

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6265581号
(P6265581)

(45) 発行日 平成30年1月24日(2018.1.24)

(24) 登録日 平成30年1月5日(2018.1.5)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G O 1 N	37/00	(2006.01)	G O 1 N	37/00	1 O 1

請求項の数 12 (全 108 頁)

(21) 出願番号	特願2011-275368 (P2011-275368)	(73) 特許権者	504031078
(22) 出願日	平成23年12月16日(2011.12.16)		ハンディラブ・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2009-502930 (P2009-502930) の分割		アメリカ合衆国ニュージャージー州074 17, フランクリン・レイクス, ベクトン ・ドライブ 1
原出願日	平成19年3月26日(2007.3.26)	(74) 代理人	100140109
(65) 公開番号	特開2012-55321 (P2012-55321A)		弁理士 小野 新次郎
(43) 公開日	平成24年3月22日(2012.3.22)	(74) 代理人	100075270
審査請求日	平成23年12月16日(2011.12.16)		弁理士 小林 泰
審査番号	不服2015-17185 (P2015-17185/J1)	(74) 代理人	100101373
審査請求日	平成27年9月18日(2015.9.18)		弁理士 竹内 茂雄
(31) 優先権主張番号	60/786,007	(74) 代理人	100118902
(32) 優先日	平成18年3月24日(2006.3.24)		弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100153028
(31) 優先権主張番号	60/859,284		弁理士 上田 忠
(32) 優先日	平成18年11月14日(2006.11.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小流体サンプルを処理するための一体化システム及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微小流体用基板を備える微小流体用のカートリッジであって、前記微小流体用基板は、
第1のPCR反応室と、
第2のPCR反応室と、
基板上に第1のサンプルを受け取るための第1のサンプルポートであって、第1のPCR
R反応室との間で流体が移動可能な第1のサンプルポートと、
基板上に第2のサンプルを受け取るための第2のサンプルポートであって、第2のPCR
R反応室との間で流体が移動可能な第2のサンプルポートと、
第1のPCR反応室との間で流体が移動可能な第1の出口と、
第2のPCR反応室との間で流体が移動可能な第2の出口と、
第1のサンプルポート及び第1の出口と第1のPCR反応室とを分離するための微小流
体用の第1の組のバルブと、
第2のサンプルポート及び第2の出口と第2のPCR反応室とを分離するための微小流
体用の第2の組のバルブと
を備え、

第1及び第2の組のバルブによる分離によって、第1及び第2のPCR反応室から及び
これらPCR反応室への液体の移動を阻止し、

第1及び第2のPCR反応室、第1及び第2のサンプルポート、第1及び第2の出口、
並びに、第1及び第2の組のバルブは、基板上に構成され、

第 1 の組のバルブは、第 2 の組のバルブと独立して動作する、
ことを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の微小流体用において、第 1 及び第 2 の P C R 反応室は、1 又は複数の
ポリヌクレオチドを相互に独立して増幅するよう構成されていることを特徴とする微小流
体用のカートリッジ。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の微小流体用基板において、第 1 及び第 2 の出口はそれぞれ第 1 及び第
2 の孔によって構成されていることを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の微小流体用基板において、第 1 及び第 2 のサンプルポートはそれぞれ
、ピペット・チップから第 1 及び第 2 のサンプルを受け取るよう構成されていることを特
徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の微小流体用基板において、第 1 及び第 2 の P C R 反応室の少なくとも
一方において、リアル・タイム P C R を実行することができるよう構成されていることを
特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の微小流体用基板において、第 1 及び第 2 の組のバルブは、加熱され
ると溶解し、第 1 及び第 2 の P C R 反応室を封鎖する温度反応型の物質で構成されているこ
とを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 7】

微小流体用基板を備える微小流体用のカートリッジであって、前記微小流体用基板は、
複数のサンプル・レーンであって、各々が相互に流体が移動可能なネットワークを構成
している複数のサンプル・レーンを備え、サンプル・レーンの各々が、

基板上にサンプルを受け取るためのサンプルポートと、

出口孔と、

第 1 及び第 2 のバルブと、

サンプルポートから第 1 のバルブを介して P C R 反応室に延びる第 1 のチャンネルと、

P C R 反応室から第 2 のバルブを介して出口孔に延びる第 2 のチャンネルと

を備え、

第 1 及び第 2 のバルブは、P C R 反応室への流体の移動又は P C R 反応室からの流体の
移動を阻止するように、サンプルポート及び出口孔と P C R 反応室とを分離するよう構成
され、

P C R 反応室、第 1 及び第 2 のバルブ、サンプルポート、出口孔、第 1 及び第 2 のチャ
ネルは、基板上に構成され、

第 1 のバルブは、第 1 のバルブ以外のバルブと独立して動作し、それにより、前記サン
プル・レーンは、互いに独立である、

ことを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の微小液適用基板において、複数のサンプル・レーンのそれぞれは、相
互に 1 又は複数のポリヌクレオチドを独立して増幅するよう構成されていることを特徴と
する微小流体用のカートリッジ。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の微小流体用基板において、複数のサンプル・レーンのそれぞれは、バ
ブル抜け孔を備えていることを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の微小流体用基板において、サンプルポートは、ピペット・チップから
サンプルを受け取るよう構成されていることを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

請求項 7 に記載の微小流体用基板において、該基板は、少なくとも 1 つの PCR 反応室においてリアル・タイム PCR を実行することが可能に構成されていることを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【請求項 1 2】

請求項 7 に記載の微小流体用基板において、第 1 及び第 2 のバルブは、加熱されると溶解して PCR 反応室を封鎖する物質で構成されていることを特徴とする微小流体用のカートリッジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、35 U.S.C. § 119 (e) に基づいて、2006 年 3 月 24 日に出願した米国仮特許出願第 60/786,007 号、及び 2006 年 11 月 14 日に出願した第 60/859,284 号の優先権を主張する。双方の内容は、ここで引用したことにより、全体が本願にも含まれるものとする。

【0002】

また、本願は、全て 2006 年 3 月 27 日に出願した米国意匠出願第 29/257,028 号、第 29/257,029 号、及び 29/257,030 号、並びに 2006 年 10 月 11 日に出願した米国特許出願第 11/580,267 号にも関係があり、その内容はここで引用したことにより本願にも含まれるものとする。

【0003】

ここに記載する技術は、ポリヌクレオチド含有サンプルを処理し、これに対して診断検査を実行するための一体化装置に関する。更に特定すれば、本技術は、サンプルを受ける微小流体カートリッジを、ベンチ・トップ・システム (bench-top system) と共に用いて、生物サンプルに対する診断結果を得るための装置に関する。本技術の使用方法についてもここに記載する。

【背景技術】

【0004】

医療診断業界は、今日の健康管理インフラストラクチャの肝要な要素である。しかしながら、現在では、診断分析は、作業手順がどうであれ、患者の世話が隘路になっている。これには、いくつかの理由がある。第 1 に、大抵の場合、サンプルを収集し、診断結果を得るまでの間には、診断分析において数個のステップがあり、操作者には異なるレベルの技量が要求され、異なるレベルの機器の複雑さが必要となる。例えば、生物サンプルは、一旦被験者から抽出したならば、処理体制に適した形態にしておかなければならず、そのためには、通例、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて対象のヌクレオチドを増幅することを伴う。一旦増幅したなら、サンプル内における対象のヌクレオチドの存在を明確に判定する必要がある。サンプルの準備は、自動化し易いプロセスであるが、比較的日常的に殆どいづれの場所でも実行されている。対照的に、PCR のようなステップ及びヌクレオチド検出は、専門機器に接近することができる、特別に訓練された個人の領域に属するのが習慣的である。第 2 に、多くの診断分析は、高度に特殊な機器でなければ行うことができず、高価であると共に、訓練を受けた臨床家 (clinician) でなければ操作することができない。このような機器は、少数の場所、多くの場合いづれの所与の都市区域においても僅かに一台しか置かれていない。これが意味するのは、殆どの病院はサンプルを分析のためにこれらの場所へ送らなければならない、これによって出荷コストや輸送遅延、そして恐らくはサンプルの紛失又は混合までも誘発するということである。第 3 に、一部の特殊機器は、通例、「オンデマンド」では利用できず、代わりにバッチで作動するので、これによって多くのサンプルには処理時間の遅延が生ずる。何故なら、これらは、機械が充填するのを待ってからでないと、処理できないからである。

【0005】

特定の診断を遂行するための生物サンプルの分析は、通例、サンプルの中にある 1 つ以上のポリヌクレオチドを検出することを含む。検出の一例に定性検出があり、例えば、ポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドの存在の判断、及び/又は、例えば、種類、サイズ、突然変異の有無、及び/又はポリヌクレオチドのシーケンスに関する情報の判断に関する。検出の別の一例には定量検出があり、例えば、存在するポリヌクレオチドの量の判断に関する。したがって、検出は一般に定性的及び定量的双方の面を含むと言える。ポリヌクレオチドを定性的に検出する場合、サンプルにおいて非常に少量の存在を確定することを含むことが多い。したがって、感度を高めるためには、問題のポリヌクレオチドの量を増幅することが多い。例えば、検出方法には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)又は関係する増幅技法によるポリヌクレオチド増幅を含む場合がある。このような技法は、酵素、プローブ、及び標識付け剤の内1つ以上を含む、含有物質の混合物を用いる。したがって、ポリヌクレオチドの検出は、種々の異なる試薬の使用が必要となる可能性があり、その多くは、その安全性を、使用中及び経時的に維持するためには、要注意の扱いを必要とする。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

サンプル・フローは、数個の主要なステップに別れることが分かっており、これらができるだけ多く自動化し、望ましくはできるだけ多くを1つの機械で遂行し、オンデマンドで多くのユーザに利用可能にする方法を検討することが望ましいであろう。したがって、サンプル準備、PCR、及び生物サンプル上における検出を、実行する別個のステップをできるだけ少なくするような方法で実行する方法及び装置が求められている。

【0007】

20

この技術に対する背景の論述は、技術のコンテキスト(context)を説明するために含まれている。これは、特許請求の範囲のいずれの優先日においても、引用する素材のいずれもが公開されている、公知であり、又は共通の一般的知識の一部であることの承認とは受け取らないこととする。

【0008】

本明細書の説明及び特許請求の範囲全体を通じて、「備えている」(comprise)並びに"comprising"及び"comprises"のようなその変形は、他の追加の物、成分、完全体、又はステップを除外することは意図していない。

【課題を解決するための手段】

【0009】

30

本装置は、挿入可能な微小流体カートリッジを収容するように構成されている受容ベイと、カートリッジに熱的に結合されており、カートリッジ上に保持してあるポリヌクレオチド含有生物サンプルの微小液滴を形成し、微小液滴を微小流体カートリッジの1つ以上の位置間で移動させ、細胞が生物サンプル内に存在する場合、当該細胞を溶解することにより、細胞からポリヌクレオチドを放出し、増幅のためにポリヌクレオチドの1つ以上を準備し、ポリヌクレオチドの1つ以上を増幅するために、1つ以上の選択した時点で、カートリッジにおいて選択した1つ以上の領域に熱を加えるように構成されている少なくとも1つの熱源と、1つ以上の増幅したポリヌクレオチドの存在を検出するように構成されている検出器と、検出器と少なくとも1つの熱源とに結合されているプロセッサであって、1つ以上の選択した時点で微小流体カートリッジの1つ以上の選択した領域に対して行う加熱を制御するように構成されている、プロセッサとを備えている。

40

【0010】

本システムは、更に、装置と相補的カートリッジとを備えており、装置及びカートリッジが共にカートリッジに注入されているサンプルを処理し、このサンプルに関する診断結果を与える一体型システムも備えている。

【0011】

本装置の受容ベイは、この中で更に説明し添付図面において例示するように、微小流体カートリッジを選択的に収容するように構成されている。例えば、受容ベイ及び微小流体カートリッジは、形状を相補的とすることができ、微小流体カートリッジを、例えば、1つの向きで選択的に収容できるようになっている。微小流体カートリッジは、受容ベイの

50

相補的機構にはまりこむ位置合わせ部材を有することができる。選択的にカートリッジを収容することにより、受容ベイは、装置がカートリッジに対して適正に動作することができるように、ユーザがカートリッジを配置するのを助けることができる。また、受容ベイは、微小流体カートリッジ上で動作する装置の種々の構成要素（ヒート・ポンプ、ペルティエ・クーラ、排熱電子エレメント、検出器、動力部材など）を、微小流体カートリッジ上で適正に動作するように位置付けることができるように、構成することもできる。例えば、接触熱源を受容ベイ内に配置し、選択的に受容ベイに収容することができる微小流体カートリッジの1つ以上の別個の位置にこの熱源を熱的に結合することができるようにする。

【0012】

ヒート・ポンプは、例えば、抵抗器、液体充填熱転移回路又は熱電エレメントのような可逆的ヒート・ポンプ、キセノン・ランプのような放射熱源等のような、熱源とすることができる。ヒート・ポンプは、微小流体エレメントに熱を供給するためだけでなく、ある種の試薬の活動を抑え、微小チャネル内の液体を凍結してその相を液体から固体に変化させ、空気室の圧力を低下させて部分的な真空を発生する等のために用いることができる。

【0013】

本装置の種々の実施形態では、本装置は、更に、微小流体カートリッジに対して相補的な位置合わせ部材を含むことができ、これによって、受容ベイは微小流体カートリッジを1つの向きで収容する。本装置は、更に、プロセッサに結合されているセンサを備えており、このセンサは、微小流体カートリッジが収容されているか否か検知するように構成されている。

