記第1の試料液体を、少なくとも

前記加熱要素を作動させることにより前記第1の複合液体セルを加熱して、

前記第1の複合液体セルに少なくとも1つの試薬を添加する

ことによって処理する第1処理ステップと

を有することを特徴とする方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記第 1 処理ステップ中、(a) 前記第 1 の試料液体は前記第 1 の複合液体セルから除去されず、(b) 前記第 1 の複合液体セルは前記安定化装置から除去されないことを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記第 1 処理ステップでは更に、前記第 1 の複合液体セルから前記第 1 の試料液体を除去することを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記第 1 処理ステップでは更に、除去された第 1 の試料液体中の生体分子を単離することを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記再利用可能デバイスの前記容器は冷却システムに動作可能に取り付けられており、少なくとも 1 つの冷却導管を通して冷却用流体を流すことにより前記第 1 の複合液体セルを冷却するステップを更に有することを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記第 1 処理ステップでは更に、断片化及びパーコーディングを行うことを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記第 1 処理ステップでは更に、核酸の増幅を行うことを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記第 1 処理ステップでは更に、夫々の安定化装置の近傍における電磁的な観察によって前記第 1 の試料液体中の標的核酸の存在を推定することを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記第 1 処理ステップの後に前記第 1 の試料液体及び第 1 の封入液体を除去するステップと、

前記毛細管システムを用いて前記安定化装置の 1 つに第 2 の試料液体及び第 2 の封入液体を置いて第 2 の複合液体セルを作成し、前記第 2 の試料液体、第 2 の封入液体及び担体液体は全て互いに不混和性であるステップと、

前記第 2 の試料液体を、少なくとも

前記加熱要素を作動させることにより前記第 2 の複合液体セルを加熱して、

前記第 2 の複合液体セルに少なくとも 1 つの試薬を添加する

ことによって処理する第 2 処理ステップと

を更に有することを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記第 2 処理ステップ中、(a) 前記第 2 の試料液体は前記第 2 の複合液体セルから除去されず、(b) 前記第 2 の複合液体セルは前記安定化装置から除去されないことを特徴とする請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記第 2 処理ステップでは更に、前記第 2 の試料液体を前記第 2 の複合液体セルから除去することを特徴とする請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 2 処理ステップでは更に、除去された第 2 の試料液体中の生体分子を単離することを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

分注要素、

該分注要素に動作可能に連結され、前記分注要素を所定の範囲の位置に動かすように構成されたアクチュエータ、及び

前記アクチュエータに命令して前記分注要素を動かし、

10

20

30

40

50

前記分注要素に命令して液体源から液体を取り出し、
 前記分注要素に命令して液体を分注する
 ようにプログラムされている計量制御部
 を有する液体計量システムと、
 容器と熱接触するように担体液体の槽を受ける高熱伝導性の前記容器、
 前記担体液体の表面上に複合液体セルを安定させるように構成された少なくとも1つの安定化装置を有し、前記容器に固定されているトレー、及び
 前記安定化装置と熱接触しており、前記容器及び前記トレーの両方に固定されている加熱要素

を有する再利用可能デバイスと、

試料液体源、

封入液体源、

液体処理システム、及び

該液体処理システムに動作可能に連結されたセル形成制御部

を有する複合液体セル形成システムと

を備えており、

前記セル形成制御部は、前記液体処理システムに

(1) 前記封入液体源から封入液体を取り出させ、

(2) (a) 前記容器中の担体液体の表面上に (b) 前記安定化装置の近傍で、前記担体液体と不混和性の取り出された封入液体を排出させ、排出された封入液体は前記担体液体と混合せずに前記担体液体上で浮かび、前記安定化装置によって固定させ、

(3) 前記試料液体源から試料液体を取り出させ、

(4) 前記試料液体が前記封入液体又は前記担体液体と混合しないように、前記封入液体及び前記担体液体と不混和性の取り出された試料液体を排出させる

ようにプログラムされており、

前記アクチュエータが前記分注要素を安定化装置と同期して分注位置に動かすことができるように、前記液体計量システム及び前記再利用可能デバイスは互いに対して配置されており、

前記液体計量システムは、請求項1～10のいずれか一項に記載の毛細管システムであることを特徴とするシステム。

【請求項24】

前記計量制御部及び前記セル形成制御部は単一の制御部であることを特徴とする請求項23に記載のシステム。

【請求項25】

前記液体計量システムは、前記複合液体セル形成システムの前記液体処理システムであることを特徴とする請求項23又は24に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【先行技術文献】

【特許文献】

【0001】

【特許文献1】米国特許第3783696号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0002】

現在、生体試料の処理には複数の重大な欠点がある。このような欠点として、比較的多量の反応容積が必要であり、その結果、試薬のコストが高くなること、消耗品のコストが高いこと、並びに、プロトコル及びプロセスに労力が必要であるため、相互汚染が極めて生じ易いことがある。これらの理由から、現在のところ生化学プロセスで夫々の個別の試料を完全に制御して単離することを確実に行うことができない。

【0003】

10

20

30

40

50

複数の生化学プロセスの適用、例えばこれらに限定されるものではないが、細胞スクリーニング、イムノアッセイ、核酸/リボ核酸試料の抽出、核酸の単離/精製、核酸の増幅、シーケンシング用の核酸ライブラリの調製では、容積のサイズ、化学的なコスト、消耗品のコスト、労働コスト、及び反応効率に制限があることは明らかである。

【0004】

医薬品の研究開発では、標的薬物が細胞集団に及ぼす効果を評価するため化合物のスクリーニングが用いられ得る。細胞を溶液中で対象の標的化合物と結合し、任意には相互作用を促進させるために化学的刺激を与える。典型的には細胞を化合物に最長48時間曝し、次にRT-PCRによってある細胞タンパク質の発現を検査する(例えばサイトカインを測定する)ため分析し、及び/又は遺伝子の発現のプロファイルを決定する。現在、このタイプの検査は典型的には、懸濁液中に最大1.5ミリリットルの細胞を必要とする96/384ウェルプレートタイプで行われる。

