

(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2018-507694

(P2018-507694A)

(43) 公表日 平成30年3月22日(2018.3.22)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/68 (2018.01)
C 12 M 1/34 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/68
C 12 M 1/34
C 12 M 1/34

テーマコード(参考)

A 4 B 0 2 9
Z 4 B 0 6 3

テーマコード(参考)

A 4 B 0 2 9
Z 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2017-545888 (P2017-545888)
(86) (22) 出願日 平成28年3月4日 (2016.3.4)
(85) 翻訳文提出日 平成29年10月16日 (2017.10.16)
(86) 國際出願番号 PCT/GB2016/000046
(87) 國際公開番号 WO2016/139443
(87) 國際公開日 平成28年9月9日 (2016.9.9)
(31) 優先権主張番号 1503775.7
(32) 優先日 平成27年3月5日 (2015.3.5)
(33) 優先権主張国 英国(GB)

(71) 出願人 511302220
ビージー リサーチ エルティーディー
B G R E S E A R C H L T D
イギリス国、ケンブリッジシャー ピーイ
ー28 ○エヌジェイ、キンボルトン、ハ
ーヴィード ウェイ、ザ ビジネス セン
ター 5
(74) 代理人 100074099
弁理士 大菅 義之
(74) 代理人 110000132
大菅内外国特許事務所特許業務法人

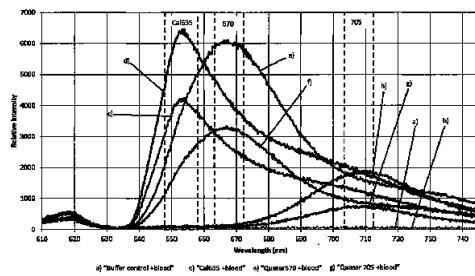
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液を含むサンプルからの直接の核酸標的の多重検出

(57) 【要約】

定量リアルタイムPCR手段による、血液を含むサンプルからの直接の核酸標的の多重検出のためのプロセスと装置。このプロセスは、目的の種の核酸を含む、PCR反応へ、直接血液を添加することと、620 nmを超える波長での照射を中心とする光調査方法とを含む。好ましくは、照射は、2 mWを超える励起パワーを照射する赤色635 nmレーザダイオードによって提供され、光ファイバによってサンプルに照射され、更に、分光測光法が、大量の血液の存在下での標的の多重検出を可能にするために利用される。そのようなプロセスと装置は、血液が存在することで通常みられる90%を超える蛍光の抑制を解決することが出来、QPCRを可能とすることが出来る。

【選択図】図2



Showing the spectroscopic output (relative intensity versus wavelength) of the fluorescence signal from 2 nM ml (625nm) excitation power. Graph shows the effect of adding 1/10 v/v to the addition of fresh human blood. Illustrates that no control sample only displays 30 to 50% inhibition in the presence of blood as opposed to the 85-95% observed for other whole blood samples.

Fig. 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプルが血液を含む場合に前記血液との反応において直接増幅される核酸標的の多重検出のための方法であって、620 nmより大きい波長に於ける前記反応の励起を含む、方法。

【請求項 2】

単一の閉止チューブ形式で実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記励起は、2 mWを超えるパワーで実行される、請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記励起は、5 mWを超えるパワーで実行される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記増幅反応は、PCR, 等熱増幅、RT-PCR を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

後続のプロセスは、検出される前記複数の信号から発生する複数の観察されたスペクトルを分光的に脱疊み込みすることを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

励起は、633 ~ 640 nm の範囲で照射される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

励起は、635 nm で照射される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

帯域通過フィルタ又はショートパスを用いて、640 nm より小さい励起を除去する、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記励起は、レーザによって照射される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記励起は、レーザダイオードから照射される、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記レーザダイオードは、一定温度に維持される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記レーザダイオードは、レーザダイオード、制御電子機器、収束のための非球面レンズを備えるモジュールの一部である、請求項 11 又は請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記レーザダイオードは、レーザダイオード、制御電子機器、収束のための非球面レンズを備えるモジュールの一部である、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

励起は、発光ダイオード (LED) によって提供される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 16】

励起は、前記 LED を、大きな直径コア、高開口数 (NA) ファイバに結合することによって提供され、大きなコア、高 NA ファイバに、同様に帯域通過フィルタリングされる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記反応を加熱及び冷却するように配置された作動面と、前記反応の上限温度と下限温度の中間の一定温度に維持される底面とを有するペルチェセルを用いて、前記反応を実行し、制御する、ことを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 18】

前記ペルチェセルの底面は、前記一定温度で液体を流す熱交換器上に配置される、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

サンプルが血液を含む場合に直接増幅される複数の核酸標的の多重検出のための装置であって、前記増幅を実行するように配置された反応チャンバーと、620 nmより大きい波長で、赤色励起光を前記サンプルに照射する手段と、を備える装置。

【請求項 20】

分光光度計を備える蛍光収集手段を有する、請求項19に記載の装置。

【請求項 21】

単一の閉止チューブ形式である、請求項19又は請求項20に記載の装置。

10

【請求項 22】

2 mWを超えるパワーで動作するように配置された励起手段を有する、請求項19～21のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 23】

5 mWを超えるパワーで動作するように配置された励起手段を有する、請求項19～22のいずれか1項に記載の装置。

20

【請求項 24】

前記増幅反応は、PCR、等熱増幅、RT-PCRを含む、請求項19～23のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 25】

633～640 nmの範囲で励起を照射するように配置された、請求項19～24のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 26】

635 nmで励起を照射するように配置された、請求項19～24のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 27】

