

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011年9月9日(09.09.2011)



PCT



(10) 国際公開番号
WO 2011/108344 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/052881
- (22) 国際出願日: 2011年2月10日(10.02.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-046170 2010年3月3日(03.03.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 島津製作所(SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 川辺 隆志(KAWABE, Takashi) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 和田 幸久(WADA, Yukihisa) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 森谷 直司(MORIYA, Naoji) [JP/JP]; 〒

6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).

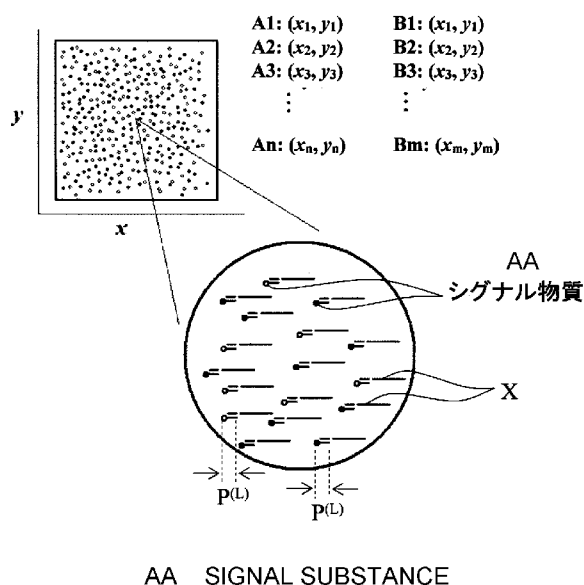
- (74) 代理人: 弁理士 岡田 正広(OKADA, Masahiro); 〒5400010 大阪府大阪市中央区材木町1番6号 第12新興ビル10階 岡田正広特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DISTINGUISHING MULTIPLE NUCLEIC ACID SPECIMENS IMMOBILIZED ON SUBSTRATE

(54) 発明の名称: 基板上に固定化された複数の核酸検体の識別方法及び装置

[図6]



(57) Abstract: Provided is a method whereby multiple kinds of nucleic acid specimens, which are immobilized on a substrate, can be distinguished without a need for separately adding index sequences for distinguishing the nucleic acid specimens or immobilizing the nucleic acid specimens at sites on the substrate that have been intentionally determined for distinguishing the nucleic acid specimens. This method comprises: preparing multiple kinds of nucleic acid specimens to be distinguished which are immobilized at random on the surface of the substrate and carry signal probes $[P^{(L)}]$; detecting signals derived from the signal probes $[P^{(L)}]$; acquiring, based on the aforesaid signals, the immobilization site data on the substrate of the individual nucleic acid specimens of multiple kinds having been immobilized as described above; and distinguishing the multiple kinds of nucleic acid specimens one another based on the site data.

(57) 要約: 本発明は核酸検体識別用のインデックス配列を別途付与する必要がなく、核酸検体識別のために基板上に作為的に決定した位置に固定化する必要もない、基板上に固定化された複数種の核酸検体を識別することができる方法を提供する。基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシ

グナルプローブ $P^{(L)}$ を有する複数種の識別すべき核酸検体を用意することと、前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ に由来するシグナルを検出することと、前記固定化された複数種の核酸検体それぞれの前記基板上的固定位置情報を前記シグナルに基づいて取得することを含む工程と、前記位置情報に基づいて前記複数種の核酸検体を互いに識別する工程とを含む方法。

WO 2011/108344 A1



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

基板上に固定化された複数の核酸検体の識別方法及び装置

技術分野

[0001] 本発明は、基板上に固定化された複数の核酸検体の識別方法及び装置（Method and Device for Distinguishing among Plural of Nucleic Acid Specimens Immobilized on Substrate）に関する。

より具体的には、本発明は、基板上に固定された核酸検体の種類を識別する方法に関する。また、本発明は、核酸シーケンスにおいて、シーケンス対象となる核酸の由来元を識別する方法に関する。さらに、本発明は、そのような方法に用いることができる装置に関する。

背景技術

[0002] DNAシーケンス法として、合成時解読（sequencing by synthesis; SBS）法が知られている（米国特許第4863849号明細書（特許文献1））。SBS法においては、DNAポリメラーゼを用い、DNAテンプレートに相補的なdNTPアナログが取り込まれる順番を測定することでDNA塩基配列を決定する。このdNTPアナログは蛍光標識されていたものであり、主にTIRF（全反射蛍光顕微鏡システム）で検出する（New High Throughput Technologies for DNA Sequencing and Genomics, Volume 2, p.216-217（非特許文献1））。

[0003] 近年、SBS法を採用した新型シーケンサが市場投入され、サンガー法に変わる次世代シーケンサとしての地位を築きつつある。SBS法を用いたDNA配列の解読法は、超並列処理化によるスループットの飛躍的な向上が見込めるといえる長所を有する。一方、SBS法を用いたDNA配列の解読法は、一度に解読できるリード長がサンガー法に比較して短いため、並列化に伴い出力される配列情報量が増大し、特にマッピング法が使えないDe Novoシーケンス（すなわち未知配列のシーケンス）における配列復元処理に多大な負

荷と困難が伴うという短所を有する。

[0004] 配列復元処理の負荷低減策の例として、シーケンス対象となるDNA検体に識別用インデックス配列を新たに付加し、個々のDNA検体が由来する核酸を明確にすることで、DNA配列のアセンブリ回数を低減する方法が採用されている（Illumina社ホームページ<URL : <http://www.illumina.com/pages.ilmn?ID=328>>（非特許文献2）、及びCraig DW, Pearson JV, Szelinger S, Sekar A, Redman M, et al. (2008) Nat Methods 5:887-93（非特許文献3））。

[0005] また、個々のDNA検体が由来する核酸を明確にする他の方法として、核酸の種類ごとに基板上の固定位置を制御することによって、核酸の種類を識別する方法がある。この方法にはスタンフォード大学によって開発されたインクジェット技術を応用した方法（米国特許第5,807,522号明細書（特許文献2）、及び米国特許第6,110,426号明細書（特許文献3））や、Affymetrix社が開発した、リソグラフィ技術を利用した基板上での核酸の直接合成法（米国特許第6,949,638号明細書（特許文献4））等がある。これらの方法は、多種類の核酸プローブを、高密度に基板上に作為的に決定される位置で配置したDNAチップを作製する技術として応用されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：米国特許第4,863,849号明細書
特許文献2：米国特許第5,807,522号明細書
特許文献3：米国特許第6,110,426号明細書
特許文献4：米国特許第6,949,638号明細書

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：New High Throughput Technologies for DNA Sequencing and Genomics, Volume 2, p.216-217
非特許文献2：Illumina社、[online]、インターネット<URL : <http://www.illumina.com>>

lumina.com/pages.ilmn?ID=328>

非特許文献3 : Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Sekar A, Redman M, et al. (2008) Nat Methods 5:887-93

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 非特許文献2に記載の方法ではMultiplexed Sequencing法を採用しており、2種類の合成用プライマーに加えて、別途識別用インデックス配列を含むプライマーを用意し、テンプレートに当該識別用配列を付与するという煩雑な調製工程が必要である。当該調製工程は、合成用プライマーを兼ねた識別用インデックス配列をライゲーション（結合）することによって、当該調製工程を幾分簡略化することが可能である。しかしながら、いずれの調製方法においても、テンプレートの種類ごとに異なる識別用インデックス配列断片を用意する必要があるため、テンプレート配列の種類が増大するほど、サンプル調製面及びコスト面での負荷が増大するという欠点がある。
- [0009] また、特許文献2、特許文献3及び特許文献4に記載のように、インクジェット又はリソグラフィを用いたテンプレート固定法は、特定疾患遺伝子を含む核酸配列断片のように、あらかじめ決められた配列を持つテンプレートを固定する用途には適している反面、基板作製には専用の装置が必要であり、またユーザーサイドでの設計自由度がないために、SBH (Sequence By Hybridization) 法によるシーケンス用途に限られるなど、汎用性に乏しいという欠点がある。
- [0010] 本発明の目的は、核酸検体識別用のインデックス配列を別途付与する必要がなく、核酸検体識別のために基板上に作為的に決定した位置に固定化する必要もない、基板上に固定化された複数種の核酸検体を識別することができる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、基板上に固定化された複数種の核酸検体それぞれに含まれる塩基配列情報、及び／又は複数種の核酸検体が基板上に固定化された順番

をインデックスとして利用することによって、基板上の無作為の位置で（すなわちランダムに）固定化された複数種の核酸検体を、それらの固定化位置情報に基づいて識別することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] 本発明は、基板上の無作為の位置で固定化された核酸検体を、その位置情報を取得することによって識別することによって、複数種の核酸検体を識別することを主題とする。

[0013] 本発明は、以下の発明を含む。

下記（１）に記載の発明は、基板上に固定化された複数種の核酸検体それぞれに含まれる塩基配列情報をインデックスとして利用することによって、基板上にランダムに固定化された複数種の検体を、それらの固定化位置情報に基づいて識別する方法である。

[0014] （１）

基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する複数種の識別すべき核酸検体を用意する工程と、

前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ に由来するシグナルを検出し、前記固定化された複数種の核酸検体それぞれの前記基板上的固定位置情報を前記シグナルに基づいて取得する工程と、

前記複数種の識別すべき核酸検体のそれぞれに含まれる塩基配列情報を取得する工程と、

前記塩基配列情報を前記位置情報と関連付けることによって、前記複数種の核酸検体を互いに識別する工程とを含む、基板上に固定化された複数種の核酸検体の識別法。

[0015] （２）

前記基板上に無作為の位置で固定化された複数種の識別すべき核酸検体が、前記複数種の識別すべき核酸検体のうち二種以上を含む溶液を前記基板に供給することによって得られるものである（１）記載の識別法。

[0016] 前記（２）の方法において、前記複数種の核酸検体が有する前記シグナル

プローブは互いに同じものであってよい。

前記（２）の方法において、前記複数種の核酸検体が有する前記シグナルプローブは互いに異なっていてよい。このことによって、塩基配列情報に加え、シグナルプローブをさらなるインデックスとして組み合わせることができ、識別の信頼性を向上させることができる。

前記（２）の方法において、前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する核酸検体は、シグナル物質標識された核酸を核酸検体にハイブリダイズ又はライゲートすることによって得られうる。

[0017] 下記（３）に記載の発明は、核酸検体が基板上に固定化された順番をインデックスとして利用することによって、基板上にランダムに固定化された複数種の検体を、それらの固定化位置情報に基づいて識別する方法である。

[0018] （３）

基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する識別すべき核酸検体を用意する工程、及び

前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ に由来するシグナルを検出し、前記固定化された核酸検体の前記基板の固定位置情報を前記シグナルに基づいて取得する工程を含む工程（Ａ）と、

前記基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する他種の識別すべき核酸検体を用意する工程、及び

前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ に由来するシグナルを検出し、前記固定化された他種の核酸検体の前記基板の固定位置情報を前記シグナルに基づいて取得する工程を含む工程（Ｂ）とを少なくとも含み、

前記工程（Ａ）及び（Ｂ）を含む工程の順番と、それぞれの工程において取得された前記位置情報とを関連付けることによって、複数種の前記核酸検体を互いに識別する、基板上に固定化された核酸検体の識別法。

