

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6949816号
(P6949816)

(45) 発行日 令和3年10月13日(2021. 10. 13)

(24) 登録日 令和3年9月27日(2021. 9. 27)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 35/08 (2006. 01)

GO 1 N 35/08 A

GO 1 N 37/00 (2006. 01)

GO 1 N 37/00 I O I

GO 1 N 21/64 (2006. 01)

GO 1 N 21/64 F

C 1 2 Q 1/6837 (2018. 01)

C 1 2 Q 1/6837 Z

C 1 2 Q 1/686 (2018. 01)

C 1 2 Q 1/686 Z

請求項の数 25 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-502804 (P2018-502804)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月19日(2016. 7. 19)
 (65) 公表番号 特表2018-531369 (P2018-531369A)
 (43) 公表日 平成30年10月25日(2018. 10. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/042913
 (87) 国際公開番号 WO2017/065854
 (87) 国際公開日 平成29年4月20日(2017. 4. 20)
 審査請求日 令和1年7月16日(2019. 7. 16)
 (31) 優先権主張番号 62/195, 381
 (32) 優先日 平成27年7月22日(2015. 7. 22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 501345323
 ザ ユニバーシティ オブ ノース カロ
 ライナ アット チャペル ヒル
 THE UNIVERSITY OF N
 ORTH CAROLINA AT CH
 APEL HILL
 アメリカ合衆国 27516 ノースカロ
 ライナ州 チャペル ヒル, チャーチ ス
 トリート 109
 (74) 代理人 100107364
 弁理士 齊藤 達也
 (72) 発明者 ラムジー, ジョン ミカエル
 アメリカ合衆国 27517 ノースカロ
 ライナ州 チャペル ヒル, モーガンスク
 リフ コート 104

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 空間的に分離してビーズを保持するビーズウェル形状及びシグナル検出セグメントを有する流体
 デバイス並びに関連する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

流体デバイスであって、
 複数の反応ウェルを備え、
 前記複数の反応ウェルは、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと、前記少なくとも
 1つのビーズ保持セグメントと流体連通した少なくとも1つの空間的に分離されたシグナ
 ル検出セグメントとを有し、
 前記少なくとも1つのビーズ保持セグメントおよび前記少なくとも1つのシグナル検出
 セグメントは、前記少なくとも1つのビーズ保持セグメントおよび前記少なくとも1つの
 信号検出セグメントの開放された上面および側壁を定義する第1の平面基材内に存在し、
 前記流体デバイスは、前記第1の平面基材に結合し、前記複数の反応ウェルと流体的に
 連通する少なくとも1つの流体ポートを有する閉鎖された外面を定義する第2の平面基材
 を有し、

前記流体デバイスは、前記複数の反応ウェルを互いにシーリングするシーリング剤を含
 む、
 流体デバイス。

【請求項 2】

前記デバイスはマイクロ流体チップであり、前記反応ウェルは反応ウェルのアレイとし
 て提供される請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記複数の反応ウェルは 1 a L から 1 μ L の範囲の容積を有する請求項 1 又は 2 に記載のデバイス。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントは、それぞれが単一のビーズのみを保持するような寸法及び構成であり、前記少なくとも 1 つの別個のシグナル検出セグメントの少なくとも 1 つは、1 μ m から 10 μ m の範囲の距離 L にある端部を有する請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントは、直径が 100 nm から 1 mm のマイクロスフェアの磁気ビーズを保持するような寸法及び構成であり、前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントは、その中に保持されたそれぞれのビーズの直径の 101 % から 195 % の間の幅を有する請求項 1 に記載のデバイス。

10

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つのシグナル検出セグメントは、隣接するビーズ保持セグメントの幅よりも小さい幅を有する長手のチャンネルを備える請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントは、単一のビーズ保持セグメントである請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 8】

20

前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントは、複数のビーズ保持セグメントである請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの別個のシグナル検出セグメントは、複数の別個のシグナル検出セグメントであり、少なくとも 1 つの隣接する対のビーズ保持セグメントを、前記少なくとも 1 つのシグナル検出セグメントの長手のチャンネルによって離間しており、前記長手のチャンネルは、前記少なくとも 1 つの隣接する対のビーズ保持セグメントより幅が狭い又は深さが浅い、或いは幅が狭くて深さが浅い、請求項 6 に記載のデバイス。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントは、複数のビーズ保持セグメントであり、それぞれが共通のサイズを有する請求項 1 に記載のデバイス。

30

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントは、複数のビーズ保持セグメントであり、その少なくとも 1 つは少なくとも 1 つの別のビーズ保持セグメントとは異なるサイズを有する請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 12】

それぞれの反応ウェルの反応容積は、対応するビーズ保持セグメントによって保持されるように寸法決めされ、構成されたビーズの容積よりも 2 倍 ~ 200 倍の大きさである請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 13】

40

前記反応ウェルは、6,000 ウェル / cm^2 ~ 2,000,000 ウェル / cm^2 の密度で提供される請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 14】

前記反応ウェルの前記保持セグメント及び / 又は前記シグナル検出セグメントは、テーパー及び / 又はストレート壁を備える請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つのシグナル検出セグメントのうちの 1 つ以上は、前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントからある距離だけ離間して、前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントと流体連通する流体チャンネルを備える請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載

50

のデバイス。

【請求項 16】

前記反応ウェルは、より幅が狭い直線流体チャネルによって流体的に接続された第1及び第2の離間した端部を有しており、前記第1の端部は、円形の外周を有し、第1のビーズ保持セグメントを画定し、前記第2の端部は、円形の外周を有し、第2のビーズ保持セグメントを画定する請求項1から15のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 17】

前記第1の端部は、前記第2の端部と比較して、直径及び/又は深さがより大きい、又はより小さい請求項16に記載のデバイス。

【請求項 18】

前記反応ウェルの前記少なくとも1つのシグナル検出セグメントからシグナルを電子的に検出することによる請求項1から17のいずれか一項に記載の前記デバイスを用いて被分析物を分析する為の方法であって、

前記少なくとも1つのシグナル検出セグメントは、隣接するビーズ保持セグメントの幅よりも小さい幅を有する長手のチャネルを備え、

複数の標的のビーズが磁氣的であって、分析のためにそれぞれのビーズ保持セグメントに磁氣的に装填され、それぞれのビーズ保持セグメントに保持された標的のビーズから放出された試薬および/または検体が、それぞれの反応ウェルの共通の溶液体積を介して拡散し、標的のビーズがビーズ保持セグメントに保持されている間、少なくとも1つのシグナル検出セグメントからシグナルが検出され、前記少なくとも1つのシグナル検出セグメントが、標的のビーズのバックグラウンドシグナルと区別可能な尻尾を含む光シグナルを生成する、

方法。

【請求項 19】

電子的なシグナルの検出を行ってそれぞれの反応ウェルの前記少なくとも1つのシグナル検出セグメントからの陽極アッセイシグナル及び/又は符号化シグナルを検出する、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記電子的なアッセイシグナルの検出は、一種類以上のビーズを含むアレイに対して実施することができ、各ビーズタイプは固有の特徴で符号化されているとともに、各タイプは、異なる被分析物又は異なる化学反応の検出を可能にする異なる試薬で官能化される請求項18又は19に記載の方法。

【請求項 21】

マイクロウェルを作製する方法であって、流体デバイスにおける複数の間隔が狭い反応ウェルのアレイを少なくとも1枚の基材内又は上に形成することを含み、前記複数の反応ウェルは、 $6,000$ ウェル/ $\text{cm}^2 \sim 2,000,000$ ウェル/ cm^2 の範囲の密度で提供され、前記複数の反応ウェルの各々は、 $1 \mu\text{L}$ から $1 \mu\text{L}$ の範囲の容積を有すると共に、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと、前記少なくとも1つのビーズ保持セグメントと流体連通している少なくとも1つの別個のシグナル検出セグメントを含み、隣接する反応ウェルのビーズ保持セグメントの中心線は $1 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ の間隔をあけており、前記少なくとも1つのシグナル検出セグメントは、前記反応ウェルの幅よりも小さい幅を有しており、 $1 \mu\text{m}$ から 1mm の距離 L だけ、少なくとも1つのビーズ保持セグメントの対応する中心線から延在しており、

前記少なくとも1つのビーズ保持セグメントおよび前記少なくとも1つのシグナル検出セグメントは、前記少なくとも1つのビーズ保持セグメントおよび前記少なくとも1つの信号検出セグメントの開放された上面および側壁を定義する前記少なくとも1枚の基材の第1の平面基材内に存在し、

前記少なくとも1枚の基材は、前記第1の平面基材に結合し、前記複数の反応ウェルと流体的に連通する少なくとも1つの流体ポートを有する閉鎖された外面を定義する第2の平面基材を有し、

10

20

30

40

50

前記流体デバイスは、前記複数の反応ウェルを互いにシーリングするシーリング剤を含む前記方法。

【請求項 2 2】

分析システムであって、

コントローラと、

前記コントローラと連通する検出器と、

複数の反応ウェルを保持するマイクロ流体デバイスの前記反応ウェルのシグナル検出セグメントに存在するシグナルを識別するように構成されたモジュールを有する画像処理器を備え、

前記マイクロ流体デバイスは、前記複数の反応ウェルを提供する上側基材と下側基材との間にスペーサとシーリング剤とを含み、前記上側基材および/または前記下側基材は、前記複数の反応ウェルと流体的に連通する少なくとも 1 つのポートを含み、前記複数の反応ウェルの各々は、前記上側基材に接触しない反応溶液を含み、前記複数の反応ウェルは、前記シーリング剤によって互いに封止されており、

前記反応ウェルは、少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントと、前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントから離れる方向に距離をあけて延在して前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントと流体連通している少なくとも 1 つの別個のシグナル検出セグメントを含み、

前記モジュールは、前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントから離れる方向に延在するシグナル検出セグメントに関連付けられた陽極アッセイシグナルを識別するように構成されている、前記システム。

【請求項 2 3】

前記モジュールは、同定された陽極アッセイシグナルに基づいて、ビーズ復号化を行うように構成された請求項 2 2 に記載のシステム。

【請求項 2 4】

前記モジュールは、単一の反応ウェルの第 1 と第 2 の別個のビーズ保持セグメントに保持された少なくとも 2 つのビーズを識別するように構成され、前記単一の反応ウェルは前記ビーズ保持セグメントの一方又は両方と流体連通する少なくとも 1 つのシグナル検出セグメントを有する請求項 2 2 又は 2 3 に記載のシステム。

【請求項 2 5】

隣接する反応ウェルのビーズ保持セグメントの中心線は $1\ \mu\text{m} \sim 1\ \text{mm}$ の間隔をあけており、前記少なくとも 1 つのシグナル検出セグメントは、標的のビーズの直径の 0.3 倍から 200 倍の範囲の距離 L だけ、それぞれの反応ウェルの前記少なくとも 1 つのビーズ保持セグメントの中心線から延在する請求項 2 2 から 2 4 のいずれか一項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は 2015 年 7 月 22 日に提出された米国仮出願番号 62/195,381 の利益及び優先権を主張するものであり、その参照により全文が本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府支援の陳述

この発明は、DOD 国防高等研究計画庁 (DARPA) によって授与された助成金番号 HR0011-12-2-0001 の下で政府の支援によってなされたものである。政府は本発明において一定の権利を有するものとする。

【0003】

本発明は、流体デバイスに関する。

【背景技術】

【0004】

10

20

30

40

50

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、ゲノム DNA (gDNA) 又は相補的 DNA (cDNA) のセグメントを増幅する為の非常に感度の高い方法である。PCR には、多くの適用方法がある。例えば、病気を引き起こす生物の存在を判定する為の微量核酸の検出、遺伝子発現、ジェノタイピング、遺伝子工学や遺伝子組み換え、及び科学捜査への応用などである。PCR 増幅により、広い被分析物の濃度範囲にわたって卓越した標的の同定及び定量を提供してもよい。しかし、PCR によって多くの被分析物の同時且つ定量的な分析が非常に困難であることが証明されている。挿入色素蛍光ベースの検出では、トータルの dsDNA の濃度を決定することができるだけであり、したがって、単一の反応容器中の複数のテンプレートの並行分析は、この検出方法を用いては不可能である。蛍光プローブ技術 (すなわち、TaqMan (登録商標)、分子ビーコン、又は他の化学物質) を使

10

って、各標的は、シグナリングレポーターとして異なる色の蛍光プローブを用いて増幅することができるので、低レベルの反応のマルチプレックス化が可能である。また、プローブは、配列特異的でもあり、プライマーダイマー形成や非特異的増幅からの誤検出を低減する。従来のマイクロタイタプレート又はマイクロ流体リアルタイム-PCR (rt-PCR) のいずれかでマルチプレックス化する為の典型的な方法では、それぞれが3つの異なる色のプローブを含む少数の反応ウェルの数を使う。しかし、それは、一般的には、互いとの互換性を保証する為には、更なるレベルの慎重な設計と最適化を必要とするので、マルチプレックスプライマー及びプローブセットを設計するのは困難であると考えられている。この方法によるマルチプレックス化は、最終的には、計装と染料との間のスペクトルの重複によって4色検出、しかも、そのうち一色は内部標準色素とするのが限界である。

20

【0005】

図1A及び1Bは、従来の円筒形又は円錐形のビーズウェルを示す。形状及び/又は制限された容積により、その溶液の体積をビーズに近接したエリアに限定できる。ビーズの背景の蛍光 (ポリスチレンビーズ、特に短波長で顕著) 又は蛍光色素符号化 (マルチプレックスアッセイに使用) は、アッセイシグナル対ノイズを大幅に減少させる重要な背景シグナルを生成する。さらに、検出色素には、ビーズに結合し、高い背景シグナルを提供するものもある (特にカチオン性及び/又は疎水性色素及びカルボキシ官能化ポリスチレンビーズの場合)。さらに、ビーズはアッセイ読み出し中に、ビーズウェル内で望ましくない量が移動してしまい、背景の蛍光の背景の減算が困難になる場合もある。

30

【発明の概要】

【課題を解決する為の手段】

【0006】

この発明の実施形態は、ウェル内でアッセイシグナルを検出する為のシグナル対ノイズを増強する為に、ウェル内の隣接する溶液の領域からそれぞれのビーズを分離することができる新規なビーズウェル形状を提供する。