640 nmより小さい励起を除去するために、前記励起起源の前段に、帯域通過フィルタ又はショートパスを組み込む、請求項19～25のいずれか1項に記載の装置。

30

【請求項 28】

前記励起を照射するためのレーザダイオードを組み込む、請求項19～27のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 29】

前記レーザダイオードを一定温度に維持するための手段を有する、請求項28に記載の装置。

【請求項 30】

前記レーザダイオードは、レーザダイオード、制御電子機器、収束のための非球面レンズを備えるモジュールの一部である、請求項27又は請求項28に記載の装置。

【請求項 31】

前記励起手段として、発光ダイオード(LED)を組み込む、請求項19～27のいずれか1項に記載の装置。

40

【請求項 32】

前記LEDは、大きな直径コア、高開口数(NA)ファイバに結合され、前記装置は、更に、大きなコア、高NAファイバに供給する帯域通過フィルタを備える、請求項31に記載の装置。

【請求項 33】

前記反応を加熱及び冷却するように配置された作動面と、前記反応の上限温度と下限温度の中間の一定温度に維持されるように配置された底面と、を有するペルチェセルを備える、請求項19～32のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 34】

50

前記ペルチェセルの底面は、前記一定温度で液体を流すように配置された熱交換器上に配置される、請求項 3 3 に記載の装置。

【請求項 3 5】

前記光源と前記反応容器との間、及び前記反応容器と光検出器との間で、光を運ぶように配置されたファイバアレイを備える、請求項 1 9 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 3 6】

前記ファイバアレイは、200ミクロンコア0.22NAファイバからなる、請求項 3 5 に記載の装置。

【請求項 3 7】

8つのランダムアクセスミクロタイター反応ウェルを備える、請求項 1 9 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の装置。 10

【請求項 3 8】

8つに分岐したファイバアレイを有する、請求項 3 7 に記載の装置。

【請求項 3 9】

前記8つに分岐した照射ファイバは、8つの収集ファイバとの接合点において、合わされる、請求項 3 8 に記載の装置。

【請求項 4 0】

ダブルコアファイバは、各サンプル反応容器の上部上まで伸び、一つは、前記励起を提供し、もう一つは、前記放射蛍光を収集する、請求項 3 9 に記載の装置。

【請求項 4 1】

前記8つの収集ファイバは、SMAコネクタ終端において、一緒にされ、2×4のアレイにされる、請求項 3 9 又は請求項 4 0 に記載の装置。 20

【請求項 4 2】

2×4の収集ファイバの前記アレイは、665nm長波長通過フィルタを通過後、前記分光光度計上に収束され、意図された放射光のみが、前記分光光度計上に画像形成されるようにする、請求項 4 0 に記載の装置及び方法。

【請求項 4 3】

各反応容器について、前記分光光度計に、固有の信号を提示するために、前記反応容器内容物の励起の順番を順序付けるように配置されたシーケンサを備える、請求項 4 2 に記載の装置。 30

【請求項 4 4】

光は、前記光源、前記反応容器、及び、前記収集器の間を、レンズとミラーの配置に応じて運ばれる、請求項 1 9 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の装置及び方法。

【請求項 4 5】

サンプルが血液を含む場合に前記サンプルとの反応において直接増幅される、核酸標的の多重検出のための、添付の図面を参照して実質的に本明細書で記述した方法。

【請求項 4 6】

サンプルが血液を含む場合に前記サンプルとの反応において直接増幅される、核酸標的の多重検出のための、添付の図面を参照して、実質的に本明細書で記述した装置。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、血液を含むサンプルからの直接の核酸標的の多重検出のためのプロセス及び装置に関する。関係する例は、白血球に存在する人間のDNAから増幅された人間の対照遺伝子と共に、目的のウイルスを同時に検出するものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

この分野で限られた数の文献しかない事は、一般に用いられる蛍光ラベルリアルタイムPCR法が、テストされるべきサンプルに任意のかなりの量の血液がある場合に利用され

ることが出来ないことを示唆している。時間のかかる核酸抽出を必要としないで、例えばポイントオブケアで血液サンプルから直接に、病原体とヒト標的の両方を迅速に検出できることは、研究者及び臨床医にとって明らかに利益のあることであろう。

【0003】

この発明の背景技術は、2つの異なる分野に存在する。まずは、超高速PCRの分野、そして、単一の閉止されたチューブ形式の粗試料から直接核酸を増幅することが出来るようになるまで超高速PCRを拡張する分野における、出願人自身の背景技術の知識である。感度のよい、検出に必要最小限の時間のみを使用する診断テストのための条件は、例えば、インフィールドスクリーニングによって多くの命が救われるであろう新生感染症の流行に際して、明確に確立されている。出願人は、複数のマトリクスから目的の種を直接高速に検出することを以前に示した。望ましく、且つ、技術的に難しい一つの目的は、全血サンプルから、直接、血液媒介病原体を直接スクリーニングする事である。この難しい問題は、一つ目は、反応に受け入れられることが出来る血液の量を、二つ目は、アッセイ結果におけるこの血液の存在の影響を含む。

10

【0004】

背景技術情報の第2の関連する領域は、Barnesらのグループの研究(Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples)（あらゆる公開文献への十分な参照が必要である）である。また、抑制物質が存在するときの直接PCRを可能とするように設計された、発生酵素および添加剤も存在する。この研究は、ポリメラーゼの突然変異によって、全血の存在下において、酵素がDNAを増幅することができるようになることが出来ることを示した。同一の論文は、本発明が解決しようとする問題、人間の血液の存在によって観察される蛍光抑制物質を取り上げている。