【0014】

プロセッサは、受容ベイ内に配置した微小流体カートリッジにおいてポリヌクレオチド又はそのプローブを検出するために、検出器を動作させるようにプログラム可能とすることができる。

【0015】

検出器は、例えば、光検出器とすることができる。例えば、検出器は、蛍光染料の吸収帯において光を放出する光源と、蛍光染料の発光帯において光を検出する光検出器とを含むことができ、蛍光染料は蛍光ポリヌクレオチド・プローブ又はその断片に対応する。例えば、光検出器は、選択的に蛍光染料の吸収帯において光を放出するバンドパス・フィルタ・ダイオードと、選択的に蛍光染料の発光帯において光を検出するバンドパス・フィルタ・フォトダイオードとを含むことができ、あるいは、例えば、光検出器は、異なる蛍光発光スペクトルを有する複数の蛍光染料を独立して検出するように構成することができ、各蛍光染料は、蛍光ポリヌクレオチド・プローブ又はその断片に対応し、あるいは、例えば、光検出器は、カートリッジ内の複数の異なる場所において複数の蛍光染料を独立して検出するように構成することができ、各蛍光染料は、蛍光ポリヌクレオチド・プローブ又はその断片に対応する。

【0016】

プロセッサは、例えば、少なくとも1つのヒート・ポンプを動作させるようにプログラム可能とすることができる。

【0017】

種々の実施形態において、少なくとも1つのヒート・ポンプは、抵抗性ヒータ、ラジエータ、流体熱交換機、及びペルティエ・デバイスから選択する接触熱源とすることができる。接触熱源は、前受容ベイにおいて、当該受容ベイに収容されている微小流体カートリッジの別個の場所に熱的に結合するように構成することができ、これによって、別個の場所を選択的に加熱することができる。少なくとも1つの追加の接触熱源を含むことができ、この場合、接触熱源は、各々、受容ベイにおいて、当該受容ベイに収容されている微小流体カートリッジの異なる別個の場所と独立して熱的に結合するように構成することができ、これによって別個の場所を独立して加熱することができる。接触熱源は、受容ベイに収容されている微小流体カートリッジの別個の場所と直接物理的に接触するように構成す

10

20

30

40

50

ることができる。種々の実施形態では、各接触熱源ヒータは、二次元における(in 2 dimensions)平均直径が約1ミリメートル(mm)から約15mm(通例約1mmから約10mm)である別個の場所、又は約1mm²のために選択的とする及び約225mm²の間(通例、約1mm²及び約100mm²の間、又は実施形態によっては、約5mm²及び約50mm²の間)の表面積を有する別個の場所を加熱するように構成することができる。

【0018】

種々の実施形態では、本装置は、接触熱源において伸展層を含むことができ、この伸展層は、接触熱源を、受容ベイに収容されている微小流体カートリッジの少なくとも一部と熱的に結合するように構成されている。伸展層は、約0.05及び約2ミリメートルの間での厚さと、約25及び約100の間のショア硬度を有することができる。

10

【0019】

種々の実施形態では、少なくとも1つのヒート・ポンプは、受容ベイに収容されている微小流体の別個の場所を直接加熱するように構成されている抵抗性熱源とすることができる。

【0020】

種々の実施形態では、1つ以上の動力部材は、受容ベイに収容されている微小流体カートリッジの少なくとも一部に力を加えるように構成されている。

【0021】

種々の実施形態では、1つ以上の動力部材は、少なくとも1つのヒート・ポンプを微小流体カートリッジの少なくとも一部に熱的に結合するために力を加えるように構成することができる。1つ以上の動力部材は、微小流体カートリッジにおいて機械的部材を動作させるように構成することができ、穿孔可能リザーバ、弁(バルブ)、又はポンプから成る一群から機械的部材を選択する。

20

【0022】

種々の実施形態では、1つ以上の動力部材は、微小流体カートリッジにおける複数の場所に力を加えるように構成することができる。1つ以上の動力部材によって力を加えることにより、受容ベイの一部と微小流体カートリッジの一部との間の界面に、平均で約5キロパスカル及び約50キロパスカルの間の圧力を発生することができ、例えば、平均圧力は、少なくとも、約14キロパスカルとすることができる。少なくとも1つの動力部材を手動で動作させることができる。少なくとも1つの動力部材を受容ベイの蓋に機械的に結合することができ、これによって、蓋の動作で動力部材が動作することになる。

30

【0023】

種々の実施形態では、本装置は、更に、受容ベイにおいて蓋を含むことができ、この蓋は、受容ベイから少なくとも部分的に周囲光を除外するように動作可能である。蓋は、例えば、滑動扉とすることができる。蓋は、光検出器を含むことができる。光検出器又は受容ベイにおける蓋の主面は、約100マイクロメートル未満だけ、例えば、約25マイクロメートル未満だけ、平坦からばらつきがあることが可能である。蓋は、装置から取り外し可能に構成することができる。蓋は、係留部材を含むことができる。

【0024】

種々の実施形態では、本装置は、更に、プロセッサに結合されている少なくとも1つの入力デバイスを含むことができる。

40

【0025】

種々の実施形態では、本装置は、更に、装置から取り外し可能に構成されている加熱ステージを含むことができ、ヒート・ポンプの少なくとも1つを加熱ステージに配置することができる。

【0026】

種々の実施形態では、カートリッジは、更に分析ポートを含むことができる。分析ポートは、外部サンプル・システムが、微小流体カートリッジにおいてサンプルを分析できるように構成することができ、例えば、分析ポートは、装置内の孔又は窓とすることができる。微小流体カートリッジにおいて現場でサンプルを分析することができる光検

50

出プローブを受け入れることができる。

【0027】

実施形態によっては、分析ポートは、微小流体カートリッジから外部サンプル・システムにサンプルを送出するように構成することができる。例えば、分析ポートは、微小流体カートリッジと流体連通する導管を含むことができ、液体サンプルをクロマトグラフ装置、光学分光計、質量分光計等に送 Out することができる。

【0028】

実施形態によっては、本装置は、微小流体カートリッジを1つの向きで収容するように構成されている受容ベイと、受容ベイに熱的に結合されている少なくとも1つの放射熱源と、別個の場所に熱的に結合されるように受容ベイにおいて構成され、これによって別個の場所を選択的に加熱することができる少なくとも2つの接触熱源と、受容ベイに収容されている微小流体カートリッジの少なくとも一部に力を加えるように構成されている1つ以上の動力部材であって、1つ以上の動力部材の内少なくとも1つは接触熱源を別個の場所に熱的に結合するために力を加えるように構成することができ、1つ以上の動力部材の内少なくとも1つは微小流体カートリッジにおいて機械的部材を動作させるように構成することができる、穿孔可能リザーバから成る一群から機械的部材を選択する、動力部材と、受容ベイにおける蓋であって、受容ベイから周囲光を少なくとも部分的に除外するように動作可能であり、1つ以上の蛍光染料を独立して検出するように構成されており、任意に異なる蛍光発光スペクトルを有する光検出器を備えており、各蛍光染料が蛍光ポリヌクレオチド・プローブ又はその断片に対応する、蓋と、キーボード、接触感応面、マイクロフォン、及びマウスから成る一群から選択した少なくとも1つの入力デバイスと、ハード・ディスク・ドライブ、光ディスク・ドライブから成る一群から選択した少なくとも1つのデータ記憶媒体と、シリアル接続、パラレル接続、ワイヤレス・ネットワーク接続、及び有線ネットワーク接続から成る一群から選択した通信インターフェースと、光学式キャラクタ・リーダ、バーコード・リーダ、及び無線周波数タグ・リーダから選択したサンプル識別器と、ディスプレイ、プリンタ、スピーカから選択した少なくとも1つの出力と、検出器、センサ、熱源、入力、及び出力と結合されているプロセッサとを含むことができる。

【0029】

微小流体カートリッジは、微小流体ネットワークと、この微小流体ネットワークと流体連通する保持部材とを含むことができ、保持部材は、少なくとも1つのポリメラーゼ連鎖反応インヒビタに対して少なくとも1つのポリヌクレオチドのために選択的とする。実施形態によっては、微小流体カートリッジは、位置合わせ部材も含む。

【0030】

微小流体カートリッジの種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、更に、微小流体ネットワークと流体連通するサンプル入口弁を含むことができる。サンプル入口弁は、周囲圧力と比較して約20キロパスカル及び200キロパスカルの間、例えば、約70キロパスカル及び110キロパスカルの間の圧力差でサンプルを受け入れるように構成することができる。

【0031】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、サンプル入口弁と流体連通するフィルタを含むことができ、このフィルタは、サンプル入口において導入するサンプル混合物から少なくとも1つの成分を分離するように構成されている。

【0032】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、微小流体ネットワークと流体連通する少なくとも1つの熱作動ポンプを含むことができる。熱作動ポンプは、気体、25及び100の間の温度及び1気圧で気化することができる液体、及び膨張性ポリマから選択した熱膨張性材料を含むことができる。

【0033】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、微小流体ネットワークと流体連通する

10

20

30

40

50

少なくとも1つの熱作動弁を含むことができる。熱作動弁は、25 及び100 の間の温度及び1気圧において固相 - 液相遷移を有する材料を含むことができる。

【0034】

種々の実施形態において、微小流体ネットワークは、試薬、緩衝液、又は溶剤を収容した少なくとも1つの封止リザーバを含むことができる。封止リザーバは、例えば、試薬、緩衝液、又は溶剤を微小流体ネットワークと流体連通させるように構成されている自己穿孔可能プリスタ・パックとすることができる。

【0035】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、少なくとも少なくとも1つの疎水ベント（抜け孔）を含むことができる。

10

【0036】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、細胞ごみのような流体及び/又は粒子物のような廃棄物を受け取り貯蔵するように構成されている少なくとも1つのリザーバを含むことができる。

【0037】

種々の実施形態では、保持部材は、ポリアルキレン・イミン又はポリカチオニック・ポリアミド、例えば、ポリエチレン・イミン、ポリ-L-リシン、又はポリ-D-リシンを含むことができる。保持部材は1つ以上の粒子の形態とすることができる。保持部材は、微小流体カートリッジから取り出し可能とすることができる。

【0038】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、溶解試薬を含むことができる。溶解試薬は、界面活性剤の1つ以上の凍結乾燥ペレットを含むことができ、微小流体ネットワークは、界面活性剤の凍結乾燥ペレットを、液体と接触させて、溶解試薬溶液を作成するように構成することができる。微小流体ネットワークは、サンプルを溶解試薬と接触させて、溶解サンプルを生成するように構成することができる。

20

【0039】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、外部熱源からの熱をサンプルに結合して、溶解サンプルを生成するように構成することができる。例えば、微小流体ネットワークは、保持部材及び溶解サンプルを接触させて、ポリヌクレオチド装填保持部材を作成するように構成することができる。

30

【0040】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、更に、ポリヌクレオチド装填保持部材を液体から分離するように構成されているフィルタを含むことができる。

【0041】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、更に、洗浄緩衝液を収容するリザーバを含むことができ、微小流体ネットワークは、ポリヌクレオチド装填保持部材を洗浄緩衝液と接触させるように構成することができ、例えば、洗浄緩衝液は、少なくとも約10のpHを有することができる。

【0042】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、放出緩衝液を収容するリザーバを含むことができ、微小流体カートリッジは、ポリヌクレオチド装填保持部材を放出緩衝液と接触させて、放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成するように構成することができる。

40

【0043】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、外部熱源からの熱をポリヌクレオチド装填保持部材に結合して、放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成するように構成することができる。

【0044】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、中和緩衝液を収容するリザーバを含むことができ、微小流体ネットワークは、放出ポリヌクレオチド・サンプルを中和緩衝液と接触させて、中和ポリヌクレオチド・サンプルを作成するように構成することができる。

50

【0045】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、ポリメラーゼ酵素及び複数のヌクレオチドを含むPCR試薬混合物を含むことができる。PCR試薬混合物は、1つ以上の凍結乾燥ペレットの形態とすることができ、微小流体ネットワークは、PCRペレットを液体と接触させて、PCR試薬混合溶液を作成するように構成することができる。

【0046】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークは、外部熱源からの熱をPCR試薬混合物及び中和ポリヌクレオチド・サンプルを、中和ポリヌクレオチド・サンプルからPCRアンプリコンを作成するのに適した熱サイクル条件の下で結合するように構成することができる。

10

【0047】

種々の実施形態では、PCR試薬混合物は、更に、陽性対照プラスミドと、プラスミドの少なくとも一部のために選択的とする蛍光原混成プローブとを含むことができる。

【0048】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、陰性対照ポリヌクレオチドを含むことができ、微小流体ネットワークは、中和ポリヌクレオチド・サンプルのPCRアンプリコン及び陰性対照ポリヌクレオチドのPCRアンプリコンを独立して作成するのに適した熱サイクル条件の下で、中和ポリヌクレオチド・サンプル及び陰性対照ポリヌクレオチドの各々をPCR試薬混合物と独立して接触させるように構成することができる。

【0049】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる少なくとも1つのプローブを含むことができ、微小流体カートリッジは、中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンをプローブと接触させるように構成することができる。プローブは、蛍光原混成プローブとすることができる。蛍光原混成プローブは、蛍光リポータ染料及び蛍光消光染料に結合されているポリヌクレオチド・シーケンスを含むことができる。PCR試薬混合物は、更に、陽性対照プラスミドと、プラスミドの少なくとも一部のために選択的なプラスミド蛍光原混成プローブとを含むことができ、微小流体カートリッジは、蛍光原混成プローブ及びプラスミド蛍光原混成プローブの独立した光学的検出を可能にするように構成することができる。