【0007】

この発明の実施形態は、複数の反応ウェルを含む流体デバイスに対するものであり、反応ウェルは、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと流体連通した少なくとも1つの空間的に分離されたシグナル検出セグメントとを有することを特徴とするものである。

40

【0008】

デバイスはマイクロ流体チップであり、反応ウェルは反応ウェルのアレイとして提供してもよい。

【0009】

反応ウェルの容積は、1 aL ~ 約 1 μ L、任意で約 10 aL ~ 約 1 μ L、又は任意で約 1 fL ~ 約 1 μ L でもよい。

【0010】

少なくとも1つのビーズ保持セグメントは、それぞれが単一のビーズのみを保持するような寸法及び構成としてもよい。

50

【 0 0 1 1 】

少なくとも1つの別個のシグナル検出セグメントの少なくとも1つは、少なくとも1つのビーズ保持セグメントのうちの1つ以上から、標的のビーズの直径の $0.3 \times$ から約 $100 \times$ の間、典型的には1から $100 \mu\text{m}$ の間、任意で1から $10 \mu\text{m}$ の間の距離 L にある端部を有していてもよい。

【 0 0 1 2 】

少なくとも1つのビーズ保持セグメントは、約 10 nm ~ 約 1 mm の間、典型的には約 100 nm ~ 約 1 mm の間の直径のマイクロスフェアのビーズを保持するように寸法決めされ、構成され得る。

【 0 0 1 3 】

少なくとも1つのビーズ保持セグメントの幅は、その中に保持されたそれぞれのビーズの直径の約 101% ~ 約 195% でもよい。

【 0 0 1 4 】

別個の少なくとも1つのシグナル検出セグメントは、隣接するビーズ保持セグメントの幅よりも小さい幅の長手のチャンネルを有していてもよい。

【 0 0 1 5 】

少なくとも1つのビーズ保持セグメントは、単一のビーズ保持セグメントとしてもよい。

【 0 0 1 6 】

少なくとも1つのビーズ保持セグメントは、複数のビーズ保持セグメントとしてもよい。

【 0 0 1 7 】

少なくとも1つの別個のシグナル検出セグメントは、複数の別個のシグナル検出セグメントとしてもよい。少なくとも1つのビーズ保持セグメントの隣接する対を、少なくとも1つのシグナル検出セグメントの長手のチャンネルによって離間させることができる。長手のチャンネルは、隣接するビーズ保持セグメントの対の幅及び深さよりも狭く、浅い幅を有していてもよい。

【 0 0 1 8 】

少なくとも1つのビーズ保持セグメントは、各々が共通のサイズを有する複数のビーズ保持セグメントとしてもよい。

【 0 0 1 9 】

少なくとも1つのビーズ保持セグメントは、複数のビーズ保持セグメントであってもよく、その少なくとも1つは少なくとも別個のビーズ保持セグメントとは異なるサイズを有する。

【 0 0 2 0 】

それぞれのビーズウェルの反応量は、対応するビーズ保持セグメントによって保持されるように寸法決めされ、構成されたビーズの体積よりも約 $2 \times$ ~ $200 \times$ の大きさとしてもよい。

【 0 0 2 1 】

ビーズウェルの密度は、約 $6,000$ ウェル / cm^2 ~ 約 $2,000,000$ ウェル / cm^2 としてもよい。

【 0 0 2 2 】

ビーズウェルの保持セグメント及び/又はシグナル検出セグメントは、テーパ及び/又はストレート壁を有していてもよい。

【 0 0 2 3 】

少なくとも1つのシグナル検出セグメントのうちの1つ以上は、少なくとも1つのビーズ保持セグメントからある距離だけ離間しており、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと流体連通する環状流体チャンネルを有していてもよい。

【 0 0 2 4 】

ビーズウェルは、より幅が狭い直線流体チャンネルによって流体的に接続された第1及び

10

20

30

40

50

第2の離間した端部を有していてもよい。

【0025】

第1の端部は、円形の外周を有し、第1のビーズ保持セグメントを画定することができ、第2の端部は、円形の外周を有し、第2のビーズ保持セグメントを画定してもよい。

【0026】

第1の端部の直径及び/又は深さは、第2の端部と比較してより大きくても小さくてもよい。

【0027】

他の実施形態は、反応ウェルの少なくとも1つのシグナル検出セグメントから符号化されたビーズシグナル及び/又はアッセイシグナルを電子的に検出することによって、上記の特徴のいずれかを有するデバイスを使用して被分析物を処理、検出、又は分析する方法に関するものである。

10

【0028】

電子的なアッセイシグナルの検出は、それぞれの反応ウェルの少なくとも1つのシグナル検出セグメントからの陽極アッセイシグナルを検出するように構成してもよい。

【0029】

任意で、電子的なシグナルの検出は、反応の前に、ベースラインの読み出しを必要とせずに反応後に実施してもよい。

【0030】

任意で、電子的なシグナルの検出は、アッセイを実施する前に、それぞれの反応ウェルの少なくとも1つのシグナル検出セグメントから符号化されたシグナルを検出するように構成してもよい。

20

【0031】

電子的なシグナルの検出は、ビーズの種類それぞれが固有の特徴（任意に異なる強度レベルの蛍光色素の組み合わせ）で符号化されているとともに、それぞれ異なる被分析物又は異なる化学反応の検出を可能にする異なる試薬で官能化された、一種類超のビーズを含むアレイに対して実施してもよい。

【0032】

さらに他の実施形態は、マイクロウェルを作製する方法に関するものである。この方法は、少なくとも1枚の基材内又は上に複数の反応ウェルを狭い間隔で形成することを含み、反応ウェルは、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと流体連通した少なくとも1つの別個のシグナル検出セグメントとを有するものである。隣接する反応ウェルのビーズ保持セグメントの中心線は、1～20 μm の間隔をあけていてもよく、少なくとも1つのシグナル検出セグメントは、標的のビーズの直径の0.3Xから100Xの間の距離L、任意で1 μm ～20 μm 若しくはそれ以上、典型的には少なくとも1つのビーズ保持セグメントの中心線から1mm以下だけ延在している。

30

【0033】

他の実施形態は、分析システムに関するものである。このシステムは、コントローラと、コントローラと連通する検出器と、反応ウェルを保持するデバイスの反応ウェルのシグナル検出セグメントに存在するシグナルを識別するよう構成されたモジュールを有する画像処理器を含む。反応ウェルは、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと、少なくとも1つのビーズ保持セグメントから離れる方向に距離をあけて延在して、少なくとも1つのビーズ保持セグメントと流体連通している少なくとも1つの別個のシグナル検出セグメントを有する。モジュールは、少なくとも1つのビーズ保持セグメントから離れる方向に延在するシグナル検出セグメントに関連付けられた陽極アッセイシグナルを識別するように構成されており、任意で、反応前に検出器からのベースラインの読み出しを必要とせず、反応後に識別を行う。

40

【0034】

モジュールは、同定された陽極アッセイシグナルに基づいて、又はアッセイが実施され

50

る前又は間に、ビーズ復号化を行うように構成してもよい。

【0035】

モジュールは、単一の反応ウェルの第1と第2の別個のビーズ保持セグメントに保持された少なくとも2つのビーズを識別するように構成してもよい。ウェルはビーズ保持セグメントの一方又は両方と流体連通する少なくとも1つのシグナル検出セグメントを有していてもよい。

【0036】

隣接する反応ウェルのビーズ保持セグメントの中心線は、1～200 μm以上の距離だけ離れていてもよい。

【0037】

少なくとも1つのシグナル検出セグメントは、それぞれの反応ウェルの少なくとも1つのビーズ保持セグメントの中心線から、標的のビーズの直径の0.3Xから200Xの距離Lだけ、また任意で1～200 μm以上延在してもよい。

【0038】

一実施形態に対して説明したこの発明の態様は、特に記載はしないが、別の実施形態に組み込んでもよいことは理解できよう。すなわち、すべての実施形態及び/又は任意の実施形態の特徴は、任意の方法及び/又は組合せで組み合わせることができる。出願人は、たとえ最初の請求がそうでなくとも、任意の他の請求項又は複数の請求項に従属する及び/又は任意の特徴を組み込む為に、任意の最初に提出された請求項を補正する権利を含み、最初に提出された請求項を修正する及び/又はそれに従った任意の新規の請求項を提出する権利を保有する。本発明のこれら及び他の目的及び/又は態様について、以下に述べる明細書において詳細に説明する。本発明のさらなる特徴、利点及び詳細は、以下の好ましい実施形態の図面及び詳細な説明を読むことにより当業者に理解されよう。また、そのような説明は本発明の単なる例示に過ぎない。

【0039】

添付の図面は、本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成しており、この発明の実施形態を示し、説明と共に本発明の原理を説明する役割を果たす。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1A】従来技術のビーズウェルアレイの上面図である。

【図1B】図1Aに示す従来のビーズウェルの側面斜視図である。

【図2A】本発明の実施形態による例示のビーズウェルアレイの上面図である。

【図2B】図2Aに示すビーズウェルの側面斜視図である。

【図3A】本発明の実施形態による別の例示のビーズウェルアレイの上面図である。

【図3B】図3Aに示すビーズウェルの側面斜視図である。

【図4A】本発明の実施形態によるさらに別の例示のビーズウェルアレイの上面図である。

【図4B】図4Aに示すビーズウェルの側面斜視図である。

【図5A】本発明の実施形態による別の例示のバリア付きのビーズウェルの上面図である。

【図5B】本発明の実施形態によるさらに別の例示のバリア付きのビーズウェルの上面図である。

【図6A】本発明の実施形態による例示のマイクロ流体チップの上面図である。

【図6B】乃至

【図6C】本発明の実施形態による図6Aに示すマイクロ流体チップの例示の取り付け可能な基材の上面図である。

【図6D】本発明の実施形態による光学スペーサを示す、マイクロ流体チップの断面図である。

【図6E】本発明の実施形態による隣接した反応ウェル間のシーリング剤の使用を示す、例示のマイクロ流体チップの断面図である。

10

20

30

40

50

【図 7 A】PCR の 30 サイクル後のウェルアレイの一部の蛍光顕微鏡画像である。

【図 7 B】12 の陽極及び 3 の陰極反応ウェルからの蛍光シグナルのプロットである。1 コピー / 50 f L 反応の比較的高い有効濃度により、およそ 11 サイクルの早期 C t をもたらす。

【図 8 A】Si ウェーハ中の連結されたビーズと反応ウェル D R I E との明視野顕微鏡画像である。

【図 8 B】図 8 A に示したものと同様のアレイの明視野顕微鏡画像を示しており、本発明の実施形態によるビーズを装填した状態を示している。

【図 8 C】本発明の実施形態による直径 3 . 3 μ m のプロマグ (P r o m a g) ビーズを装填したアレイのビーズの背景の蛍光が高いことを示す蛍光顕微鏡画像である。

10

【図 9 A】乃至

【図 9 B】本発明の実施形態によるサイクル 10 (増幅が検出される前、図 9 A) 及びサイクル 30 (増幅後、図 9 B) からの蛍光画像である。

【図 10 A】ビーズウェル領域上で 6 個の陽極ウェル (実線のトレース) と 3 個の陰極ウェル (破線のトレース) のみに対する r t - P C R の 30 サイクルの間の平均化した生蛍光シグナルのプロットを表す図である。

【図 10 B】本発明の実施形態によるこれらの同じビーズに対するシグナル検出セグメント (スリット) ウェル領域のみから平均化された生蛍光シグナルのプロットである。

【図 11 A】乃至

【図 11 B】図 11 A は、シール前の各ウェルのビーズの画像を示し、図 11 B は、シール数分後の画像を示す。

20

【図 12 A】乃至

【図 12 B】射出成形によって製造され、ビーズが装填されたビーズウェルアレイを有するポリマーデバイスの例を示す。図 12 A は、ビーズを有するデバイスの S E M であり、図 12 B は、装填されたアレイの蛍光顕微鏡画像を示す。

【図 13 A】乃至

【図 13 B】本発明の実施形態によるプラスチック / ポリマー基材にブルズアイ形状のウェル (図 13 B) を製造する為に D R I E エッチングされたシリコンモールド (図 13 A) を使用してホットエンボス加工されたアレイを示す S E M 画像である。

【図 14 A】乃至

30

【図 14 D】本発明の実施形態によるデュアル又はマルチビーズ保持形状を有する反応ウェルの例の上面概略図である。

【図 15 A】乃至

【図 15 C】本発明の実施形態による 2 つより多くのビーズ保持形状を有する反応ウェルの例の上面概略図である。

【図 16】本発明の実施形態による分析システムの概略図である。

【図 17】乃至

【図 19】本発明の実施形態の例示の方法を示すフローチャートである。

【発明を実施する為の形態】

【0041】

40

本発明について、本発明の実施形態を示す添付の図面と例を参照しながら以下に説明する。しかしながら、この発明は、様々な異なる形態で具現化することが可能であり、ここで説明する実施形態に限定されると解釈してはならない。むしろ、これらの実施形態は、この開示が徹底的且つ完全となるように提供されるものであり、同業者には、この発明の範囲が完全に伝わるであろう。

【0042】

全体を通して同様の参照番号は同様の要素を示すものである。図面では、明確に示す為に、一部の線、層、構成部分、要素、又は特徴が強調されている場合もある。本文と図面における、図面 F i g u r e を表す略語 F I G . と F i g . は入れ替えても使用できる。

【0043】

50

本明細書で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明する目的で使用するものであり、この発明を限定することを意図したものではない。本明細書では、文脈がそれを明らかに示さない限り、単数形は複数形もまた含むことを意図している。さらに、本明細書で用いられる「含む」及び／又は「含んでいる」という用語は、述べられた特徴、ステップ、動作、要素、及び／又は構成要素の存在を特定するが、１つ以上の他の特徴、ステップ、動作、要素、構成要素、及び／又はそのグループの存在又は追加を排除するものではないことが理解されるであろう。本明細書で用いられる、用語「及び／又は」は、列挙された関連項目の１つ以上の任意及び全ての組み合わせを含むものである。本明細書で用いられる「XとYとの間」及び「約XとYとの間」のような語句は、XとYを含むものであることが理解されるであろう。本明細書で用いられる「約XとYとの間」のような語句は、「約Xと約Yの間」を意味する。本明細書で用いられる「約XからYまで」のような語句は、「約Xから約Yまで」を意味する。