20

【0005】

リアルタイムPCRが、標準的なリアルタイム熱循環器(standard realtime thermal cycler)内にヒト全血が存在する状態で完了するとき、用いた染料の波長に依存して、85～95%のオーダの、蛍光信号の、非常に高いバックグラウンドと、それに加えて減衰が観察される。本発明者は、挿入染料アプローチを用いて、これを解決することを追求したが、血液サンプル内のヒト全ゲノムDNAのバックグラウンドのレベルがかなり高いことから、このアプローチは臨床使用向きではなくなり、また多重化も不可能となる。全ての臨床アッセイは、内部制御核酸種のある形態を有することになり、したがって、ヒト全血サンプルからの目的の種の直接診断検出を実行することは不可能であった。

30

【0006】

本発明者は、蛍光収集における血液の影響を決定するために、初期実験を繰り返したが、これは機能しないだろうと仮定されていたので、PCRの分野に関連した背景を記載した論文は殆どなかった。しかし、脳と他の臓器を検査するための、直接蛍光イメージング血液の分野に幾つかの論文が存在する。データは85～95%の蛍光の減少・全血からの直接の核酸標的の直接多重検出を不可能とする - がどうして存在するのかを効果的に示している。まず、541と577nm周辺に大きな吸収ピークがあり、これらが、これらの波長のあらゆる一般的な染料からの蛍光出力を完全に吸収する。第2に、観察可能な赤方偏移がある；標準的なシステムは、検出器の前段に、狭い10～20nm帯域通過フィルタを有し、あらゆる波長シフトは、収集されるだろう波長から、光の一部を明らかに遠ざけるだろう。第3に、ヘモグロビン自身の存在から、強度消光(quenching)効果が存在する。まとめると、単一の閉止チューブ形式に於ける複数の核酸標的の直接な多重検出を可能とするための、波長不感検出器と、フィルタの使用の一般的に用いられる組み合わせは、血液の存在下では機能しないだろう。

40

【0007】

本発明は、したがって、全血を含むサンプルから1以上の核酸標的を検出するための光学系を含む。

【発明の概要】

50

【0008】

本発明者は、620 nmまでの大きな消光効果を越えると、血液が存在することによる効果ははるかに低くなり、85～95%の抑制に対して20～30%の範囲であり、したがって、システムは、サンプルに赤色光の高い励起パワーを送る手段を提供する、ということを発見した。第2のキーとなる特徴は、650 nmにおいて、範囲が750 nmの光を収集するように較正された分光光度計の使用により、発光された蛍光信号を検出する能力である。高い励起パワーの赤色光と分光光度計の使用により、スペクトル脱疊み込みアプローチによって、単一の蛍光読み取りにおいて、複数の目的の種を同時に検出することが出来るようになる。関連する例は、同様な症状を引き起こす臓器からの感染を排除しつつ、フィロウイルス科から帰結する感染間を区別し、依然、内部制御のためのスペクトル空間を有すること、とすることが出来る。標準PCR光学アプローチは、発光フィルタと組み合わせて、単一点励起起源を用い、したがって、染料発光波長間に十分な間隔がなく、且つ、これらのチャネル間のクロストークを除去する能力もないであろう。システムは、赤色又は近赤外励起コンポーネントを有するものが存在するが、これらは、絶対的な条件がある場合、高いレベルの多重化は出来ない。

10

【0009】

したがって、本発明の第1の側面によると、サンプルが全血を含むとき、単一の閉止チューブ形式において直接増幅される、複数の核酸標的の多重検出のための方法は、少なくとも2 mWのオーダで、好ましくは、5 mWより大きい、620 nm波長より大きい波長での、赤色励起光のサンプルへの照射を含む。好適実施形態においては、この励起は、635 nmにおけるレーザダイオードによって照射されるが、633～642の範囲が適用可能と分かっている。640 nm波長範囲を下回るレーザからの発光を除去するために、帯域通過フィルタ又はショートパスが用いられることが出来る。別の実施形態においては、LED励起は、LEDを、大きな直径コア、高NAファイバに結合することによって提供され、同様に帯域通過フィルタリングされる。更に、励起に関して、自由空間アプローチが実施されたが、好適実施形態は、ファイバベースの照射アプローチである。

20

【0010】

本発明の第2の側面によると、サンプルが全血を含むときに直接増幅される複数の核酸標的の多重検出のための装置が提供され、この装置は、増幅を起こさせるように配置された反応チャンバと、620 nm波長より大きい波長で、赤色励起光をサンプルへ照射する手段と、を備える。

30

【0011】

励起光は、好ましくは、少なくとも2 mWのオーダのパワーで照射され、更により好ましくは、5 mWを超える。励起は、635 nmのレーザダイオードで照射されることが出来るが、633～642の範囲が適用可能であることがわかっている。640 nm波長範囲を下回るレーザからの発光を除去するために、帯域通過フィルタ又はショートパスが用いられることが出来る。別の実施形態においては、LED励起は、LEDを大きな直径コア、高NAファイバに結合することにより提供され、同様に、帯域通過フィルタリングされる。更に、励起に関し、自由空間アプローチが実施されたが、好適実施形態は、ファイバベースの照射アプローチである。装置は、結果の放射プロファイルの調査のための分光光度計を組み込む事ができる。

40

【0012】

好適実施形態においては、システムは、直接インフィールド検出のための8ウェルランダムアクセスシステムの形態を取る(GB2015000027)。この以前の明細書は、直接フリーズ／ソー(freeze/thaw)(EP2585581)媒介溶解と、単一閉止チューブ形式での組み合わせ増幅を可能とするHRMアプローチ(US8597937)を利用するシステムを記述する。8ウェル形式は、8つの反応容器のすべてが、蛍光信号を、単一の共有分光光度計に送らなくてはならず、したがって、光ファイバアレイは、好適実施形態を形成することを意味する。これは、8つの個々のレーザダイオードモジュールにそれぞれがいたる、8つの200ミクロンコア0.22 NAファイバからなる8つに分岐した(octofurcated)ファイバアレ