20

【0050】

種々の実施形態では、プローブは、有機体の特徴付けることができるポリヌクレオチド・シーケンス、例えば、デオキシリボ核酸又はリボ核酸ポリヌクレオチドを用いたあらゆる有機体のために選択的とすることができる。つまり、プローブは、いずれの有機体のためにも選択することができる。適した有機体は、ほ乳類（ヒトを含む）、鳥類、は虫類、両生類、魚類、家畜、飼育動物、野生動物、絶滅した有機体、バクテリア、菌類、ウイルス、植物等を含む。また、プローブは、それら自体のポリヌクレオチドを用いる有機体、例えば、ミトコンドリアの成分のために選択的とすることもできる。実施形態の中には、プローブは、微小有機体、例えば、食品生産に用いられる有機体（発酵製品において用いられるイースト、チーズに用いられるカビ又はバクテリア等）又は病原体（例えば、ヒト、家畜又は野生動物、家禽又は野生鳥類等の）に用いられる有機体のために選択的とすることができる場合もある。実施形態の中には、プローブが、グラム陽性バクテリア、グラム陰性バクテリア、イースト、菌類、原生動物、及びウイルスから成る一群から選択した有機体のために選択的とすることができる場合もある。

30

40

【0051】

種々の実施形態では、プローブは、グループBストレプトコッカスの特徴を示すポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる。

【0052】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、発光原混成プローブの光学的検出を可能にするように構成することができる。

【0053】

50

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、更に、コンピュータ読み取り可能なラベルも含むことができる。例えば、ラベルは、バーコード、無線周波数タグ、又は1つ以上のコンピュータ読み取り可能キャラクタを含むことができる。ラベルは、機械的に伸展可能な材料で形成することができる。例えば、ラベルの機械的に伸展可能な材料は、約0.05及び約2ミリメートルの間の厚さと、約25及び約100の間のショア硬度とを有することができる。

【0054】

種々の実施形態では、取扱及び保管中、並びに室に挿入する前に、微小流体カートリッジを更に封止パウチで包囲することができる。微小流体カートリッジは、パウチの中に不活性ガスと共に封止することができる。封止パウチは、一塊の乾燥剤も収容することもできる。微小流体カートリッジは使い捨て型とすることができる。

10

【0055】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、1つ以上のサンプル・レーンを内蔵することができる。例えば、サンプル・レーンは、熱作動型ポンプ、熱作動型弁、サンプル入口弁、フィルタ、及び少なくとも1つのリザーバを含むことができる。レーンは互いに独立であることができ、又は部分的に依存することもでき、例えば、レーンが、溶解試薬のような、1つ以上の試薬を共有することができる。

【0056】

実施形態によっては、微小流体カートリッジが位置合わせ部材及び微小流体ネットワークを含むことができる。微小流体ネットワークは、流体連通した状態で、少なくとも1つの熱作動型ポンプ、少なくとも1つの熱作動型弁、周囲圧力と比較して約70キロパスカル及び110キロパスカルの間の圧力差でサンプルを受け入れるように構成されているサンプル入口弁、少なくとも1つのポリメラーゼ連鎖反応よりも少なくとも1つのポリヌクレオチドのために選択した保持部材であって、ポリアルキレン・イミン又はポリカチオンック・ポリアミドで形成した複数の粒子の形態である、保持部材、ポリヌクレオチド装填保持部材を液体から分離するように構成されているフィルタ、複数のリザーバであって、少なくとも1つが封止されている自己穿孔可能プリスタ・パック・リザーバである、リザーバを含むことができる。複数のリザーバは、とりわけ、リーシス試薬であって、微小流体ネットワークは、サンプル入口に導入されるサンプルを、リーシス試薬及び保持部材と接触させて、ポリヌクレオチド装填保持部材を作成するように構成されている、リーシス試薬と、洗浄緩衝液を収容するリザーバであって、微小流体ネットワークがポリヌクレオチド装填保持部材を洗浄緩衝液と接触させるように構成されている、リザーバと、放出緩衝液を収容するリザーバであって、微小流体ネットワークがポリヌクレオチド装填保持部材を放出緩衝液と接触させて放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成するように構成されている、リザーバと、中和緩衝液であって、微小流体ネットワークが放出ポリヌクレオチド・サンプルを中和緩衝液と接触させて、中和ポリヌクレオチド・サンプルを作成する、中和緩衝液と、ポリメラーゼ酵素、陽性対照プラスミド、プラスミドの少なくとも一部及び複数のヌクレオチドのために選択した蛍光原混成プローブを備えているPCR試薬混合物と、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる少なくとも1つのプローブであって、微小流体ネットワークが中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンをプローブと接触させるように構成することができる、プローブとを含むことができる。更に、微小流体ネットワークは、中和ポリヌクレオチド・サンプルからPCRアンプリコンを作成するのに適した熱サイクル条件の下で、外部熱源からの熱をPCR試薬混合物及び中和ポリヌクレオチド・サンプルに結合するように構成することができる。

20

30

40

【0057】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド分析システムは、微小流体カートリッジ及び、更にこの中で説明する、装置の双方を含むことができる。

【0058】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、微小流体ネットワーク

50

と、この微小流体ネットワークと流体連通する保持部材とを備えている微小流体カートリッジであって、少なくとも1つのポリメラーゼ連鎖反応インヒビタに対して少なくとも1つのポリヌクレオチドのために保持部材を選択する、微小流体カートリッジと、サンプル・コンテナと、シリンジのような液体転送部材とを含むことができる。

【0059】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、更に、サンプルをサンプル・コンテナから微小流体ネットワークに転送するために液体転送部材を用いる命令を含むことができる。

【0060】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、更に、サンプルをサンプル・コンテナから送出し、ある体積の空気を微小流体ネットワークに送出手間のために液体転送部材を用いる命令を含むことができ、空気の体積は、約0.5 mL及び約5 mLの間である。

10

【0061】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、更に、フィルタと、例えば、液体転送部材を用いてサンプルをサンプル・コンテナからフィルタを通じて微小流体ネットワークに送出手間を含むことができる。

【0062】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、更に、サンプル・コンテナ上に少なくとも1つのコンピュータ読み取り可能ラベルを含むことができる。このラベルは、例えば、バーコード、無線周波数タグ、又は1つ以上のコンピュータ読み取り可能キャラクタを含むことができる。微小流体カートリッジは、不活性ガスと共にパウチの中に封止することができる。

20

【0063】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、更に、採取部材、転送コンテナ、及び採取部材を生物サンプルに接触させ、採取部材を転送コンテナの中に置く命令を含むことができる。

【0064】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、更に、サンプル緩衝液、及び、例えば、採取部材及びサンプル緩衝液を接触させる命令を含むことができる。

30

【0065】

種々の実施形態では、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、更に、ポリヌクレオチド・シーケンス、例えば、グラム陽性バクテリア、グラム陰性バクテリア、イースト、菌類、原生動物、及びウイルスから成る一群から選択した病原体の特徴を示すポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる少なくとも1つのプローブをふうむことができる。

【0066】

実施形態によっては、ポリヌクレオチド・サンプル・キットは、微小流体ネットワークと、この微小流体ネットワークと流体連通する保持部材とを備えている微小流体カートリッジと、蛍光原プローブとを備えている微小流体カートリッジであって、少なくとも1つのポリメラーゼ連鎖反応インヒビタに対して少なくとも1つのポリヌクレオチドのために保持部材を選択し、グラム陽性バクテリア、グラム陰性バクテリア、イースト、菌類、原生動物、及びウイルスから成る一群から選択した病原体の特徴を示すポリヌクレオチド・シーケンスのために蛍光原プローブを選択する、微小流体カートリッジと、サンプル・コンテナと、液体転送部材と、採取部材と、転送コンテナと、サンプル緩衝液と、命令とを含むことができる。命令は、サンプルをサンプル・コンテナから微小流体ネットワークに転送するために液体転送部材を用い、サンプルをサンプル・コンテナから送出し、ある体積の空気を微小流体ネットワークに送出手間のために液体転送部材を用い、空気の体積は、約0.5 mL及び約5 mLの間であり、サンプルをサンプル・コンテナからフィルタを通じて微小流体ネットワークに送出手間のために液体転送部材を用い、採取部材を生物サンプルに

40

50

接触させ、採取部材を転送コンテナの中に置く命令を含むことができる。

【0067】

ポリヌクレオチドの採取方法は、微小流体カートリッジにおける保持部材を生物サンプルと接触させるステップであって、生物サンプルが少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、これによって微小流体カートリッジにおいてポリヌクレオチド装填保持部材を生成するステップと、生物サンプルの少なくとも一部をポリヌクレオチド装填保持部材から分離するステップと、ポリヌクレオチド装填保持部材からポリヌクレオチドの少なくとも一部を放出することにより、放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成するステップとを含むことができる。

【0068】

種々の実施形態では、本方法は、更に、以下のステップの内1つ以上を含むことができる。微小流体カートリッジを前述の装置の受容ベイに入れるステップ、装置において動力部材を動作させて、受容ベイの一部と微小流体カートリッジの一部との間の界面に圧力を加えるステップ（例えば、約5キロパスカル及び約50キロパスカルの間の圧力、又は実施形態によっては少なくとも約14キロパスカルの圧力を発生させる）、動力部材を用いて微小流体カートリッジの中にある機械部材に力を加えるステップであって、この機械部材を、穿孔可能リザーバ、弁又はポンプから選択し、少なくとも1つの試薬、緩衝液、又は溶剤を微小流体チップの中にあるリザーバから放出するステップ、及び/又は蓋を閉鎖して動力部材を動作させ、動力部材を機械的に受容ベイにおける蓋と結合することができるステップ。

【0069】

実施形態によっては、本方法は、更に、サンプル識別器を用いて、微小流体カートリッジ上のラベル、又は生物サンプル上のラベルを読み取るステップも含むことができる。

【0070】

実施形態によっては、本方法は、更に、生の生物サンプルを微小流体カートリッジに導入し、微小流体カートリッジの中で、例えば、カートリッジ内においてフィルタを用いて、生の生物サンプルから生物サンプルを分離するステップを含むことができ、あるいは生物サンプルを微小流体カートリッジに導入する前に、生物サンプルを生の生物サンプルから分離することもできる。

【0071】

実施形態によっては、本方法は、更に、例えば、熱、溶解試薬等を用いて、生物サンプルを溶解するステップを含むこともできる。実施形態によっては、微小流体カートリッジが1つ以上の溶解試薬の凍結乾燥ペレットを備えている場合、本方法は、更に、液体によって界面活性剤の凍結乾燥ペレットを復元し、溶解試薬溶液を作成するステップを含むこともできる。

【0072】

種々の実施形態では、本方法は、更に、以下のステップの内1つ以上を含むことができる。微小流体カートリッジにおいて生物サンプルを加熱するステップ、微小流体カートリッジにおいて、周囲圧力と比較して約20キロパスカル及び200キロパスカルの間の差圧、又は、実施形態によっては、約70キロパスカル及び110キロパスカルの間の差圧で生物サンプルを加圧するステップ。

【0073】

実施形態によっては、ポリヌクレオチド装填保持部材から分離した生物サンプルの一部は、ヘモグロビン、ペプチド、糞便複合体、フミン酸、粘性複合体、DNA結合蛋白質、又はサッカリドから成る一群から選択した、少なくとも1つのポリメラーゼ連鎖反応インヒビタを含む可能性がある。実施形態によっては、本方法は、更に、生物サンプルにおけるポリメラーゼ連鎖反応インヒビタの実質的に全てからポリヌクレオチド装填保持部材を分離するステップを含むことができる。

【0074】

種々の実施形態では、本方法は、更に、以下のステップの内1つ以上を含むことができ

10

20

30

40

50

る。熱作動型ポンプ又は熱作動型弁を動作させることによって、微小流体カートリッジにおいて流体を送出するステップ、ポリヌクレオチド装填保持部材を洗浄緩衝液と接触させるステップ、ポリヌクレオチド装填保持部材を少なくとも約50（実施形態によっては、温度は100以下とすることができる）に加熱するステップ、約10分未満の間ポリヌクレオチド装填保持部材を加熱するステップ、ポリヌクレオチド装填保持部材を放出緩衝液と接触させて、放出ポリヌクレオチド・サンプル（例えば、実施形態によっては、放出緩衝液は、約50マイクロリットル未満の体積を有することができ、放出緩衝液は洗剤を含むことができ、及び/又は放出緩衝液は少なくとも約10のpHを有することができる）を作成するステップ、及び/又は放出ポリヌクレオチド・サンプルを中和緩衝液と接触させて、中和ポリヌクレオチド・サンプルを作成するステップ。