10

【 0 0 4 4 】

特に定義しない限り、本明細書で用いられるすべての用語（技術的又は科学的用語を含む）は、一般に本発明が属する技術分野の当業者によって理解されるものと同じ意味を有するものである。一般に用いられる辞書で定義されるような用語は、明細書の文脈及び関連技術における意味と一致する意味を有するものとして理解すべきであり、本明細書に定義されていない限り、理想化された、又は過度に正式な意味で解釈されるべきではないことがさらに理解されるであろう。周知の機能又は構造は、簡潔及び／又は明瞭の為に詳しく説明しない場合もある。

20

【 0 0 4 5 】

ある要素が、他の要素に対し、「上に」「取り付けられて」「接続されて」「連結されて」「接触して」などのように表現されている場合は、直接、当該他の要素上にある、取り付けられている、接続されている、連結されている、又は接触している場合があり、又はその間に介在する要素が存在する場合も含むことは理解されよう。それとは対照的に、ある要素が、例えば、他の要素に対し、「直接～上に」、～に「直接取り付けられた」、～に「直接接続された」、～と「直接連結された」、又は「直接接触して」などと表現される場合には、間に介在する要素は存在しないものとする。当業者にとって、他の構造に隣接して」配置される構造又は特徴物は、隣接する特徴物と上下に重なる部分を有していてもよいことは理解できよう。

30

【 0 0 4 6 】

空間的関係を示す用語、例えば、「下に」「下方に」「より低い」「上に」「より上に」などは、図面に示すように、１つの要素又は特徴物の、他の要素（複数も含む）又は特徴物（複数も含む）に対する関係の説明を容易とする為に本明細書で用いられることができる。空間的関係を示す用語は、使用中又は操作中のデバイスについて、図面に示した方位に加え、異なる方位も含むことを意図していることは理解されよう。例えば、図面のデバイスを反転させた場合、他の要素又は特徴物の「下」又は「下位」にあると説明した要素は、他の要素又は特徴物の「上位」となる。よって、例示の用語「下」は、「上」と「下」の方位双方を含むことができる。デバイスは、別の方位とする（９０度回転する、又は他の方位）でもよく、本明細書で用いられる空間的関係性を示す記述用語はそれに従って解釈するものとする。同様に、本明細書で用いられる「上方に」「下方に」「垂直に」「水平に」なども、特に指定がない限りは、説明のみを目的とする。

40

【 0 0 4 7 】

本明細書で様々な要素に対して「第１」「第２」などを称することがあるが、これらの要素は、これらの用語によって限定されるものではないことは理解できよう。これらの用語は、１つの要素を別の要素から区別する為にのみ使用する。よって、下記に説明する「第１の」要素が本発明の教義から逸脱することなく、「第２の」要素となることも可能である。操作（又はステップ）の配列は、特に指定がない限り、請求項又は図面に示された配列に限定するものではない。

【 0 0 4 8 】

50

用語「マイクロチップ」及び「マイクロ流体チップ」は入れ替えて使用してもよく、略平坦で薄い装置を意味するものである。マイクロ流体チップは、剛性、半剛性、又は柔軟性を有するものでよい。用語「薄い」は、10 mm以下、例えば、10 mmと0.1 mmの間の厚み寸法をいい、約3 mm、約2.5 mm、約2 mm、約1.5 mm、約1 mm、又は約0.5 mmでもよい。マイクロチップは典型的には、約6インチ未満の幅と長さを有し、より典型的には約1インチ～6インチの間である。しかしながら、いくつかの実施形態では、マイクロチップは、より長い場合もあり、例えば、長さ及び/又は幅が1フィート以上のものもある。マイクロチップは、長さ寸法より小さい幅寸法を有しているものでもよい。マイクロ流体チップは、いくつかの実施形態では、約2.13インチ(54 mm)の幅寸法と約3.4インチ(85.5 mm)の長さ寸法を有していてもよい。マイクロチップは、マイクロサイズ及び/又はナノサイズの流体チャネルも含みうる。

10

【0049】

用語「主寸法」は、流体チャネルの幅及び/又は深さ寸法のことをいう。

【0050】

流体チャネルに対する用語「マイクロサイズの」及び「マイクロ流体の」は、サブミリメートル又はそれより小さい寸法の幅及び/又は深さ(例えば、この用語は、マイクロメートル及びナノメートルサイズのチャネルを含む)を有する流体流路のことをいい、少なくとも数ミリメートル以下の寸法範囲、典型的には900ミクロン未満且つ1 nmより大きいセグメントにおける幅及び/又は深さを有するチャネルを含む。

【0051】

20

ビーズウェルアレイのビーズウェルのチャネルは、側壁と、1枚以上の基材に形成された床を有して上面は開放され、底面は閉鎖され、それらの間を側壁が延在する。1つ以上のスペーサ、上基材、膜、又はカバーを使用してもよい。上基材、膜、又はカバーは、流体チャネル(複数も含む)及び/又は反応ウェルのアレイの上面をシール、被覆、又は閉鎖してもよい。

【0052】

用語「約」は、 $\pm 20\%$ 以下、例えば $\pm 10\%$ の間で変化しうるパラメータのことをいう。

【0053】

用語「ビーズ」は、反応ウェルで使用するのに適した、ポリマー、フォトレジスト、プラスチック、ガラス、二酸化シリコン、金属又は半金属酸化物(酸化アルミニウム、酸化チタン、酸化ジルコニウム又は他の酸化物を非限定的に含む)、量子ドット、金属粒子などのような、多孔、表面多孔、無孔材料の粒子、顆粒、又はマイクロスフェア、典型的には磁性マイクロスフェアのような固相部材のことをいう。

30

【0054】

用語「回路」は、ハードウェアの実施形態全体又はソフトウェアとハードウェアを結合する実施形態のことをいう。

【0055】

サンプルの中の被分析物は、例えば、合成及び生物学的高分子、ナノ粒子、小分子、DNA、核酸/ポリ核酸、ペプチド、たんぱく質等を含む多様な混合物を含むサンプルからの任意の目的の被分析物でよい。被分析物は、1つ以上の被分析物分子でもよい。サンプル又はサンプルの被分析物は、アミノ酸又は荷電分子、分子、ペプチド、及びタンパク質のような1つ以上の極性代謝産物をさらに含んでいてもよい。サンプル及び/又は被分析物は、生物学的流体、血液、血清、尿、乾燥血液、細胞増殖培地、溶解した細胞、飲料又は食品から抽出された分子を含むことも、代替として含んでいてもよい。サンプルはまた、水、空気又は土壌のような環境サンプルをさらに含んでいても、代替として含んでいてもよい。

40

【0056】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、少なくとも約5ヌクレオチド～約500ヌクレオチド(例えば、5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 2

50

5, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450、又は500ヌクレオチド)の核酸配列を指す。いくつかの実施形態では、例えば、オリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、又は約20ヌクレオチド～約25ヌクレオチドでもよく、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅アッセイにおけるプライマーとして及び/又はハイブリダイゼーションアッセイ若しくはマイクロアレイにおけるプローブとして使用してもよい。この発明のオリゴヌクレオチドは、当技術分野で周知のように、天然又は合成であってもよく、例えば、DNA、RNA、PNA、LNA、修飾主鎖など、又はそれらの任意の組み合わせでよい。

【0057】

増幅及び/又は検出の為のものを含むプローブ及びプライマーは、任意の適切な長さのオリゴヌクレオチド(DNA及び合成及び/又は修飾オリゴヌクレオチドなど)のような自然に存在するオリゴヌクレオチドを含む)であるが、典型的には長さが5, 6又は8ヌクレオチドから長さ40, 50又は60ヌクレオチドまで、又はそれ以上である。そのようなプローブ及び/又はプライマーは、ビーズ、チップ、ピン、若しくはマイクロタイタープレートウェルのような固体支持体上に固定、若しくは結合してもよく、さらに/又は蛍光化合物、化学発光化合物、放射性元素、若しくは酵素のような検出可能な基に結合しても、標識化されてもよい。

【0058】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、公知の技術に従って実施してもよい。例えば、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、第4,800,159号、及び第4,965,188号参照のこと。一般に、PCRは、まず、ハイブリダイゼーション条件下で検出されるべき特定の配列の各鎖について1つのオリゴヌクレオチドプライマーで核酸サンプルを(例えば、熱安定性DNAポリメラーゼの存在下で)処理して、各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長産物が特定の配列の各鎖に十分相補的なプライマーで合成されて、各プライマーから合成された伸長産物が、その相補体から分離すると、他のプライマーの伸長産物の合成の為の鋳型として働くようにハイブリダイズし、次に、変性条件下で試料を処理して、検出すべき配列(単数又は複数)が存在する場合、プライマー伸長産物をそれらの鋳型から分離することを含む。これらのステップは、所望の程度の増幅が得られるまでサイクル的に繰り返される。増幅された配列の検出は、反応生成物に、その反応性生物(例えば、本発明のオリゴヌクレオチドプローブ)にハイブリダイズできる、検出可能な標識を担持したオリゴヌクレオチドプローブを添加し、次いで既知の技術に従って、又はゲル上で直接的に視覚化することにより標識を検出することによって達成してもよい。増幅された配列は、反応混合物に挿入色素を添加し、二本鎖DNAの全質量に比例する蛍光シグナル強度を監視することによって検出してもよい。本発明による実施形態はPCR反応に関して記載されているが、ローリングサークル増幅又はループ媒介等温増幅(LAMP)などの等温増幅技術を含む逆転写PCR(RT-PCR)のような他の核酸増幅法や、核酸配列決定法をも用いることができることを理解されたい。

【0059】

上記のようなDNA増幅技術は、目的の多型又は突然変異を含むDNAに特異的に結合するが同じハイブリダイズ条件下で目的の多型を含まないDNAには結合せず、増幅反応におけるDNA又はその一部の増幅の為のプライマー又は複数のプライマーとして働くプローブ、プローブの対、又は2対のプローブの使用を含むことができる。このようなプローブは、本明細書では増幅プローブ又はプライマーと呼ぶことがある。

【0060】

「試薬」という用語は、化学反応を引き起こす為にシステムに添加されるか、又は反応が起こるかどうかなを見る為に添加される、プライマー、核酸鋳型、及び増幅酵素を含む任意の物質又は化合物のことをいう。増幅試薬(単数又は複数)とは、プライマー、核酸鋳型、及び増幅酵素以外の増幅に一般に用いられる試薬(デオキシリボヌクレオチド3リン酸、緩衝液など)のことをいう。典型的には、増幅試薬は、他の反応成分と共に、反応容

10

20

30

40

50

器（試験管、マイクロウェルなど）に入れて、収容される。

【0061】

本明細書で使用される用語「磁気」は、強磁性、常磁性、及び超常磁性を含む。

【0062】

一般に、目的の多型又は突然変異を含むDNAを検出する為に使用されるオリゴヌクレオチドプローブは、その突然変異又は多型を符号化するDNAに結合するが、同じハイブリダイゼーション条件下では、突然変異又は多型を含まないDNAには結合しないものである。オリゴヌクレオチドプローブは、以下に示すような、適切な検出可能な基で標識化される。このようなプローブは、本明細書では、検出プローブ又はプライマーと呼ばれる場合もある。

10

【0063】

図2A、図2B、図3A、図3B、図4A、及び図4Bを参照すると、シグナル検出が改善された幾何形状を有するビーズウェル10の例が示されている。図1A及び図1Bに示すように、従来のビーズウェル10は、ビーズを保持するように構成された円形の外周（典型的には円筒形又は円錐形のウェル）を有する。対照的に、本発明の実施形態によるビーズウェル10は、ビーズ保持セグメント11に隣接するシグナル検出セグメント15と流体連通するビーズ保持セグメント11を有する幾何形状を有する。

【0064】

ビーズウェル10は、密集したビーズウェル10の比較的高密度のアレイ10aに設けることができる。ビーズウェル10は、行と列に整列させることができ、又は互いにオフセットさせることもできる。ウェル10は、定期的な反復パターン、不規則な反復パターン、又は他のパターンで提供される。「密」という用語は、流体分析装置のフットプリントが、1平方ミリメートルあたり約100～6000ウェル10、及び/又は1平方センチメートルあたり10,000～5,000,000ウェル10、典型的には1平方センチメートルあたり約6,000～約2,000,000ウェル10、さらに典型的には1平方センチメートルあたり約500,000～約2,000,000ウェル10を意味する。

20

【0065】

隣接するウェル10のいくつか又は全ては、それぞれの隣接するビーズ保持セグメント11の中心線間を測定して、約1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm、10μm、11μm、12μm、13μm、14μm、15μm、16μm、17μm、18μm、19μm、20μm、100μm、200μm、300μm、400μm、500μm、600μm、700μm、800μm、900μm、1mm、2mm、3mm、4mm、5mm、6mm、7mm、8mm、9mm、10mm、若しくはそれ以上、及びそれらの間の任意の数など、1μm～10mmの間の分離距離を有していてもよい。

30

【0066】

ウェル10のいくつか又は全ては、増幅試薬と協働する反応ウェル10でもよい。ウェル10のいくつか又は全ては、サブピコリットルの反応量を処理してもよい。

【0067】

シグナル検出セグメント15は、任意で、シグナル検出セグメント15eの端部とビーズ保持セグメント11とを接続する短い及び/又は長手の流体チャネル15chを備えていてもよい。シグナル検出セグメント15は、ビーズ保持セグメント11から、典型的には標的ビーズの直径の30%～約10,000%(0.3X～約100X)、より典型的には、標的ビーズの直径の約0.3X～約20X離れた距離「L」に端部15eを含むことができる。いくつかの実施形態では、Lは、標的ビーズの直径の1X～5Xでもよい。例えば、直径3.2μmのビーズの場合、長さLは、約1～約640μm、より典型的には1～32μm、特定の実施形態では、約3.2～16μmとしてもよい。明確にする為に、文字「X」を有する数字は、乗数、1倍(1X)、10倍(10X)等を指す。