50

イからなる。これらは、レーザダイオード、制御電子機器、コリメートのための非球面レンズ、及び、640 nmより小さい光のみを発光するための帯域又はショート通過フィルタを備える。これらのレーザダイオードのそれぞれは、H R M 機構(US8597937)の分岐内に含まれる手段によって温度制御され、それらの温度が、一定に保たれるようにする；レーザダイオードシフト波長及び、温度シフトを有する励起パワーなどは、安定化されなければならない。8つに分岐した照射ファイバは、8つの収集ファイバと、接合部分で合わされ、ダブルコアファイバは、各サンプル反応容器の上部にいたり、一つは、励起を提供し、もう一つは、放射蛍光を収集する。8つの収集ファイバは、SMAコネクタ終端において、添付の図面のように、2×4のアレイに合わされ、これらは、650 nmより小さい任意の光を除去する長波長通過フィルタを通った後、分光光度計に収束され、意図された放射光のみが、分光光度計上に画像形成されるようとする。

10

【0013】

使用においては、好適実施形態は、各個別の容器の照射が順番に検出器に一つのスペクトルの画像形成を行うように、順序だてられて動作する。電子制御の手段は、この照射を、時間ベースと加熱システムの両方に同期し、各ウェルからの同時の読み取りが、正しい時間点でなされるようとする。

【0014】

異なる数の分光光度計および実際に異なるファイバアレイを用いた、自由空間照射を伴う一つの容器から単一の分光光度計への、中心的な主張を満たす実施形態を構成することができるということが、はっきりとわかり、ここで中心的な主張とは、システムは、620 nmより大きい波長において十分な励起パワーを持っていなければならず、好適には、結果として得られる放射プロファイルの調査のための分光光度計を利用する、ということである。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

本発明の実施形態が、添付の図面を参照して、例示の形で具体的に記述されるだろう。【図1a】蛍光ネガティブ対照サンプルがなく、血液が存在しない場合の、様々な積分時間での、励起光波長に対する相対的検出強度のグラフである。

30

【図1b】挿入染料及びDNAがある場合の、図1aと同様のグラフである。

【図1c】血液がある場合の、図1aと同様のグラフである。

【図1d】血液がある場合の、図1bと同様のグラフである。

【図2】赤色励起を用いたことにより発生する蛍光を示すグラフである。

【図3】8つのウェルフィールドPCR装置の透視図である。

【図4】図3に図示された装置の平面図である。

【図5】図3の装置のヘッドアレイの断面図である。

【図6】図3の装置における光学構成の平面図である。

【図7】図3の装置に対する光励起源アレイを図示する。

【図8】分光光度計を示す。

【図9】光ファイバアレイ13を示す。

【図10】PCRシステムと光学素子を示すためにむき出しにされた完全なPCR装置を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0016】

図1a～d及び2は、PCRを受けるサンプルの蛍光から発せられる信号への血液の影響を示し、縦軸は、光の相対的強度を示し、横軸は、ナノメータ(nm)での波長を示す。

【0017】

図1aは、血液を含まない、対照サンプルからの結果を図示する。観察される信号は、青色473 nm LED励起から発生する。

【0018】

50

図 1 b は、二重鎖 DNA の 100 ng (ナノグラム) の添加を含む、通常濃度での SYBR Gold 挿入染料の添加によって生成される蛍光を示す。より高い積分時間において検出器を飽和する蛍光を示す。参考までに、545 nm で、55,000 の強度がバックグラウンドに生じた。

【0019】

図 1 c は、サンプルへの、体積で 10 % のヒト血液の添加の効果を示す。560 と 610 nm において放射ピークを有する内在性自己蛍光が存在する。

【0020】

図 1 d は、サンプルへの、体積で 10 % のヒト血液の添加を伴う、図 1 b の実験と同一の実験設定の結果を示す。例えば、545 nm において、複数の吸収ピークが観察され、また、610 nm において、自己蛍光の著しい増加がみられる。545 nm での信号強度は、図 1 b に比べ、92 % を超えて低下した。

10

【0021】

異なるパラメータ下での 2 mW 赤色 (625 nm) でのサンプルからの蛍光の分光出力が、図 2 に示されている。グラフは、体積で 10 % のヒト血液の添加が、あり (+) 及びなし (-) の影響を示す。赤色中心染料 Cal635、Quasar70 及び Quasar 705 は、他の可視波長では血液の存在下で 85 ~ 95 % の抑制が観察されるのに対して、30 ~ 50 % のみの抑制を示す。

【0022】

図 1 a ~ d 及び 2 は、まとめると、本発明は、従来の qPCR 光アプローチを用いて観察される蛍光信号の 90 % より大きい抑制を解決することを示す。

20

【0023】

図 3 ~ 9 に示されるように、本発明の好適な実施形態は、全血の存在下での増幅された核酸標的のフィールド検出のための装置 10 である。血液は、赤色である限り、ヒトのものでも、他の動物のものでもよい。