上記（３）に記載の方法において、（Ａ）工程～（Ｂ）工程の一連の工程をさらに繰り返すこともできる。

[0019] （４）

前記工程（Ａ）が、前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する核酸検体を含む溶液を前記基板に供給することを含み、前記工程（Ｂ）が、前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する他種の核酸検体を含む溶液を、前記核酸検体を含む溶液が供給された前記表面の領域に重ねて供給することを含む、（３）に記載の識別法。

[0020] 下記（５）に記載の発明は、上記（１）に記載の方法と上記（３）又は（４）に記載の方法とを組み合わせたものであり、すなわち、基板上に固定化された複数種の核酸検体それぞれに含まれる塩基配列情報、及び複数種の核酸検体が基板上に固定化された順番をインデックスとして利用することによって、基板上にランダムに固定化された複数種の検体を、それらの固定化位置情報に基づいて識別する方法である。このことによって、上記（３）や（４）に記載の方法において核酸検体の種類ごとにシグナル検出及び固定化位置情報を取得する場合に比べ、シグナル検出及び固定化位置情報の取得の回数を減らすことができる。

[0021] （５）

前記基板表面に固定化された前記核酸検体及び／又は前記他種の核酸検体が、複数種の前記識別すべき核酸検体のうち二種以上の識別すべき核酸検体を含む溶液によって供給されるものであり、工程（Ａ）及び／又は（Ｂ）において、前記基板表面に固定化された前記二種以上の識別すべき核酸検体のそれぞれに含まれる塩基配列情報を取得することをさらに含む、（３）又は（４）に記載の核酸検体の識別法。

[0022] 前記（５）において、前記複数種の核酸検体が有する前記シグナルプローブは互いに同じものであってよい。

前記（５）において、前記複数種の核酸検体が有する前記シグナルプローブは互いに異なっていてよい。このことによって、固定化の順番に加え、シグナルプローブをさらなるインデックスとして組み合わせることができ、識別の信頼性を向上させることができる。

前記（５）において、前記シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する核酸検体は、シ

グナル物質標識された核酸を核酸検体にハイブリダイズ又はライゲートすることによって得られうる。

[0023] 下記（６）は、上記（１）、（２）及び（５）における塩基配列取得方法を特定したものである。

（６）

前記核酸検体に含まれる前記塩基配列情報の取得を、シグナル物質標識されたヌクレオチド $N^{(L)}$ を相補鎖合成基質として含む核酸合成系において、前記識別すべき核酸検体を鋳型として相補鎖合成し、前記シグナル物質標識されたヌクレオチド $N^{(L)}$ が前記核酸検体に相補鎖結合した順に前記シグナル物質に由来するシグナルを検出することによって行う、（１）、（２）及び（５）のいずれかに記載の識別法。

上記（６）に記載の方法を行うために、ＳＢＳ法を用いることができる。

[0024] （７）

前記複数種の識別すべき核酸検体それぞれが増幅されたものである、（１）～（７）のいずれかに記載の識別法。

[0025] 以下の発明は、上記（１）～（７）に記載の核酸検体の識別法の実施に適した装置に向けられる。

下記（８）及び（９）は、例えば上記（１）や（２）の識別法の実施に用いることができる装置である。

（８）

複数種の識別すべき検体が基板表面の無作為の位置で固定化されるように、検体を基板上に供給する手段と、
固定化された前記検体に由来するシグナルを検出する手段と、
前記検体の前記基板上の固定位置情報を取得する手段と、
前記検体に含まれる塩基配列情報を取得する手段と、
を備える、基板上に固定化された複数種の検体の識別装置。

[0026] （９）

前記取得した固定位置情報を記録する手段、

前記取得した塩基配列情報を記録する手段、及び

前記固定位置情報と前記塩基配列情報とを関連付ける手段の少なくともいずれかをさらに備える、（８）に記載の装置。

[0027] 下記（１０）は、例えば上記（３）や（４）に記載の識別法の実施に用いることができる装置である。

（１０）

複数種の識別すべき検体が基板表面の無作為の位置で固定化されるように、検体を基板上に複数回供給する手段と、

固定化された前記検体に由来するシグナルを検出する手段と、

前記検体の前記基板上の固定位置情報を取得する手段と、

前記供給する手段、前記検出する手段及び前記固定位置情報を取得する手段の一連の手段を複数回機能させるための制御手段と

を備える、基板上に固定化された複数種の検体の識別装置。

[0028] 下記（１１）は、例えば上記（５）に記載の識別法の実施に用いることができる装置である。

（１１）

前記検体に含まれる塩基配列情報を取得する手段をさらに備える、（１０）に記載の装置。

[0029] 下記（１２）は、例えば上記（６）に記載の識別法の実施に用いることができる装置である。

（１２）

前記塩基配列情報を取得する手段が、

蛍光物質標識されたヌクレオチドを供給する手段と、前記蛍光物質に由来する蛍光を観察する全反射蛍光顕微鏡システムとを含み、

前記観察された蛍光を塩基配列情報に変換する手段を含んでよい、（８）、（９）及び（１１）のいずれかに記載の装置。

上記（１２）の装置においては、前記観察された蛍光を塩基配列情報に変換する手段をさらに含んでよい。

[0030] 下記（１３）は、例えば上記（３）、（４）、（５）や（６）に記載の識別法の実施に用いることができる装置である。

（１３）

前記取得した固定位置情報を記録する手段、及び

前記固定位置情報と前記一連の手段を機能させた順番とを関連付ける手段の少なくともいずれかをさらに備える、（１０）～（１２）のいずれかに記載の装置。

[0031] 下記（１４）は、例えば上記（７）に記載の識別法の実施に用いることができる装置である。

（１４）

核酸増幅手段をさらに備える、（８）～（１３）のいずれかに記載の装置。

発明の効果

[0032] 本発明によると、核酸検体識別用のインデックス配列を別途付与する必要がなく、核酸検体識別のために基板上に作為的に決定した位置に固定化する必要もない、基板上に固定化された複数種の核酸検体の識別が可能になる。また、本発明において、核酸検体自身に含まれる配列をインデックスとして利用する場合、複数種の核酸検体を混合物として基板上に供給することによって一度に固定化を行うとともに、それぞれの核酸検体の識別が可能になる。

図面の簡単な説明

[0033] [図１]核酸検体を増幅する場合において、核酸検体に二本鎖プライマーをライゲートした態様の一例を模式的に示したもの、及び（ｂ）合成開始用プライマーを有するシグナルプローブを有する核酸検体の一例を模式的に示したものである。

[図２]シグナルプローブを有する核酸検体のいくつかの例を模式的に示したものである。

[図３]シグナルプローブを有する核酸検体が、固定化用タグを介して基板上の

リンカーに結合することによって、基板表面に固定化される態様の一例を模式的に示したもの（a）及び（b）、及び基板上に固定化され且つシグナルプローブを有する核酸検体において、当該核酸検体のインデックスとなりうる塩基配列（核酸検体の初期配列）が合成される態様の一例を模式的に示したものである。

[図4] 及び基板上に固定化され且つシグナルプローブを有する核酸検体において、当該核酸検体のインデックスとなりうる塩基配列（核酸検体の内部配列）が合成される態様の一例を模式的に示したものである。

[図5] 核酸検体が基板上に無作為の位置で固定化され、位置情報が取得された態様の一例を、基板上の一部における固定化された核酸検体の態様を示す拡大図と共に模式的に示したもの（a）、及びさらにその後、当核酸検体において、インデックス用塩基配列情報を与える部分配列を合成した態様の一例を模式的に示したものである。

[図6] 図5（a）において位置情報が取得された後、さらに別の核酸検体を無作為の位置で固定化し位置情報を取得した態様の一例を、基板上の一部における固定化された核酸検体の態様を示す拡大図と共に模式的に示したものである。

発明を実施するための形態

[0034] [1. シグナルプローブを有する複数種の識別すべき核酸検体]

[1-1. 識別すべき複数種の核酸検体]

核酸検体は、基板上に固定化された状態でその種類を区別する要請があるものであれば、特に限定されるものではない。核酸検体の種類の区別は、例えば、由来元が異なる複数種の核酸検体や、解析対象として異なる複数種の核酸検体を、同一基板上で互いに別個の核酸検体として認識する目的で行われうる。

[0035] 具体的な例としては、配列決定すべき核酸に含まれる複数の部分配列を取得し、取得された複数の部分配列を再構築することによって当該核酸の配列決定を行う場合において、当該複数の部分配列が由来する核酸を明確にする

ために、本発明を用いることができる。

この場合におけるより具体的な例としては、複数種の核酸から得られた複数種の核酸断片を固定化して、当該核酸断片全体の配列情報を得て、当該核酸断片の配列情報を再構築して当該核酸の配列を決定する場合に、それぞれの核酸断片の由来元となる核酸の種類を互いに区別するために本発明を用いることができる。

[0036] 具体的な他の例としては、異なる個体に由来する複数種の核酸検体を、同一基板上で免疫検出などの検出法によって検査する場合に、当該由来が異なる複数種の核酸検体それぞれを、互いに異なる検査対象として区別するために本発明を用いることができる。

[0037] 本発明において、複数種の核酸検体とは、異なる種類の核酸検体をいい、ユーザーにとって互いに区別することを要する核酸検体である。複数種の核酸検体の例としては、異なる配列を有する核酸同士、同配列を有する核酸同士、及び実質的に同配列（複製時のエラーや、変異等を許容する意）の核酸同士を問わない。例えば、由来元が異なる核酸同士や、異なる母集団に属する核酸同士、解析対象として異なる核酸同士も、複数種の核酸検体となりうる。

[0038] 従って、本発明において、同じ種類に属する核酸検体は、ユーザーにとって互いに区別することを要しない核酸検体である。同じ種類に属する核酸検体としては、同配列を有する核酸同士、実質的に同配列（複製時のエラーや、変異等を許容する意）の核酸同士、及び異なる配列を有する核酸同士を問わない。例えば、由来が同じ核酸同士や、同じ母集団に属する核酸同士も、同じ種類に属する核酸検体となりうる。

[0039] [1-2. 核酸検体の種類]

構造的観点からは、主として核酸塩基、五炭糖およびリン酸基から構成されるヌクレオチド残基がホスホジエステル結合により連結したポリマーであり、核酸塩基としては、プリン又はピリジミンの誘導体及び塩基対形成が可能なその他のいかなる核酸塩基も許容される。より具体的には、DNA、R

N A、その他核酸アナログ、及びそれらの混合が挙げられる。さらに、核酸検体は一本鎖であっても二本鎖であってもよい。

また、配列由来の観点からは、天然に由来するもの、人為的に変更されたもの又は合成配列、及びそれらの混合が許容される。より具体的には、ヒトを含む様々な生物、及びウイルス及び細菌を含む様々な微生物の染色体、ゲノム、cDNA、それらの断片（但し鋳型核酸より大きな単位のもの）などが挙げられる。また、ポリヌクレオチドは、異なる個体に由来する同じ配列のものであってもよい。

[1-3. 核酸検体の調製法]

核酸検体は、1つの細胞に由来するものであってもよいし、複数の細胞に由来するものであってもよい。また、核酸検体は、1つの検体に由来するものであってもよいし、複数の検体に由来するものであってもよい。

[0040] 核酸検体は、細胞から精製されたものでありうる。適宜断片化されたものであってもよい。精製の手法としては特に限定されるものではなく、当業者によって公知の方法が適宜選択される。

[0041] 複数種の核酸検体は、各種が複数本存在してよい。複数種の核酸検体それぞれについて同配列或いは実質的に同配列のものを複数本得るための方法としては、当該核酸検体のコピーを調製する方法が挙げられる。