40

【0068】

50

いくつかの実施形態において、 L は、約 $1\mu\text{m}$ ～ 10mm 以上、典型的には約 1mm 又は約 $100\mu\text{m}$ まで、より典型的には $1\sim 20\mu\text{m}$ 、例えば約 $1\mu\text{m}$ 、約 $2\mu\text{m}$ 、約 $3\mu\text{m}$ 、約 $4\mu\text{m}$ 、約 $5\mu\text{m}$ 、約 $6\mu\text{m}$ 、約 $7\mu\text{m}$ 、約 $8\mu\text{m}$ 、約 $9\mu\text{m}$ 、約 $10\mu\text{m}$ 、約 $11\mu\text{m}$ 、約 $12\mu\text{m}$ 、約 $13\mu\text{m}$ 、約 $14\mu\text{m}$ 、約 $15\mu\text{m}$ 、約 $16\mu\text{m}$ 、約 $17\mu\text{m}$ 、約 $18\mu\text{m}$ 、約 $19\mu\text{m}$ 、及び約 $20\mu\text{m}$ である。長さ L は、ビーズ保持セグメント11の中心線から、又はビーズ保持セグメント11をシグナル検出セグメント15eの端部と接続するチャンネル15c上に引かれたビーズ保持セグメントの直径を完成する線から測定すればよい。

【0069】

図2A及び図2Bは、シグナル検出セグメント15を狭いチャンネル又は「スリット」として構成することができ、典型的には、ビーズ保持セグメント11の幅より25%～75%幅を小さくできることを示している。

【0070】

図3A及び図3Bは、シグナル検出セグメント15の端部は、ビーズ保持セグメント11の曲率半径より小さい曲率半径を有する弧状部15aとしてもよいことを示している。ビーズ保持セグメントの中心線と弧状端部15eとの間の距離「 d 」は、上述の長さ「 L 」と同じでもよい。

【0071】

図4A及び図4Bは、シグナル検出セグメント15の端部は、内部上方突出部材19を取り囲む環状チャンネル17としてもよいことを示している。突出部材19は、シグナル検出セグメント15の環状チャンネル17内の流体の上に延在するのに十分な高さを有していてもよい。この構成は、環状形状を有する部分を含む光学的に検出可能なシグナルを規定してもよい。

【0072】

ビーズウェル10の新しい形状は、マイクロビーズアレイベースの技術での検出を改善すると考えられている。これらのウェル形状は、ウェル11の1つのエリアが磁気ローディング及びビーズ保持用であり、ウェル15の別の領域がシグナルの検出に（主に又はそれのみに）使用されるように構成してもよい。いくつかの実施形態では、ウェル10のビーズ領域11内のビーズ25（図2A、図3A、及び図4Aのそれぞれのウェルのうちの1つに黒丸で例として示す）を装填した後、少量の試薬流体を、当業者には知られているように、不混和性の流体シールなどの方法を使用して、又はガasket若しくは他の基材のような別の表面に押し付けて、ウェル10内で単離してもよい。

【0073】

いくつかの例示的な実施形態を図2A、図2B、図3A、図3B、図4A、及び図4Bに示すが、他の実施形態は、他の形状を含んでもよく、典型的には、ビーズ保持領域11が、ビーズ25の直径の約101～195%の開口直径を有するポケット又はレセプタクルを有するように構成されており、いくつかの実施形態では約105%～150%であってもよい。ビーズ保持領域11のウェルの深さは、ビーズの直径の約50%～185%でもよい。

【0074】

図5A及び図5Bは、ウェル10が、ビーズ保持セグメント11内のビーズ25をブロックすることができる物理的バリア16を含みうることを示している。バリア16は、流体がビーズ保持セグメントからシグナル検出セグメント15へ進入できるようにしてもよい。バリア16は、上面を横切って存在し、ウェル10の底部に向かってある距離だけ下方に延び、及び/又はビーズ25が保持領域11から移動するのを阻害又は防止しながらウェルの液面より下に浸漬してもよい。障壁16は、全体又は部分的に反応ウェル10の対向する側壁を横切るように延在してもよい。

【0075】

シグナル検出領域15の一部又はすべてにおけるウェル10の深さは、ビーズ保持セグメント11のウェルと同じか、それよりも深く、又は浅くてもよい。チャンネル15chが

10

20

30

40

50

ビーズ保持セグメント 11 から遠ざかるにつれて、深さが減少してもよい。チャンネル 15 c h がビーズ保持セグメント 11 からシグナル検出セグメント 15 の端部に向かって移動するにつれて、深さが増加してもよい。ウェル 10 の壁は、ウェル 10 内に向かう方向において、外側又は内側に向かってテーパ状になっていてもよい。

【0076】

異なるウェル 10 は、異なる容積、幾何学的形状パターン及び/又はサイズを有してもよい。

【0077】

いくつかの実施形態では、シグナル検出セグメント又は領域 15 は、標的ビーズが物理的に進入することができないポケット又はスリット又は他の幾何学的形状などのチャンネル 15 c h を有していてもよい。両方の領域 11、15 は流体的に接続され、ビーズ 25 から放出された試薬及び/又は検体は、ウェル 10 の共通の溶液体積全体にわたって拡散あるいは混合してもよい。ビーズ 25 を検出領域 11 から空間的に分離することにより、シグナルに対するビーズ蛍光の寄与を低減又は排除し、シグナル対ノイズ比を改善してもよい。

【0078】

ウェル 10 の形状は、それぞれの反応量を増加させ、潜在的に反応効率を改善しながら、反応ウェル 10 の高い単一占有装填を可能としてもよい。

【0079】

図 6 A ~ 図 6 E に示すように、マイクロ流体デバイス 50 は、複数のウェル 10 を有するウェルアレイ 10 a を含んでもよい。ウェル 10 は、ビーズ保持セグメント 11 にビーズ 25 を保持してもよい。ビーズ 25 は、任意で、そこに付着したプライマーを含んでもよく、また任意でウェル 10 のビーズ保持セグメント 11 に予め装填してもよい。デバイス 50 は、互いに付着する上側及び下側基材 50 u、50 b (図 6 B、図 6 C) を含んでもよい。上側基材 50 u は、下側基材 50 b と同じでも、異なってもよい。基材 50 u、50 b のいずれか又は両方は、硬質であってよく、例えば、ガラス、石英、シリコン、又は適切な金属を含むことができる。基材 50 b のいずれか又は両方は、シリコン又は他のポリマー材料 (多くの他のものの中でも PMMA、COC、COP、PDMS、PP、PE、PTFE、又はカプトン (ポリアミド) など) のようなポリマーであってもよく、ビーズウェル 10 a の配列を提供してもよい。上側及び下側基材 50 u は、ウェル 10 と流体連通した少なくとも 1 つのポート 50 p を有していてもよい。反応ウェル 10 は、例えば、任意で、試薬充填及び/又はオイルシールの間に、ウェル 10 a のアレイを有するアレイチャンバを通る流れに対して垂直であってもよいが、他の位置合わせ構成を使用してもよい。

【0080】

図 6 A は、ビーズウェルのアレイ 10 a が高密度アレイウェルを有するフットプリント「F」(典型的には 1 mm ~ 10 cm の間) を占めるように、マイクロ流体チップ 50 を構成してもよいことを示す。流体マイクロチップ 50 は、当業者には周知のように、サンプル用の輸送チャンネル (単数又は複数) 及び試薬、又はアレイ 10 a と流体連通してもよい他の化学的添加物を含んでもよい。

【0081】

図 6 D は、上下側基材 50 u、50 b との間に存在し得る任意のスペーサ 50 s を示す。スペーサ 50 s は、それぞれのウェル 10 のいくつか若しくはすべての側壁を画定してもよい。スペーサ 50 s は、ガasketとスペーサの両者として用いたフォトレジストを含んでもよい。

【0082】

図 6 E は、シーリングオイルのようなシーリング剤 75 が、当業者には周知のように、隣接するウェル 10 とビーズ 25 を分離させることができることを示している。疎水性膜 (単数又は複数) も、或いは代替として使用してもよい。シーリング剤 75 (例えばオイル) を下部基材 50 b の上面にわたって延ばして塗布してもよい。シーリング剤 75 は、

10

20

30

40

50

スパーサ/ガスケット50sに関連付けられた厚み又は深さを有していてもよい。シーリング剤75は、ビーズ/反応ウェル10以外のすべてを覆うことができる。シーリング剤75は、鉱物、シリコン、炭化水素、又はフルオロカーボン系油及び/又はワックス或いはそれらの任意の組み合わせ又は混合物を含んでいてもよい。反応溶液23、例えば、水溶液は、典型的には、上側基材50uに接触しない。

【0083】

この技術は、アナログ又はデジタル検出モードで蛍光シグナルの読み出しを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)又は酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などの増幅方法を含むビーズに基づくアッセイにおいて特に有利であろう。これらのアッセイでは、0個、1個、又は複数の検体分子が磁気ビーズによって捕捉される。次いで、ビーズ25の装填をウェル10あたり1個又は0個のビーズに限定する形状を有するマイクロウェルアレイ10aに、磁気ビーズを装填してもよい。少量の増幅試薬をビーズ25が入った各反応ウェル10に封入して、被分析物分子が存在する場合には、化学反応を行って蛍光シグナルを生成してもよい。次いで、アッセイ蛍光シグナルを測定し、処理し、それを使用して試料中の検体濃度を決定してもよい。

【0084】

コンパクトアレイにおけるシングルプレックス反応(SiRCA)は、多くの異なる標的配列に対して、数百、又は数千から数百万の単離されたシングルプレックスrt-PCR反応を同時に行う可能性を有するマイクロビーズ-アレイフォーマットを使用する大規模な並列増幅及び検出方法である。例えば、マルチプレックス空間内マイクロ流体デバイス上での並列アッセイの為の試薬のビーズに基づく送達について記載する米国特許出願第14/402,565号を参照のこと。この文書の内容は、参照によりここに完全に記載されているように本明細書に援用する。

【0085】

低い分析標的物濃度での単一コピー、デジタル定量化、及び高い分析標的物濃度での複数コピー、アナログrt-PCR定量化を実行する能力により、aM LODで大きなダイナミックレンジとなる。いくつかの実施形態では、アレイ10aは、色素符号化され、ストレプトアビジン標識化された、磁性マイクロスフェア又はビーズに結合された個々のピオチン化プライマーのセットで使用してもよい。数十から数百までのビーズタイプを含むビーズセットライブラリを作製することができ、それぞれは異なる標的配列に対して異なるプライマーセットを用い、新しいビーズセットを自由にビーズ混合物に加えることができる。ビーズ混合物が被分析物DNA又はRNAと共に培養される場合、ビーズに付着したプライマーは、ハイブリダイゼーションプローブとして作用し、そのビーズに特異的な核酸配列を捕捉して精製する。ビーズを磁氣的に分離して洗浄することによって、サンプルのマトリックスインターフェレント(余分なDNA、RNA、細胞膜成分など)を除去してもよい。クリーンアップ後に、ポリメラーゼ、dNTP、及び挿入色素を添加し、ビーズを個々のウェル10に装填し、非混和性の油又は疎水性膜を用いて互いにシールする。個々の符号化されたプライマービーズを別個のマイクロ反応ウェルに静的に装填することは、手動でピペットによるものや試薬印刷とは異なり、数秒から数分で達成してもよい。最適化された形状への磁気によるビーズの装填は、液滴への希釈、又はビーズ捕捉用に設計された領域が、ウェル10用の別個の検出領域を含まない反応ウェルによるランダムな単離より高効率となりうる。ストレプトアビジン/ピオチン相互作用は50 未満の温度では非常に安定しているが、PCR中の変性の為に使用される高温により、その後、標的DNAの増幅を開始する第1のrt-PCRサイクル中に、プライマーを放出する可能性がある。

【0086】

サブ-pL反応におけるSiRCAの性能を評価する為に、プライマー及びgDNAを用いたビーズを用いない予備試験を、直径3.7µm、深さ5µm(容積およそ50fLの円筒形)、10µmの中心間隔を有する、シリコン中に深い反応性イオンエッチング(DRIE)を行って製造されたウェルのアレイを有するシリコン流体チップで行った。

従って、 rt -PCRを、ビーズを含まない溶液中でプライマーを用いて及びgDNAフリーでおよそ50 fLの円筒形反応ウェル中で行った。チップをヘプタン中のオクチトリクロロシランで前処理して、表面を疎水性にした。チップをエタノール、次いで水で湿らせ、次いでローディング緩衝液(20 mM Trizma、50 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、1% BSA、及び0.1% Tween 20)でブロックした。マスターミックス(0.0625 ユニット/ μ Lの追加のPlatinum Taq DNAポリメラーゼ、0.5% BSA、2.7 μ Mプライマー、S. mutans由来のgDNA、及び3x SYBR Greenを含む1x プラチナ定量PCR SuperMix-UDG)をチップに添加し、次いでKrytox GPL 104 ペルフルオロオイルをチップを通して引いて、反応量を互いにシールした。図7Aは、30 PCRサイクル後のチップを示す蛍光顕微鏡画像であり、図7Bは、12個の陽極ウェル及び3個の陰極ウェルについての蛍光シグナルのプロットを示す。ウェルあたり1コピー(1コピー/50 fL又はおよそ3 pM)と関連する鋳型の濃度が比較的高いので、Ctはわずか11サイクルとなる。

10

【0087】

ポリスチレンビーズの背景の蛍光は、反応ウェルの直径が減少するにつれて、より問題になる可能性がある。4~25 pLのSiRCA反応を用いた以前の研究では、反応ウェル直径は約25~50 μ mであり、ビーズの3.3 μ m直径(ビーズ体積およそ20 fL)よりもはるかに大きかった。ビーズウェルはウェルの中央に位置していた為、ビーズの背景の蛍光は無視するか、バックグラウンドシグナルとして差し引くことができた。高密度のサブ-pL反応のアレイの場合、円筒状ビーズウェルは、事実上は反応ウェルであり、ビーズ蛍光がシグナルを支配してもよい。ビーズの背景の蛍光は、アレイのイメージング中に光退色し、PCR増幅によって生成された蛍光シグナルに関係なく、シグナルの正味が減少する。さらに、特定のサイズ未満、例えば、直径がおよそ4.5 μ m、深さがおよそ5 μ mの小さな容積のウェルにおける、ビーズのシーリング及びサーモサイクリングの予備調査の間、ビーズは、サイクルの間にウェル内を移動したことが観察され、背景の減算が困難となった。