【0024】

装置 10 は、それぞれが、個別の光検出ヘッド 11 を有する 8 つのランダムアクセス反応ステーションを備える。エンドユーザに解析結果を提示するためのディスプレイモニタ 12 が存在する。各光ヘッド 11 は、SMA コネクタ 14 によって固定される 8 分岐ファイバアレイ 13 の 1 つの分岐を含む。これらのコネクタの夫々内では、コリメートレンズ 15 が配置され、反応容器から発せられる励起ビーム及び放射光がファイバ 13 に収束されるようにする。励起ビームは、クリアリッド (clear lid) 16 を介して、反応容器 17 に収束され、反応容器の底部で 1 点に収束される。ファイバアレイ 13 の遠端は、SMA 筐体に含まれる 8 つの赤色レーザダイオード 18 に取り付けられ、それぞれは、帯域通過フィルタ 19 を有し、不要な波長が、ファイバに入射されるのを防止する。レーザダイオード 18 は、PCB 2 によって駆動され、電流をそれぞれのデバイスに送り、励起パワーがアレイ 13 に渡って規格化されることが出来るようになる。

30

【0025】

各光検出ヘッド 11 は、ピボット 21 を介して装置に搭載され、ヘッド 11 が、反応容器 16 をのけて旋回できるようにし、容器 16 が、冷却 / 加熱装置に配置されたり、これから取り除かれたりできるようにし、したがって、PCR が容器の内容物について実行されることが出来るようになる。

40

【0026】

水冷ブロック 22 が、レーザダイオード 17 アセンブリの温度を安定化するために配置される。

【0027】

この実施形態においては、635 ~ 638 nm で放射するレーザダイオード 18 が、反応容器内で蛍光を励起するために、630 ~ 642 を通過するが、OD6 における他の波長をブロックするレーザ筐体内の帯域通過フィルタとペアにされる。

【0028】

50

分光光度計 23(図8)は、分光光度計23の入り口において、ファイバアレイ13及び、ペアにされた650又は665nm長波長通過フィルタ24を介して、反応容器17から放射される光を受信するように配置される。

【0029】

図9は、光ファイバアレイ13を示す。右側のファイバ束25は、レーザダイオードを取り付けられた、單一コアを含むファイバを備える。これらのファイバは、スプリッタ26に入り、ここから、2つのコアを含む8つのファイバ27が伸び、一つは、励起のためのレーザダイオード18に戻され、他方は、検出のために、分光光度計23に導かれる。ファイバ27は、装置ピボットヘッドに配置されるものである。分光光度計23に通じる分岐は、スプリッタを出て、 2×4 アレイに8つのコアを含む、單一ファイバ28に結合される。

10

【0030】

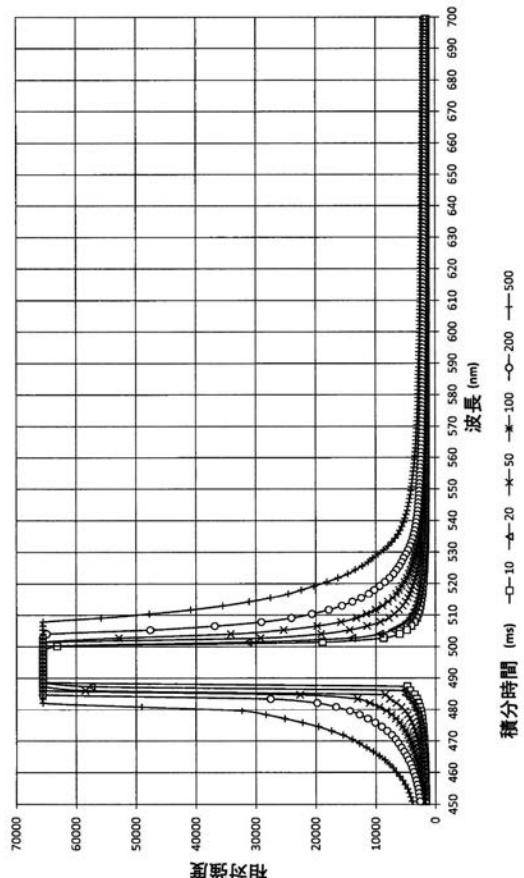
図面には図示されていないのが、反応容器17内で、PCR反応が実行される手段である。マイクロタイマーの容量である反応容器17は、ペルチェセルの作動面に連携する反応容器受け入れカップ内にぴったりと保持され、規定温度が、反応容器の反応チャンバ内で、迅速に到達されることが出来るようになる。ペルチェセルの底面は、PCRサイクルの上限温度と下限温度の中間の一定温度で流れるように水が配置される熱源シンクと連携する。

【0031】

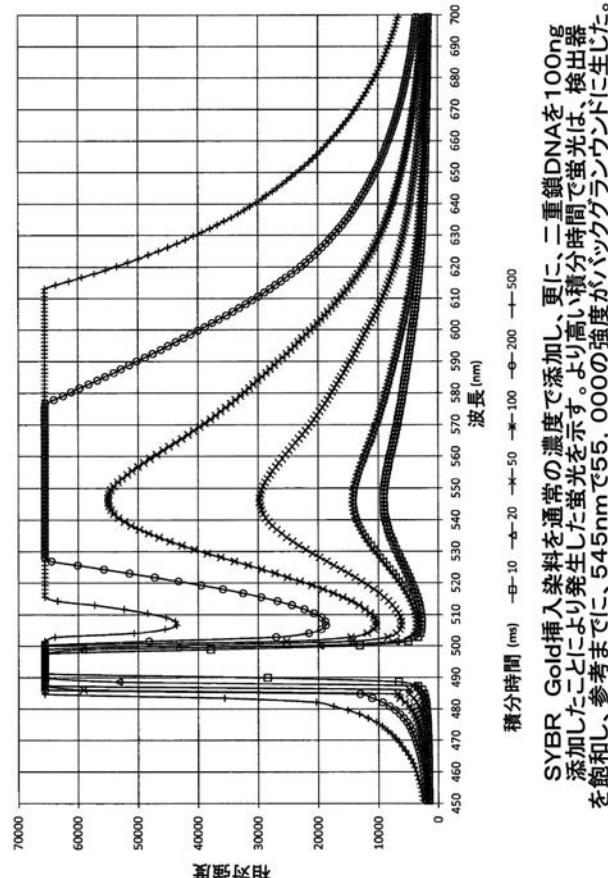
使用においては、病原体などの潜在標的を含むと疑われるヒト全血は、例えば、Cy5.5、quasar 670、quasar 705又は、当分野で知られる任意の他の多重染料で標識された、正しいプライマ及びプローブと共に、反応容器17内に配置される。レーザは、PCRが進むと、反応容器17に照射され、增幅が成功すると、血液が存在しても観察することが出来るスペクトルを生成する。