10

【0075】

種々の実施形態では、本方法は、更に、以下のステップの内1つ以上を含むことができる。中和ポリヌクレオチド・サンプルを、ポリメラーゼ酵素及び複数のヌクレオチド（実施形態によっては、PCR試薬混合物は、更に、陽性対照プラスミド、及びプラスミドの少なくとも一部のために選択した蛍光原混成プローブを含むことができる）を含むPCR試薬と接触させるステップ。実施形態によっては、PCR試薬混合物は、1つ以上の凍結乾燥ペレットの形態とすることができ、本方法は、更に、PCRペレットを液体によって還元し、PCR試薬混合物溶液を作成するステップと、中和ポリヌクレオチド・サンプルからPCRアンプリコンを作成するのに適した熱サイクル条件の下で、PCR試薬混合物及び中和ポリヌクレオチド・サンプルを加熱するステップと、中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンを、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる少なくとも1つのプローブと接触させるステップと、中和ポリヌクレオチド・サンプルのPCRアンプリコン及び陰性対照ポリヌクレオチドのPCRアンプリコンを独立して作成するのに適した熱サイクル条件の下で、中和ポリヌクレオチド・サンプル及び陰性対照ポリヌクレオチドの各々をPCR試薬混合物と独立して接触させるステップと、及び/又は中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコン、及び陰性対照ポリヌクレオチド又はそのPCRアンプリコンを、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択した少なくとも1つのプローブと接触させるステップ。

20

【0076】

種々の実施形態では、本方法は、更に、以下のステップの内1つ以上を含むことができる。生物サンプルにおけるポリヌクレオチド・シーケンスの存在を判定するステップであって、プローブが中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンにおいて検出された場合、ポリヌクレオチド・シーケンスがプローブに対応する、ステップ、プローブが陰性対照ポリヌクレオチド又はそのPCRアンプリコンにおいて検出された場合、汚染結果を判定するステップ、及び/又は、実施形態によっては、PCR試薬混合物が更に陽性対照プラスミド及びプラスミドの少なくとも一部のために選択したプラスミド・プローブを備えている場合、本方法は、更に、プラスミド・プローブが検出された場合にPCR反応が発生したと判定するステップを含む。

30

【0077】

種々の実施形態では、本方法は、更に、ポリヌクレオチド装填保持部材の遠心分離を含まない。

40

【0078】

実施形態によっては、ポリヌクレオチド採取方法は、微小流体カートリッジを装置の受容ベイに入れるステップと、装置において動力部材を動作させて、受容ベイの一部と微小流体カートリッジの一部との間の界面に圧力を加えるステップであって、力は、少なくとも1つの試薬、緩衝液、又は溶剤を微小流体カートリッジの中にあるリザーバから放出するように動作する、ステップと、微小流体カートリッジにおいて生物サンプルを溶解して、溶解生物サンプルを作成するステップと、微小流体カートリッジにおいて保持部材を溶解生物サンプルと接触させるステップであって、生物サンプルが少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、これによって、微小流体カートリッジにおいてポリヌクレオチド装填

50

保持部材を生成し、保持部材が、ポリアルキレン・イミン又はポリカチオニック・ポリアミドで形成した複数の粒子の形態である、ステップと、ポリヌクレオチド装填保持部材を洗浄緩衝液と接触させるステップと、ポリヌクレオチド装填保持部材を少なくとも約50の温度に約10分未満の間加熱するステップと、ポリヌクレオチド装填保持部材を放出緩衝液と接触させて、放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成するステップと、放出ポリヌクレオチド・サンプルを中和緩衝液と接触させて、中和ポリヌクレオチド・サンプルを作成するステップと、中和ポリヌクレオチド・サンプルからPCRアンプリコンを作成するのに適した熱サイクル条件の下で、中和ポリヌクレオチド・サンプルをPCR試薬混合物と接触させるステップであって、PCR試薬混合物が、ポリメラーゼ酵素、陽性対照プラスミド、プラスミドの少なくとも一部のために選択した蛍光原混成プローブ、及び複数のヌクレオチドを含む、ステップと、中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンを、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる少なくとも1つの蛍光原プローブと接触させるステップであって、プローブは、グラム陽性バクテリア、グラム陰性バクテリア、イースト、菌類、原生動物、及びウィルスから成る一群から選択した有機体の特徴を示すポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができ、1つの蛍光原プローブを選択することができる有機体の存在を判定するステップを含むことができる。

10

【0079】

種々の実施形態では、コンピュータ・プログラム生産物は、前述の装置を動作させるためのコンピュータ読み取り可能命令をその上を含む。

20

【0080】

実施形態によっては、コンピュータ・プログラム生産物は、システムに放出ポリヌクレオチド・サンプルを生物サンプルから作成させるコンピュータ読み取り可能命令をその上を含む。コンピュータ読み取り可能命令は、ポリヌクレオチド装填保持部材を生成するのに適した条件の下で、保持部材を生物サンプルと接触させる命令と、生物サンプルの少なくとも一部をポリヌクレオチド装填保持部材から分離する命令と、ポリヌクレオチド装填保持部材からポリヌクレオチドの少なくとも一部を放出することによって、放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成する命令とを含むことができる。

【0081】

種々の実施形態では、コンピュータ・プログラム生産物は、システムに、受容ベイに微小流体カートリッジを入れたことの指示を出力させ、サンプル・ラベル又は微小流体カートリッジ・ラベルを読み取らせ、ユーザがサンプル識別子を入力する指令を出力させ、ユーザがサンプル転送部材に生物サンプルを装填する指令を出力させ、ユーザがフィルタをサンプル転送部材に適用する指令を出力させ、ユーザが生物サンプルを微小流体カートリッジに導入する指令を出力させ、ユーザに生物サンプルを微小流体カートリッジにおける溶解試薬と接触させる指令を出力させ、ユーザが微小流体カートリッジを受容ベイに入れる指令を出力させ、ユーザが装置において動力部材を動作させて、受容ベイの一部と微小流体カートリッジの一部との間の界面に圧力を加える指令を出力させ、ユーザが蓋を閉鎖して動力部材を動作させる指令を出力させ、及び/又はユーザが生物サンプルを約0.5 mL及び約5 mLの間の体積の空気と共に導入することによって、微小流体カートリッジの中で生物サンプルを加圧する指令を出力させる1つ以上の命令を含むことができる。

30

40

【0082】

種々の実施形態では、コンピュータ・プログラム生産物は、システムに、生物サンプルを溶解させ、生物サンプルを溶解試薬によって溶解させ、液体によって界面活性剤の凍結乾燥ペレットを復元させて、溶解試薬溶液を作成させ、生物サンプルを加熱させ、ポリヌクレオチド装填保持部材を生物サンプルの少なくとも一部から分離させ、生物サンプルにおけるポリメラーゼ連鎖反応インヒビタの実質的に全てからポリヌクレオチド装填保持部材を分離させ、熱作動型ポンプ又は熱作動型弁を動作させることによって、微小流体カートリッジにおいて流体を送出させ、ポリヌクレオチド装填保持部材を洗浄緩衝液と接触させ、ポリヌクレオチド装填保持部材を少なくとも約50（実施形態によっては、温度は

50

100 以下とすることができる)に加熱させ、約10分未満の間ポリヌクレオチド装填保持部材を加熱させ、ポリヌクレオチド装填保持部材を放出緩衝液と接触させて、放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成させ、及び/又は放出ポリヌクレオチド・サンプルを中和緩衝液と接触させて、中和ポリヌクレオチド・サンプルを作成させる1つ以上の命令を含むことができる。

【0083】

種々の実施形態では、コンピュータ・プログラム生産物は、システムに、中和ポリヌクレオチド・サンプルを、ポリメラーゼ酵素及び複数のヌクレオチドを含むPCR試薬混合物と接触させ、中和ポリヌクレオチド・サンプルからPCRアンプリコンを作成するのに適した熱サイクル条件の下で、PCR試薬混合物及び中和ポリヌクレオチド・サンプルを加熱させ、中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンを、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる少なくとも1つのプローブと接触させ、中和ポリヌクレオチド・サンプルのPCRアンプリコン及び陰性対照ポリヌクレオチドのPCRアンプリコンを独立して作成するのに適した熱サイクル条件の下で、中和ポリヌクレオチド・サンプル及び陰性対照ポリヌクレオチドの各々をPCR試薬混合物と独立して接触させ、中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコン、及び陰性対照ポリヌクレオチド又はそのPCRアンプリコンを、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択した少なくとも1つのプローブと接触させ、プローブが中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンにおいて検出された場合、生物サンプルにおけるポリヌクレオチド・シーケンスの存在の判定を出力させ、ポリヌクレオチド・シーケンスがプローブに対応し、及び/又はプローブが陰性対照ポリヌクレオチド又はそのPCRアンプリコンにおいて検出された場合、汚染結果の判定を出力させる1つ以上の命令を含むことができる。

【0084】

種々の実施形態では、コンピュータ・プログラム生産物は、システムに前述の方法のステップの1つ以上を自動的に実行させる1つ以上の命令を含むことができる。

【0085】

種々の実施形態では、微小流体ネットワークが2つ以上のサンプル・レーンを含み、その各々が、熱作動型ポンプ、熱作動型弁、サンプル入口弁、フィルタ、及び少なくとも1つのリザーバを含み、コンピュータ読み取り可能命令は、システムにおける各レーンを独立して動作させるように構成することができる。

【0086】

実施形態によっては、コンピュータ・プログラム生産物は、生物サンプルから放出ポリヌクレオチド・サンプルをシステムに作成させるコンピュータ読み取り可能命令をその上に含む。このシステムは、微小流体ネットワークと、この微小流体ネットワークと流体連通する保持部材であって、少なくとも1つのポリメラーゼ連鎖反応インヒビタに対して少なくとも1つのポリヌクレオチドのために選択した保持部材とを備えている微小流体カートリッジと、微小流体カートリッジを選択的に収容するように構成されている受容ベイと、受容ベイにおける微小流体カートリッジに熱的に結合するように構成されている少なくとも1つのヒート・ポンプと、検出器と、検出器及びヒート・ポンプと結合されているプログラマブル・プロセッサとを備えている装置とを含むことができる。コンピュータ読み取り可能命令は、生物サンプルを溶解試薬と接触させることによって生物サンプルを溶解し、更に加熱して溶解サンプルを生成し、保持部材を生物サンプル及び/又は溶解サンプルと接触させて、ポリヌクレオチド装填保持部材を生成し、ポリヌクレオチド装填保持部材から生物サンプルの少なくとも一部を分離し、ポリヌクレオチド装填保持部材を洗浄緩衝液と接触させ、ポリヌクレオチド装填保持部材を放出緩衝液と接触させるか、又は加熱してポリヌクレオチドの少なくとも一部をポリヌクレオチド装填保持部材から放出することによって、放出ポリヌクレオチド・サンプルを作成し、放出ポリヌクレオチド・サンプルを中和緩衝液と接触させて、中和ポリヌクレオチド・サンプルを作成し、PCRアンプリコンを独立して作成するのに適した熱サイクル条件の下で、中和ポリヌクレオチド・サ

10

20

30

40

50

ンプル及び陰性対照ポリヌクレオチドの各々をPCR試薬混合物と独立して接触させ、PCR試薬混合物が、ポリメラーゼ酵素、複数のヌクレオチド、陽性対照プラスミド、プラスミドの少なくとも一部のために選択したプラスミド・プローブを含み、プラスミド・プローブが検出された場合、PCR反応が発生したと判定し、中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコン、及び陰性対照ポリヌクレオチド又はそのPCRアンプリコンを、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択した少なくとも1つのプローブと接触させ、プローブが中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンにおいて検出された場合、生物サンプルにおけるポリヌクレオチド・シーケンスの存在を判定し、ポリヌクレオチド・シーケンスがプローブに対応し、プローブが陰性対照ポリヌクレオチド又はそのPCRアンプリコンにおいて検出された場合、汚染結果の判定を出力させる1つ以上の命令を含むことができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】本明細書に記載する装置の模式的全体像を示す。

【図2A】本明細書に説明する種々の構成における装置の一例の斜視図を示す。

【図2B】本明細書に説明する種々の構成における装置の一例の斜視図を示す。

【図2C】本明細書に説明する種々の構成における装置の一例の斜視図を示す。

【図2D】本明細書に説明する種々の構成における装置の一例の斜視図を示す。

【図2E】本明細書に説明する種々の構成における装置の一例の斜視図を示す。

【図3】装置の典型的な構成要素の分解図である。

20

【図4】装置のブロック図である。

【図5】蛍光検出モジュールの図である。

【図6A】装置内への実装後における微小流体カートリッジの、種々の実施形態における、場所を示す図である。

【図6B】装置内への実装後における微小流体カートリッジの、種々の実施形態における、場所を示す図である。

【図7】本明細書において説明する、着脱式ヒータ・モジュールの斜視図である。

【図8A】PCR反応ゾーンに隣接するヒータ回路の平面図を示す。

【図8B】PCR反応ゾーンに隣接するヒータ回路の平面図を示す。

【図8C】動作中のヒータ回路の熱像の平面図を示す。

30

【図9】本明細書に説明する、微小流体カートリッジの斜視図を示す。

【図10】微小流体デバイスの斜視図である。

【図11】ポリヌクレオチドを保持する及び/又はポリヌクレオチドをインヒビタから分離する処理領域の断面図である。

【図12A】ゲートの斜視図である。

【図12B】ベント・ゲートの斜視図である。

【図13】アクチュエータの断面図である。

【図14A】微小流体カートリッジの斜視図である。

【図14B】図14Aの微小流体カートリッジの側断面図である。

【図15A】図15Bと併せて、図14A及び図14Bの微小流体カートリッジの微小流体網の斜視図を示す。

40

【図15B】図15Aと併せて、図14A及び図14Bの微小流体カートリッジの微小流体網の斜視図を示す。

【図16】図14A及び図14Bの微小流体カートリッジの動作構成要素に対する熱源のレイを示す。

【図17】開放状態における弁を示す。

【図18】閉鎖状態における弁を示す。

【図19A】図6A及び図6Bの微小流量網の混合ゲート、並びに網の隣接領域を示す図である。

【図19B】図6A及び図6Bの微小流量網の混合ゲート、並びに網の隣接領域を示す図

50

である。

【図 19 C】図 6 A 及び図 6 B の微小流量網の混合ゲート、並びに網の隣接領域を示す図である。

【図 19 D】図 6 A 及び図 6 B の微小流量網の混合ゲート、並びに網の隣接領域を示す図である。

【図 20 A】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 20 B】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 20 C】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 21 A】封止空間を有するリザーバを示す図である。