10

【0005】

核酸試料の抽出及び精製/単離は、細胞含有物(例えば血液又は組織試料)から遺伝物質を遊離させて単離するために一般的に必要とされるステップである。このために、細胞を過剰量の緩衝液に懸濁させて、細胞壁を破壊する溶解を行い、核酸を露出させることが必要である。試料のタイプ/由来によっては核酸を精製し、その後の分析に影響を及ぼす妨害化合物を低減/除去することが必要な場合がある。核酸を精製するための典型的な手法には、膜/カラムを通して遠心分離してDNA結合を促進し、続いて更なる分析のため適切な緩衝液に再懸濁することが伴う。別の一般的な方法では、核酸が結合し得る磁気ビーズ懸濁液を導入する。次に磁界の作用を用いてビーズを固定する一方、含有物の除去を抑制することができる。次に典型的には適切な緩衝液を用いて対象の核酸を再懸濁すると、化合物を阻害することなしに分析に使用可能な試料が得られる。このプロセスは典型的には、数十マイクロリットルの開始試料が必要な96ウェルプレート又は384ウェルプレートで実施される。

20

【0006】

ライブラリの調製は、次世代シーケンシングによる解析用のゲノム核酸を調製するプロセスである。現在、次世代プラットフォームでは、パイロシーケンシング、合成によるシーケンシング又は連結反応によるシーケンシングなどの少し異なる方法が用いられている。しかしながら多くのプラットフォームでは、シーケンシングの前に核酸を調製することが必要である。典型的なステップには、断片化(音波処理、噴霧化又は剪断)と、その後のDNA修復及び末端ポリッシング(平滑末端又はAオーバーハング)と、最後のプラットフォーム特有のアダプタ連結反応とが含まれる。現今の最先端のシーケンサであっても、正確な配列決定には比較的高い局所濃度の標的分子が必要である。特定のワークフローを合理化するには、自動化された機械において、核酸含有物を修飾して増幅するための一連のプロセスの自動化及び小型化に伴う課題を克服しなければならない。この生化学プロセスは一般的に、典型的な容積が10マイクロリットル~200マイクロリットルの範囲内の96静的ウェルプレート又は384静的ウェルプレートで実施される。

30

【0007】

別の生化学プロセスとしてパイロシーケンシングでは、比較的高濃度の核酸をプライマでコーティングが施されたビーズと混合する。核酸はビーズに付着してクローンコロニーを形成する。次に、形成されたクローンコロニーをエマルジョン系のPCRを用いて増幅する。シーケンサは、シーケンシングに必要な関連酵素と併せて単一のビーズに十分な大きさのピコリットル容積のウェルを多数含む。パイロシーケンシングはルシフェラーゼ酵素を使用して読取り情報として光を発生させ、シーケンサは、加えられたヌクレオチド毎にウェルの写真を撮る。このプロセスの重大な問題の1つは、ビーズをプライマで効率的にコーティングすることである。現在の技術を用いると、一定の割合のビーズはプライマで適切にコーティングされず、反応効率が低下する。現今の技術を用いてビーズのコーティング効率を向上させるには、持続不可能な試薬コストの増加が必要となる。

40

【0008】

50

核酸連結反応においても、同様の生化学処理問題が生じる。核酸連結反応は現在の分子生物学研究において組み換え核酸配列を生じさせるための重要なツールとなっている。例えば、核酸リガーゼを制限酵素と共に使用して、核酸断片、多くの場合には遺伝子を、遺伝子工学で使用されるプラスミドに挿入する。核酸連結反応は分子生物学において比較的一般的な技法であり、DNAの短鎖が、用いられるプロトコルに応じた特定の温度、一般には16~25で酵素、リガーゼの作用によって共に結合され得る。例えば合成遺伝子配列を構築する際に、DNAの短鎖の3以上の配列を共に結合するには、DNAの全ての鎖を結合して、次に連結反応を実施することが不可能である。このため、1つの鎖の末端が誤った鎖の始点に結合されるランダム配列になる。この誤った配列又は向きは、遺伝子コードの順序が決定的に重要である合成して構築された遺伝子では望ましくない。この技法を正しく実施するために、初めに隣り合う配列の対での組み合わせを連結して正しい向きを生じさせなければならない。このような対にされた合成構築物を、次に正しい向きに連結することにより、更に長い合成構築物が生成され得る。このプロセスには大量の複雑な化学的処理及び操作が伴う。これは、現今の液体処理技術を使用して実施される場合にはかなり労力の必要なプロセスとなり得ると共に、消耗品のコストが高くなり、静的ウェルプレート及びピペット吸引の既知のデッドボリューム損失を被る。また、現今の液体処理技術を使用すると、少量の容積の混合及び制御が、比較的少量の容積の吸引及び操作能力によって制限される。核酸連結反応で使用される典型的な容積は、50~200塩基対の核酸鎖長で10~200マイクロリットルである。