20

【図1A】

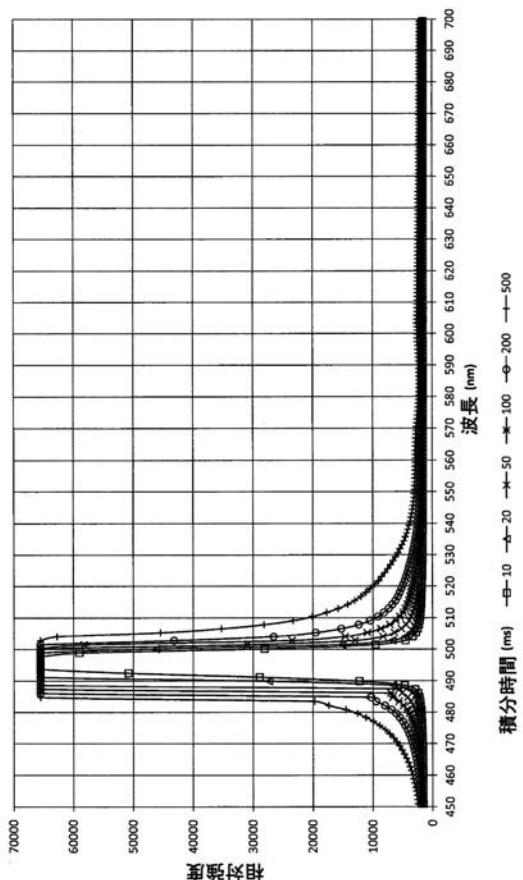


【図1B】

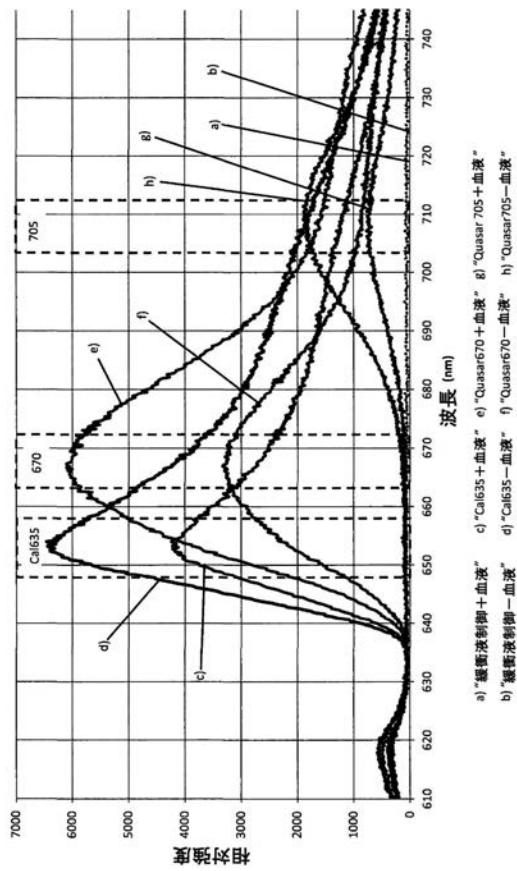


SYBR Gold挿入染料を通常の濃度で添加し、更に、二重鎖DNAを100ng添加したことにより発生した蛍光を示す。より高い積分時間で強光は、検出器を飽和したことにより発生したことを示す。よって、参考までに、54.5nmで55,000の強度がバックグランジンに生じた。