【図 21 B】図 21 A に示したリザーバにおいて、可動部材を押下げた状態を示す図である。 10

【図 21 C】図 21 A に示したリザーバにおいて、穿孔部材が封止空間の下層を裂いた状態を示す図である。

【図 22】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 23 A】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 23 B】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 24 A】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 24 B】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 25】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。

【図 26】作動メカニズムを有するリザーバを示す図である。 20

【図 27 A】穿孔部材を有する試薬パックの実施形態を示す図である。

【図 27 B】穿孔部材を有する試薬パックの実施形態を示す図である。

【図 28】小型ベンチ・トップ・リアルタイム・ポリヌクレオチド分析システムとして動作することができる装置を示す図である。

【図 29】装置と共に用いることができるサンプル・キットを示す図である。

【図 30】サンプル・キットの構成要素のためのパウチを示す図である。

【図 31】微小流体カートリッジの一例を示す図である。

【図 32】微小流体カートリッジ上のリード・バーコードに対するバーコード・リーダの使用を示す図である。

【図 33】サンプル・コンテナ上のバーコードを読み取るためのバーコード・リーダの使用を示す図である。 30

【図 34】サンプル入口を通じた、微小流体カートリッジのリーシス・リザーバへのフィルタの取付を示す図であり、これによってシリンジの内容物を微小流体カートリッジにフィルタを介して注入することができる。

【図 35】微小流体カートリッジを加圧するためのシリンジへの空気の追加を示す図である。

【図 36】装置の受容ベイの中への微小流体カートリッジの配置を示す図である。

【図 37】装置の蓋の閉鎖を示す図である。

【図 38】装置の蓋の閉鎖を示す図である。

【図 39】加熱/センサ・モジュールの装置からの取り外しを示す図である。 40

【図 40】加熱/センサ・モジュールの装置からの取り外しを示す図である。

【図 41 A】装置からのリアル・タイム熱センサ・データのグラフである。

【図 41 B】装置からのリアル・タイム光検出器データのグラフである。

【図 42】微小流体カートリッジの一例における室及び/又はサブユニットの種々の例の模式図である。

【図 43】微小流体カートリッジの一例において実行することができる PCR 及び検出に関するステップの模式図である。

【図 44】TaqMan (登録商標) アッセイに基づくリアル・タイム PCR アッセイの一例の模式図である。

【図 45】採用することができる陽性内部対照プラスミドの模式図である。 50

- 【図46】2つの流体(「A」-青色、そして「B」-蜜柑色)の混合を示す図である。
- 【図47A】閉鎖(図47A)及び開放(図47B)構成における、相遷移材料(PTM)510に基づく熱作動ポンプ500を示す図である。
- 【図47B】閉鎖(図47A)及び開放(図47B)構成における、相遷移材料(PTM)510に基づく熱作動ポンプ500を示す図である。
- 【図47C】ゲート515を動作させるために作動させることができる、室513内にエクспанセル・ポリマ(expancel polymer)511を有するポンプ501の別の例を示す図である。
- 【図47D】ゲート515を動作させるために作動させることができる、室513内にエクспанセル・ポリマ(expancel polymer)511を有するポンプ501の別の例を示す図である。 10
- 【図48】一体化した単体の、微小流体技術に基づく、使い捨てカートリッジの構成要素を示す図である。
- 【図49】採用することができるDNA捕獲ビーズを示す図である。
- 【図50A】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図50B】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図50C】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。 20
- 【図50D】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図50E】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図50F】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図50G】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図50H】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。 30
- 【図50I】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図50J】図15A及び図15Bに示した微小流体カートリッジの種々のエレメントを強調する図である。
- 【図51】レバー1210、ギア・ユニット1212、及び動力部材1214を有するレバー・アセンブリ1200の側面図である。
- 【図52】受容ベイ内に微小流体カートリッジを有するレバー・アセンブリ1200の側面図を示す。
- 【図53】受容ベイの近接図を示す。
- 【図54】微小流体カートリッジ、熱伝導性、機械的共形層、及び熱ステージ間のインターフェースの近接図を示す。 40
- 【図55】アセンブリ1200の上面図を示す。
- 【図56】図55の近接図である。
- 【図57】動作中のレバー1210の一連の映像を示す図である。加えて、ギア・アセンブリ1212の中には、カム1228も示すことができ、これによって、レバー1210は、動力部材1214に結合されているプレート1230に力を加えることができる。
- 【図58】動作中のレバー1210の一連の映像を示す図である。加えて、ギア・アセンブリ1212の中には、カム1228も示すことができ、これによって、レバー1210は、動力部材1214に結合されているプレート1230に力を加えることができる。
- 【図59】動作中のレバー1210の一連の映像を示す図である。加えて、ギア・アセン 50

ブリ 1 2 1 2 の中には、カム 1 2 2 8 も示すことができ、これによって、レバー 1 2 1 0 は、動力部材 1 2 1 4 に結合されているプレート 1 2 3 0 に力を加えることができる。

【図 6 0】自己穿孔リザーバ 1 2 2 8 及び自己穿孔リザーバを作動させるための機械部材 1 2 3 0 を有する微小流体カートリッジの図を示す。

【図 6 1】自己穿孔リザーバ 1 2 2 8 及び自己穿孔リザーバを作動させるための機械部材 1 2 3 0 を有する微小流体カートリッジの図を示す。

【図 6 2】光源 1 2 3 2 (例えば、発光ダイオード)、レンズ 1 2 3 4、光検出器 1 2 3 6 (例えば、フォトダイオード)、及びフィルタ 1 2 3 8 を含む光検出エレメント 1 2 2 0 のエレメントを示す図である。

【図 6 3】光源 1 2 3 2 (例えば、発光ダイオード)、レンズ 1 2 3 4、光検出器 1 2 3 6 (例えば、フォトダイオード)、及びフィルタ 1 2 3 8 を含む光検出エレメント 1 2 2 0 のエレメントを示す図である。

【図 6 4】微小流体デバイスを示す図である。

【図 6 5】5 に沿った、図 6 4 の微小流体デバイスの断面である。

【図 6 6】ニシン精液 DNA の保持を示す図である。

【図 6 7】グループ B ステプトコッチ (steptococci) からの DNA の保持及び放出を示す図である。

【図 6 8】インヒビタを除去したサンプル、及びインヒビタを除去していないサンプルの PCR 応答を示す図である。

【図 6 9】ここに記載する技術にしたがって準備したサンプル、及び商用 DNA 抽出方法を用いて準備したサンプルの PCR 応答を示す図である。

【図 7 0 A】ポリヌクレオチド及びインヒビタを分離する方法の間に実行するステップを示すフロー・チャートである。

【図 7 0 B】図 2 6 A の方法を受けるサンプルからの DNA を示す図である。

【図 7 1】例 1 3 に記載するような、結果を解釈するために装置 8 0 0 において判断アルゴリズムが用いることができる規準従業の一例の全体像を示すフロー・チャートである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0088】

本技術の 1 つ以上の実施形態の詳細は、添付図面及び以下の説明に明記されている。本技術のその他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面、並びに特許請求の範囲から明白であろう。種々の図面における同様の参照記号は、同様の要素を示すこととする。

これより、システム、微小流体カートリッジ、キット、方法、及びコンピュータ・プログラム生産物について更に説明する。

【0089】

生物サンプルの分析は、多くの場合、1 つ以上のポリヌクレオチド (例えば、DNA、RNA、mRNA、又は rRNA) がサンプルの中に存在する可能性があるか否か判断することを含む。例えば、サンプルを分析して、特定の病原体 (バクテリア又はビールスのような) を示すポリヌクレオチドが存在する可能性があるか否か判断する場合がある。ポリヌクレオチドは、ゲノム DNA のサンプルとすることができ、又はミトコンドリア DNA のサンプルとすることもできる。通例、生物サンプルは複合の混合物とすることができる。例えば、サンプルは、血液サンプル、組織サンプル (例えば、鼻、口、肛門、膣組織のスワブ) バイオプシ吸引液、溶菌液、菌類、又はバクテリアとして供給することができる。判断すべきポリヌクレオチドは、粒子の中に含有されていてもよい (例えば、細胞 (例えば、白血球細胞及び/又は赤血球細胞)、組織断片、バクテリア (例えば、グラム陽性バクテリア及び/又はグラム陰性バクテリア)、菌類、孢子)。1 つ以上の液体 (例えば、水、緩衝液、血液、血液プラズマ、唾液、尿、髄液、又は有機溶剤) が、通例、サンプルの一部となることができ、及び/又は処理ステップの間にサンプルに添加することができる。

【0090】

生物サンプルの分析方法は、生物サンプル (例えば、スワブ) を用意し、サンプルの粒

10

20

30

40

50

子（例えば、バクテリアのような細胞）からポリヌクレオチドを放出し、放出したポリヌクレオチドの1つ以上を増幅し（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって）、増幅ポリヌクレオチドの存在（又は不在）を判定する（例えば、蛍光検出によって）。しかしながら、生物サンプルは、通例、インヒビタ（例えば、粘液複合物、ヘモグロビン、糞便複合物、及びDNA結合蛋白質）を含み、これがサンプルにおけるポリヌクレオチドの存在を判定するのを妨げる可能性がある。例えば、このようなインヒビタは、PCR及びポリヌクレオチドの存在を判定するその他の酵素技法によるポリヌクレオチドの増幅効率を低下させる可能性がある。インヒビタの濃度が、判定すべきポリヌクレオチドに対して減少しない場合、分析が偽りの陰性結果を生成する可能性がある。ここでは、生物サンプル（例えば、判定すべき1つ以上のポリヌクレオチドを有するサンプル）を処理する本方法及び関係するシステムは、通例、インヒビタの濃度を判定すべきポリヌクレオチドの濃度に対して、ここで更に説明する方法によって低下させることができる。

10

【0091】

システム及び微小流体カートリッジの種々の態様について、ここで説明する。その種々の構成要素の追加の開示は、米国特許出願第11/580,267号、及び仮特許出願第60/859,284号において見出すことができ、その明細書はここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。

【0092】

システムの全体像

ここに記載する分析を実行するシステム981の模式的な全体像を図1に示す。図1に示すシステム981の構成要素の幾何学的配置は、一例であり、限定することは意図していない。マイクロプロセッサのようなプロセッサ980は、図示のようなシステムの種々の構成要素の機能を制御するように構成されており、これによってこのような構成要素の各々と通信する。即ち、プロセッサ980は、分析すべきサンプルに関するデータを、例えば、サンプル・リーダ990から受け取るように構成されている。サンプル・リーダ990は、バーコード・リーダ、光学式キャラクタ・リーダ、又はRFIDスキャナ（無線周波数タグ・リーダ）とすればよい。例えば、サンプル識別器は、ハンドヘルド・バーコード・リーダとすることができる。プロセッサ980は、ユーザ命令や動作条件の選択を入力984から受け入れるように構成されており、このような命令は、サンプルの分析を開始する命令を含むことができる。また、プロセッサ980は、ディスプレイ982と通信するように構成されているので、例えば、分析の結果をディスプレイに送信する。加えて、プロセッサ980は、ディスプレイ982上に表示すべき1つ以上の質問を送信し、ユーザがそれに応答して入力を与えるように促すことができる。つまり、ある種の実施形態では、入力984及びディスプレイ982は、互いに一体化されている。任意に、プロセッサ980は更に分析の結果を、プリンタ、視覚ディスプレイ、又はスピーカ、あるいはその組み合わせのような出力デバイスに送信するように構成されている。任意に、プロセッサ980は更にネットワーク・インターフェースのような通信インターフェースを通じて、コンピュータ・ネットワーク988に接続されている。通信インターフェースは、シリアル接続、パラレル接続、ワイヤレス・ネットワーク接続、及び有線ネットワーク接続から成る一群から選択した1つ以上のインターフェースとすることができる。これによって、システムが相応しくネットワーク上でアドレスされているとき、遠隔ユーザはプロセッサにアクセスし、命令を送信し、データを入力し、データを読み出し、プロセッサと関連のあるメモリ（図示せず）、又はプロセッサと通信するその他の何らかのコンピュータ読み取り可能媒体に格納することができる。

20

30

40

【0093】

図1には示していないが、種々の実施形態では、入力984は、キーボード、接触感応面、マイクロフォン、トラック・パッド、網膜スキャナ、及びマウスから成る一群から選択した1つ以上の入力デバイスを含むことができる。

加えて、種々の実施形態では、本装置は、更に、プロセッサ、入力デバイス、及び通信インターフェースの1つ以上からデータを受け取るように構成されているデータ記憶媒体

50

も備えることができ、データ記憶媒体は、ハード・ディスク・ドライブ、光ディスク・ドライブ、フラッシュ・カード、及びDC-Romから成る一群から選択した1つ以上の媒体である。