核酸検体のコピーを調製する方法としては、例えば、核酸検体を鋳型とする核酸増幅法（PCRに代表される方法）が挙げられる。例えば核酸検体が二本鎖である場合、図1（a）に模式的に示されるように、核酸検体（これをXと表記する）に二本鎖プライマー（これを例えばp/p'と表記する）をライゲートするとともに核酸増幅を行うことができる。また例えば、核酸検体に含まれる塩基配列情報をインデックスとして用いる場合（後述6-1）であって、当該インデックスを与える塩基配列が核酸検体の既知配列の間に存在する場合は、当該既知配列を有するプライマーをハイブリダイズするとともに核酸増幅を行うことができる。

核酸増幅を行うための手段としては、いかなる手段を用いてもよい。また

、本発明の検体識別装置において、核酸増幅を行うための手段が一手段として備えられてよい。

増幅法の具体的なプロトコルも特に限定されるものではなく、当業者によって公知の方法から適宜選択される。

[0042] また、核酸検体のコピーを調製する他の方法としては、例えば、核酸検体をベクターに挿入し、宿主細胞で増殖させることによって行う方法が挙げられる。この方法についても、具体的なプロトコルは特に限定されるものではなく、当業者によって公知の方法が適宜選択される。

[0043] 核酸検体それぞれについて同配列或いは実質的に同配列のものを複数本得るための他の方法としては、異なるソースから核酸検体を取得し、断片化することによって得る方法が挙げられる。異なるソースとしては、異なる細胞が挙げられる。当該異なる細胞は、異なる個体に由来しうる。

[0044] 核酸検体を得るために行われうる断片化工程は、公知の手法を用いて当業者によって適宜行われる。具体的には、超音波や制限酵素を用いた方法が挙げられる。

[0045] [1-4. シグナルプローブを有する核酸検体]

識別すべき核酸検体は、基板上における自らの存在位置を示すためのシグナルプローブを有する。シグナルプローブは、シグナル物質そのものであってもよいし、シグナル物質とその他の要素とを含むものであってもよい。

核酸検体がシグナルプローブを有する態様としては特に限定されない。核酸検体とシグナルプローブとの結合の種類としては、共有結合及び特異的結合（水素結合や抗原抗体結合など）を問わない。シグナルプローブは、例えば、シグナル物質で標識された核酸でありうる。また、シグナルプローブは、後述するように固定化用タグ（図3（a）に例示される）を有するものであってもよい。

[0046] 核酸検体は、シグナル検出が行われるまでにシグナルプローブを有していればよい。従って、シグナルプローブは、識別すべき核酸検体のシグナル検出が行われるまでのいかなる段階で完成してもよい。また、シグナルプローブ

ブを有する核酸検体の調製を行うに当たっては、シグナル物質とその他の要素とからシグナルプローブを得て、得られたシグナルプローブを核酸検体に付与してもよいし、シグナルプローブを構成する一部分を核酸検体に付与し、その後、シグナルプローブの他の構成部分を付与することによって、核酸検体にシグナルプローブを完成してもよい。さらに、シグナルプローブは、それ自身又はそのシグナル標識部分のみが取り外し可能な態様で核酸検体に付されることができる。

[0047] シグナル物質標識とともにシグナルプローブとして供されうる当該核酸は、例えば前述のように、核酸合成系で用いられる合成開始用プライマーとしても機能することができる比較的短い核酸を含みうる（図1（b）及び図2（a）～（c）等に模式的に例示される）。なお、プライマーは、核酸合成反応系において、核酸合成の開始点として働くオリゴヌクレオチドである。プライマーは合成したものであっても良く、生物界から単離したものであっても良い。

[0048] このようなシグナルプローブを有する核酸検体のより具体的な例としては、核酸検体をX、シグナルプローブを $p^{(L)}$ と表記すると、シグナル物質標識された短い核酸が核酸検体にライゲートしたもの（ $p^{(L)}-X$ 、図2（a）に例示される）；シグナル物質標識された短い核酸が核酸検体にハイブリダイズしたもの（ $X/p^{(L)}$ 、図2（b）に例示される）；又は、シグナル物質標識された短い核酸が、核酸検体にライゲートした他の核酸（これを p' と表記する）にハイブリダイズしているもの（ $p'-X/p^{(L)}$ 、図2（c）に例示される）が挙げられる。なお、図2（c）にいくつか例示されるように、Xにライゲートしている核酸 p' と、それにハイブリダイズしているシグナルプローブ $p^{(L)}$ におけるプライマーpとは、少なくとも一部の配列が相補的であればよく、両者の全配列が完全に相補的であることを必ずしも要しない。

[0049] このようなシグナルプローブを用いることは、本発明の核酸検体識別方法を用いるとともに核酸検体を鋳型とする核酸合成に供する態様において有用

である。そのような態様としては、本発明の核酸検体識別法において、核酸検体に含まれる塩基配列を核酸合成によって相補鎖合成し、得られた塩基配列情報を核酸検体識別のためのインデックスとして用いる態様（後述 6-1）や、その他、本発明の核酸検体識別法とは別の工程で核酸検体を核酸合成に供する態様が挙げられる。

[0050] [1-5. シグナル物質]

シグナルプローブにおけるシグナル物質は、核酸検体が基板上に固定化された場合に、基板上における存在位置を把握することができるものが特に限定されることなく用いられる。

[0051] シグナル物質は、当業者に公知の手段によって検出可能なものであればよい。好ましくは、蛍光物質が挙げられる。より具体的には、例えば、Dimethyl coumarine、BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY 630/650・Naphthofluorescein、Fluorescein Chlorotriazinyl、Oregon Green 488、Rohdamine Green、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 594、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy3.5、Lissamine Rohdamine B、Tetramethyl rohdamine、Texas Redなどが挙げられる。

[0052] シグナル物質は、識別すべき複数種の核酸検体の間で同じものが付されてよい。本発明の方法は、核酸検体に含まれる塩基配列情報及び／又は核酸検体の固定化の順番をインデックスとして利用するため、複数種の核酸検体の間でシグナル物質を異ならしめることなく、それらの識別を可能にする。

[0053] しかしながら、本発明においては、識別すべき複数種の核酸検体の間で異なるものを付すことも許容する（図6に例示する）。例えば、本発明においてインデックスとして核酸検体に含まれる塩基配列情報を利用する場合は、基板上に供給する複数の核酸検体について一種類ごと又は数種類ごとに異な

るシグナル物質を用いてよい。また、本発明においてインデックスとして核酸検体の固定順を利用する場合は、一回固定すること又は数回固定することに異なるシグナル物質を用いることができる。

このことによって、シグナル物質をさらなるインデックスとして利用することができるため、複数のインデックスの組み合わせによって、核酸検体の識別の信頼性を向上させることができる。

[0054] [2. 基板]

基板としては、核酸検体の固定化、シグナル検出及び位置情報取得に支障がない限り特に限定されるものではない。例えば、少なくとも光を透過させる材質から構成されるものが用いられうる。例えば、シリコン、ガラス、石英ガラス、石英などのケイ素含有基材や、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリメタクリル酸メチルなどの樹脂基材など、高い光透過率を有する材質から構成される基板が用いられうる。

また、核酸合成反応液より高い屈折率を有し、且つ、基板と反応液との界面でレーザーを全反射させたときに、反応液側にエバネッセント場を生じることができるような物体であることが好ましい場合がある。上記のような基板は、特に、インデックスとしての塩基配列情報の取得（後述 6-1）を、エバネッセント場を利用することによって行う場合に好適に用いられる。

さらに、基板はディスプレイザブルであってよい。

[0055] [3. 固定化]

本発明においては、基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブ P^(L) を有する複数種の識別すべき核酸検体を用意する。本発明においては、広義の固定化として、このような固定化された核酸検体を用意するための一連の工程を行うことを意味する場合がある。また、狭義の固定化として、基板と固定化対象とを結合させることを意味する場合もある。

[0056] このように固定化された核酸検体を得るための固定化方法は当業者によって適宜決定されるものであって、特に限定されるものではない。通常、固定化は、核酸検体にシグナルプローブ P^(L) が核酸検体に備えられること、核酸

検体が基板上の無作為の位置へ供給されることと、核酸検体が固定化を達成することができる条件に付されることが任意の順番で行われることによって行われる。

[0057] シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する核酸検体は、核酸検体部分において基板と結合していてもよいし、シグナルプローブ $P^{(L)}$ 部分で基板と結合していてもよい。また、シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する識別すべき核酸検体は、固定化用タグ及びリンカーを介して基板表面へ固定化されている（図3（a）及び（b）に例示される）。なお後述するが、固定化用タグは、固定化される対象に付されるべき構造又は固定化される対象自身を構成する一部でありうる。また、リンカーは、基板に付されるべき構造又は基板自身を構成する一部でありうる。

[0058] [3-1. 核酸検体の基板上における固定化位置]

本発明においては、核酸検体が基板上に固定化される位置は無作為に定まるものである（図5及び図6に例示される）。すなわち、固定化にかかる操作において、核酸検体はその種類によって固定化位置が識別可能となるようには制御されない。すなわち、アレイ技術を用いた固定化によって実現されるような整然さは伴わない。従って、複数種の核酸検体が基板上に固定化されると、各種核酸検体は互いに混合した状態で分布する。混合の度合いは供給態様によって異なる場合もあり、特に限定されない。例えば、基板上の複数の核酸検体が固定化されている領域全体において、各種核酸検体の混合割合がほぼ同じとなる分布である場合（図6に例示される）や、基板上の場所によって各種核酸検体の混合割合において不連続な変化が生じるような分布である場合がある。前者の場合は、複数の核酸検体の全てを含む溶液を供給することや、核酸検体を複数回に分けて且つ基板上の同じ位置に重ねて供給することによって生じうる。後者の場合は、核酸検体を複数回に分けて供給することによって生じうる。

[0059] [3-2. 核酸検体の基板上における固定化密度]

基板上に固定化する核酸検体の密度としては、例えば固定化された核酸検

体が有するシグナルプローブ $P^{(L)}$ に由来するシグナルを検出するための検出器によって光学分解可能な密度とすることができる。そのような密度としては、例えば、512pixel×512pixelのCCDを検出器として用いる場合、近接場顕微鏡と組み合わせることで、5pixel×5pixelの中の1pixelの輝点を認識することは可能であるから、1画面(80 μ m×80 μ m)あたり10,000個程度までの輝点を光学分解可能である。またその場合の核酸固定化密度は1,500,000検体/mm²程度となる。従って、固定化密度は、1,500,000検体/mm²程度以下であれば当業者が適宜決定することができる。

[0060] [3-3. 核酸検体の供給]

本発明において、核酸検体に含まれる塩基配列情報をインデックスとする場合、核酸検体の基板上への供給は、識別すべき複数種の核酸検体のうち少なくとも二種を含む溶液を供給することによって行われうる。この場合、識別すべき複数種の核酸検体を一時に供給してもよいし、複数回に分けて供給してもよい。無論、識別すべき核酸検体を一種類ずつ供給することも許容される。いずれの場合も、シグナルの取得を行うまでに全ての核酸検体が供給され固定化される。

[0061] 本発明において、固定化の順番をインデックスとする場合、核酸検体の基板上への供給は、識別すべき核酸検体が一種類ずつステップワイズに供給されうる。核酸検体の一種類について供給及び固定化され、位置情報が取得された後に、核酸検体の他の一種類について供給及び固定化され、位置情報が取得される、という操作が繰り返される。