20

【0088】

二本鎖DNAアンプリコンの存在下において、アッセイシグナルを提供する挿入色素である約497 nm/520 nmのSYBR Greenの最適励起/発光では、ポリスチレンビーズの自己蛍光は高い。さらに、SYBR Greenはビーズと相互作用して、ビーズの蛍光をかなり増加させることができる。より長い波長の励起/極大発光の他の挿入色素をテストして、ビーズの背景の蛍光のアッセイシグナルへの寄与を減少させようと試みたが、1x~15xの濃度でSYBR Greenで観察されたものよりも強い蛍光シグナルを生じさせることはできなかった。ビーズの明るい背景からアッセイシグナルを空間的に分離してもよいデバイスの使用が望ましい場合がある。

30

【0089】

ビーズの背景の蛍光を回避し、反応量を増加させる為に、非円筒状の反応ウェル形状のSiRCAでの使用について評価した。図8Aは、Siウェーハ中の結合ビーズ及び反応ウェルDRIEの明視野顕微鏡画像である。ウェルの左側のビーズウェルセグメントは直径がおよそ3.5~3.7 μ mであり、右側の検出ウェルセグメントは直径がおよそ2.1 μ mである。それらを結ぶチャネルは、幅がおよそ2.0~2.1 μ m、長さが7.4 μ mである。深さは約5 μ mであり、約150 fLの反応量を提供してもよい。図8Bは、ビーズを装填して示した同様のアレイを示す。図8Cは、直径3.3 μ mのプロマグビーズが装填されたアレイにおけるビーズの背景の蛍光が高いことを示す画像である。磁気装填率が高いと占有率が高くなり、二重装填は比較的少ないことが観察された。ビーズの背景の蛍光が高いことは明白である。

40

【0090】

新しい反応ウェル10, 10'は、ビーズの背景の蛍光の問題に対処してもよい。効率的なPCRの為に十分な試薬容量を提供し、コンパクトアレイの為に高い反応ウェル密度

50

を維持し、ビーズ及びその蛍光シグナルを検出領域から物理的に分離する設計を評価した。ビーズウェル保持セグメント11は、狭いスリットであるチャンネル15chに流体接続してもよい(図8A)。ビーズウェル保持セグメント11は、ビーズ直径よりも僅かに大きくすることができ、検出スリットは、ビーズ直径より小さくてよく、ウェル構造当たり単一のビーズを装填してもよい。図8Bは、参照により本明細書に援用される米国特許出願第14/402,565号に記載されている磁気装填技術を用いてウェルに装填された $3.3\mu\text{m}$ のプロマグビーズの明視野顕微鏡画像を示す。

【0091】

検出スリットは、任意のフットプリントに適合してもよい隔離された反応ウェルの数を、典型的には2倍減少させるが、高い装填占有率により、任意のフットプリントに対して装填されたウェルを高密度に維持する(この例では、 $>6\text{k/mm}^2$ 又は 600k/cm^2)。反応をシールする為の最適なウェル間隔を決定する為に最適化を行うことができ、これにより、ウェル密度がより高くなる可能性が最も高い。相対的に二重装填の例はほとんど観察されなかったが、ビーズの異質性により、いくつかのより小さなビーズが検出ウェル又は接続スリットに装填されることがあった。これは容易に検出でき、それらのウェルは分析から除外してもよい。プロトタイプは、反応量がおおよそ $100\sim150\text{fL}$ の範囲のウェルで作製され、ビーズは約 20fL を移動した。

【0092】

プラスモジウム種間で保存された18S rRNA遺伝子のプライマーで機能化されたストレプトアビジン被覆プロマグビーズを用いて、これらのウェルでSiRCAを試験した。簡潔に言うと、おおよそ 350k プライマー標識ビーズを、培養時におおよそ 4k の寄生虫/ μL 濃度でマラリア血液試料から $40\mu\text{L}$ の核酸抽出で30分間培養した。ビーズを洗浄し、アリコートチップに装填した。マスターミックス($1\times$ の追加のSYBR Green, 0.5% BSA、及び 0.125 単位/ μL のプラチナTaqポリメラーゼを含むKapa SYBR FAST)をチップに添加し、Krytox GPL 104オイルでシールした。図9A/9Bは、サイクル10(増幅が検出される前)及びサイクル30(増幅後)からの蛍光画像を示す。図9Bに、陽極ウェルを丸で囲んで示す。

【0093】

SiRCAは、おおよそ 150fL の反応量を有する非円筒形ビーズウェルを有する装置で行った。サイクル10(図9A)とサイクル30(図9B)との間の比較が示され、スリット及びより小さいウェルにおける蛍光の増加によって、陽極ウェル(図9Bの円で囲まれている「尻尾」が見える部分)を同定してもよい。2つ以上のビーズを装填するウェルは、分析から容易に識別して廃棄してもよい。

【0094】

ビーズの背景の蛍光から離れた空間でアッセイシグナルを読み取る能力により、SYBR Greenを用いてサブpLのウェルでSiRCAが可能になる。これは、ビーズウェル領域からの平均シグナルをスリット及び検出ウェルからの平均シグナルと比較することによって示される。図10Aは、図9Bに示す6つの陽極ウェル及び3つの陰極ウェル用のビーズウェル領域のみからの平均蛍光シグナルを示す。陰極及び陽極ウェルの間には、ビーズの高い背景シグナルによる、視覚的に容易に識別可能な違いはない。ウェルのスリット(検出)領域のみからのシグナルをプロットすると(図10B)、PCRの約15サイクル後の蛍光シグナルの顕著な増加によって、ブランクから陽極反応ウェルを容易に区別してもよい。光漂白はすべてのエリアで見られる。チップ表面及び/又は緩衝液又はシグナル処理の修正を変更することにより、より早いサイクルで検出領域の高い背景を低減してもよい。

【0095】

図10Aは、ビーズウェル領域上で6個の陽極ウェル(実線のトレース)と3個の陰極ウェル(破線のトレース)のみに対する30サイクルのrt-PCRの間の平均化した生蛍光シグナルのプロットを表す図である。図10Bは、これらの同じビーズに対するスリット及び検出ウェル領域のみから平均化された生蛍光シグナルのプロットである。

【0096】

タフツ大学 (Tufts University) 及びクオンテリックス社 (Quanterix Corporation) によって一般化された単一分子アレイ (SiMoA) フォーマットに基づくELISAアッセイにおいて、スリット形状を有するビーズウェルのアレイ10a (例えば、図2A、図2B) も試験して、ビーズの背景の蛍光 (かなりの程度及び可変性でありうる) をアッセイシグナルからデカップリングすることにより、陽極反応の判定を間違えない為にシグナル対ノイズの増強ができるかどうかを判定する。図11A/11Bは、抗TNF- α 抗体で標識化したビーズを使用してTNF- α 抗原を捕捉した例を示す。抗原に対するビオチン化二次抗体を使用して、ビーズによって捕捉された抗原にストレプトアビジン結合 - ガラクトシダーゼ酵素分子を結合させた。ビーズをアレイに装填し、酵素標識用の蛍光発生基材で密封した。図11Aは、シール前のビーズの画像を示し、図11Bは、数分後の画像を示す。図11Aにおいて、ウェル(8)中のビーズは、シール前の背景の蛍光によって見る事ができ、図11Bでは、アッセイの読み出しは明白であり、5つの陽極を示している。

10

【0097】

ビーズを含む5つのウェル(5)では、ウェルのアッセイ領域では明確なシグナルが見られ、ビーズを含む3つのウェル(3)は背景の蛍光のみを示す。陽極反応を一義的に呼び出すことができる能力により、ビーズの背景の蛍光の寄与を除去し、基材の有意な変換 (時間ゼロ又は T_0 画像) が起こる前にアレイを画像化する必要性を排除することによって、SiMoAアッセイの精度を改善することができるようになる。反応が非常に迅速に起こるので、1枚又は数枚の画像でアレイ全体をカバーするのに十分な解像度又は視野が撮像システムにない場合には、大型アレイの画像 T_0 を撮ることは実現できないことがある。別個の領域でアッセイシグナルを読み取ることにより、反応が起こった後にアレイをスキャンし、複数の画像を一緒に結合するか、又は他の方法で調べるか又は組み合わせ、アレイ全体の画像を精度を損なうことなく作成してもよい。さらに、新しいウェル形状の実施形態によって収容されたビーズウェルにおけるより大きな試薬容積は、より多くの基材分子を意味し、したがって、各反応についてより多くの潜在的な蛍光色素分子を得ることができる。

20

【0098】

ビーズ保持セグメント11及びシグナル検出セグメント15を有する形状のこれらのウェル形状を含んだアレイ10aは、任意の適切な材料で製造することができ、シリコン又はガラスに限定されない。例えば、ウェルアレイ10aを有するポリマー基材は、熱エンボス加工又は射出成形などの方法で製造してもよい。図12A及び12Bは、射出成形によって製造され、ビーズが装填されたビーズウェルアレイ10aを有するポリマーデバイスの例を示す。図12Aは、ビーズを有するデバイスのSEMを示し、図12Bには、装填されたアレイの蛍光顕微鏡画像を示す。

30

【0099】

図13A及び図13Bは、プラスチック/ポリマー基材にブルズアイ形状のウェルを製造する為にDRIEエッチングされたシリコンモールド (図13A) を使用してホットエンボス加工で製造されたアレイを示すSEM画像である。図13Aはまた、内径2 μ mの環を含む4 $^\circ$ テーパの非円筒型を示し、図13Bは、対応するプラスチック/ポリマー複製を示す。

40

【0100】

この発明の実施形態は、2つ以上のビーズを含むように構成された形状を有する反応ウェル10'を含んでいるので、1つ以上のビーズから放出され、溶液又は1つ以上のビーズの表面又はそれらの任意の組み合わせで反応する試薬間の反応が、図示のように指定された検出領域 (単数又は複数) で、又は、その代替として、例えば図14A~図14D及び図15A~図15Cに示されているようにビーズの表面上で研究されてもよい。ビーズウェルアレイ10aは、いくつかのウェル10が1つのビーズ25を保持し、いくつかのウェル10'が2つのビーズ25を保持し、いくつかのウェル10'が3つ以上のビーズ

50

25を単一の基材又は流体デバイス、或いは別個の基材又はデバイス上に保持するというバリエーションを有していてもよい。ウェル10'が2つ以上のビーズ保持セグメント11を含む場合、複数の(典型的にはそれぞれの)ビーズ保持セグメント11は、流体チャネル15chなどのシグナル検出セグメントを介して互いに流体連通してもよい。

【0101】

図14A~図14D及び図15A~図15Cは、研究された各成分について液体試薬を添加することをユーザが必要とする他のコンビナトリアルアプローチと比較して、ユーザの相互作用及び労力を大幅に低減する単純なプロセスで混合物の組合せの複数の反復を迅速に生成する能力を利用することができるいくつかの例示的な構成を示す。これらのウェル10'は、2つ以上のビーズ保持セグメント11a、11b、及び場合によっては11c(図15A~図15C)を有するように設計され、2つ以上のビーズ25(図14Dに例示)をチャネル15cによって流体接続された別個の読み出し/検出セグメント又は領域15(典型的には、幅及び/又は深さ領域がより薄い)で装填してもよい。ビーズウェル保持セグメント11a、11b(11c)は、図示のものと同じ又は異なるサイズであってもよく、追加の形状又は数のビーズを有する繰り返しが可能である。2つ及び3つのビーズ保持セグメントが示されているが、ウェル10'は4つ以上のビーズ保持セグメント11で構成することができ、異なる形状としてもよい。

【0102】

この発明の実施形態で考えられるビーズウェル10、10'の使用は、PCR又はELISAに基づくアッセイに限定されない。アレイ10aは、ある体積の試薬、及び対応するシグナルが測定及び/又は検出されるエリア又は領域から試薬又は被分析物を担持するビーズを空間的に分離することが有益となり得る任意のプロセス又は方法に使用できる。

【0103】

いくつかの実施形態において、新しいビーズウェル10は、異なるプライマーセットを試験してマルチプレックスプライマー反応におけるそれらの適合性を評価する為に必要な単調性及び費用を低減する方法において使用してもよい。プライマーの特異性を促進し、プライマーダイマーの形成を回避する為の様々なガイドラインを用いて、PCRプライマーを分析及び示唆する複雑な予測ソフトウェアが存在するが、現在の最先端のソフトウェアは、パイロットPCR実験で経験的にテストされるべき配列のみを提案してもよい。この予測、テスト、及び再設計のサイクルは、実験者の間では非常に共通の問題であり、リソースと時間の両方においてコストがかかる。予想外のプライマーダイマー又は的外れな増幅は、非カノニカル塩基相互作用、劣悪な酵素忠実度、ポリメラーゼによって無視されるプライマー配列ミスマッチ、及びSNP配列又は予想外の実験配列の存在を含む様々なメカニズムから生じる。このプロセスは、マルチプレックスPCR反応において、特に複数の生物由来の核酸を含有する試料ではさらに複雑である。

【0104】

プライマーダイマーの形成は、PCR反応の効率を著しく低下させ、誤検出、混乱配列決定労力、及び/又はアンプリコンの他の下流分析を引き起こし兼ねない。伝統的に、プライマーセットは、異なる組み合わせで混合して、2つ以上の対が互いに相互作用して意図しないアンプリコン(ダイマー)を形成するかどうかを決定しなければならない。多数のセット(例えば、10~50セット)を単一の反応に統合する必要がある場合、非特異的な生成物を減少させる為に改変されたセットの初期スクリーニング及び再テストの両方の為に、数千の反応が必要となる。異なるプライマーセットを有する複数の符号化されたビーズセットが作製された場合、それらを一緒に混合し、個々のピペット試薬溶液に代わる単一のアリコートとしてデバイスに装填してもよい。ビーズが、2つ以上のビーズ25を捕捉する反応ウェル形状10'(例えば図14A~図14C、図15A~図15C)を有するマイクロウェルアレイ10に装填される場合には、プライマーセットの確率的混合を容易に達成してもよい。その後、PCRは、アレイを復号化した後のプライマーセットの全ての組み合わせの間の望ましくない相互作用の存在を明らかにして、各反応における各ビーズの同一性を決定してもよい。これらの反応ウェルが1つのデバイスに数百万個存