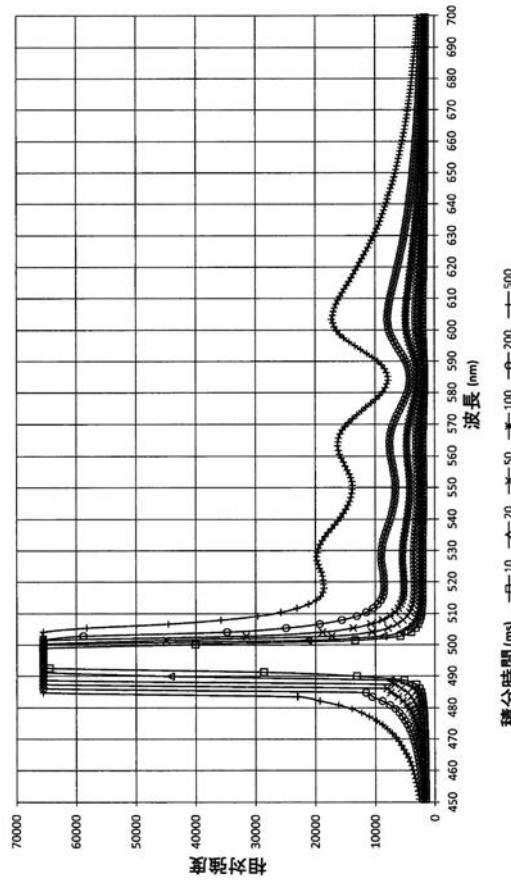
【図 1 C】



【図 2】



【図 1 D】



560および610nmにおいて放射ピークを有する、
10%のヒト血液自体の内在性自己蛍光を示す。

【図 3】

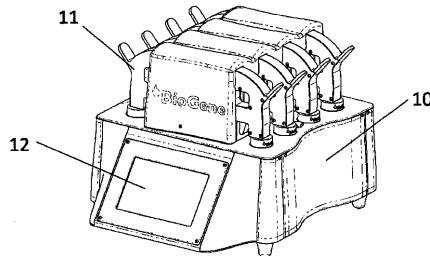


Fig 3.

体積で10%のヒト血液を添加した、図1Bと同一の実験設定。例えば、545nmでの複数の吸収ピークを見ることができ、また、610nmでの自己蛍光の著しい増加も見ることができる。545nmの信号強度は、図1bと比較して、92%より多く減少した。

【図4】

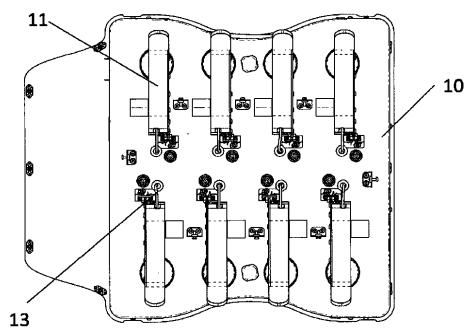


Fig 4.

【図5】

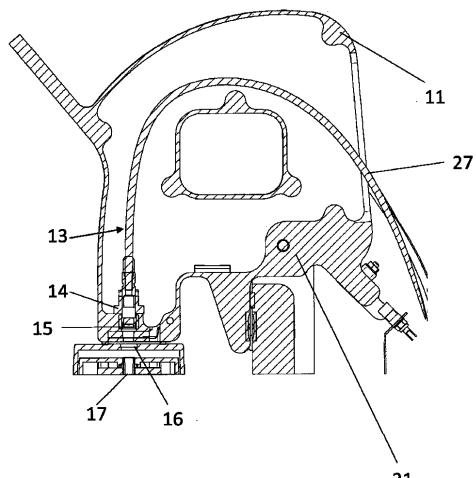


Fig 5.

【図6】

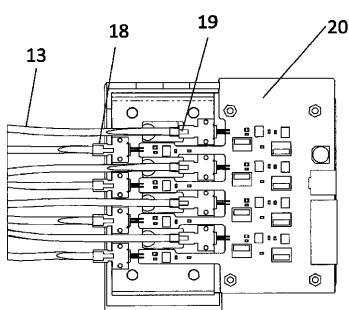


Fig 6.

【図7】

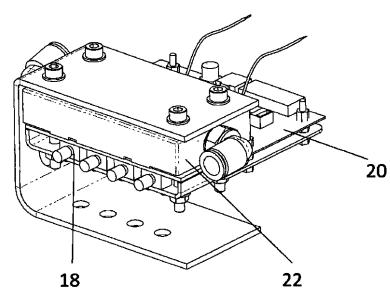


Fig 7.

【図 8】

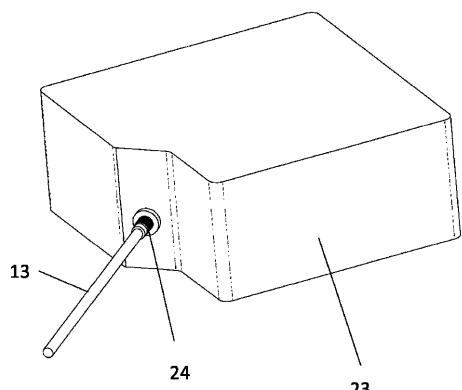


Fig 8.

【図 9】

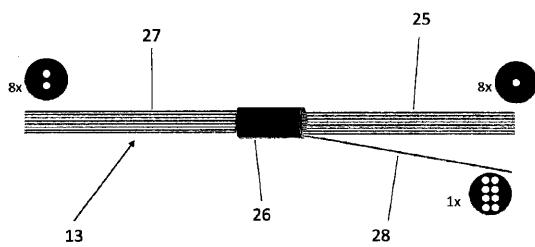


Fig 9.

【図 10】

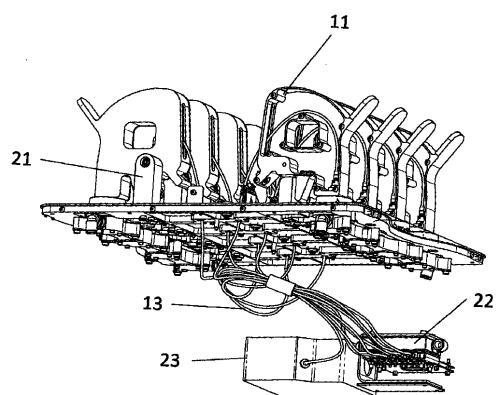


Fig 10.