また、本発明において、核酸検体に含まれる塩基配列情報と固定化の順番との両方をインデックスとする場合、核酸検体の基板上への供給は、複数種の核酸検体が複数回にわたって供給されうる。

[0062] このような核酸検体の供給を行う手段は、核酸検体の識別装置に一手段として備えられることができ、自動化することもできる。異なる核酸検体を複数回にわたって供給することができる機構を有しているものが好ましい。

そのような手段としては、複数流路の切り換え機能を有するバルブ、核酸

供給用のポンプ(微量検体を定量的に供給できるポンプとしては、例えばシリンジポンプ等がある)がチューブを介して流路に接続される形態を有するものが挙げられる。それぞれの流路の先端には、複数の異なる核酸検体、流路洗浄用のリンス液等が保持された容器が接続されており、バルブを順次切り替えることにより、異なる核酸検体を流路中に導入することが可能となる。溶液の導入方法としては、押し出しによる供給と、吸い込みによる供給方法が考えられるが、複数溶液の供給を1台のポンプで実現できる観点から、吸い込みによる供給方法が好ましい。

[0063] [3-4. 固定化の態様]

すでに述べたとおり、固定化は、核酸検体にシグナルプローブP^(L)が備えられることと、核酸検体が基板上の無作為の位置へ供給されることと、核酸検体が固定化を達成することができる条件に付されることが任意の順番で行われる。

上記任意の順番で行われる固定化のいくつかの態様の例として、以下が挙げられる。

シグナルプローブP^(L)が付された核酸検体が基板上へ供給され、固定化を達成することができる条件下、シグナルプローブP^(L)が付された核酸検体が、固定化用タグ及びリンカーを介して基板表面へ固定化される。

シグナルプローブP^(L)が付された核酸検体が基板上へ供給され、固定化を達成することができる条件下、核酸検体に付されたシグナルプローブP^(L)が、固定化用タグ及びリンカーを介して基板表面へ固定化される(図3(a)に例示される)。

核酸検体に付されるべきシグナルプローブP^(L)が基板上へ供給され、固定化を達成することができる条件下、シグナルプローブP^(L)が固定化用タグ及びリンカーを介して基板表面へ固定化され、その後、固定化されたシグナルプローブP^(L)に核酸検体が付加される。

核酸検体に付されるべきシグナルプローブP^(L)が基板上へ供給され、固定化を達成することができる条件下、核酸検体が供給され、核酸検体が、固定

化用タグ及びリンカーを介して基板表面へ固定化されるとともにシグナルプローブP^(L)に付加する。

シグナルプローブP^(L)が付されるべき核酸検体が基板上へ供給され、固定化を達成することができる条件下、核酸検体が、固定化用タグ及びリンカーを介して基板表面へ固定化され、その後、固定化された核酸検体にシグナルプローブP^(L)が付される。

シグナルプローブP^(L)が付されるべき核酸検体が基板上へ供給され、固定化を達成することができる条件下、シグナルプローブP^(L)が供給され、シグナルプローブP^(L)が、固定化用タグ及びリンカーを介して基板表面へ固定化されるとともに核酸検体に付加する。

従って、本発明においては、シグナルプローブが付された核酸検体、シグナルプローブが付されるべき核酸検体、核酸検体に付されたシグナルプローブ及び核酸検体に付されるべきシグナルプローブを、固定化される対象（又は固定化対象）と記載することがある。

[0064] また、固定化される対象、固定化用タグ、リンカー及び基板を結合させる順番は、特に限定されるものではない。

例えば、固定化される対象が、核酸検体に付されたシグナルプローブ又は核酸検体に付されるべきプローブである場合を挙げると、固定化用タグを有するシグナルプローブ（具体的には、固定化用タグが付されたシグナルプローブ又は固定化用タグをその一部として有するシグナルプローブ）を、リンカーを有する基板（具体的には、リンカーが付された基板又はその一部としてリンカーを有する基板）に結合させることができる。例えば、固定化用タグを有するシグナルプローブを、リンカーを与える物質の存在下、基板に結合させることができる。例えば、シグナルプローブを、固定化用タグ及びそれに結合したリンカーを有する基板（具体的には、固定化用タグ及びリンカーが付された基板、又は自身の一部を構成するリンカーに固定化用タグが結合した基板）に結合させることができる。例えば、シグナルプローブを、固定化用タグを与える物質の存在下、リンカーを有する基板に結合させること

ができる。

固定化される対象が、シグナルプローブが付された核酸検体又はシグナルプローブが付されるべき核酸検体である場合も、上記に準じる。

[0065] 固定化の条件としては、固定化される対象、固定化用タグ、リンカー及び基板を結合させることができる条件であれば特に限定されることなく、それぞれの要素の特性に基づいて、当業者が適宜選択することができる。

例えば、リンカーと固定化用タグとを結合させることができる条件は、当該リンカーや固定化用タグの特性に基づいて、当業者が適宜選択することができる。

リンカーと固定化用タグとの間の結合の種類については特に限定されず、他の工程における条件下（例えば核酸合成条件下）においてリンカーと固定化用タグとが不所望に離れないものであればよい。例えば、水素結合、抗原抗体結合、及びビオチン結合性タンパク質－ビオチン間結合などの特異的結合や、共有結合などの結合が挙げられる。

[0066] 水素結合の例としては、適当な塩基配列を有する核酸同士の相補的結合が挙げられる（図3（b）に例示される）が、その他核酸が関与しない水素結合のあらゆるものも含まれる。

抗原抗体結合のごく一例としては、ジゴキシゲニン／ジゴキシゲニン抗体間の結合が挙げられるが、その他当業者によって用いられうる抗原抗体間結合のいかなるものも含まれる。ビオチン結合性タンパク質－ビオチン間結合としては、アビジン－ビオチン結合に代表されるもので、それらの一方又は両方が誘導体である場合の結合も含まれる。

共有結合としては、反応性官能基間において形成される結合であれば特に限定されるものではない。また、当該結合は、リンカー試薬を介在させることによって形成されるものであってもよい。反応性官能基としては、ごくいくつかの例として、アミノ基、水酸基、カルボキシル基などが挙げられる。また、リンカー試薬としては、ごくいくつかの例として、EDC（1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbonyl

diimide Hydrochloride) や NHS (N-hydroxysuccinimide) などが挙げられる。

[0067] 基板とリンカーとの間の結合の種類、及び固定化される対象と固定化用タグとの間の結合の種類については後述する。

[0068] [3-5. 固定化用タグ]

固定化用タグは、固定化される対象（すなわち核酸検体若しくはシグナルプローブ）に付されるべき構造でありうる。或いは、固定化用タグは、固定化される対象自身（すなわち核酸検体自身若しくはシグナルプローブ自身）を構成する一部でありうる（図3（a）に例示される）。固定化用タグは、固定化工程が行われるまでに固定化される対象に備えられていれば良いため、固定化される対象自身を構成する一部（例えば固定化される対象自身が有する官能基）をそのまま固定化タグとして用いる場合を除き、当該固定化用タグを固定化される対象に付す工程は、固定化工程を行う以前のいずれの段階で行われてもよい。

固定化される対象自身が有する官能基としては、例えば核酸分子が有するいかなる基も挙げられ、例えばアミノ基、カルボニル基、水酸基、アリール基、炭化水素基、及びリン酸基などが挙げられる。

[0069] 固定化用タグは、リンカーに対する結合能を有する構造であれば特に限定されるものではなく、当業者が適宜決定することができる。固定化用タグとリンカーとの結合の種類については、上述のとおりである。従って固定化タグとしては、例えば、適当な塩基配列を有する核酸、抗原又は抗体、アビジン又はビオチン、及び反応性官能基などを用いることができる。

核酸としては、前述の項目1-2において述べた核酸検体と同様のものが適用される。抗原／抗体としては、あらゆるものが許容され当業者が適宜選択することができるが、ごく一例として、ジゴキシゲニン／ジゴキシゲニン抗体が挙げられる。アビジン／ビオチンとしては、それらの誘導体も含む。反応性官能基としては、アミノ基、水酸基、カルボキシル基及びそれらを含む基などが含まれる。

本発明においては、核酸であって、基板表面に設けられたリンカーとしての核酸と相補的結合が可能な配列を有するものが固定化用タグとして用いられる（図3（a）に例示される）。

[0070] [3-6. リンカー]

リンカーは、基板に付されるべき構造又は基板自身を構成する一部でありうる。リンカーは、基板がその表面に有するものであって、上記固定化タグに対する結合能を有する構造である。

リンカーは、固定化タグに対する結合能を有する構造であれば特に限定されるものではなく、当業者が適宜決定することができる。固定化用タグとリンカーとの結合の種類については、上述のとおりである。従ってリンカーとしては、例えば、適当な塩基配列を有する核酸、抗原又は抗体、アビジン又はビオチン、及び反応性官能基（アミノ基、水酸基、カルボキシル基及びそれらを含む基など）などを用いることができる。本発明においては、核酸であって、固定化用タグとしての核酸と相補的結合が可能な配列を有するものが、リンカーとして好ましく用いられる（図3（a）に例示される）。

[0071] 基板自身を構成する一部であるリンカーとしては、基板を構成する高分子が有する反応性官能基であって基板表面に露出しているものや、基板表面にコーティングされた物質が有する反応性官能基であってコート層表面に露出しているものなどが挙げられる。ごくいくつかの例として、シラノール基、水酸基、アミノ基などが挙げられる。

また、基板に付されるべきリンカーは、上述の基板自身を構成する一部である反応性官能基に対して、固定化用タグとの結合能を有する構造を付与することによって設けることができる。

[0072] 核酸検体が基板上に固定化された後においては、洗浄などによって、未固定の核酸検体を除去する処理が行われていることが好ましい。この処理は当業者によって適宜行われる。

[0073] [4. シグナルの検出]

基板表面上に無作為の位置で、シグナルプローブP^(L)を有する核酸検体が

固定化されているため、当該核酸検体が有するシグナルプローブを検出することによって、核酸検体の存在を認識することができる。

シグナル検出のための手段は、上述のシグナルプローブの種類に応じて当業者が適宜決定することができるものである。シグナル検出手段は、通常、シグナルを励起させる光を発する励起光源、レンズなどを用いてシグナルを集める集光部と、励起光やバックグラウンドを取り除くフィルターと、シグナルを検出し、解析可能なデジタルデータに変換する検出・デジタル化部とを有しうる。シグナル検出手段は、スキャナータイプ及びカメラタイプを問わない。従って、励起光源としてはレーザー及びランプを問わない。集光部としては、ガルバノミラー方式及びスキャンヘッド可動式を問わない。検出・デジタル化部としては、光電子増倍管（Photo Multiplier Tube : PMT）及びCCD（Charge-Coupled Device）を問わない。

[0074] シグナル検出手段の選択に当たっては、核酸の固定密度に対応可能な検出精度を有するものを選択する。例えば、前記のように、512pixel×512pixelのCCDを検出器として用いる場合、近接場顕微鏡と組み合わせることで、1画面(80 μ m×80 μ m)あたり10,000個程度の輝点を光学分解可能である。またその場合の核酸固定化密度は1,500,000検体/mm²程度となる。

[0075] [5. 位置情報の取得]