【0094】

更に、プロセッサ980は、全体像において以下に続き、この中で更に詳しく説明する、サンプル診断の種々の態様を制御するように構成されている。本システムは、微小流体カートリッジのような、相補的カートリッジ994と合わせて動作するように構成されている。カートリッジ自体は、この中で更に説明するが、生物サンプル996を、ワークアップ及び診断分析に適した形態で受け取るように構成されている。カートリッジは、システムの中にある受容ベイ992に収容される。受容ベイは、ヒータ998と連通しており、ヒータ998自体はカートリッジの特定の領域をサンプルワークアップ及び分析中の特定の時点に加熱するようにプロセッサ980によって制御される。また、プロセッサは、カートリッジ994からの診断の指示を受け取る検出器999を制御するように構成されている。前述のように、診断は、出力デバイス986及び/又はディスプレイ982に送信することができる。

10

【0095】

適したプロセッサ980は、当技術分野では周知の設計原理及び半導体処理方法によって、それぞれ、設計及び製造することができる。

【0096】

図1に全体像を示したシステムは、ここに記載するその他の実施形態例と同様に、優位性がある。何故なら、これは試薬の蓄積に適した構成のシステム内部に場所を必要としないからである。本システムも、この中にあるその他の実施形態例も、例えば、ボトル、キャニスタ、又はリザーバのような外部蓄積容器から試薬を受け取るように構成されている入口や出口ポートを必要としない。したがって、図1におけるシステムは自己充足的であり、微小流体カートリッジと合わせて動作する。このカートリッジは、その内部に試薬蓄積専用の場所を有する。

20

【0097】

図1のシステムは、研究室のセッティングのような、1つの場所で動作を実行するように構成することができ、あるいは携行可能であってもよく、例えば、異なる場所の患者を訪問する場合がある、外科医又はその他の健康管理専門家に随伴することができる。本システムには、通例、電力コードが設けられているので、主電源又は発電機からAC電力を受け入れることができる。任意の変圧器(図示せず)をシステムに組み込むか、又は電力ソケットとシステムとの間で外部に配置すれば、AC入力電力をシステムが用いるためのDC出力に変圧する。また、本システムは、1つ以上のバッテリーを用いることによって動作するように構成することもでき、したがって、通例、バッテリー再充電システムや、診断分析を信頼性高く開始又は完了するにはバッテリー電力が低くなり過ぎた場合にはユーザに警告する種々の警報デバイスも装備されている。

30

【0098】

図1のシステムは、更に、他の実施形態では、多重化サンプル分析に合わせて構成することもできる。このような構成の1つでは、図1に全体像を示したようなシステムの多数のインスタンス同士を一緒に動作させて、多数のカートリッジを受け入れて処理する。各カートリッジには、異なるサンプルが装填されている。図1に示す各構成要素は、したがって、サンプルの数だけあってもよいが、種々の構成要素は共通の筐体内に構成することができる。

40

【0099】

更に別の構成では、システムは、多数のカートリッジを受け入れて処理するように構成されているが、図1における1つ以上の構成要素は、多数のカートリッジに共通である。例えば、1つのデバイスに多数のカートリッジ受容ベイを構成することができるが、共通のプロセッサ及びユーザ・インターフェースを、種々のカートリッジの同時、連続、又は同時制御を可能にするのに適した構成とすることができる。更に、このような実施形態は

50

、1つのサンプル・リーダー及び1つの出力デバイスを利用することも可能である。

【0100】

更に別の構成では、図1に示すシステムは、1つのカートリッジを受け入れるように構成されているが、1つのカートリッジは、1つよりも多い、例えば、2、3、4、5、又は6つのサンプルを並列に、互いに独立して、処理するように構成されている。多数のサンプルを取り扱うことができるカートリッジを作成する技術の例は、別の文献、例えば、米国特許出願第60/859,284号に記載されている。その内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。

【0101】

更に、カートリッジに、タグを付ける、例えば、サンプルを示す分子バーコードを付けることができ、サンプルの追跡をしやすくし、サンプルの混合の危険性を極力抑えるようにすることも、本技術と調和する。このようなタグ付け方法は、例えば、米国特許出願公開第10/360,854号に記載されている。その内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。

【0102】

システム例

図2A～図2Eは、本明細書中で更に説明するシステム例の種々の構成の外部斜視図を示す。図2Aは、微小流体カートリッジ(図示せず)を収容し、カートリッジに導入されたサンプルに種々の処理動作を行わせ、それらの動作を制御するシステム2000の斜視図を示す。システム2000の要素は、明示的に示すものに限定されるのではない。例えば、図示しないが、システム2000は、この中で更に説明するように、ハンドヘルド・バーコード・リーダーに接続することもできる。

【0103】

システム2000は、筐体2002を備えており、筐体2002は金属又は硬化プラスチックで作ることができる。図2Aに示す筐体の形態は、様式的及び機能的特徴を具体化している。本発明のその他の実施形態は、構成要素の配列において、そして線の平滑さ、外部仕上げ、及び模様に関するそれらの全体的外観において、多少異なって見える場合もある。更に、システム2000は、1つ以上の安定化部材2004を備えている。図2Aに示すのは、安定脚であり、通常数個設けられており、システム2000の下側の種々の領域に配置されて、バランスを取り支持している。例えば、3本、4本、5本、6本、又は8本のこのような安定脚があってもよい。脚は、成型され、筐体2002と同じ材料で作るとよく、あるいは1つ以上の別個の材料で作製し、システム2000の下側に取り付けるとよい。例えば、脚は、ゴムを含み、システム2000が設置されている面上で滑り難くし、更に表面を傷から保護することもできる。部材の安定化部材は、脚以外の形態、例えば、レール、ランナ、又は1つ以上のパッドの形態をなすこともできる。

【0104】

更に、システム2000は、ディスプレイ2006を備えており、これはアクティブ・マトリクスのような液晶ディスプレイ、OLED、又はその他の何らかの適した形態とすればよい。これは、画像及びその他の情報をカラー又は白黒で呈示することができる。また、ディスプレイ2006は、接触感応ディスプレイとしてもよく、したがって、種々の表示プロンプトにตอบสนองしてユーザからの入力を受け入れるように構成することもできる。ディスプレイ2006は、反射防止被膜をその上に有し、研究室設定において頭上光からのグレアや反射を低減するようにするとよい。また、ディスプレイ2006は、例えば、バックライトから照明し、暗い研究室において一層視認し易くするとよい。

【0105】

図2Aに示すように、システム2000は、ハンドル2008を有する可動蓋2010も備えている。蓋2010は、前後に摺動することができる。図2Aでは、蓋は前方位置にあり、これによって「閉鎖」されている。図2Bでは、蓋は後方位置にあり、この場合蓋は「開放」しており、微小流体カートリッジを収容するように構成されている受容ベイ2014を露見させる。勿論、当業者は認めようが、ここに記載する技術は、摺動する蓋や、

10

20

30

40

50

前後に摺動する蓋には限定されない。蓋がデバイスの前方に位置するとき「開放する」構成のように、横の移動も可能である。また、蓋が蝶番式の蓋であることや、完全に取り外し可能な蓋であることも可能である。

【0106】

ハンドル2008は、ユーザが蓋2010を一方の位置から他方に移動させることを可能にする役割を果たし、更に、閉鎖位置にあるときに、蓋に対して下方に圧力を賭けさせ、圧力が受容ベイ2014の中にあるカートリッジに加えることができるようにする役割も果たす。図2Cでは、ハンドル2008は押下位置に示されており、これによって力が蓋2014に加えられ、このため、蓋の直下にある受容ベイに収容されているカートリッジに圧力が加えられる。

10

【0107】

一実施形態では、ハンドル及び蓋の構造体には運動センサがはめ込まれており、受容ベイの中にカートリッジがないときには、ハンドルを押下させないようにする。別の実施形態では、ハンドル及び蓋の構造体には、機械的ラッチがはめ込まれており、分析が進行中のときにはハンドルを引き上げられないようにする。

【0108】

システム2000の更に別の構成を図2Dに示す。この場合、扉2012が開放位置にある。扉2012は、図2A～図2Cでは閉鎖位置に示されている。扉は、任意の構成要素であり、ユーザがヒータ・モジュール2020、そしてコンピュータ・読み取り可能媒体入力トレイ2022にも接近することができるようにする。システム2000は、ヒータ・モジュール2020及び媒体入力2022を覆う扉がなくても機能するが、このような扉が取り付けられていると便利ながある。扉2012は底辺が蝶番式となつて示されているが、その側辺、又はその上縁に蝶番が取り付けられていてもよい。あるいは、扉2012は、蝶番で取り付けの代わりに、取り外し可能なカバーであってもよい。例えば、ヒータ・モジュール及び/又はコンピュータ読み取り可能媒体入力への接近がシステムの異なる面上の方が望ましい場合、扉2012は、システム2000の背面又は側面に配置してもよい。また、ヒータ・モジュール、及びコンピュータ読み取り可能媒体入力には、デバイスの同じ又は異なる側面で別個の扉を介して到達することも、本システムと調和し、この場合、このような別個の扉は、独立して蝶番で取り付けられていても、取り外し可能でもよい。

20

30

ヒータ・モジュール2020は、好ましくは取り外し可能であり、以下で更に説明する。

【0109】

コンピュータ読み取り可能媒体入力2022は、種々の媒体の1つ以上を受け入れることができる。図2Dに示すのは、入力2022の一形態例であり、共通に用いられる読み取り可能、読み取り・書き込み可能、及び書き込み可能フォーマットのCD、DVD、又はミニ・CD、あるいはミニ・DVDを受け入れるCD-Romトレイである。また、フロッピー・ディスク、メモリ・スティックのようなフラッシュ・メモリ、コンパクト・フラッシュ、スマート・データ・カード、又はセキュア・データ・カード、ペン・ドライブ、可搬型USBドライブ、ジップ・ディスク、及びその他のような、他の形態の媒体も受け入れることができる入力も、この中の記載と調和する。また、このような入力は、様々な異なる形態の媒体も受け入れるように構成することができる。このような入力2022は、プロセッサと通信し(図2A～図2Eには示さないが、図1に関連付けて説明した)、適正に入力に挿入されたときに、コンピュータ読み取り可能媒体からデータを読み取ることができる。

40

【0110】

図2Eは、システム2000の背面の平面図を示す。図示するのは、分析の間余分な熱を逃がすためのエア・ベント2024である。通例、システム2000の内側には、エア・ベント2024を介してファンがあるが、図2Eには示されていない。図2Eに示すその他のポートは次の通りである。システム2000を電源に接続する電力コードを受け入

50

れる電力ソケット2026、システム2000をローカル・エリア・ネットワークのようなコンピュータ・ネットワークにリンクするイーサネット（登録商標）接続2028、システム2000を電話ネットワークのような通信ネットワークにリンクするフォン・ジャック接続2032、システム2000を、プリンタ又はコンピュータ・ハード・ドライブのような1つ以上の周辺デバイスに接続する1つ以上のUSBポート2030、例えば、リモート・コントローラ（図示せず）と通信して、ユーザに、タッチ・スクリーン・インターフェースを用いずに、システムを制御させる、赤外線ポート。例えば、ユーザは離れたところからスケジューリング・コマンドをシステム2000に発行して、今後の特定の時刻に分析を開始させることもできる。

【0111】

システム2000の背面上に示す機構は、種々の構成要素の内部構成に応じて、いずれの異なる様式にでも配置することができる。加えて、システム2000の背面にあるように示す機構は、設計の好みに応じて、任意にシステム2000の別の面に設けてもよい。図2Eに示すのは、接続の例である。尚、入力、出力、ソケット、及び接続を含むその他の機構がシステム2000の背面上に設けても、図示しないが、システム2000の別の面上に設けてもよいことは言うまでもない。

【0112】

本装置の実施形態の一例の分解図を図3に示し、特に、装置2000の内部機構を示す。装置2000は、それと共に用いるカートリッジ上の動作を駆動し監視するために用いることができるハードウェア/ファームウェア、及びカートリッジ内で処理されるサンプルに対して実行される診断検査の結果を解釈し、伝達し、格納するソフトウェアが構成されているコンピュータ読み取り可能媒体を備えることができる。図3を参照すると、装置2000の典型的な構成要素が示されており、例えば、制御電子回路2005、着脱可能なヒータ/センサ・モジュール2020、携行検出モジュールのような検出器2009、表示画面又は任意に合体したディスプレイ及びユーザ・インターフェース2006（例えば、医療級接触感応液晶ディスプレイ（LCD））を含む。実施形態によっては、蓋2010、検出器2009、及びハンドル2008を纏めてスライダ・モジュール2007と呼ぶことができる場合もある。装置2000の更に別の構成要素には、種々のモジュール（例えば、ヒータ/センサ・モジュール2020及び/又はスライダ・モジュール2007）を位置合わせして保持し、構造的剛性を与えるためのフレーム2019のような、1つ以上の機械的固定具を含むことができる。検出器モジュール2009は、レールに配置すれば、装置2000におけるカートリッジ2060の開放及び配置がし易くなり、閉鎖するときに光学素子の位置合わせをし易くすることができる。ヒータ/センサ・モジュール2020は、容易に取り外し構造体に挿入するために、レール上に配置することもできる。

【0113】

また、装置2000の実施形態は、ソフトウェア（例えば、ユーザとインターフェースし、分析を行い、及び/又は検査結果を分析するため）、ファームウェア（例えば、カートリッジ812上での検査の間ハードウェアを制御するため）、及び周辺機器のための、2031で纏めて示す1つ以上の周辺通信インターフェース（例えば、コンパクト・ディスク又はハード・ディスクのようなストレージに接続するため、バーコード・リーダ及び/又はキーボードのような入力デバイスを接続するため、その他のコンピュータ又はストレージにネットワークを通じて接続するため等の、USB/シリアル/イーサネット（登録商標）のような通信ポート）も含む。