10

20

30

40

50

在する可能性がある為、可能なすべての組み合わせの複製が多数あり、分析用の豊富なデータセットが提供される。

【 0 1 0 5 】

同様の実施形態において、異なる参照ゲノムに対する複数のプライマーセットのスクリーニングは、複数のビーズを装填するアレイを用いて行うことができる。プライマーセットの標的の特異性を確立する為には、目的とする標的だけでなく、関連する試料中に存在し得る複数の生物の核酸に対してもプライマーセットをスクリーニングすることが重要である。多くの可能な相互作用を排除する為に配列データベースを使用できるが、配列がしばしば不完全であり、現在の最先端のアルゴリズムが完全ではない為、経験的試験が依然として必要である。例えば、病原体定量の為に設計された各アッセイについては、宿主ゲノム DNA 及び関連細菌及びウイルス血清型の複数の種をスクリーニングすべきである。マイクロバイオームの研究に適用される場合、数百から数千もの異なる種、時には非常に密接に関連する種を比較する必要がある場合もある。参照ゲノムビーズは、(符号化されたストレプトアビジン官能化ビーズとのその後の培養による断片のビオチン化などの方法を用いて)生物のゲノムを断片化し、その断片を符号化されたビーズに結合させることにより作製してもよい。符号化された参照ゲノムビーズのライブラリーと符号化されたプライマーセットビーズのライブラリーを混合することにより、研究者は、単一のアッセイにおける意図した標的に対し、オフターゲット増幅のスクリーニングと増幅効率の評価の両方が可能となる。プライマービーズは、プライマーにより小さなビーズを使用し、ゲノムにより大きなビーズを使用する(又はその逆)ことにより、ゲノムビーズと効率的に組み合わせることができる。この場合、反応ウェルには大きなビーズウェルと小さなビーズウェルが含まれ、狭いスリットで接続してもよい(図 9 B)。最初により大きなゲノムビーズを大きなビーズウェルに装填する場合、より小さいビーズウェルは空となっている。この工程の後、より小さいプライマービーズを、より小さいビーズウェルに効率的に装填してもよい。この方法論は、反応ウェルにおいて、望ましくないプライマー対プライマー及びゲノム対ゲノムの組み合わせを避けることができる。この方法論及び他の方法では、参照ゲノムビーズは、ビーズから放出されたプライマーがそれらと相互作用して測定可能なシグナルを検出領域で生成する間、それらの試薬を、必ずしもそうである必要はないが、保持することができるので、両方の試薬をビーズから放出する必要はない。

【 0 1 0 6 】

別の例では、この原理は、多くの臨床試料又は実験室試料の核酸プロファイリングに同時に適用してもよい。単一の生物からの mRNA 又は IncRNA などの核酸の配列は、単一のビーズセットで捕捉してもよい。次いで、多くの異なる個体からの核酸抽出から作製された異なる符号化されたビーズを組み合わせることによって、ライブラリーを作製してもよい。次いで、このライブラリーは、上記のプライマービーズライブラリーに対する標的についてスクリーニングし、単一ヌクレオチド多型(SNP)、遺伝子発現、又は他の現象を同定してもよい。

【 0 1 0 7 】

本発明の方法を実施する為に有用なキットは、一般に、それに結合した試薬及び上記の方法を実施する為の他の試薬が付着した1つ以上のビーズのセット、例えば、任意でこれらの方法を実施する為の適切な指示とともにパッケージ化された制限酵素などを含むことができる。キットはまた、そこに含まれるハウジング要素の為の容器を含んでもよい。そのような容器には、バイアル、ビーズウェルアレイを備えたマイクロ流体チップ、及び予め装填されたビーズデバイスを含むカートリッジが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態では、ビーズ25には、プライマーが付着していてもよい。プライマーは、一対のビオチン化プライマーであってもよく、ビーズ25は、ビオチン化プライマーがビーズに結合されるようにストレプトアビジン標識化されてもよい。いくつかの実施形態において、ビーズ25は、各ビーズ25に固定されたプライマーを同定する為に分

析中に使用できる光学マーカーなどのマーカーを含んでいてもよい。例えば、分析中に、付着した異なるプライマーセットを同定できるよう、同じ、又は異なるサイズの符号化された異なるビーズにはマーキングしてもよい。単独で、又は他の符号化方法と組み合わせて使用される、所定のサイズ、形状、磁気特性、及び／又は蛍光ドーピングを含む様々な事前符号化方法を使用して、ビーズ25上にマーカーを付すことができる。カスタム配列のビオチン化プライマー及びストレプトアビジンで標識化した常磁性磁気ビーズは、共に、市販業者から容易に購入することができ、又は適切に装備された実験室で適切な量で作製してもよい。

【0109】

上述したように、本発明による実施形態は、PCR反応に関して本明細書に記載されているが、本明細書に記載のマイクロ流体デバイス、ビーズ、及び反応方法は、様々な他の反応、例えば、試薬がビーズからウェルへ固着して反応に関与するような場合などにも使用することができることは理解できよう。例えば、任意の核酸の転写及び／又は増幅に関連する反応又は配列決定反応は、PCR反応、リアルタイムPCR (rt-PCR)、デジタルPCR (dPCR)、cDNA (RT) へのRNAの逆転写、前RT工程からのcDNAのPCR (RT-PCR)、リアルタイム又はデジタル定量化を使用するRT-PCR、免疫PCR (iPCR) 及びその変異体、ループ媒介等温増幅 (LAMP)、ローリングサークル複製、及び／又は非酵素的核酸増幅法 (例えば、「DNA回路」) を非限定的に含み、本発明の範囲に含まれる。本発明の範囲内に非限定的に含まれる他の反応には、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、単一分子アレイ測定 (Simoa) 又はデジタルELISA、蛍光基材がその後の反応の為にいくつかの点で固着されるように支持面に結合されるELISA法、複数のビーズを使ってコンビナトリアルケミストリー用に異なる試薬を送達する反応、ビーズが触媒試薬を送達する反応、及び／又は「クリック」化学試薬が確率的ビーズ装填によって決まる化学量論で送達される反応が含まれる。

【0110】

図16は、分析システム200の略図である。システム200は、カメラ又は他の撮像装置又は他のシグナル検出装置を含む光検出器のような電子シグナル検出器220と通信する少なくとも1つのコントローラ210 (通常、少なくとも1つのプロセッサを含む) を含んでいてもよい。シグナル検出器220は、それぞれのマイクロ流体チップ50のビーズウェルアレイ10aのシグナルを検出するように構成されている。コントローラ210は、アッセイシグナルが反応ウェルのシグナル検出セグメントに存在するかどうかを識別するように構成されたモジュール221 (例えば、コンピュータプログラム) を有する画像プロセッサ211と通信してもよい。画像プロセッサモジュール221は、コントローラ及び／又はシグナル検出器220の全部又は一部に搭載しても、遠隔でもよい。画像プロセッサモジュール221は、ウェルが積極的な読み出しを有するかどうかを評価する為に、複数のウェルのアッセイ後の画像を組み合わせるように構成してもよい。画像プロセッサモジュール221は、各ウェルのビーズ保持セグメントからバックグラウンドノイズを除去してもよい。モジュール221は、それぞれのウェルの検出セグメント (単数又は複数) からのシグナルの存在を同定して、陽極アッセイ反応が生じたかどうかを同定するように構成してもよい。

【0111】

図17は、本発明の実施形態による分析方法の実行の為に使用できる例示的な動作のフローチャートである。ビーズウェルを有する流体装置が提供される。ビーズウェルは、ビーズ保持セグメントと、ビーズ保持セグメントと流体連通した間隔を空けたシグナル検出セグメントを有する (ブロック250)。シグナルは、ビーズがそれぞれのビーズ保持セグメントに保持されている間に、ウェルのシグナル検出セグメントから得られる (ブロック260)。

【0112】

これら及び／又は他の実施形態では、ビーズを含むセグメントから (すなわち、ビーズから直接的に) 符号化されたシグナルを読み取って、ビーズが含有し得る試薬 (単数又は

10

20

30

40

50

複数)及び/又は被分析物を確認してもよい。このようにして、アレイを復号化して、陽極又は陰極アッセイシグナルの意味を判定してもよい。ビーズは、1つ以上の強度レベルの1つ以上の色素による蛍光色素染色、ビーズ直径、ビーズ形状、又は定義された及び/又は観察可能な又は検出可能な特性の任意の組み合わせを含む当業者に知られた手段によって光学的に符号化してもよい。

【0113】

ビーズウェルは、反応ウェルを画定するビーズウェルの高密度アレイとして配置してもよい(ブロック252)。ビーズ保持セグメントは、ビーズの直径と同じか又はそれより大きい形状及び直径を有していてもよく、シグナル検出セグメントは、ビーズの直径よりも小さい幅の形状を有する(ブロック254)。

10

【0114】

シグナル検出セグメントは、ビーズの直径よりも狭い長手のチャネルを含んでいてもよく、ビーズのウェルの形状は、(a)スリット、(b)長手のチャネルによって間隔をあけて配置された非対称な円周、(c)ブルズアイパターン(すなわち、環状チャネルに合流する長手のチャネル)、(d)それらの間に延びる少なくとも1本の長手のチャネルによって結合された複数の間隔をあけた円形及び/又は曲線状の円周、のうちの1つ以上を有するように構成されていてもよい(ブロック256)。

【0115】

ビーズ保持セグメントは、単一の磁気ビーズを保持するだけのサイズと構成にしてもよい(ブロック257)。

20

【0116】

ビーズウェルは、1つ以上の増幅試薬を含んでいてもよい(ブロック258)。

【0117】

検出セグメントは、対応するビーズ保持セグメントから、標的ビーズの直径の0.3Xと200Xの間、例えば、1 μ m~1mm以上の間、典型的には1~100 μ mの間の距離Lだけ離間させることができる(ブロック259)。

【0118】

シグナルは、被分析物分子が存在する場合、蛍光シグナル(尾部を伴う)を含むことができる(ブロック261)。

【0119】

30

図18は、本発明の実施形態による例示的なデバイスを製作する方法のフローチャートである。ウェルのアレイは、基材内にパターン化される(例えば、形成される)。すなわち、ウェルは、1aL~100 μ Lの間、より典型的には1fL~1 μ Lの間の容積とすることができ、1mm~10cmの間の線形寸法を有する規定されたフットプリント内に1つ以上の定義された形状を有していてもよく、定義された形状は、ビーズ保持セグメントから空間的に分離されたシグナル検出セグメントと流体連通するビーズ保持セグメントを含む(ブロック300)。

【0120】

ウェルのアレイは、基材にエッチングすることによって形成してもよい(ブロック302)。

40

【0121】

ウェルのアレイは、基材に成形してもよい(ブロック304)。他の製造方法、例えば、フォトリソグラフィ、FIBミリング、エンボス加工、スタンピングなどが考えられる。

【0122】

ビーズウェルは、いくつかの実施形態では、約3.2~3.7 μ mの範囲の直径で、幅が約2~3 μ m、長さLが標的ビーズの直径の0.3X~200Xの間、例えば、1 μ m~10mmの間、1 μ m~1mmの間、1~100 μ mの間、及び/又は1~10 μ mの間のチャネルに合流するビーズ保持セグメントを有してシグナル検出セグメントを形成してもよい(ブロック306)。

50

【0123】

基材を滅菌して、ウェルと協働する磁気ビーズを用いて標的被分析物を流動分析するパッケージ及び／又はキットを提供する（ブロック308）。

【0124】

ウェルは、1つ以上の増幅試薬との反応ウェルでもよい（ブロック310）。

【0125】

ウェルのアレイは、 $6,000/\text{mm}^2$ から約 $10,000/\text{mm}^2$ 、典型的には約 $6,000/\text{mm}^2$ の密度で配置してもよい（ブロック312）。

【0126】

ウェルのアレイは、 $10,000/\text{cm}^2 \sim$ 約 $2,000,000/\text{cm}^2$ の密度で提供してもよい（ブロック314）。 10

【0127】

ビーズ保持セグメントは、周囲が、標的（例えば、磁気）ビーズの直径と同じか又は約195%以内、すなわち標的ビーズの直径の101%～195%又は150%の間の幅でもよい（ブロック316）。

【0128】

ウェルは、100～150 fLの反応量、20 fLのビーズ容積を有していてもよい（ブロック318）。

【0129】

図19は、本発明の実施形態によるアッセイを評価する方法のフローチャートである。アッセイシグナルは、反応ウェルの複数のシグナル読み出しセグメントから電子的に検出され、反応ウェルのそれぞれは、それぞれのビーズ保持セグメント内のウェルによって保持されたビーズから分離される（ブロック350）。「電子的に」という用語は、カメラ、例えばCCDカメラ、SEMなどの機械ベースの検出（人の視覚ではない）のすべての形態を指す。シグナルは、光散乱特性（透明度）の変化、透過率又は吸光度の変化、化学発光又は異なるパラメータの組み合わせを含む、強度、蛍光、1つ以上の定義された色、定義されたピクセルパラメータなどの増加であってもよい。 20

【0130】

アッセイシグナルは、反応が起こって陽極を識別した後に、ビーズ保持セグメントから空間的に分離されたシグナル読み出しセグメントをそれぞれ有するビーズウェルのアレイから電子的に検出してもよい（ブロック352）。 30

【0131】

シグナル読み出しセグメントは、ビーズ保持セグメント（単数又は複数）の直径よりも小さい幅及び／又は深さを有する長手のチャンネルを含む（ブロック354）。

【0132】

シグナル読み出しセグメントは、ビーズ保持セグメント（単数又は複数）と流体連通する環状流体チャンネルを含む（ブロック356）。

【0133】

アッセイシグナルは、PCR又はELISAに基づくアッセイの為のものである（ブロック358）。 40

【0134】

同じサイズのビーズ又は異なるサイズのビーズを用いて、複数のプライマーセットを互いに又は異なる参照ゲノムに対してスクリーニングすることができ、少なくとも2つのビーズが2つの（場合により異なるサイズの）ビーズ保持セグメント及び少なくとも1つの別個の読み出しセグメント（単数又は複数）を有する1つの反応ウェルによって保持される（ブロック360）。

【0135】

アッセイシグナルは、規定されたビーズセットを使用して、臨床サンプル又は実験室サンプルの核酸プロファイリングとしてもよい（ブロック362）。

【0136】

上記は本発明の例示であり、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。この発明のいくつかの例示的な実施形態について説明したが、当業者であれば、この発明の新規な教示及び利点から実質的に逸脱することなく、例示的な実施形態において多くの変更が可能であることを容易に理解できるであろう。したがって、そのような変更のすべては、特許請求の範囲に定義されるこの発明の範囲内に含まれることが意図される。したがって、前述は本発明の例示であり、開示された特定の実施形態に限定されるものと解釈されるべきではなく、開示された実施形態に対する変更、ならびに他の実施形態が、添付の特許請求の範囲内に含まれるものとすることは理解できよう。この発明は、下記に示す添付の特許請求の範囲によって定義され、その中に含まれる特許請求の範囲の等価物によって定義される。