検出されたシグナルは、核酸検体の基板上における位置情報に変換される。位置情報は、どのような形式で表されるものであってもよいが、検出されたシグナルの位置を、基板上の座標として特定することによって表されるものであることが好ましい。具体的には、基板上に座標系（好ましくは直交座標系）を定め、検出された一のシグナルに対して一義的に定まる二の実数の組によって、シグナルの位置（すなわち核酸検体の位置）を特定することができる（図5（a）及び図6に例示される）。

[0076] 核酸検体に含まれる塩基配列情報をインデックスとする場合、基板上に固定化された識別すべき核酸検体の全てについて、一工程で位置情報を取得す

ることができる。

固定化の順番をインデックスとする場合、識別すべき核酸検体が基板上に固定化される都度、位置情報の取得を行う。具体的には、基板上に固定化された識別すべき核酸検体について位置情報を取得し、その後新たに基板上に固定化された別の識別すべき核酸検体について位置情報を取得する。このとき、例えば、既に取得された核酸検体の位置座標と、新たに取得された核酸検体の位置座標との間で差分をとり、新たなシグナルが検出された座標を、当該別の核酸検体の位置情報として取得することができる。

[0077] このような位置情報を取得する手段は、核酸検体の識別装置に一手段として備えられることができ、自動化することができる。位置情報読み取り手段としては特に限定されることなく、デジタイザなど、当業者によって適宜選択される。

[0078] 取得された位置情報は、本発明の識別装置に備えられうる記憶手段に記憶されてもよいし、本発明の識別装置から外部の装置に出力されることによって、外部の装置における記憶手段に記憶されてもよい。

[0079] [6. インデックス]

インデックスは、複数種の核酸検体を種類ごとに特定することによって、核酸検体の識別を可能にする。本発明において、核酸検体の種類の識別のために用いられるインデックスには、核酸検体に含まれる塩基配列情報と、核酸検体の固定化順番とが挙げられる。いずれか一方のインデックスのみを用いてもよいし、両方のインデックスを組み合わせることもできる。

[6-1. インデックスとして塩基配列情報を利用する場合]

識別すべき複数の核酸検体を識別するためのインデックスの一つとして、核酸検体に含まれる塩基配列情報を利用する場合、識別すべき複数の核酸検体の全てを基板上に固定化し、位置情報を取得した（図5（a）に例示される）後、このような塩基配列情報の取得を行う（図5（b）に例示される）ことができる。

[0080] インデックスとして利用される塩基配列情報は、複数種の核酸検体を識別

するための固有配列情報を与えることができるものであれば特に限定されない。

また、当該塩基配列は、通常、核酸検体の一部を構成する部分配列であるが、核酸検体自体の長さによっては、その全配列となることを妨げない。核酸検体に含まれる塩基配列の長さとしては特に限定されないが、複数種の核酸検体を識別することができる固有の配列を与える十分な長さであって、塩基配列情報の取得工程が本発明の識別法の効率性や簡便性の支障にならない程度の長さとすることができる。このような長さは、当業者であれば容易に決定することができる。

インデックスとしての塩基配列の、核酸検体中の位置としては特に限定されない。すなわち、核酸検体の末端に位置する配列であってもよいし、内部に位置する配列であってもよい。

[0081] 塩基配列情報の取得の方法としては、固定化された核酸検体に基づいてシーケンスを行うことができる方法であれば特に限定されない。例えば、固定化された核酸検体を鋳型とし、相補鎖合成用基質であるヌクレオチドを用いて相補鎖を合成し、当該ヌクレオチドが鋳型に結合した順番に基づいて塩基配列を決定する方法を用いることができる。

[0082] [6-1-1. シグナルプローブを有する核酸検体を含むハイブリッド]

当該方法においては、鋳型である核酸検体X及びシグナルプローブP^(L)とともに、合成開始用プライマーを備えたハイブリッドを核酸合成系に供することによって、鋳型である核酸検体Xに含まれる塩基配列を有する相補鎖x^(L)を得ることができる(図3(c)及び図5(b)に例示される)。相補鎖x^(L)がシーケンスの対象であり、得られる塩基配列情報が本発明のインデックスとなる。相補鎖x^(L)の合成とシーケンスとは、同時に行ってもよい(すなわちSBS(sequencing by synthesis)法を行ってもよい)し、相補鎖x^(L)を合成した後、合成された相補鎖x^(L)をシーケンスしてもよい。

[0083] 核酸合成系に供される当該ハイブリッドの態様としては、プライマーの3

’ 末端から核酸検体 X に含まれる配列を相補鎖合成できる態様であればいかなる態様も許容される。

上述のとおり、シグナルプローブ $P^{(L)}$ は、合成開始用プライマーとしても機能することができる核酸を有しうる。この場合、シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する核酸検体が例えば図 2 (b) で例示されるような $X/P^{(L)}$ や、図 2 (c) で例示されるような $p' - X/P^{(L)}$ といったハイブリッド体であれば、そのまま相補鎖合成が可能である。

[0084] また、シグナルプローブ $P^{(L)}$ が核酸を含む場合であって、シグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する核酸検体が例えば図 2 (a) で例示されるような $P^{(L)} - X$ といったライゲート体であれば、シグナルプローブ $P^{(L)}$ に含まれる当該核酸に相補的な配列を有するプライマー p を、当該ライゲート体にハイブリダイズさせる (図 2 (a') で例示される) ことによって、相補鎖合成が可能なハイブリッド $P^{(L)} - X/p$ を形成することができる。

[0085] 上記例の変形例として、核酸検体において、シグナルプローブがライゲートした側とは反対側に合成開始位置が存在してもよい (図 2 (d) に例示される)。この場合、当該反対側に二本鎖プライマー p/p' をライゲート、又は一本鎖プライマー p をハイブリダイズさせることによって、相補鎖合成が可能なハイブリッドを形成することができる。

[0086] 前述のとおり、インデックスとしての相補鎖 $x^{(L)}$ の配列は、核酸検体の末端に位置する配列であってもよいし、内部に位置する配列であってもよい。

インデックスとしての相補鎖 $x^{(L)}$ の配列が、核酸検体の末端に位置する配列である場合、末端配列は、相補鎖 $x^{(L)}$ の核酸合成反応における合成開始位置が、核酸検体の末端塩基に対する相補結合位置となる場合に得られるもの (すなわち初期配列) であることが好ましい。このような態様は、核酸合成系に供される当該ハイブリッドが例えば図 2 (a') に例示される $p^{(L)} - X/p$ や、図 3 (a)、(b) 及び図 2 (c、但し一番下に記載するものは除く) に例示される $p' - X/p^{(L)}$ といったものである場合に実現されうる。

[0087] インデックスとしての相補鎖 $x^{(L)}$ の配列が、核酸検体の内部に位置する配

列である場合、内部配列は、相補鎖 $x^{(L)}$ の核酸合成反応における合成開始位置が、核酸検体の内部塩基に対する相補結合位置となる場合に得られる。このような態様は、核酸合成系に供される当該ハイブリッドが例えば図 2 (b) に例示される $x/p^{(L)}$ である場合に実現されうる。

インデックスとしての配列が核酸検体の内部配列であるこの態様は、核酸検体の配列の少なくとも一部が既知である場合に有用である。この場合において、当該既知の配列に基づいてプライマーが調製される。

さらに、インデックスとしての配列が核酸検体の内部配列であるこの態様は、核酸合成系に供されるハイブリッドにおけるプライマーが、相補鎖 $x^{(L)}$ の合成に先立って伸長される場合 (図 4 (a) ~ (c) に例示される) にも有用である。プライマー p が予め伸長されることにより、引き続き相補鎖 $x^{(L)}$ の核酸合成反応における合成開始位置が、核酸検体の内部塩基に対する相補結合位置となり、これによって、核酸検体の内部配列を有する相補鎖 $x^{(L)}$ を得ることができる (図 4 (c) に例示される)。

[0088] [6-1-2. 相補鎖合成基質]

インデックスとしての相補鎖 $x^{(L)}$ を合成するための基質としては、シグナル物質で標識されたヌクレオチドアナログ $N^{(L)}$ を用いることができる。

ヌクレオチドアナログ $N^{(L)}$ のヌクレオチド部は、主として核酸塩基、五炭糖および 1 以上 (通常 1 ~ 3) のリン酸基から構成されるものであれば特に限定されるものではない。従って、核酸塩基としては、プリン又はピリジミンの誘導体、及び鋳型核酸 x への相補結合により塩基対形成が可能なその他のいかなる核酸塩基も許容される。五炭糖としては、デオキシリボースやリボースに代表され、3' -OH 基を有していればそれらの誘導体であることも許容する。具体的には、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、及びその他ヌクレオチドアナログなどが挙げられる。

[0089] ヌクレオチドアナログ $N^{(L)}$ は、ヌクレオチド部の核酸塩基が異なる複数種のものが混合されて用いられる。しばしば、ヌクレオチド N は、その核酸塩基が、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、及びチミン (T

）又はウラシル（U）であるものが混合されて用いられる。例えば、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）が混合されたものが用いられる場合がある。混合量としては、通常それぞれのヌクレオチドが同量程度（モル基準）となるように調整される。

[0090] ヌクレオチドアナログN^(L)のシグナル物質による標識部については、例えば以下の蛍光物質に由来する基が挙げられる。Dimethylcoumarine、BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY630/650・Naptofluorescein、Fluorescein、Fluorescein Chlorotriazinyl、OregonGreen488、Rohdamine Green、Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor546、Alexa Fluor594、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy3.5、Lissamine Rohdamine B、Tetramethylrohdamine、Texas Redなど。

[0091] また、核酸合成酵素として例えばDNAポリメラーゼ β を用いる場合に、陰イオン性の蛍光基が好ましく用いられる場合がある。これは、陰イオン性の蛍光基をシグナル標識として有するヌクレオチドアナログN^(L)とDNAポリメラーゼ β との相性を有効に利用することができる場合があるためである。上述の蛍光基のうち、陰イオン性の蛍光標識としては、フルオレセイン、Oregon Green 488、ナフトフルオレセイン、Cy3.5・5・5などが挙げられる。

[0092] 標識部に由来するシグナルによってヌクレオチド部の違いを識別することができるように、標識部は、ヌクレオチド部の種類に応じてそれぞれ異なるシグナルを発するように選択されうる。例えばシグナル物質が蛍光物質である場合、蛍光物質は、ヌクレオチド部の種類に応じてそれぞれ異なる波長の蛍光を発するように選択されうる。このことによって、発せられたシグナルに基づいてシーケンスを行うことができる。

[0093] [6-1-3. 相補鎖伸長]

このような相補鎖合成基質を用いて、鋳型である核酸検体Xとシグナルプロブp^(L)とを含むハイブリッドとともに核酸合成系を構築する。

- [0094] 核酸合成系は、上記成分を含んだ核酸合成反応液を適切な条件下におくことによって構築されるものであり、上記成分以外の成分の使用及び条件などは当業者が適宜決定することができる。

具体的には、核酸合成反応液は、上記成分の他に、pH緩衝液、MgCl₂、KClなどの塩類及び核酸合成酵素を含む。その他に、界面活性剤やタンパク質などの物質を必要に応じて添加することができる。

- [0095] pH緩衝液としては、例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンと、塩酸、硝酸、硫酸などの鉱酸とを組み合わせたもの、及び、その他種々のpH緩衝液を用いることができる。pH調製された緩衝液は、PCR反応液の中で10mMから100mMの間の濃度で使用するすることができる。

- [0096] 核酸合成酵素としては、上記相補鎖合成基質を鋳型核酸依存的にプライマーへ結合させる能力を有するものであれば特に限定されず、当該分野で用いられうるいかなる核酸重合酵素も含まれる。