【0009】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、標的DNA及びcDNAを増幅すべく、分子生物学における多くの適用に広く用いられている。PCR技術では、DNAの断片の単一又は数個のコピーを増幅して、特定のDNA配列の数千個乃至数十億個のコピーを生成する。現在のPCR機器は、PCRプロセスを5~200マイクロリットルの範囲内の反応容積で実行する。少量の容積でPCRを実行することの最大の障害の1つは、手動のピペットによる少量の構成試薬の操作が困難なことである。大きい容積サイズは、サブマイクロリットルの容積で分注して混合する能力が既存の技術に不足していることの直接的な結果である。更に、流動システムに基づく次世代マイクロ流体技術では、生化学プロセスに必要な試料の実際の量に対して分注される開始容積によって制限されている。このようなマイクロ流体システムはまた、生化学プロセス中、試料の定められたプロトコル制御に限定される。このようなシステムは、典型的にはマイクロスケールの流路網に基づいてサブマイクロリットルの容積を運んで混合する。これらの技術の主な欠点の一部として、(1)汚染を防止するためマイクロ流体の消耗品が使い捨てであるか又はその使用に限度があること、(2)夫々の個別の試料の動的な制御を欠いており、即ち、任意の個別の試料を生化学プロセスにおける任意の時点で運ぶ及び/又は混合することができないこと、及び(3)システムの密閉構成となる機器類が反応から出る気泡の発生に対処することができないことがある。

【0010】

詳細には、デジタルポリメラーゼ連鎖反応(dPCR)の現在の方法は、初期試料を複数のより少量の試料へと、夫々のサブ容積に1つのDNA鋳型が残るまで分割することによって実施される。DNAを含有する正サブ容積の数を数えて、元の容積中の開始コピー数を計算することができる。典型的には、これには1つの反応容積につき統計的に1つのDNA標的を含む試料容積を生じさせるために複数の段階希釈ステップが伴う。統計的には全容積のうちのあるサブセットを検査することで初期コピー数を決定し得るため、PCR反応の総数を減らすことが可能である。しかしながら、希少な標的を検出するために、より大きいサブセットの容積を検査して統計的精度を向上させる必要がある。これによりプランク容積の数が増え、検査容積が大きくなり、即ち、化学物質、時間、機器類、試料の処理、及びプロセスステップをより多く使用することになる。

【0011】

dPCRの別の方法では、油性担体中に検査容積のエマルジョンを生成させる。この方

10

20

30

40

50

法は、ある結果に必要な機器の数及び時間を減らそうとする試みである。まず、標的試料を担体油中に希釈して乳化し、1滴につき1コピー未満の統計的分布を有する十分に小さい容積にする。次にこのより大きい容積を単一の試料容積として扱い、PCRプロトコルを使用して処理することができる。しかしながら、この方法は概して終点検出に限定されている。フローサイトメータの形態の、従ってセンサを通り過ぎて流れる液滴毎に標的の存在を検出することが可能な更なる機器類が必要である。フローサイトメータは一般的に高価であり、特定の流体媒体を必要とすることもあり、終点検出のみが可能である。終点検出の制限として、後処理ステップが必要であること、結果を得るまで時間がより長くなること、より多くの機器類に関する特殊性及び要件が挙げられる。エマルジョン系のPCR法の更なる課題は、各液滴の必要とされる安定性及び制御である。液滴の合流又は分流により、処理に更なる統計誤差が生じる。

10

【0012】

現今のピペット操作及び液体処理システムは、上記に述べた適用の各々で所与の開始容積を100%処理し得ない。ピペットについては、液体貯蔵システム(静的プラスチックウェルプレート)及び液体貯蔵システム内の機械的作動の両方が、試料の完全な吸引を妨げる。静的プレートにおけるこのような損失又はデッドボリュームは、表面の濡れ特性及び幾何形状によって説明されることができ、これらのいずれについても、現在の技術は考慮できていない。

【0013】

流動システムでは、生化学プロセス中又は生化学プロセスの終了の際に個別の生体試料を収集することが、既存の技術にとって極めて難題であることが分かっている。典型的な連続流動システムはポンプ及びリザーバを備えており、これらが概して、特にマイクロスケールでの臨界流体の容易な回収を技術的に困難にしている。また、流動システムではシステムの初期プライミングに時間、費用がかかり、初期プライミングが誤って行われた場合には検査の破滅的失敗を招き、生体試料の再検査が必要となる。

20

【0014】

既存の生化学処理の別の欠点は、ナノリットル容積及びサブナノリットル容積の生化学プロセスを自動化できないことである。既存の自動化技術では、夫々の個別の試料を運び、混合する又は回収することができない。

【0015】

少量の流体を操作することが必要なより一般的な化学処理、例えば一般微量化学では、静的ウェルプレート又はシステム内に残留する廃液流体の容積に、現在の技術の限界があることを明確に認めることができる。この結果、常に高度化している分子生物学技術、及び効率向上の必要性によって求められるより少量の容積を分注して制御する能力が、現在の技術に欠けている。

30

【0016】

遺伝子型判定は、種のメンバー間での遺伝的変異を決定するために広く用いられているプロセスである。一塩基変異多型(SNP)は特定のタイプのDNA配列変異であり、SNPを決定することにより、様々な疾患の原因に関する見解を得ることができる。SNPはまた、表現型の差異の予測にも有用である。SNP遺伝子型判定は、関連した表現型情報を与えるために同定された特定のサブセットのSNPを標的にするのに効果的なツールである。SNPの高処理遺伝子型判定には、PCR及びフラップエンドヌクレアーゼアッセイなどの様々な方法が有用であるが、大量の反応容積並びにこの反応容積に付随して熱サイクルに必要なコスト及び時間、SBSウェルプレートの使用に固有のデッドボリューム、及び多量のウェルプレート及び先端部を使用することによる消耗品のコストなど、標準的な液体処理手法に関連する限界がある。

40

【0017】

従って本発明は、上記の問題の少なくとも一部を克服するための試料処理の向上に関する。

【課題を解決するための手段】

50

【0018】

液体試料を調製して処理するためのデバイス、システム及び方法を開示する。詳細には、例えば、ライブラリの調製の自動化、ステップ毎の容積の回収性、試料の処理容積の低減、試料の処理プロセスの減少、即ち、プロセスステップ毎のプレート間の移動の低減、プロトコル試薬の使用の低減、使い捨てでなく汚染のない処理用プラットフォーム、独立した処理プレート又はチップの連続フロー、サーマルチップ又はサーマルプレート毎の柔軟なプロトコル、即ち、異なるチップ毎に熱サイクル及び試薬プロトコルを独立してプログラム可能であること、高処理を可能にする容易に拡張可能なチップ/プレート技術、及び、正規化ステップにより夫々の試料中のヌクレオチド配列コピー数を標準化し得ることを提供することにより、本発明は上記に記載する問題の多くに対処する。