【0114】

制御電子回路840は、図4では模式的にブロック図で示されており、種々の実施形態において、例えば、主制御900、多重化902、表示制御904、検出器制御906等のための1つ以上の機能を含むことができる。主制御機能は、装置2000における制御電子回路840のハブとしての役割を果たせばよく、種々の電子機能の通信及び制御を管理することができる。また、主制御機能は、ユーザ又はプリンタ920のような出力デバ

10

20

30

40

50

イス、並びに任意の診断及び安全機能との電氣的及び通信インターフェース 908 をサポートすることができる。主制御機能 900 と合わせて、マルチプレクサ機能 902 は、センサ・データ 914 及び出力電流 916 を制御し、ヒータ/センサ・モジュール 2020 を制御するのに役立つことができる。表示制御機能 904 は、タッチ・スクリーン LCD 846 への出力を制御し、そして該当するのであれば、これからの入力を解釈することができ、ある種の実施形態では、これによってグラフィカル・インターフェースをユーザに提供する。検出器機能 906 は、制御電子回路 840 内に実施することができ、典型的な制御及び処理回路を用いて、1つ以上の蛍光検出モジュールのような検出器 2009 からのデータの収集、デジタル化、フィルタ処理、及び/又は送信する。

【0115】

種々の実施形態では、蛍光検出モジュール 2009 は、微小化した、高感度蛍光検出システムとすることができ、例えば、図 5 に示すように、相応しく位置付けした微小流体カートリッジから発する蛍光信号のリアル・タイム分析を可能とすることができる。検出モジュール 2009 は、1つ以上の光源 2850 (例えば、発光ダイオード (LED))、1つ以上の検出器 2852 (例えば、フォトダイオード)、並びに1つ以上のフィルタ 2851 及び/又はレンズ 2853 を用いることができる。実施形態によっては、検出モジュール 2009 は多数 (例えば、6つ) の検出エレメントを内蔵することができる場合もあり、各エレメントが1つ以上の蛍光プローブを検出することができる。

【0116】

種々の実施形態では、装置 2000 のスライダ・モジュール 2007 は、検出モジュール 2009 (例えば、光検出システム) 及びスライダ・モジュール 2007 のハンドル 2008 を押下したときに微小流体カートリッジ 2020 を押下する機械的構造体/光学素子ジグ 856 を収容することができる。図 6A 及び図 6B は、種々の実施形態における、装置 2000 への挿入後の微小流体カートリッジ 2060 の場所を示す。光学素子ジグ (optics jig) 856 は、1箇所以上 (例えば、4箇所) の点でスライダ・モジュール 2007 のケースから吊り下げることができる。スライダ・モジュール 2007 を閉鎖し、装置 2000 のハンドル 2008 を下に回すと、1つ以上の機械的アクチュエータ 858 (例えば、4つのカム) がプレート 860 を1つ以上 (例えば、4つ) のばね 862 に対抗して押下することができる。圧縮時には、ばね 862 は力を検出器モジュール 2009 に伝達することができる。検出器モジュール 2009 の底面 864 は平坦に作る (例えば、250 ミクロン以内、典型的には 100 ミクロン以内、更に典型的には 25 ミクロン以内)、表面 864 はカートリッジ 2060 を押圧することができる。カートリッジ 2060 は、非圧縮時に厚さが 0.1 ~ 2.5 mm、典型的には非圧縮時の厚さが約 1.5 mm の共形層 868 (例えば、ショア高度が約 50 から 70) を有することができる。したがって、カートリッジ 2060 の圧縮は、平坦面 864 との組み合わせで、圧力、つまり熱接触を、微小流体カートリッジ 2060 全域にほぼ均一に発生することができる。スライダ・モジュール 2007 における1つ以上のばね 862 は力 (例えば、5 ~ 500 N、典型的には約 200 ~ 250 N) を伝達し、微小流体カートリッジ 2060 の底面全域に圧力 (例えば、2 psi) を発生することができる。また、図 6B は、スライダ・モジュール 2007 を閉鎖することができるときに、スライダ・モジュール 2007 の機械的機構 863 が微小流体カートリッジ 2060 の自己穿孔可能リザーバ 866 を押下して、リザーバの内容物 (例えば、DI 水、PCR 試薬) を放出させることができる。

【0117】

着脱式ヒータ・モジュール

着脱式ヒータ・モジュール 2020 の一例を図 7 に示す。このモジュールは、局在化した熱を、受容ベイ 2014 の中に収容されているカートリッジの種々の選択領域に伝達するように構成されている。図 7 に示すのは、凹陷面 2044 を有するヒータ・モジュールであり、これが、受容ベイ 2014 の中にあるときカートリッジを支持するプラットフォームを設ける。一実施形態では、カートリッジは直接表面 2044 上に載る。表面 2044 は、図 7 では、凹陷して示されているが、そうである必要はない。

10

20

30

40

50

【0118】

区域2044は、1つの向きで微小流体カートリッジを受け入れるように構成されている。したがって、区域2044には、ユーザがカートリッジを受容ベイ2014に間違っ
た構成で挿入することを防止する機械的なキーのような、位置合わせ部材を装備すること
ができる。図7において機械的なキー2045として示すのは、区域2044の対角線に
沿って切り欠いた角であり、この中に微小流体カートリッジの相補的に切り欠いた角を
はめ込む(例えば、図9参照)。その他の位置合わせ部材も、ここに記載する装置と調和し
、例えば、2つ以上のような数個の切欠角、図9のカートリッジの1つ以上の縁に切り込
んだ1つ以上のノッチ、又は図9のカートリッジの1つ以上の縁に製作した1つ以上の突
起を含むがこれらには限定されない、カートリッジの1つ以上の縁に設計する機構である
。代わりの位置合わせ部材には、カートリッジの下側に設計され、表面2044における
1つ以上の凹陷ソケット又は孔と相補的な1つ以上のラグ(lug)又はバンブ(bump)が含ま
れる。代わりの位置合わせ部材には、カートリッジの下側に設計され、表面2044にお
ける1つ以上の1つ以上のラグ又はバンブと相補的な1つ以上の凹陷ソケット又は孔が
含まれる。一般に、機構のパターンは、カートリッジが少なくとも1つの非対称エレメン
トを所有し、1つの向きでしか受容ベイには挿入できないようになっている。

10

【0119】

また、図7には、ハンド・グリップ2042も示されており、ユーザによるヒータ・モ
ジュールの取り外し及び挿入をやり易くする。切欠2048によって、ユーザは、処理実
行後カートリッジを受容ベイ2014から容易に取り外すことが可能になり、例えば、ユ
ーザの親指は、カートリッジの上面を掴んでいるとき、切欠2048によって余裕のある
空間が得られる。切欠2042及び2048の双方は、図7の実施形態では半円状の凹陷
として示されているが、これらはその形状に限定されるのではないことは言うまでもない
。つまり、矩形、正方形、三角形、楕円形、及びその他の形状の凹陷も、ここに記載する
ヒータ・モジュールと調和する。

20

【0120】

図7の実施形態は、図2A~図2Eのシステムと互換性を有するように設計されており
、ヒータ・モジュールの前面が図の左側にある。ヒータ・モジュール2020の背後には
、RS-232接続のような電気接続2050があり、これによって、この中で更に説明
するサンプル処理及び分析の間、区域2044の特定の領域に配置されているヒータに電
気信号を送出することができる。つまり、区域2044の直下は、図7には示されてい
ないが、抵抗性ヒータのような熱源のアレイとすることができ、受容ベイに適正に挿入され
た微小流体カートリッジの指定箇所と整合するように構成されている。表面2044は、
周期的に浄化して、サンプル取り扱いの間に発生する可能性があるいずれの液体の漏出も
、短絡を全く起こさないことを確保することができる。

30

【0121】

ヒータ・モジュール2020には、他にも以下の必須でない機構がある。ヒータ・モ
ジュール2020の1つ以上の側面(前面、背面、又はフランキング等)、又は表面(上面
又は下面等)には、1つ以上のエア・ベント2052を設けることができ、受容ベイ20
14の直下にあるヒータが動作しているときに、過剰の熱を逃がすことができる。図7に
おけるエア・ベントの構成は一例であり、他の数及び形状も、ヒータ・モジュールの慣例
的な製作及び使用と調和することは言うまでもない。例えば、5つの正方形エア・ベント
を示すが、1、2、3、4、6、8、又は10個というような他の数のエア・ベントを、
ヒータ・モジュールの一方側に配列する、あるいは2つ以上の側面及び/又は面全体に
分散させることもできる。更に別の実施形態では、エア・ベントは、円形、矩形、楕円形、
三角形、多角形、とすることもでき、湾曲した又は直角の頂点、又は不規則な形状を含む
、更に別の形状を有することもできる。

40

【0122】

更に、ヒータ・モジュール2020は、1つ以上の案内部材2047も備えることが
でき、これらはヒータ・モジュールを装置に挿入し易くする。これについては、ヒータ・モ

50

ジュール2020がユーザによって取り外すことができる実施形態で更に説明する。ヒータ・モジュールが取り外せることが利点であるのは、異なる位置合わせ部材及び/又は微小流体ネットワークを有する異なるカートリッジを、同じ又は異なる処理動作のシーケンスと共に採用するというように、異なる種類の分析のためにシステム2000の構成を容易に変更できるからである。別の実施形態では、ヒータ・モジュール2020は、固定とし、例えば、浄化、交換、又は保守のために、製造業者又は公認保守代理人によってのみ取り外すことができ、ユーザによって日常的に取り外すことはできないように設計されている。案内部材は、ヒータ・モジュールが正しく装置内で位置合わせされていることを確保すること、そしてサンプルの処理及び分析の間、又は装置の輸送の間、ヒータ・モジュールが密着し大きく移動しないことを保証することという1つ以上の役割を果たすことができる。図7の実施形態に示す案内部材は、受容ベイ2044のいずれかの側にあり、モジュール2020の全長の相当な部分に沿って広がっている。別の案内部材もこの中の使用と調和し、限定ではないが、1、3、4、5、6、又は8つというような、別の数の案内部材、そしてモジュール2020の区域2051内に配置することを含む、別の位置が含まれる。案内部材2047は、その長さに沿って一定でない厚さを有するように示されている。他の案内部材はその長さに沿って本質的に一定の厚さを有してもよいことは、本発明と調和する。

10

【0123】

隣接する受容ベイ2014は、ランプのような、凹陷区域2053の中に設定した、非接触加熱エレメント2046である。凹陷区域2053には、反射板、又は反射被膜も設けて、非接触加熱エレメント2046からのできるだけ多くの熱及び光エネルギーを受容ベイ2014に向けて外側に送出するように構成するとよい。エレメント2046は、ある種の実施形態では、熱ランプである。エレメント2046は、電気エネルギーを受け、それによって電気抵抗の効果によって加熱するように構成されている。エレメント2046は、受容ベイ2014に収容されているカートリッジの隆起領域を加熱する方法を提供する。カートリッジの隆起領域(例えば、図9参照)は、溶解室を内蔵することができ、非接触加熱エレメント2046からの熱を加えることによって、溶解室内で細胞を溶解させる効果を有することができる。

20

【0124】

また、図7には、ヒータ・モジュール2020の区域2051上にある、光学蛍光材2049のような、蛍光材の任意領域も示されている。蛍光材の領域は、この中で更に説明する検出システムによって検出されるように構成されている。領域2049は、サンプル処理及び分析に先だって、検出システムにおいて光学素子の状態を検証するために用いられ、したがって制御又は標準として作用する。例えば、一実施形態では、装置の蓋(例えば、図2A参照)が開いているとき、周囲の光が領域2049に到達することができ、これによって蛍光材が特性周波数又は光のスペクトルを放出することができ、これを検出器が、例えば、標準化又は校正の目的で測定することができる。別の実施形態では、周囲光を抛り所として蛍光材料に発光させる代わりに、1つ以上のLEDのような、検出システム自体からの光源を用いる。したがって、領域2049は、検出器の位置と整合するように位置付けられる。領域2049は、矩形であるように示されているが、正方形、円形、楕円形、三角形、多角形のようなその他の形状で、湾曲した又は直角の頂点を有するように構成することもできる。また、領域2049は、都合に応じて、そして展開する検出システムに対して相補的となるために、ヒータ・モジュール2020上の他の場所に配置してもよいことは言うまでもない。

30

40

【0125】

また、ヒータ・モジュール2020は、区域2044の直下に配されているヒータのレイも備えているが、図7には示されていない。更にここで説明するように、このようなヒータは、受信した電気信号にしたがって特定のそして特定の時点に加熱するように構成されている、抵抗性ヒータとするとよい。