核酸重合酵素には、DNAポリメラーゼ類、RNAポリメラーゼ類、逆転写酵素類、リガーゼ類、キナーゼ類、及びそれらの組み換え体などが含まれる。酵素の起源となる種についても特に限定されない。

例えば、DNAポリメラーゼβ、E. coliのDNAポリメラーゼ、E. coliのDNAポリメラーゼのクレノーフラグメント、T4DNAポリメラーゼ、TaqDNAポリメラーゼ、T. litoralisDNAポリメラーゼ、TthDNAポリメラーゼ、PfuDNAポリメラーゼ、Hot Start Taqポリメラーゼ、KODDNAポリメラーゼ、EX TaqDNAポリメラーゼ、逆転写酵素などを用いることができる。

- [0097] なお、好ましくは、補鎖合成基質であるシグナル物質で標識されたヌクレオチドアナログN^(L)の取り込み活性が高い核酸重合酵素を当業者が適宜選択することができる。例えば蛍光標識デオキシリボヌクレオチドの取り込み活性が高い核酸重合酵素として、上記の核酸合成酵素のうち、DNAポリメ

一ゼ β を選択することが好ましい場合がある。

[0098] 増幅反応におけるその他の条件としては、核酸合成酵素の活性を保持することができる条件が当業者によって適宜選択される。例えば、25℃におけるpHが8.5～9.5、温度が65～95℃である条件下で核酸合成反応を行うことができる。

相補鎖合成を止める方法としては、合成原料であるデオキシリボヌクレオチド中に、ターミネータ付きのヌクレオチドを一定割合混合しておく方法が採用できる。混合割合は、当業者が適宜決定することができるものである。この方法の好ましい態様は、ターミネータを用いる点で従来のサンガー法で採用されている方法に類似するが、ターミネータ付きヌクレオチドに蛍光修飾が必ずしも必要ではない点と、ターミネータがリバーシブルである点がサンガー法とにおいて異なる。

なお、リバーシブルターミネータは、ヌクレオチドの伸長において、さらなる伸長が起こらないようにヌクレオチド末端をターミネートする機能とともに、自身が外れることによってヌクレオチドの伸長を再開することを可能とするリバーシブル機能を有するターミネータをいう。従って、リバーシブルターミネータは、成長中の核酸へさらなるヌクレオチドの取り込みを妨害することが可能な構造を有する。例えば、五炭糖の少なくとも3'－水酸基における改変部（すなわち3'－水酸基の置換基）が挙げられる。当該改変部は、プライマーpと鋳型核酸Xとの相互作用に支障をきたさない条件下で除去することができるものである。

[0099] [6－1－4. シーケンス]

相補鎖x^(L)はシーケンスによりその配列が解読される。このことによって、インデックスとして利用することができる、核酸検体Xに含まれる塩基配列情報を得ることができる。

前述のように、シグナル物質は、デオキシリボヌクレオチドのヌクレオチド部の違いを識別できるように、ヌクレオチド部の種類に応じてそれぞれ異なるシグナルを発するように選択されうる。従って、上述の相補鎖伸長にお

いて、シグナル物質標識ヌクレオチドN^(L)が結合した順に当該シグナル物質に由来するシグナルを検出することによってシーケンスが行われうる。

シグナル物質の検出の手段としては特に限定されるものではないが、単塩基分解能で検出を行うことができる手段を用いることができる。

[0100] 単塩基分解能で検出を行うことができる手段の例としては、米国特許第6,818,395号明細書やProceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 100, 3960-3964, (2003)に記載されている方法が挙げられる。この方法においては、必要な種類（通常4種）の蛍光標識デオキシリボヌクレオチドを用意し、それら必要な種類の溶液を1種類ずつ順に流し、洗浄することを繰り返すことによって、蛍光標識デオキシリボヌクレオチドごとに塩基取り込みの有無を確認しながら解析していく。

[0101] 単塩基分解能で検出を行うことができる手段の他の例としては、全反射蛍光顕微鏡技術（total internal reflection fluorescence microscopy; TIRFM）を用いる方法が挙げられる。この場合、鋳型核酸Xを含むハイブリッドが基板に固定化される。そして、この基板における、鋳型核酸Xを含むハイブリッドが固定化された表面に、エバネッセント場を発生させる。核酸合成反応によって、蛍光標識デオキシリボヌクレオチドが核酸合成酵素に取り込まれたときに、取り込まれた蛍光標識デオキシリボヌクレオチドの蛍光標識がエバネッセント場によって励起される。このように励起された蛍光を検出することができる。

[0102] 蛍光分子を励起するために、全反射照明を行い、基板の表面にエバネッセント場を発生させることができる。エバネッセント光が染み出すエリアは基板の表面から約200nm以内に限定され、それより遠い領域は非照明領域となる。このため、その限定された領域において生じる蛍光現象の観察を、バックグラウンド蛍光の少ない状態で高感度に行うことが可能になる。

- [0103] 蛍光標識されたデオキシリボヌクレオチドは、検出用のカメラでは捉えきれない速度でブラウン運動を行っているため、通常は、照明範囲内にある蛍光標識デオキシリボヌクレオチドは認識することができない。一方、核酸合成酵素に取り込まれると、蛍光標識デオキシリボヌクレオチドはそのブラウン運動が抑えられるため、検出用カメラで認識することが可能になる。このことによって、取り込まれたデオキシリボヌクレオチドと、取り込まれていないデオキシリボヌクレオチドすなわち溶液中を漂う遊離のデオキシリボヌクレオチドを区別することができる。
- [0104] さらに、励起された蛍光標識デオキシリボヌクレオチドは、励起光によって生成した活性酸素の働きにより、次の蛍光標識デオキシリボヌクレオチドが取り込まれて発光するまでに消光する、もしくは次の蛍光標識デオキシリボヌクレオチドが取り込まれて発光し消光する以前に前の蛍光標識デオキシリボヌクレオチドが消光する。このため、読みたい蛍光標識デオキシリボヌクレオチドのみを検出することができる。このようにして、発光した蛍光分子の波長及び／又は強度を順に読み取ることによって、相補鎖 $x^{(L)}$ のシーケンスを行うことができる。
- [0105] 上記のような配列を取得する手段は、本発明の検体識別装置に一手段として備えられることができ、自動化することもできる。そのような手段には、蛍光物質標識されたヌクレオチドを供給する手段、及び前記蛍光物質に由来する蛍光を観察する全反射蛍光顕微鏡システムが含まれる。
- また、本発明の検体識別装置は、観察された蛍光を塩基配列情報に変換する手段をさらに含んでもよい。このような手段はソフトウェアによって実現される。
- [0106] 取得された配列情報は、本発明の識別装置に備えられる記憶手段に記憶されてもよいし、本発明の識別装置から外部の装置に出力されることによって、外部の装置における記憶手段に記憶されてもよい。
- [0107] [6-2. インデックスとして固定化の順番を利用する場合]
- 識別すべき複数の核酸検体を識別するためのインデックスの一つとして、

核酸検体が基板上に固定化された順番を利用する場合、識別すべき核酸検体が基板上に固定化される都度、位置情報の取得を行う。すなわち、工程順番の違いが識別すべき核酸検体の違いを反映する。

[0108] まず、基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する核酸検体を用意する。当該核酸検体へのシグナルプローブ $P^{(L)}$ の完備、当該核酸検体の供給及び基板への固定化は、前述のとおり順不同で行われる。その後、当該核酸検体におけるシグナルプローブ $P^{(L)}$ に由来するシグナルが検出され、位置情報が取得される（図5（a）に例示される）。次に、同一の基板表面上において、無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブ $P^{(L)}$ を有する他の核酸検体を用意する。当該他の核酸検体へのシグナルプローブ $P^{(L)}$ の完備、当該他の核酸検体の供給及び基板への固定化は順不同で行われる。その後、当該他の核酸検体におけるシグナルプローブ $P^{(L)}$ に由来するシグナルが検出され、位置情報が取得される（図6に例示される）。同様の工程が、さらに繰り返して行われることもできる。

[0109] なお、図6の例においては、後に固定化した核酸検体が有するシグナル標識は、先に固定化した核酸検体が有するシグナル標識と異なるように示されているが、同じシグナル標識を用いることもできる。いずれの場合であっても、位置情報取得においては、既に取得された先の核酸検体の位置座標と、新たに取得された後の核酸検体の位置座標との間で差分をとり、新たなシグナルが検出された座標を、当該後の核酸検体の位置情報として取得することができる。

[0110] 本発明の検体識別装置においては、固定化されるべき核酸検体を供給する手段と、シグナルを検出する手段と、固定位置情報を取得する手段を含む一連の手段をこの順で複数回機能させるための制御手段が備えられうる。このような手段は、ソフトウェアによって実現されうる。

[0111] [7. 位置情報とインデックスとの関連付け]

インデックスとして、核酸検体に含まれる配列を利用する場合、取得された位置情報と配列情報とを本発明の検体識別装置又は外部装置の記憶手段が

ら呼び出し、位置情報と、当該位置において取得された配列情報とを関連付けることによって、各種核酸検体を識別することができる。

例えば図5（a）に示すように、固定化及びシグナル検出された検体に、符号A 1、A 2、A 3・・・A nを付し、それぞれについて位置座標を取得し、図5（b）に示すように、それぞれの核酸検体に含まれる配列の相補鎖合成を行って、配列情報を取得する。取得した配列をインデックスとして、それぞれの検体に関連付ける（図示せず）。それぞれの検体が固有の位置情報を有し、それぞれに核酸検体の種類を表すインデックスが関連付けられているため、位置情報から核酸検体の種類を特定することができる。

[0112] インデックスとして、核酸検体の固定化順番を利用する場合、位置情報を取得するごとに、取得された位置情報を本発明の検体識別装置又は外部装置の記憶手段から呼び出し、当該位置情報を取得した核酸検体の固定化順番を関連付けることによって、各種核酸検体を識別することができる。

例えば図5（a）に示すように、工程Aにおいて固定化及びシグナル検出された検体に、工程順番を表すインデックスAを付した符号A 1、A 2、A 3・・・A nを付し、それぞれについて位置座標を取得し、図6に示すように、工程Bにおいて、新たに固定化及びシグナル検出された別種類の検体に、工程順番を表すインデックスBを付した符号B 1、B 2、B 3・・・B mを付し、それぞれについて位置情報を取得する。それぞれの検体が固有の位置情報を有し、それぞれに核酸検体の種類を表すインデックスが関連付けられているため、位置情報から核酸検体の種類を特定することができる。

[0113] 本発明の検体識別装置においては、このように位置情報とインデックス情報とを関連付ける手段が備えられていてよい。当該手段は、ソフトウェアによって実現されうる。