10

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】毛細管システムを概略的に示す図である。

【図2】エアシースを備えた毛細管システムを示す写真図である。

【図3】再利用可能プレートの一実施形態を概略的に示す図である。

【図4】全システムの例を示す写真図である。

【図5】全システムで行われる特定のプロトコルを概略的に示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

毛細管計量システム

水性液体の分注システムは毛細管作用に基づくことが可能である。このような毛細管システムは、毛細管、つまり穴を画定する内面を有する毛細管を備え得る。毛細管は外面も有し得る。外面は略円筒状であり、側面、上面及び底面を有し得る。内面は2つの領域、つまり末端側の計量領域と基端側の制限領域とを有し得る。内面の計量領域は略親水性であってもよい一方、内面の制限領域は略疎水性であってもよい。外面全体も疎水性であってもよい。

20

【0021】

毛細管の、本明細書では末端部と称される端部を水性試料に接触させると、試料が毛細管作用によって穴内へと引き込まれる。しかしこの毛細管作用は、水性試料が穴の親水性部分、即ち濡れ性部分内に含まれている場合にのみ機能し得る。十分な水性試料が穴内に引き込まれ、計量領域が完全に満たされると、水性試料に有効な更なる濡れ性表面がないため、毛細管作用はそれ以上試料液体を引き込まなくなる。このように、毛細管作用は所望の量の水性液体を正確に計量するために利用され得る。断面積が一定の穴では、毛細管作用によって引き込まれる液体の容積が、計量部分の長さとの積に等しくなる。

30

【0022】

ある実施形態では、計量領域及び制限領域は以下のとおり構築され得る。毛細管のある長さを疎水性ポリマ、例えばポリテトラフルオロエチレン(PTFE)などのフルオロカーボンポリマでコーティングするか、又は毛細管全体を疎水性ポリマから形成し得る。次にエッチング溶液を毛細管の内部の穴に通して、PTFEコーティングからPTFEの表面近傍のフッ素原子を除去する。このプロセスによってフッ素原子を典型的には数オングストロームの深さまで除去する。その結果、エッチングされたPTFE表面は親水性である。次に毛細管の汚れを落として、所定の長さで切断すると、所望の内部容積を有する計量領域が形成される。次に、毛細管の内部がエッチングされ内部が親水性の部分、毛細管の疎水性部分に取り付け、毛細管全体が形成される。ある実施形態では、ポリイミドなどのポリマを使用して毛細管が形成され得る。

40

【0023】

ある実施形態では、毛細管はガラス基材から形成されている。ガラスは天然で親水性であるため、基材が、例えば天然で疎水性のポリマの代わりにガラスである場合、計量領域の形成に表面処理は不要である。外面及び制限領域は、ガラスを疎水性材料、例えば上述

50

のポリマでコーティングすることにより形成されてもよい。

【 0 0 2 4 】

毛細管の外表面、特に毛細管の末端部を疎水性にすることの利点の1つは、水性試料がこのような材料に付着しないことである。従って疎水性の外表面は、ある水性液体試料が別の水性試料の液滴で汚染されないようにシステムを保護する。毛細管の末端部が水性試料に挿入されると液体が親水性の計量領域に引き込まれるが、疎水性領域には付着しない。

【 0 0 2 5 】

毛細管システムは、毛細管に加え、毛細管の基端部と流体連通している圧力源も備え得る。圧力源は正圧空気圧を供給し得るか又は別の気体若しくは液体を使用することができ、但し空気が好ましい。正圧を印加して水性試料を毛細管から吐出させることができる。水性液が毛細管から完全に吐出される最も低い正圧の空気圧を見つけて、その後、その空気圧を正確且つ精密に制御しなければならない。並行して使用される複数の毛細管がある場合、正圧を均一に分配しなければならない。全ての水性試料を吐出して、水性試料が毛細管から吐出されると、毛細管からの空気の吹き出しを防ぐために正圧を直ちに無効にし得るべく、正圧が毛細管に印加される最も短い時間を見つける。次に、試料の容積の正確さ及び精密さ、試料の分解並びにCLCに対する障害を調べる試料分注検査を実施するために、印加される正圧及び時間を用いなければならない。その後、これらのパラメータの範囲内でCLCに試料を最適に分注すべく正圧及び時間を調整する。システムは、水性試料が所定の位置で分注されるように所望の時間で正圧を印加するようにプログラムされている毛細管制御部も備え得る。この位置は、例えば複合液体セルの安定化位置であってもよく、この位置では封入流体のアリコートが水性試料を受ける準備ができています。正圧を使用して水性液体が穴から吐出され得るが、水性液体は毛細管作用によって引き込まれるため、水性液体を穴に引き込むのに負圧は不要であることに注目すべきです。

【 0 0 2 6 】

一実施形態では、水性試料の分注後、全ての残留試料を毛細管から確実に除去し、毛細管を洗浄して乾燥し、次の水性試料の吸引及び分注サイクルの準備を整える手順が続く。毛細管を分注位置から動かして負圧の空気流中に下げ、ここでは毛細管を通して高い正圧を吹き込むことにより、毛細管の内部空洞から水性試料を完全且つ確実に排出する。負圧の空気流は、吹き出されるあらゆる残留の水性試料を捕捉し、毛細管の外表面も乾燥させる。次に負圧の空気流をフィルタに通して、そうしなければ空中浮遊物質となり得るあらゆる汚染物質を封じ込める。その後、洗浄溶液をリザーバから毛細管によって吸引し、負圧の空気流中に分注して、毛細管の汚染を確実に除去する。