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月1日(2017.11.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプルが血液を含む場合に前記サンプルとの反応において直接増幅される核酸標的の多重検出のための方法であって、 620 nm より大きい波長に於ける前記反応の励起を特徴とする方法。

【請求項2】

単一の閉止チューブ形式で実行される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記増幅反応は、PCR、等熱増幅、RT-PCRを含む、請求項1又は請求項2に記載の方法。

【請求項4】

後続のプロセスは、検出される前記複数の信号から発生する複数の観察されたスペクトルを分光的に脱疊み込みすることを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記励起は、レーザ又は発光ダイオード(LED)によって照射される、前記請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記反応を加熱及び冷却するように配置された作動面と、前記反応の上限温度と下限温度の中間の一定温度に維持される底面とを有するペルチェセルを用いて、前記反応を実行し、制御することを含む、前記請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

サンプルが血液を含む場合に直接増幅される複数の核酸標的の多重検出のための装置であって、前記増幅を実行するように配置された反応チャンバ(17)と、 620 nm より大きい波長で、赤色励起光を前記サンプルに照射する手段(18)と、を特徴とする装置。

【請求項8】

分光光度計(23)を備える蛍光収集手段を有する、請求項7に記載の装置。

【請求項9】

2 mW を超えるパワーで動作するように配置された励起手段(18)を有する、請求項7又は請求項8に記載の装置。

【請求項10】

前記増幅反応は、PCR、等熱増幅、RT-PCRを含む、請求項7～9のいずれか1項に記載の装置。

【請求項11】

$633\sim640\text{ nm}$ の範囲の励起を照射するように配置された、請求項7～10のいずれか1項に記載の装置。

【請求項12】

レーザダイオード及び発光ダイオード(LED)のうちの一つを含む励起手段(18)を組み込む、請求項7～11のいずれか1項に記載の装置。

【請求項13】

前記反応を加熱及び冷却するように配置された作動面と、前記反応の上限温度と下限温度の中間の一定温度に維持されるように配置された底面と、を有するペルチェセルを備える、請求項7～12のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 1 4】

前記光源(18)と前記反応容器との間、及び前記反応容器と光検出器との間で、光を運ぶように配置されたファイバアレイ(13)を備える、請求項 7～13のいずれか1項に記載の装置。

【請求項 1 5】

2×4 収集ファイバ(13)のアレイは、665 nm長波長通過フィルタ(24)を通過後、分光光度計(23)上に収束され、意図された放射光のみが、前記分光光度計(23)上に画像形成されるようにする、請求項 7～14のいずれか1項に記載の装置。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2016/000046						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01L7/00 C12Q1/68 ADD.								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01L C12Q								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, FSTA								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> "MxPro QPCR Software for Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems", , 1 March 2009 (2009-03-01), pages 1-433, XP55276973, Retrieved from the Internet: URL:http://www.agilent.com/cs/library/user/manuals/public/MxPro_Manual.pdf [retrieved on 2016-06-01] page 13, last par.; page 198, last par.; screenshots on pages 47, 51 and 52 ----- -/-/ </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">19,46</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	"MxPro QPCR Software for Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems", , 1 March 2009 (2009-03-01), pages 1-433, XP55276973, Retrieved from the Internet: URL: http://www.agilent.com/cs/library/user/manuals/public/MxPro_Manual.pdf [retrieved on 2016-06-01] page 13, last par.; page 198, last par.; screenshots on pages 47, 51 and 52 ----- -/-/	19,46
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	"MxPro QPCR Software for Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems", , 1 March 2009 (2009-03-01), pages 1-433, XP55276973, Retrieved from the Internet: URL: http://www.agilent.com/cs/library/user/manuals/public/MxPro_Manual.pdf [retrieved on 2016-06-01] page 13, last par.; page 198, last par.; screenshots on pages 47, 51 and 52 ----- -/-/	19,46						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.								
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 20 June 2016	Date of mailing of the international search report 29/06/2016							
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Leber, Thomas							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2016/000046

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHIAN ZHANG ET AL: "Direct DNA Amplification from Crude Clinical Samples Using a PCR Enhancer Cocktail and Novel Mutants of Taq", THE JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS, vol. 12, no. 2, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 152-161, XP055001258, ISSN: 1525-1578, DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090070 page 156, right col. and Fig. 5 -----	1-18, 20-46
Y	A. CASTLEY: "Clinical Applications of Whole-Blood PCR with Real-Time Instrumentation", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 51, no. 11, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 2025-2030, XP055167243, ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/clinchem.2005.055327 page 2015, right col.; page 2026, left col.; Fig. 1; -----	1-18, 20-46
Y	BRIAN J TAYLOR ET AL: "Real-time PCR detection of Plasmodium directly from whole blood and filter paper samples", MALARIA JOURNAL, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 1, 19 August 2011 (2011-08-19), page 244, XP021092124, ISSN: 1475-2875, DOI: 10.1186/1475-2875-10-244 page 2 right col.; Fig. 1 -----	1-18, 20-46
Y	LUTZ ERIC LEHMANN ET AL: "A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples", MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 197, no. 3, 16 November 2007 (2007-11-16), pages 313-324, XP019630543, ISSN: 1432-1831 title; abstract -----	1-18, 20-46

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,R0,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,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ナザレス , ネルソン

イギリス国 , ケンブリッジシャー ピーイー28 0エヌディー アッパー ディーン , ハイ ス
トリート , クロックウインダーズ 1

(72)発明者 エッジ , デイヴィッド

イギリス国 , サリー シーアール6 9アールピー ワーリングガム , ヴァーデイン ガーデンズ
41

(72)発明者 タイラー , アダム

イギリス国 , ノーザンプトンシャー エヌエヌ15 5ティーエス ケタリング , パートン ラテ
イマー , バーンウェル クロース 8

F ターム(参考) 4B029 AA07 BB13 BB20 CC02 CC08 CC11 FA01 FA15 GB04 GB06
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ10 QQ42 QQ52 QR32
QR35 QR55 QR62 QS25 QS32 QS36 QS39 QX01 QX02