請求の範囲

- [請求項1] 基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブP^(L)を有する複数種の識別すべき核酸検体を用意する工程と、
- 前記シグナルプローブP^(L)に由来するシグナルを検出し、前記固定化された複数種の核酸検体それぞれの前記基板上的固定位置情報を前記シグナルに基づいて取得する工程と、
- 前記複数種の識別すべき核酸検体のそれぞれに含まれる塩基配列情報を取得する工程と、
- 前記塩基配列情報を前記位置情報と関連付けることによって、前記複数種の核酸検体を互いに識別する工程とを含む、基板上に固定化された複数種の核酸検体の識別法。
- [請求項2] 前記基板上に無作為の位置で固定化された複数種の識別すべき核酸検体が、前記複数種の識別すべき核酸検体のうち二種以上を含む溶液を前記基板に供給することによって得られるものである、請求項1に記載の核酸検体の識別法。
- [請求項3] 基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブP^(L)を有する識別すべき核酸検体を用意する工程、及び
- 前記シグナルプローブP^(L)に由来するシグナルを検出し、前記固定化された核酸検体の前記基板上的固定位置情報を前記シグナルに基づいて取得する工程を含む工程（A）と、
- 前記基板の表面上に無作為の位置で固定化され且つシグナルプローブP^(L)を有する他種の識別すべき核酸検体を用意する工程、及び
- 前記シグナルプローブP^(L)に由来するシグナルを検出し、前記固定化された他種の核酸検体の前記基板上的固定位置情報を前記シグナルに基づいて取得する工程を含む工程（B）とを少なくとも含み、
- 前記工程（A）及び（B）を含む工程の順番と、それぞれの工程において取得された前記位置情報とを関連付けることによって、複数種の前記核酸検体を互いに識別する、基板上に固定化された核酸検体の

識別法。

[請求項4] 前記工程（A）が、前記シグナルプローブP^(L)を有する核酸検体を含む溶液を前記基板に供給することを含み、前記工程（B）が、前記シグナルプローブP^(L)を有する他種の核酸検体を含む溶液を、前記核酸検体を含む溶液が供給された前記表面の領域に重ねて供給することを含む、請求項3に記載の核酸検体の識別法。

[請求項5] 前記基板表面に固定化された前記核酸検体及び／又は前記他種の核酸検体が、複数種の前記識別すべき核酸検体のうち二種以上の識別すべき核酸検体を含む溶液によって供給されるものであり、工程（A）及び／又は（B）において、前記基板表面に固定化された前記二種以上の識別すべき核酸検体のそれぞれに含まれる塩基配列情報を取得することをさらに含む、請求項3に記載の核酸検体の識別法。

[請求項6] 前記核酸検体に含まれる前記塩基配列情報の取得を、シグナル物質標識されたヌクレオチドN^(L)を相補鎖合成基質として含む核酸合成系において、前記識別すべき核酸検体を鋳型として相補鎖合成し、前記シグナル物質標識されたヌクレオチドN^(L)が前記核酸検体に相補鎖結合した順に前記シグナル物質に由来するシグナルを検出することによって行う、請求項1又は5に記載の核酸検体の識別法。

[請求項7] 前記複数種の識別すべき核酸検体それぞれが増幅されたものである、請求項1又は3に記載の核酸検体の識別法。

[請求項8] 複数種の識別すべき検体が基板表面の無作為の位置で固定化されるように、検体を基板上に供給する手段と、
固定化された前記検体に由来するシグナルを検出する手段と、
前記検体の前記基板上の固定位置情報を取得する手段と、
前記検体に含まれる塩基配列情報を取得する手段と、
を備える、基板上に固定化された複数種の検体の識別装置。

[請求項9] 前記取得した固定位置情報を記録する手段、

前記取得した塩基配列情報を記録する手段、及び
前記固定位置情報と前記塩基配列情報とを関連付ける手段の少なくともいずれかをさらに備える、請求項 8 に記載の装置。

[請求項10] 複数種の識別すべき検体が基板表面の無作為の位置で固定化されるように、検体を基板上に複数回供給する手段と、
固定化された前記検体に由来するシグナルを検出する手段と、
前記検体の前記基板上の固定位置情報を取得する手段と、
前記供給する手段、前記検出する手段及び前記固定位置情報を取得する手段の一連の手段を複数回機能させるための制御手段とを備える、基板上に固定化された複数種の検体の識別装置。

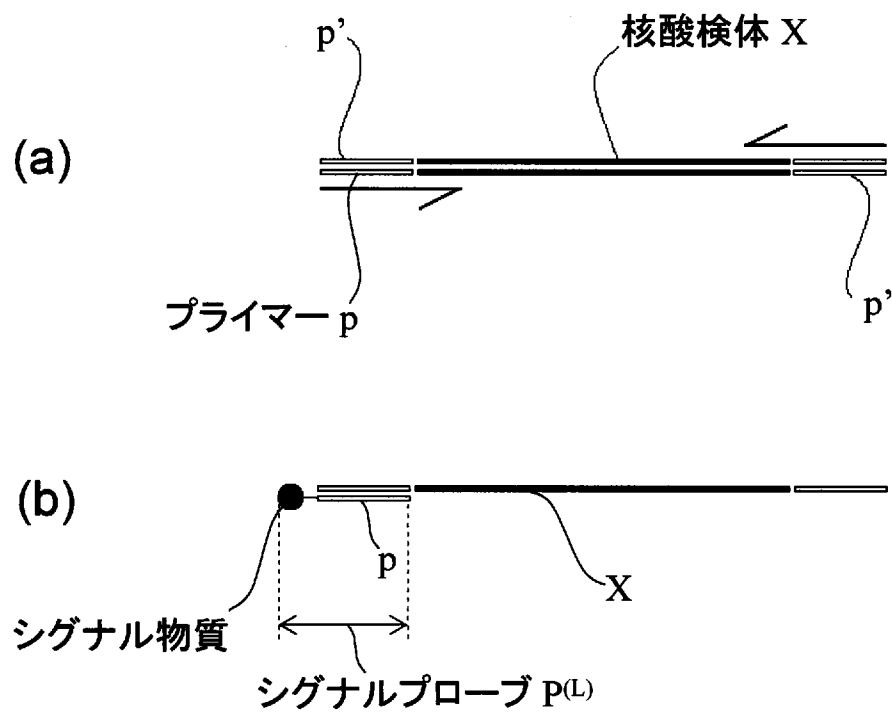
[請求項11] 前記検体に含まれる塩基配列情報を取得する手段をさらに備える、請求項 10 に記載の装置。

[請求項12] 前記塩基配列情報を取得する手段が、
蛍光物質標識されたヌクレオチドを供給する手段と、前記蛍光物質に由来する蛍光を観察する全反射蛍光顕微鏡システムとを含む、請求項 8 又は 11 に記載の装置。

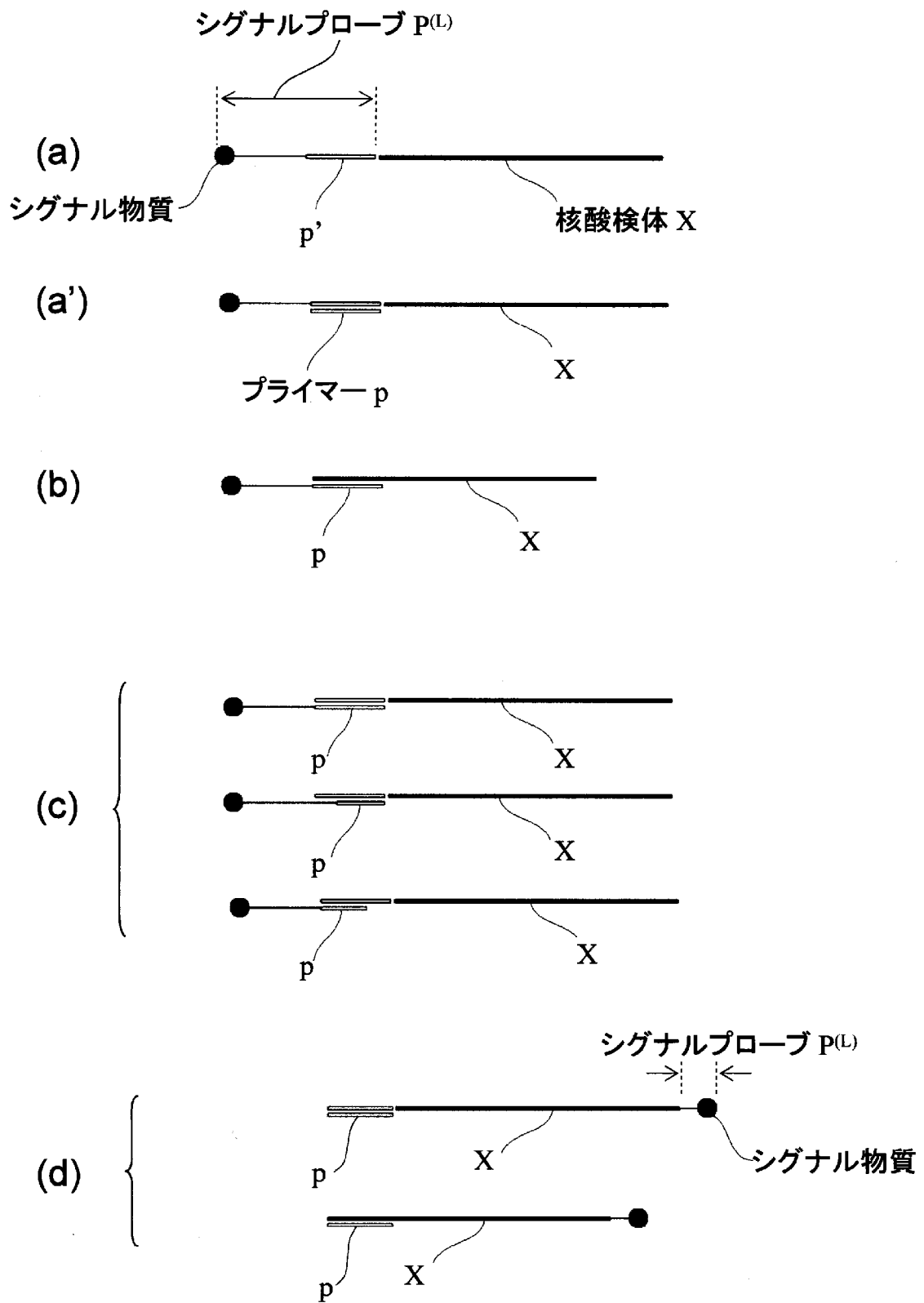
[請求項13] 前記取得した固定位置情報を記録する手段、及び
前記固定位置情報と前記一連の手段を機能させた順番とを関連付ける手段の少なくともいずれかをさらに備える、請求項 10 に記載の装置。

[請求項14] 核酸増幅手段をさらに備える、請求項 8 又は 10 に記載の装置。

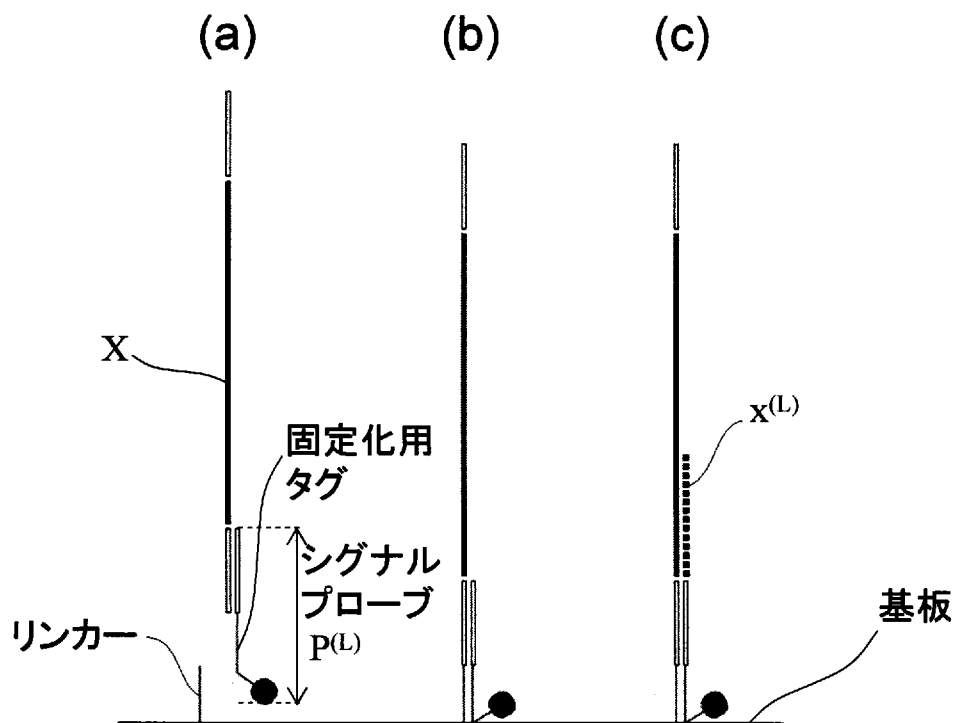
[図1]