【 0 0 2 7 】

図1及び図2は、このようなシステムの例示的な実施形態を示す。

【 0 0 2 8 】

毛細管システムはエアシースも備えることができ、エアシースは、毛細管に対して外部から加えられる空気流から構成されている。外部から加えられる空気流は、水性試料が任意の外側の親水性領域に付着する可能性を低減する。

【 0 0 2 9 】

毛細管システムは、毛細管を複数の位置に動かすアクチュエータも備え得る。アクチュエータは、アクチュエータによって毛細管を動かすようにプログラムされ得る毛細管制御部によって制御され得る。典型的なプログラムでは、まず毛細管の末端部を動かして水性試料に接触させ、水性試料を毛細管に引き込み、次に毛細管を、安定化機構又は既存の複合液体セル(以下「CLC」)などの分注位置に末端部が隣り合うように動かし、最後に毛細管の基端部に十分な正圧を印加して水性試料を毛細管の末端部から吐出させる。

【 0 0 3 0 】

特定の一実施形態では、毛細管の内径は約200~250 μm 、好ましくは221又は230 μm であり、外径は約800 μm である。システムに引き込まれる任意の容積の水溶液を選択することができる。特定の毛細管は、約10ナノリットル~約10000ナノリットル、特に約500ナノリットル引き込むように設計され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

別の実施形態では、単一の制御部によって複数の毛細管を計量するために、単一の末端側の計量領域から構成された内面を有する複数の毛細管がキャビティ内に配置されることにより制限領域が設けられている。

【 0 0 3 2 】

別の実施形態では、圧力制御部が毛細管の計量容積を可変に制御する。処理される毛細管が所与の長さに切断され、次に、この毛細管の半径に基づき設定された最大容積が与えられる。末端側の計量領域内の容積は、組立体の内部の空気圧を使用して制御される。空気圧を使用して分注するが、この実施形態では、毛細管内に制御された一定の圧力を維持することにより親水性の末端側の計量領域内の容積を制御する。これは、所与の容積に關して圧力を毛細管力に平衡させることにより達成される。流体は圧力に一致する高さまで毛細管作用を受ける。圧力を変えると容積が変わる。これは、所与の流体に関する総毛細管上昇高及び毛細管の半径の範囲内にある。

10

【 0 0 3 3 】

別の実施形態では、毛細管計量システムが複数の毛細管を備え得る。全ての毛細管の基端部が単一の圧力導管と流体連通し、圧力導管は圧力源と流体連通し得る。このようにして、単一の圧力源を使用して単一の正圧を印加し、複数の毛細管全てから液体を同時的分注することができる。同様に、単一の圧力源が単一の正圧を印加して、複数の毛細管全ての毛細管力を平衡させることができる。

【 0 0 3 4 】

再利用可能なCLCプレート

先に説明したとおり、CLCは、生体試料処理、例えば断片化及びバーコーディング、核酸の増幅、及び標的核酸の検出の実施に有用な環境である。このような処理には、CLCで実施されるか、又は使い捨てトレー内のウェルで実施されるかに関わらず、典型的には試料の精密な熱制御と、試薬などの液体を添加したり除去したりする能力とが必要である。使い捨てトレーが使用されるか否かに関わらず、システムは、試料がプロセスを経るにつれて試料の環境を変えるための種々の機構を備えなければならない。従来、これには時に、試料をある容器から別の容器に移して、その結果汚染のリスクを伴うこと、又は密閉された容器をある場所から別の場所に動かして、特定の位置に関連する作用に試料を曝して、その結果機械的な複雑さを伴うことが含まれる。このようなシステムは、典型的には使い捨てプレートを使用して汚染を低減する。しかしながら使い捨てプレートには欠点があり、例えば、用いられる使い捨て器具の一つ一つが消費者のコスト負担となる。汚染の問題を生じない再利用可能なプレートが、これらの懸念に対処し得る。

20

30

【 0 0 3 5 】

CLCに含まれる試料を処理するシステムでは、再利用可能プレートなどのデバイスが用いられ得る。プレート/デバイスは、担体液体の槽を含むサイズ及び形状の基部部分又は容器部分を備え得る。担体液体は自由面を有してもよく、自由面上にCLCが形成されてもよい。容器は熱伝導性が極めて高く、例えば複合材料、セラミック及び金属、詳細にはアルミニウムであってもよく、そのため、容器に加えられる熱が担体液体を通じてCLC内に均一に広がる。プレートは、熱電モジュール、流体冷却システム又は強制対流冷却システムのいずれかに動作可能に取り付けられるように構成された冷却領域を備え得る。プレートはまた、容器と熱的に接触する加熱要素も備え得る。加熱要素は、例えば、制御部に電氣的に連結されてエッチングされたフォイルヒータであってもよく、制御部は、加熱要素を作動させてCLCに所望の熱サイクルを生じさせるようにプログラムされている。プレートはまた、担体液体の自由面上にCLCを安定化させるように構成された安定化機構を有するトレーも備え得る。ある実施形態では、プレートは、使用中に蒸発する場合がある担体液体を補充するために、容器に担体流体を供給するための入口を備え得る。

40

【 0 0 3 6 】

或いは、加熱要素は、ワイヤに電流を流すことにより作動する電気ワイヤであってもよい。ワイヤは、安定化機構を形成するために用いられ得る材料、例えばPTFEで電氣的

50

に絶縁され得る。この実施形態では、加熱要素は容器と熱的に直接接触している必要がなく、電氣的に絶縁性の安定化機構を通じてCLCに熱をより直接的に伝える。安定化機構はワイヤの絶縁体と一体化されてもよく、同じ材料から形成されてもよい。或いは、安定化機構がワイヤに取り付けられてもよく、及び/又は場合により絶縁体とは異なる材料から形成されてもよい。このような実施形態では、安定化機構を有するトレーを備えてもよく、備えなくてもよい。加熱要素はトレーに組み込まれることができ、又はプレートの別個の要素として設けられることができる。