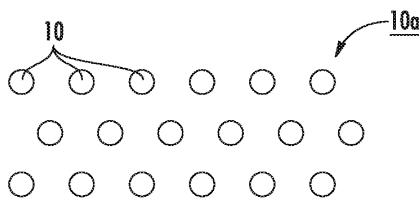
10

【符号の説明】

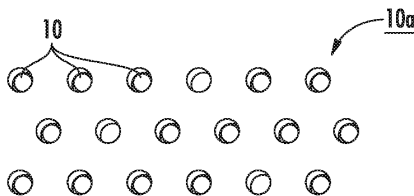
【 0 1 3 7 】

- 1 0 ビーズウェル
- 1 0 a アレイ
- 1 1 ビーズ保持セグメント
- 1 5 シグナル検出セグメント
- 2 5 ビーズ

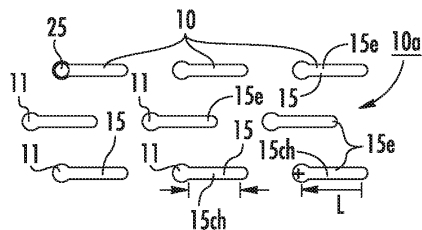
【 図 1 A 】



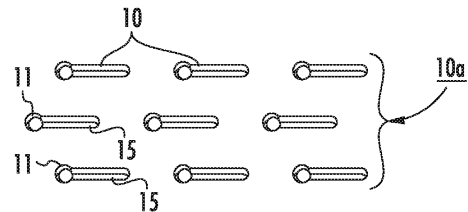
【 図 1 B 】



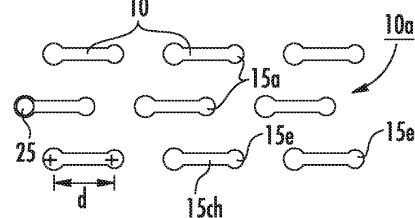
【 図 2 A 】



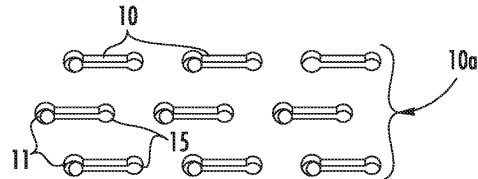
【 図 2 B 】



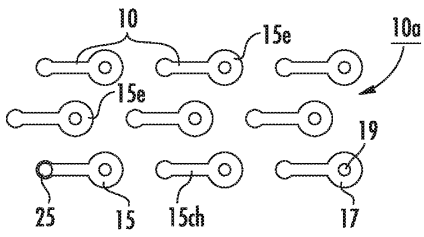
【 図 3 A 】



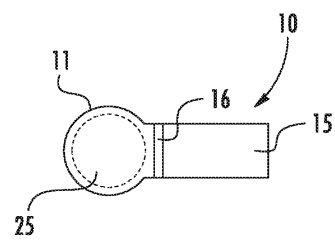
【 図 3 B 】



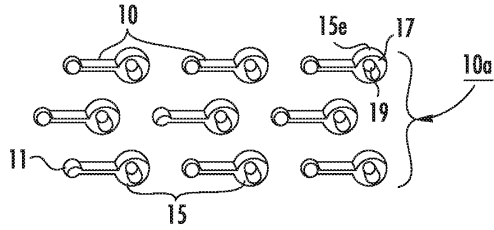
【図 4 A】



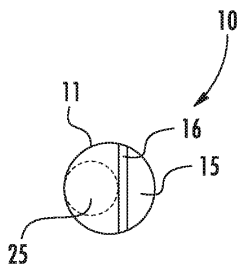
【図 5 B】



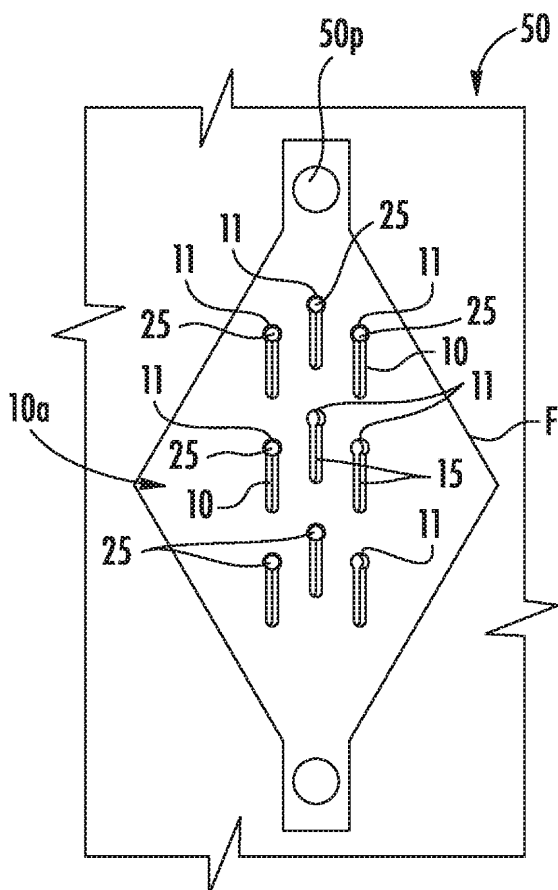
【図 4 B】



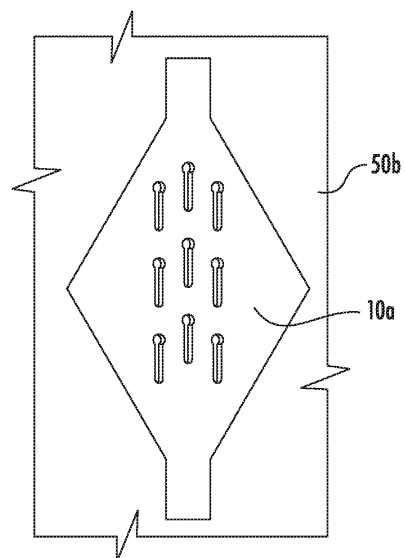
【図 5 A】



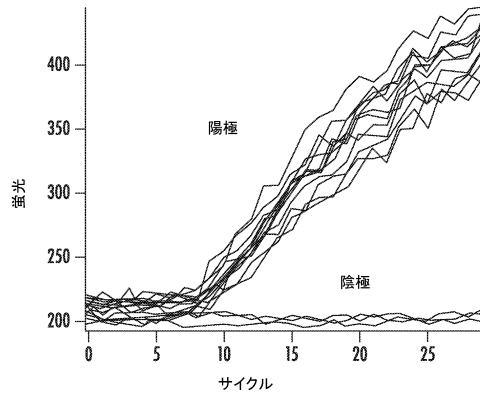
【図 6 A】



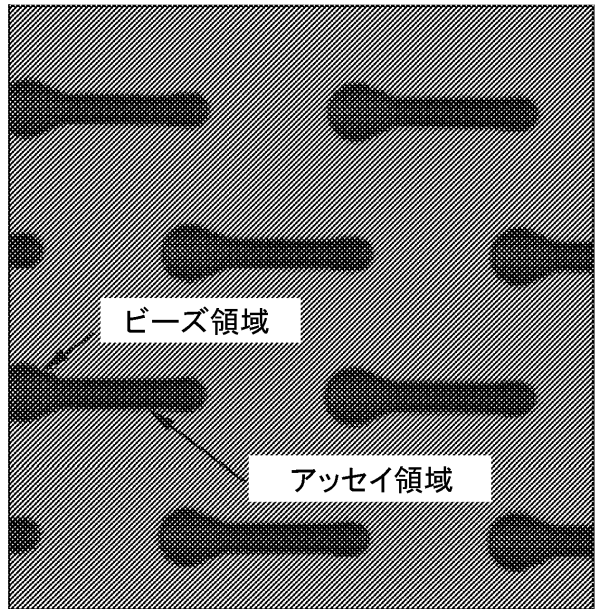
【図 6 B】



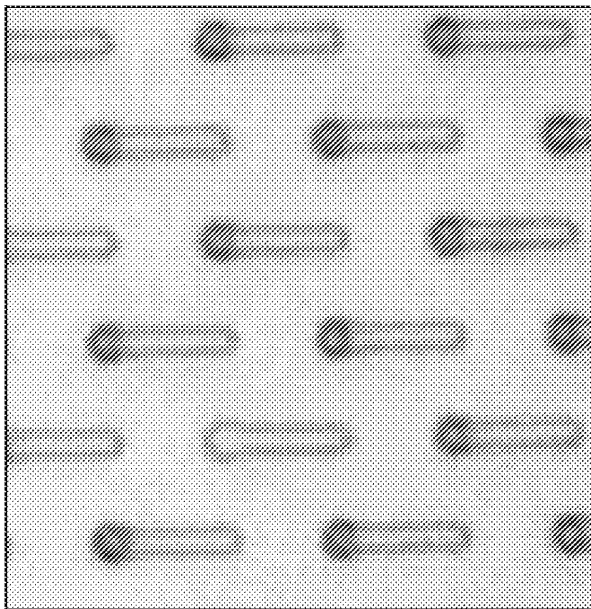
【図 7 B】



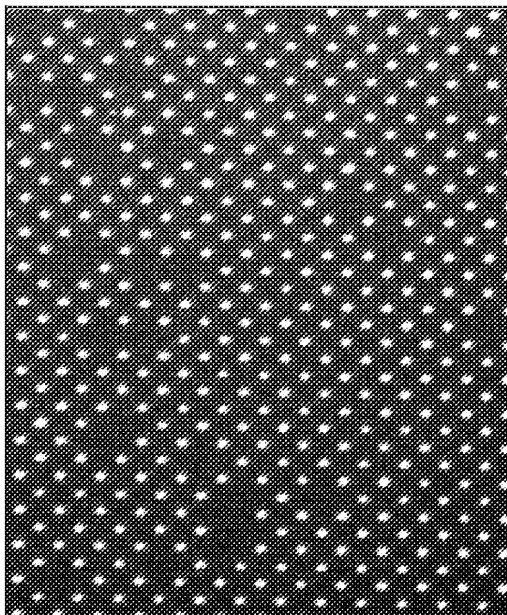
【図 8 A】



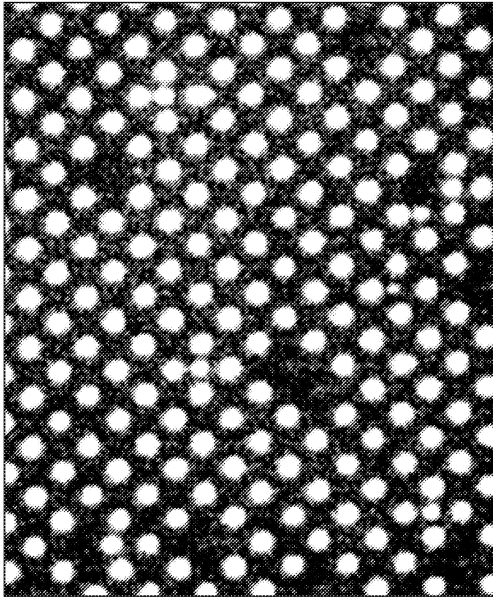
【図 8 B】



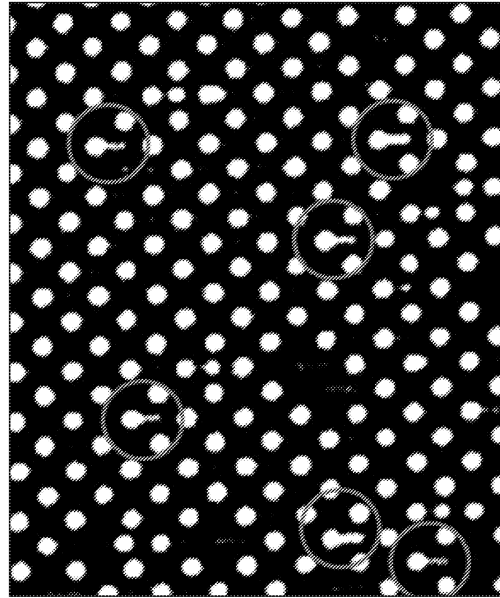
【図 8 C】



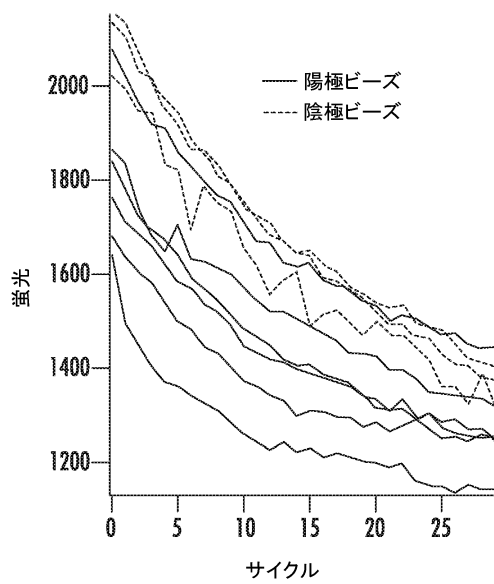
【図 9 A】



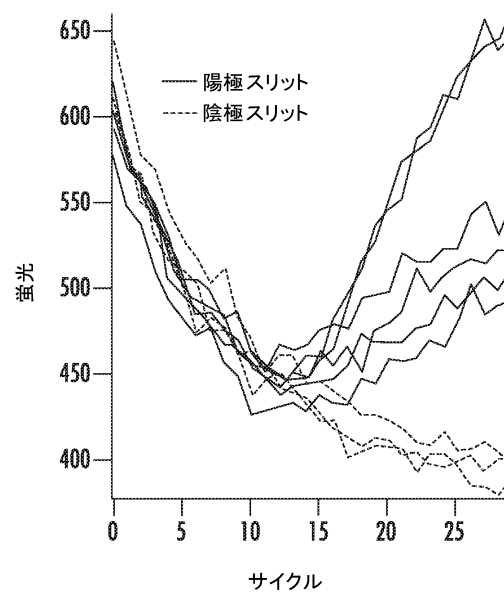
【図 9 B】



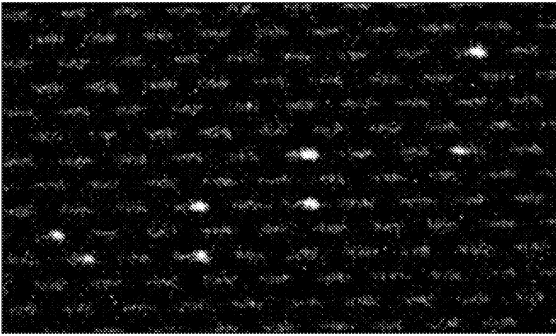
【図 10 A】



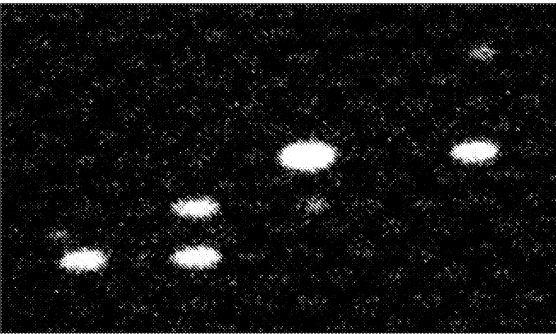
【図 10 B】



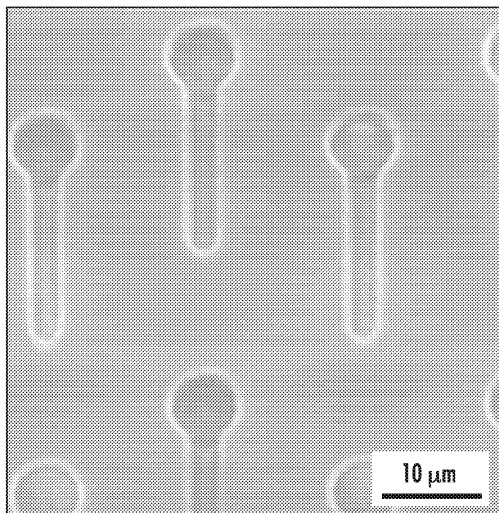
【図 1 1 A】