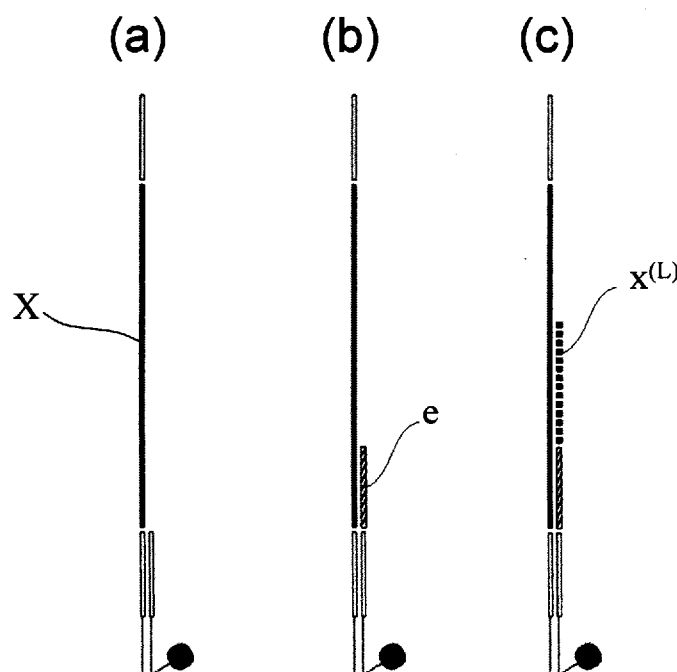
[図2]



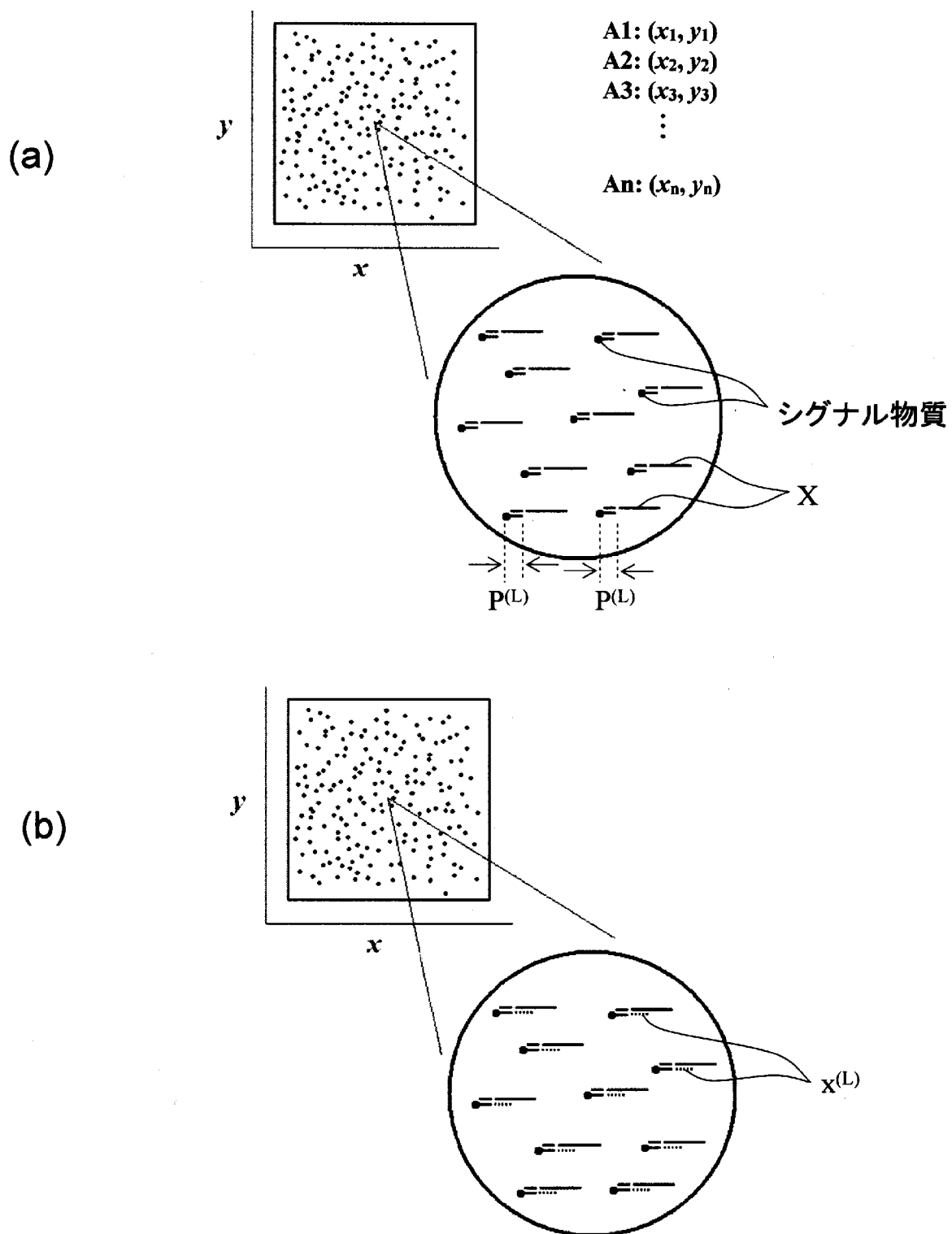
[図3]



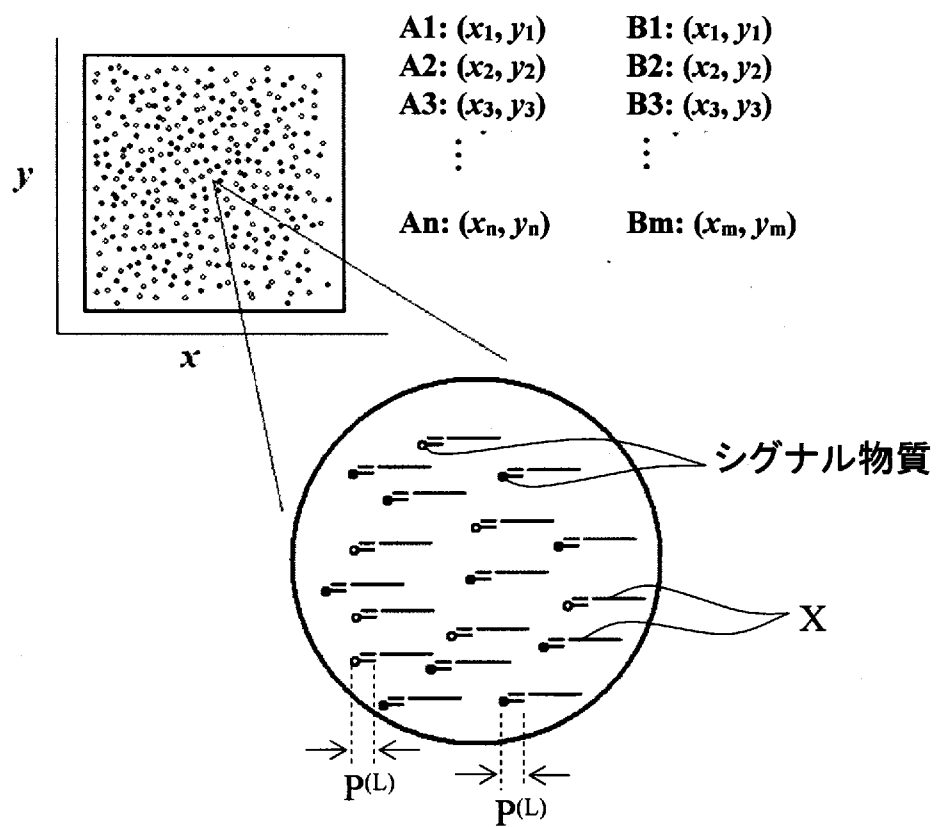
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/052881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	David W CRAIG et al., Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing, NATURE METHODS, 2008.10, Vol.5, No.10, p.887-893, particularly, abstract, page 887, right column, 16th line from the lower part to page 888, left column, line 27	8, 9, 12, 14 1-7, 10, 11, 13
X A	Mio TONOUCHI, "Jisedai Sequencer de Gan Genome o Kaimei susu: Illumina Genome Analyzer", Bio Clinica, 2008, vol.23, no.9, pages 817 to 821, particularly, the item of 2. Jisedai Sequencer: Illumina Genome Analyzer	8, 9, 12, 14 1-7, 10, 11, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
29 March, 2011 (29.03.11)

Date of mailing of the international search report
12 April, 2011 (12.04.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/052881

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Masafumi YODA, "Jisedai Genome Kaiseki Gijutsu - Yotsudomoe no Tatakai no Yukue", Bio Technology Journal, 2007, no.7, pages 392 to 393, particularly, page 392, left column, 1st line from the lower part to page 393, left column, line 10	8,9,12,14 1-7,10,11,13
X A	Mio TOMOUCHI, "Genome Kaiseki no Kakumeiteki Tool: Illumina Genome Analyzer", Bio Technology Journal, 2007, vol.11, pages 742 to 743, particularly, the item of Kihon Genri, Resequencing	8,9,12,14 1-7,10,11,13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X - A	David W CRAIG et al., Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing, NATURE METHODS, 2008.10, Vol.5, No.10, p.887-893, 特に、Abstract, 第 887 頁右欄下段から第 16 行-第 888 頁左欄第 27 行参照	8, 9, 12, 14 - 1-7, 10, 11, 13
X - A	登内未緒, 次世代シーケンサーで癌ゲノムを解明する: Illumina Genome Analyzer, Bio Clinica, 2008, Vol.23, No.9, p.817-821, 特に、2. 次世代シーケンサー: Illumina Genome Analyzer の項参照	8, 9, 12, 14 - 1-7, 10, 11, 13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 0 3 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 4 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 悠美子

4 N

4 5 0 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X - A	養王田正文, 次世代ゲノム解析技術～4つ巴の戦いの行方, バイオテクノロジージャーナル, 2007, No. 7, p. 392-393, 特に、第 392 頁左欄下段から第 1 行-第 393 頁左欄第 10 行参照	8, 9, 12, 14 - 1-7, 10, 11, 13
X - A	登内未緒, ゲノム解析の革命的ツール: Illumina Genome Analyzer, バイオテクノロジージャーナル, 2007, Vol. 11, p. 742-743, 特に、基本原理の項、リシークエンシングの項参照	8, 9, 12, 14 - 1-7, 10, 11, 13