【0037】

このような再利用可能なプレート上にCLCを形成することができ、その後、CLCをプレート上のその位置から一度も動かすことなくCLC内の試料液体を処理することができ、ある実施形態では、一度もCLCを移動させたり、又は封入液体の内部から試料液体を露出させたりすることなく、より大型の試料処理システム内でこのようなプレートを動かす。これは、試料液体を露出させるあらゆるプロセスと比較した場合、汚染の低減に明らかに有利である。複合液体セルの封入により試料のプレートとの接触が回避され、汚染の懸念なしに、且つ操作後に毎回プレートを交換するコストなしにプレートを再利用することが可能となる。プレートに加熱要素を組み込むことにより、試料液体の温度を精密に制御することが可能となる。要素のこの特定の組み合わせには、多種多様な利点がある。

10

【0038】

このようなプレートの一例が、図3に概略的に示される。要素の他の構成も可能である。ある場合には、CLCが典型的に置かれる安定化機構に加熱要素を可能な限り近付けて置くことが有益であり得る。CLC内の試料の温度を制御すべきであるため、加熱要素を可能な限りCLCの近くに置くことで、エネルギー消費を減らして効率を高める一方、担体液体の蒸発も減らすことができる。

20

【0039】

プレートはまた、各安定化機構の近傍から発する蛍光の直接視認による検査を可能にするように配置されてもよい。CLCの処理が蛍光、他の何らかの電磁的な観測値又は呼掛けの検出に基づき標的ヌクレオチド配列の存在を推定することを含む場合、検出器からCLCが収容され得る各安定化機構に至るクリアな見通しを維持することが有用であり得る。

30

【0040】

プレートは、CLCを通じた光学的な呼掛けを可能にするように構成されてもよく、この場合、検出器からCLCへの見通しがプレートを通じて維持される。光学的な検出方法として、限定はされないが、蛍光、吸光度、ラマン、干渉法及びシャドウグラフ法が挙げられる。

【0041】

プレートは、CLC及び安定化機構をプレートと共に密閉するように容器と係合するサイズ及び形状の蓋も備え得る。蓋は自動アクチュエータによって開閉可能であってもよく、又は手動で操作されてもよい。蓋によって担体液体を容器内に密閉することができ、担体液体の蒸発が抑制される。蓋は容器に対して部分的に密閉してもよく、又は略気密であり、圧力封止を維持してもよい。蓋は、任意の特に望ましい波長の光に対して透過的であってもよく、CLCの電磁的呼掛けを可能にし得る。加熱要素が蓋に含まれてもよい。

40

【0042】

以下のとおりプレートを使用してCLC内の試料を処理することができる。容器に担体液体槽を置き、CLCを作成するか又は移すための自由面を作成し得る。次にCLCを自由面上に作成するか又は自由面に移して、安定化機構で安定化し得る。CLCは上記に開示した形態を有することができ、このような形態では試料液体が担体液体の自由面上に封入液体によって被覆されており、これら3つの液体は全て互いに不混和性である。その後、試料を所定のパターンで加熱及び/又は冷却する、即ち熱サイクルに置く一方、場合により特定の処理プロトコルを実施するため一又は複数の試薬を所定の一又は複数の時点で

50

添加することにより、CLC内の試料を処理し得る。プレート、ひいてはCLCを、加熱要素を作動させることにより加熱することができ、又は冷却導管に冷却流体を流すことにより冷却することができる。冷却導管は、冷却剤を供給して戻すために入口及び出口の両方を有し得る。CLCをその安定化機構から動かすことなく、且つCLCのいずれから試料液体を除去することなく全プロセスを行うことができる。或いは、ある種のオフプレート処理の手順の間、試料液体をCLCから除去してもよく、又はCLC全体をプレートから除去してもよい。オフプレート処理には、例えば、試料液体中の生体分子を例えば磁気ビーズを使用して単離することが含まれ得る。一般に、CLCの処理として、例えば、断片化及びパーコーディング、PCR若しくは他の方法による核酸の増幅、及び/又はCLCの試料液体中の標的核酸の存在を推定するために安定化機構の近傍におけるCLCからの電磁放射線の観察がある。

10

【0043】

既述のとおり、プレートは再利用可能であってもよく、コストのかかる使い捨て要素を最小限に抑え得る。プレートを再利用する一方法では、処理後にトレー上の任意のCLCから試料液体及び封入液体を除去する。担体液体の自由面上に新しい試料及び封入液体を導入することにより、新しいCLCを形成し得る。次に新しいCLCを用いてプロセス全体を繰り返し、加熱、冷却及び1以上の試薬の添加によって、それ自体の安定化機構の所定の位置にあるCLCを処理し得る。新しいCLCを最初のCLCと同じように処理する必要はない。

【0044】

別の実施形態では、再利用可能なプレートは、1440個のCLC安定化機構を含むPTFEディスクの形態である。ディスクは、ディスクを2度ずつ回転させることが可能な回転アクチュエータに装着されており、担体流体を含むアルミニウム槽内に置かれる。回転増分毎の周期は、必要とされる様々なインキュベーション時間に合わせて変更され得る。槽は、アルミニウムの下面に取り付けられエッチングされたフォイルヒータを有する。ヒータは制御部に電氣的に連結されており、制御部は、加熱要素を作動させてCLCに所望の等温条件を生じさせるようにプログラムされている。PTFEディスクの上側は、約10mm厚の空気層である。この空気層は、ディスクの4分の3に亘ってプラスチックカバーで遮断されている。覆われていない部分が動作領域であり、動作領域にCLCが作成され、蛍光検出が行われる。