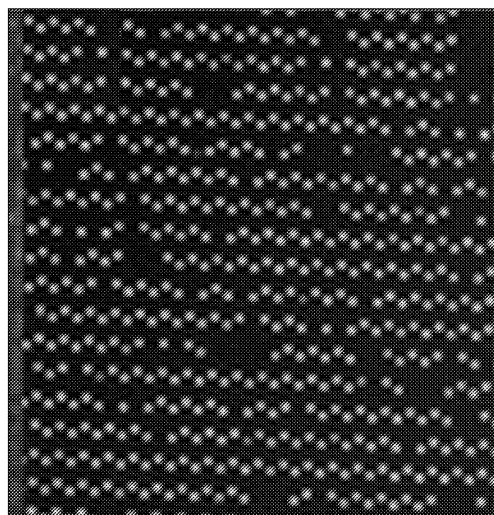
【図 1 1 B】



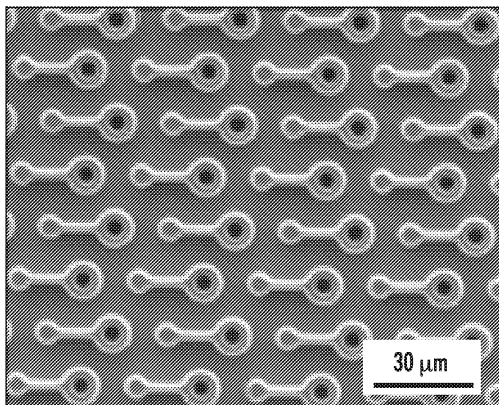
【図 1 2 A】



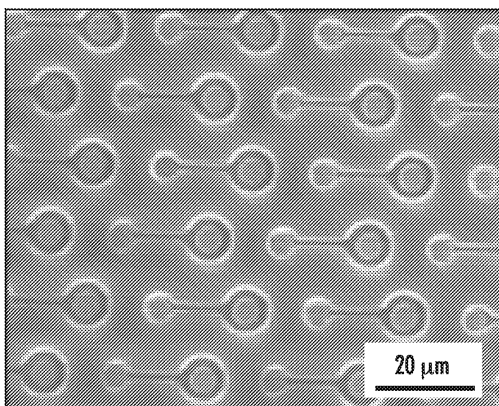
【図 1 2 B】



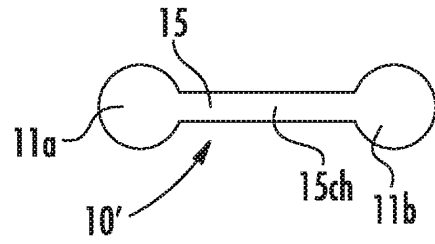
【図 1 3 A】



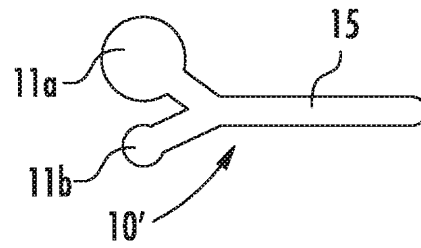
【図 1 3 B】



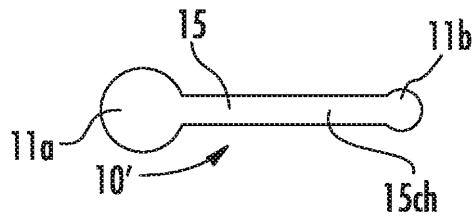
【図14A】



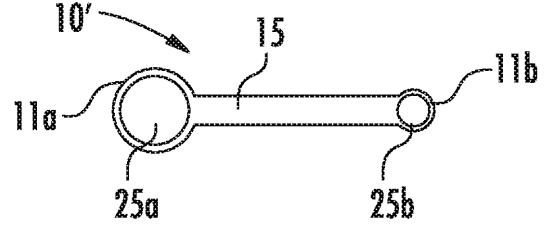
【図14C】



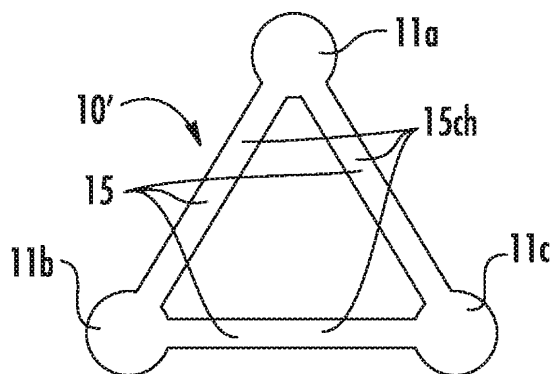
【図14B】



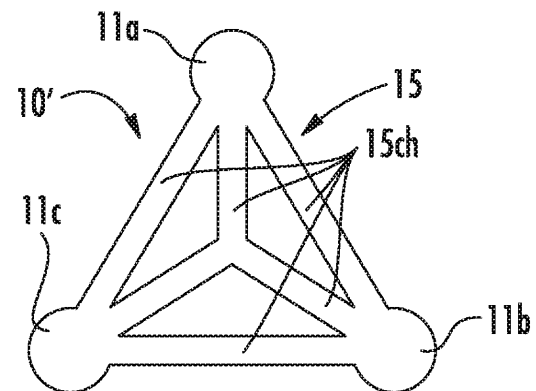
【図14D】



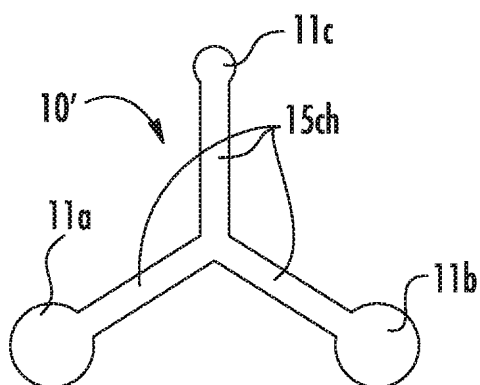
【図15A】



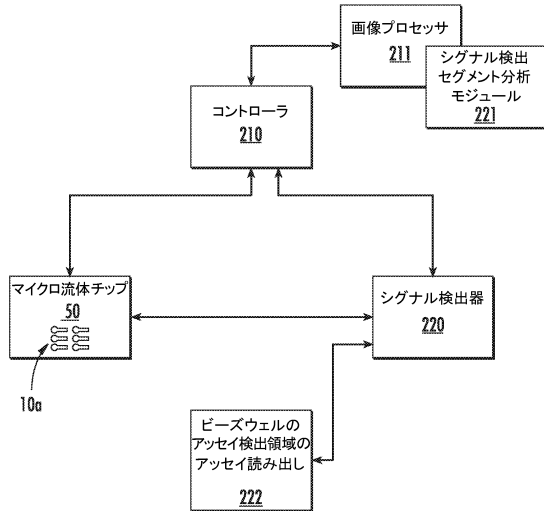
【図15C】



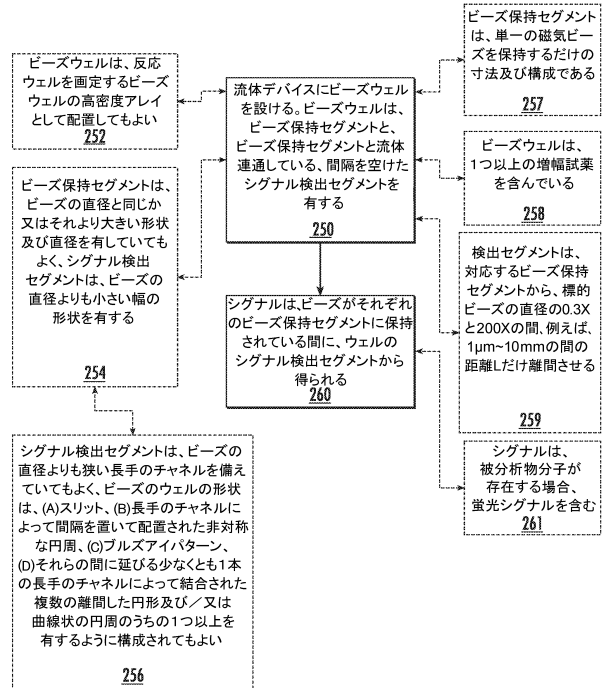
【図15B】



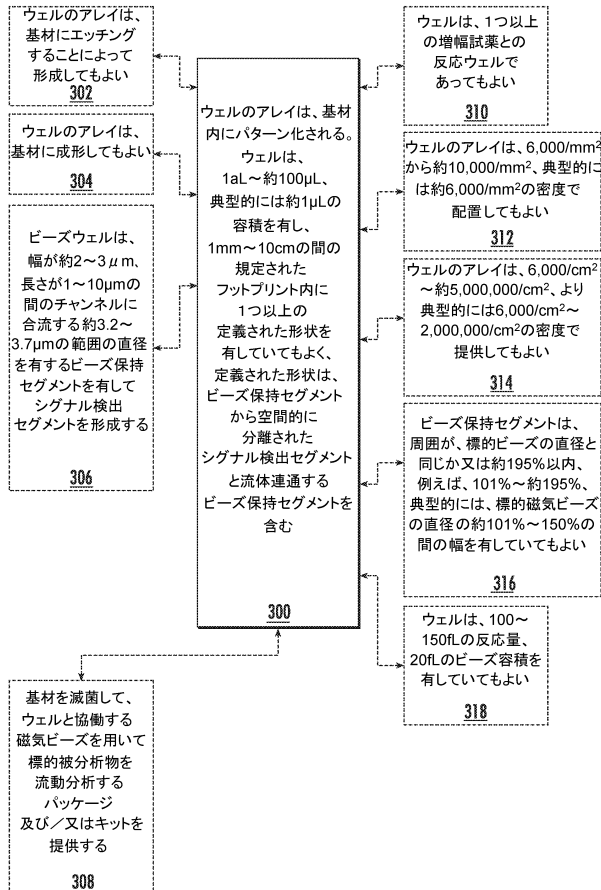
【図 16】



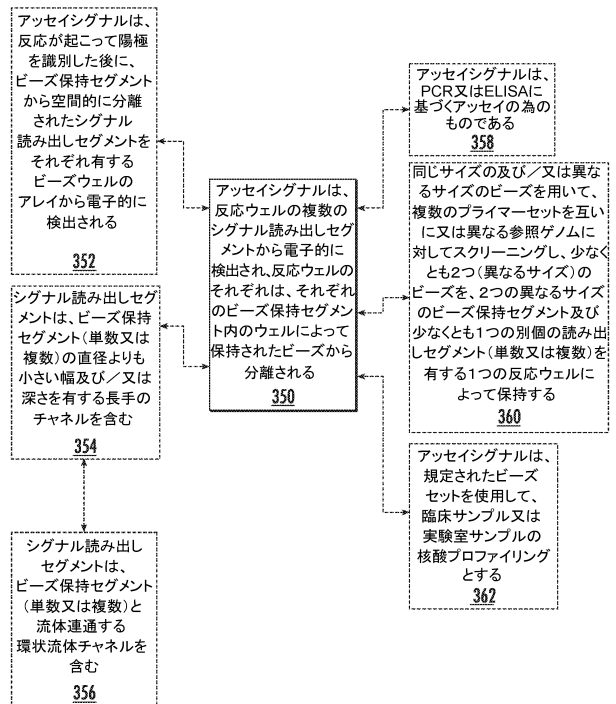
【図 17】



【図 18】



【図 19】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/6823 (2018.01) C 1 2 Q 1/6823 Z

(72)発明者 ヘンリー, ウィリアム ハンプトン
アメリカ合衆国 2 7 5 1 6 ノースカロライナ州 チャペル ヒル, ノースウッド ドライブ
2 0 3

審査官 福田 裕司

(56)参考文献 特開2011-196849(JP, A)
特開2010-112839(JP, A)
特開2009-195160(JP, A)
国際公開第2014/052671(WO, A1)
国際公開第2012/026541(WO, A1)
米国特許第06589779(US, B1)
米国特許出願公開第2010/0055766(US, A1)
特表2016-536983(JP, A)
国際公開第2012/121310(WO, A1)
特表2004-529323(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 5 / 0 0 ~ 3 7 / 0 0
G 0 1 N 2 1 / 6 4
C 1 2 Q 1 / 6 8 3 7
C 1 2 Q 1 / 6 8 6
C 1 2 Q 1 / 6 8 2 3