20

30

【0045】

別の実施形態では、プレート内のCLC安定化機構は、CLCに捕捉された任意の膨張空気の飛沫の逃がし経路を与えるための領域を有する。このような機構がない場合、油界面に捕捉される空気の飛沫が熱サイクル中に膨張して、CLCを安定化機構から除去し得る。空気の飛沫はCLCを除去する代わりに、逃がし経路に移動することが好ましい。

【0046】

統合CLC処理システム

CLCを調製して処理するシステムは、前述の毛細管システム及び再利用可能なプレートの両方と、2011年8月3日に出願された米国実用特許出願第13/147,679号明細書に詳細に記載されているようなCLC形成システムとを備え得る。参照により本明細書に組み込まれるこの先願に記載されているように、CLC形成システムは、試料液体源と、封入液体源と、液体処理システムと、液体処理システムに動作可能に連結されたセル形成制御部とを備え得る。セル形成制御部は、液体処理システムに(1)封入液体源から封入液体を取り出させ、(2)(a)容器中の担体液体の自由面上に(b)安定化機構の近傍で担体液体と不混和性の取り出された封入液体を排出させ、排出された封入液体は担体液体と混合せずに担体液体上で浮かび、安定化機構によって固定させ、(3)試料液体源から試料液体を取り出させ、(4)封入液体及び担体液体と不混和性の取り出された試料液体を排出させ、試料液体は封入液体又は担体液体と混合しないようにプログラムされている。このようなシステムでは、アクチュエータが毛細管を安定化機構と同期して分注位置に動かすことができるように、毛細管システム及び再利用可能なプレートは互い

40

50

に対して配置され得る。これにより毛細管が例えば試薬を既存のCLCに分注すること、又は毛細管が試料材料を安定化機構に置いてCLCを作成することが可能となる。関連して、毛細管システムは合わせてCLC形成システムの液体処理システムになり得る。同様に、セル形成制御部及び毛細管制御部は単一の制御部になり得る。図4に例が示されている。

【0047】

或いは、毛細管分注システムの代わりに、任意の他の計量システムを使用してもよい。例として、このような計量システムは、分注要素、アクチュエータ及び制御部を備え得る。アクチュエータは分注要素を所望の位置に動かすように構成され得る。制御部は、(1)アクチュエータによって分注要素を移動させ、(2)分注要素によって液体源から液体を取り出させ、(3)分注要素によって液体を分注させるようにプログラムされ得る。

10

【0048】

例えば、このようなシステムを使用して、シーケンシング用のDNAライブラリを調製することができる。Ion Torrent Ampliseq化学を例として用いると、このプロセスは以下のとおり進行し得る。

【0049】

(A) 10個の96ノードCLCチップを線状に配列して、システムの水平中心軸に沿って運ぶ。

【0050】

(B) 水平中心軸に沿って、複数の異なるステージで試薬の添加/除去、熱処理及びDNA精製を実施する。この例では、図5において10個のステージに1~10の番号を付している。熱処理が行われるステージは赤色の背景で表されている。

20

【0051】

(C) この概略図の最も左側にあるステージ1にCLCチップ1を供給する。ここでチップは静止したままである一方、マイクロタイターソースプレートからDNAを移す。DNAを移した後、試薬分注システム(RDS)がAmpliseqプロトコルに従いプライマープール及びマスターミックスを分注する。

【0052】

(D) これら3つの添加ステップが完了すると、CLCチップ1がステージ2に進む。合わせてステージ1にCLCチップ2を供給する。

30

【0053】

(E) 上記のステージ1の動作をCLCチップ2で実施する。合わせてCLCチップ1の熱プロセス1を開始する。

【0054】

(F) ステージ1及び2で動作が完了すると、CLCチップが次のステージに進む。CLCチップ1はステージ3にあり、CLCチップ2はステージ2にあり、CLCチップ3はステージ1にある。

【0055】

(G) システムを通して残りのCLCチップを連続的に処理し、全てのチップがこの概略図の最も右側にあるステージ10を通過し終わるまで、様々な動作を並行して実施する。この時点で960個の特有のDNAライブラリが作成され、対でプールされている(1プール=2CLCチップ=192試料)。

40

【0056】

(H) ここでCLCチップをリセットして、更なる試料を処理するため機器の開始点に戻す。

【0057】

更なる例は、遺伝子型判定の例である。このプロトコルでは、再利用可能なプレートを担当液体の容器又は槽に入れる。エッチングされたフォイルヒータが制御部に電氣的に連結されており、制御部は、加熱要素を作動させてCLCに所望の等温条件を生じさせるようにプログラムされている。機械的な安定化機構を含むプレートは、担当液体の自由面上

50

にCLCを安定化させるように構成されている。プレートはディスク形状であり、2度ずつ回転する。CLC形成制御部が、容器内の担体液体の自由面上に封入液体を分注する。この後、7.5 μ lの特定温度の化学物質をCLC内に排出する。最後に、7.5 μ lの核酸試料を添加する。完成したCLCのインキュベーションを設定温度で行い、その後、蛍光検出を行う。最後に試料を除去して、機械的な安定化機構に再びCLCを充填する。

【0058】

2010年7月22日に出願された米国仮特許出願第61/344,434号明細書、2011年4月1日に出願された米国仮特許出願第61/470,515号明細書、2011年4月1日に出願された米国仮特許出願第61/470,520号明細書、2012年1月25日に出願された米国仮特許出願第61/590,499号明細書、及び2011年8月3日に出願された米国実用特許出願第13/147,679号明細書は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

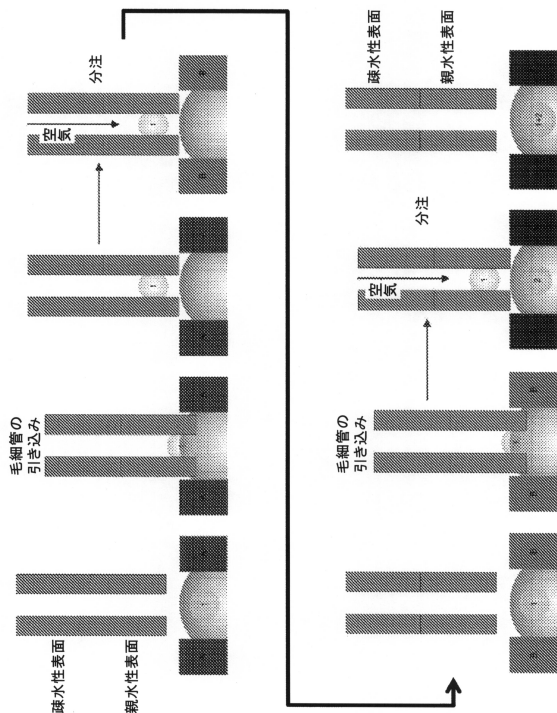
10

【0059】

関連出願の相互参照

本願は、2012年11月27日に出願された米国仮特許出願第61/730,336号明細書の利益を主張しており、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図1】



【図2】

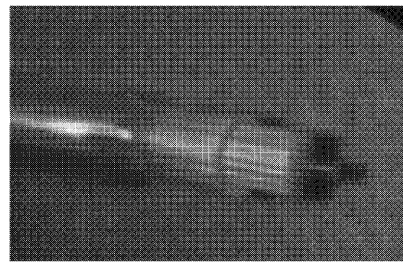
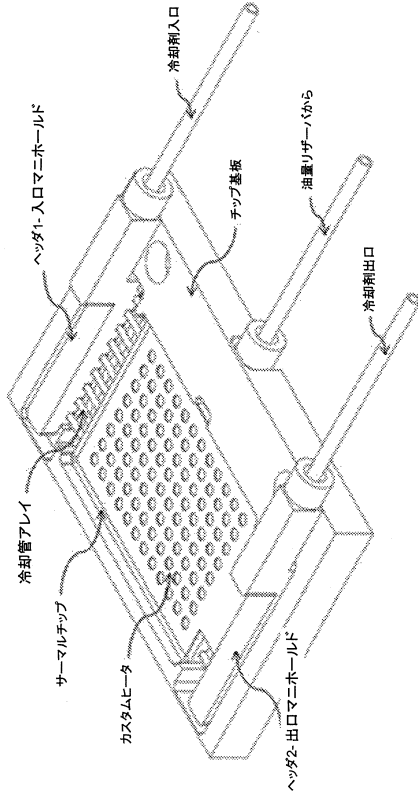


Figure 2

【 図 3 】



【 図 4 】

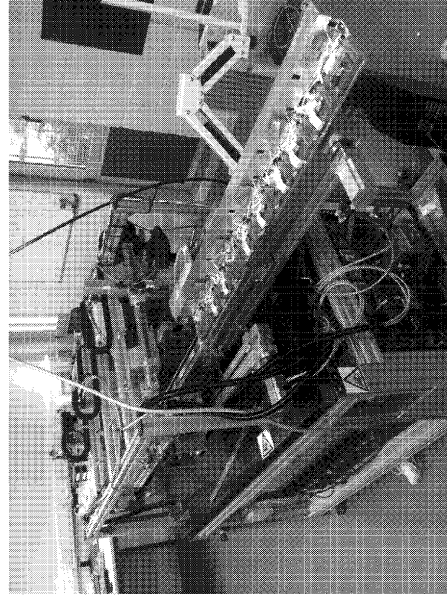
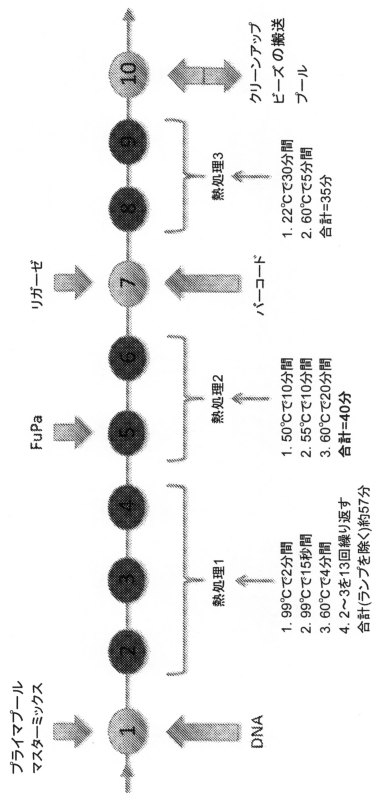


Figure 4

【 図 5 】



フロントページの続き

- (72)発明者 マグワイア, デイビッド
アイルランド カウンティ ウェクスフォード, エニスコーシー, シンガン マイルハウス 18
9
- (72)発明者 チョウク, ブライアン
アイルランド カウンティ リムリック, アスキートン, ミルタウン
- (72)発明者 フレミング, ポール
アイルランド カウンティ リムリック, キャッスルロイ, キルベイン, コイス グルード 32
- (72)発明者 バレット, ブライアン
アイルランド カウンティ ティペレアリ, カシエル, ドュアラ ロード, ライムツリー グロー
ブ 5
- (72)発明者 サイア, ノエル
アイルランド カウンティ ゲートウェイ, バリーモア, リサギーラフ

審査官 上村 直子

- (56)参考文献 米国特許第03783696 (US, A)
米国特許出願公開第2003/0032198 (US, A1)
特開平09-103662 (JP, A)
特表平06-506713 (JP, A)
特開2011-110474 (JP, A)
米国特許第03958045 (US, A)
特開2003-236411 (JP, A)
国際公開第2009/061748 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12M 1/00
Google Scholar