【0126】

50

即ち、図7には示されていないが、ヒータ/センサ・モジュール2020は、例えば、多重化機能902を離散多重化回路ボード(MUXボード)に、1つ以上のヒータ(例えば、マイクロヒータ)、1つ以上の温度センサ(任意に、例えば、溶融シリカ基板上にフォトリソグラフィによって製作したような、1つ以上のそれぞれのマイクロヒータを有し、任意に合体して1つのヒータ/センサ・ユニットとなる)、及び非接触加熱エレメント2046を含むことができる。マイクロヒータ及び非接触加熱エレメントは、熱エネルギーを供給することができ、この熱エネルギーは、相応しく位置付けられている微小流体カートリッジ上にある種々の微小流体構成要素を作動させることができる。センサ(例えば、抵抗性温度検出器(RTD)のような)は、例えば、フィードバックに基づくメカニズムを通じて、マイクロヒータ及び非接触ヒータ2046のリアル・タイム監視を可能とし、温度制御に対処する。1つ以上のマイクロヒータは、相応しく位置付けられた微小流体カートリッジ上で加熱する対応の微小流体構成要素(例えば、弁、ポンプ、ゲート、反応室)と位置合わせすることができる。マイクロヒータは、微小流体カートリッジ上の対応する微小流体構成要素よりも多少大きく設計することができるので、中心外れのように、カートリッジが多少ヒータからずれていても、個々の構成要素を効果的に加熱することができる。

10

【0127】

また、非接触ヒータ2046は、相応しく位置付けられている微小流体カートリッジの少なくとも一区分を加熱する放射熱源としての役割を果たすこともできる。例えば、20Wのキセノン・ランプを、非接触加熱エレメント2046として用いることができる。種々の実施形態では、ヒータ/センサ・モジュール2020は、個々のカートリッジ設計に特定のとすることができ、装置800の前面パネルを通じて容易に交換可能とすることができる。ヒータ/センサ・モジュール2020は、普通の洗剤(例えば、10%漂白溶液)で加熱面2044を洗浄できるように構成することができる。

20

【0128】

図8A及び図8Bを参照すると、循環的にPCR反応ゾーン1001を加熱するように構成されているヒータ集合の一例が示されている。尚、図8A及び図8Bに示すヒータを統御する原理と同様の原理にしたがって、他のゲート、弁、及びアクチュエータのような微小流体カートリッジの他の領域を作動させるためのヒータ構成を設計し展開することもできることは言うまでもない。PCR反応ゾーン1001の一例、通例、 $\sim 1.6\mu\text{l}$ の容積を有する室又はチャンネルには、長辺と短辺とが設けられており、各々には、加熱エレメントが関連付けられている。PCR反応ゾーンは、ここでは、PCRリアクタとも呼ぶ場合もある。したがって、装置は、好ましくは、図8Aの実施形態例に示すように、所与のPCR反応ゾーンの辺に沿って配置されこれを加熱するように構成されている4つのヒータ、即ち、長い上側ヒータ1005、長い下側ヒータ1003、短い左側ヒータ1007、及び短い右側ヒータ1009を含む。長い上側ヒータ1005と長い下側ヒータ1003の間に小さい間隙があるため、無視し得る温度勾配(PCR反応ゾーンの長さに沿ったいずれの地点においてもPCRチャンネルの幅を横切って1未満)が生じ、したがってPCR反応ゾーン全体に事実上均一な温度が得られる。PCRリアクタの短縁上のヒータは、2つの長ヒータによってリアクタの中心からリアクタの縁までに発生する勾配を相殺するための熱を供給する。

30

40

【0129】

尚、PCR反応ゾーンを中心に配置されている1つ以上のヒータの更に別の構成も、ここに記載する方法及び装置と調和することは、当業者には当然分かるはずである。例えば、反応ゾーンの「長い」辺は、2つ以上のヒータで加熱するように構成することができる。熱伝導性が低い基板上においても均一な加熱ゾーンを創作するために、特定の方位及び構成のヒータを用いる。何故なら、ガラス又はクォーツ、あるいは溶融シリカ基板の低い熱伝導性は、弁のような種々の微小流体構成要素の独立した動作、及び種々のPCRレーンの独立した動作を促進するために利用されるからである。尚、PCR反応ゾーン周囲のヒータの構成の基礎となる原理は、アクチュエータ、弁、及びゲートのような、微小流

50

体カートリッジのその他の構成要素に隣接するヒータの配列にも同様に適用可能であることも、当業者には当然分かるはずである。

【0130】

ある種の実施形態では、各ヒータには温度センサが関連付けられている。図8Aの実施形態では、双方の長ヒータに1つの温度センサ1011が用いられている。短い左側ヒータの温度センサ1013、及び短い右側ヒータの温度センサ1015も示されている。リアクタの中央にある温度センサは、フィードバックを与え、2つの長ヒータに供給する電力量を制御するために用いられ、一方短ヒータの各々は、それに隣接して配置されておりそれを制御するための専用の温度センサを有する。温度センサは、好ましくは、ヒータを加熱させる電流をヒータが受信していないようなときに、その近傍における温度に関する情報をプロセッサに送信するように構成されている。これは、電流サイクルのしかるべき制御によって達成することができる。

10

【0131】

PCRヒータを制御するために必要なセンサ又はヒータ・エレメントの数を削減するために、熱を検知するためにもヒータを用いることによって、ヒータ毎に別個の専用センサを有する必要性をなくすることができる。別の実施形態では、4つのヒータの各々は、しかるべきワット数を有し、4つのヒータを直列又は並列に接続して、電氣的に制御可能なエレメントの数を4から1に削減することによって、付随する電子回路への負担を低減するように設計することができる。

【0132】

図8Bは、図8AのPCR反応ゾーンと共に用いるヒータ及び温度センサの拡大図を示す。温度センサ1001及び1013は、約200~300オームの常温抵抗を有するように設計されている。この抵抗値は、堆積する金属層の厚さ(例えば、400のTiW/3, 000のAu/400のTiWの積層)を制御し、金属巻線をエッチングして約10~25µmの幅及び20~40mmの長さを有するようにすることによって決定する。この層に金属を用いることによって、約0.5~20 / 、好ましくは1.5~3 / の範囲の抵抗率の温度係数がそれに与えられる。もっと高い温度で抵抗を測定すると、これらのセンサの場所の正確な温度の判定が可能となる。

20

【0133】

図8Aに示す、1つのPCR反応ゾーンのための均一加熱構成は、多数の独立したPCR反応が起こるマルチ・レーンPCRカートリッジにも適用することができる。

30

各ヒータは、ここに記載する装置と共に用いるプロセッサ及び/又は制御回路によって独立して制御することができる。図8Cは、図8A及び図8Bにおけるように構成したヒータによって加熱した場合の、微小流体カートリッジの上面からの熱像を示す。このとき、各ヒータを次のように順番に活性化した。図8Cにおいて、(1)は長い上側のみ、(2)は長い下側のみ、(3)は短い左側のみ、(4)は短い右側のみ、及び(5)は4つのヒータ全てがオン下状態を示している。パネル(6)は、図8Cにおけるその他の画像パネルと同じメモリで、反応ゾーン及びヒータの図を示す。また、図8Cには、温度軸も示されている。

【0134】

微小流体カートリッジ

40

図9は、本明細書に記載するシステムと共に用いる微小流体カートリッジ2060の一例の外見の斜視図を示す。カートリッジ2060の中には、少なくとも1つの試薬パッケージ2062が含まれている。このような試薬カートリッジが4つ示されているが、限定ではなく、1、2、3、5、6、8、10、及び12個というような、その他の数のこのようなパッケージも、用途に応じて可能である。更に、カートリッジ2060は、試薬を収容し、ルアーのような入口2066にはめ込まれるタワー2064を備えている。入口2066を通じて、生物サンプルの一部を導入することができる。また、タワー2064は、バルク・溶解室2065及び廃棄物室2067のような、1つ以上の室も備えることができる。廃棄物室2067は、空気のような気体を放出するためのベント2069を有

50

するとよい。

【0135】

タワー2064以外では、カートリッジ2060は実質的に平坦であり、操作者が容易に取り扱うことができ、図1に示すような装置の相補的受容ベイに容易に沿わせることができるようになっている。

更に、カートリッジ2060は、ポート2068を備えており、これを通じて検出器が、処理又は増幅中に、信号を直接又は間接的にサンプル内の1つ以上のポリヌクレオチドから受け取り、ユーザにサンプルに対する診断結果を供給することができる。

更に、カートリッジ2060は、受信ベイにおける対応する位置合わせ部材に対して相補的な、機械的キーのような、位置合わせ部材も備えることができる。図9には、位置合わせ部材2071の一例として、カートリッジからの角切欠が示されている。

【0136】

ここに記載する一体化システムは、微小流体カートリッジを収容するように構成されている装置と、微小流体カートリッジとを備えている。微小流体カートリッジの多数の異なる構成、及びその目的が、相応しく構成された装置と互換性を有することは、ここに記載するシステムと調和する。つまり、例えば、1つのカートリッジが収集した生物サンプルを受け入れ、サンプルに一連の検査を行い、溶解細胞(lysing cell)を含ませてその中に含有するポリヌクレオチドを解放及び収集し、予備増幅準備ステップをポリヌクレオチドに適用し、ポリヌクレオチドを増幅し、増幅したポリヌクレオチドを検出させることができる場合の便益について述べるが、他の微小流体カートリッジを用いることができることも、この中の記載と調和する。このようなその他のカートリッジは、前述のステップよりも少ない、1つ以上のようなステップを実行するように構成することができ、対応して、それと共に用いる装置は、このような少ないステップを実行させるように構成される。したがって、この中で微小流体カートリッジの種々の構成例を紹介するときは、その種々の構成要素は、修正せずにも、適宜幾何学的形状又はサイズの適した調節又は修正を伴ってでも、相互交換可能に用いることができることは言うまでもない(例えば、1つのカートリッジと関連付けて記載する弁の一例は、他のカートリッジと関連付けて記載するネットワークにおいて用いることもできる。)

【0137】

微小流体カートリッジの態様

したがって、本技術は、以下のような属性を有する微小流体カートリッジも備えている。つまり、本技術は、1つ以上のポリヌクレオチドを処理し、例えば、ポリヌクレオチドを終結させる及び/又はポリヌクレオチドの検出及び/又は増幅を妨げる虞れがあるインヒビタ複合体(例えば、ヘモグロビン、ペプチド、糞便複合体、フミン酸、粘性複合体、DNA結合蛋白質、サッカリド)からポリヌクレオチドを分離するように構成されている微小流体カートリッジを含む。

【0138】

微小流体カートリッジは、ポリヌクレオチドと、インヒビタとは対照的にポリヌクレオチドと優先的に連合する(例えば、保持する)、比較的固定化した複合体とを接触させるように構成することができる。複合体の一例には、ポリカチオニック・ポリアミド(poly-cationic polyamide)(例えば、ポリ-L-リシン及び/又はポリ-D-リシン)又はポリエチレンイミン(PEI)があり、表面(例えば、1つ以上の粒子の表面)に結合することができる。複合体は、ポリヌクレオチドを保持し、複合体及び付随するポリヌクレオチドが結合される表面を洗浄する等によって、ポリヌクレオチド及びインヒビタを分離できるようにする。分離の再、ポリヌクレオチドと複合体との間の連合は破壊され、複合体及び表面からポリヌクレオチドを放出(例えば、分離)することができる。

【0139】

実施形態の中には、表面(例えば、1つ以上の粒子の表面)を、共有結合によって表面に結合することができる、ポリアミド又はPEIのようなポリカチオニック物質で改質することができる場合もある。ポリカチオニック・ポリアミドは、ポリ-L-リシン及びポ

10

20

30

40

50

リ-D-リシンの内少なくとも1つを含むとよい。実施形態の中には、ポリカチオン・ポリアミド（例えば、ポリ-L-リシン及びポリ-D-リシンの内少なくとも1つ）は、少なくとも約7500Daの平均分子重量を有する。ポリカチオン・ポリアミド（例えば、ポリ-L-リシン及びポリ-D-リシンの内少なくとも1つ）は、約35,000Da未満の平均分子重量を有するとよい（例えば、約30,000Da未満の平均分子重量（例えば、約25,000Daの平均分子重量））。ポリカチオン・ポリアミド（例えば、ポリ-L-リシン及びポリ-D-リシンの内少なくとも1つ）は、少なくとも約15,000Daの中央分子重量を有するとよい。ポリカチオン・ポリアミド（例えば、ポリ-L-リシン及びポリ-D-リシンの内少なくとも1つ）は、約25,000Da未満の中央分子重量（例えば、約20,000Da未満の中央分子重量（例えば、約20,000Daの中央分子重量））を有するとよい。ポリカチオン材料がPEIである場合、その分子重量は、600~800ダルトンの範囲であることが好ましい。

10

【0140】

他の実施形態では、微小流体カートリッジは、ポリカチオン・ポリアミド又はPEIが結合した表面と、表面を流体サンプルに接触させるための表面と連通するサンプル導入路とを含む。

実施形態の中には、本装置が、表面と接触する水溶液を少なくとも約65℃まで加熱するように構成されている熱源を含む場合もある。

実施形態の中には、カートリッジが少なくとも約10（例えば、約10.5以上）のpHを有する液体のリザーバを含む場合もある。カートリッジは、表面を液体と接触させるように構成することができる（例えば、圧力源を作動させて液体を移動させることによって）。

20

【0141】

微小流体カートリッジの別の態様は、保持部材、例えば、結合PEI、又はポリリシン、例えば、ポリ-L-リシンを含むビーズのような複数の粒子、並びに関係する方法及びシステムに関する。サンプルを処理する方法の一例は、保持部材を、混合物と接触させることを含み、液体及びある量のポリヌクレオチドを含む混合物を供給することを含む。保持部材は、ポリメラーゼ連鎖反応インヒビタと比較して、ポリヌクレオチドを優先的に保持するように構成するとよい。混合物における液体の実質的に全てを、保持部材から除去することができる。ポリヌクレオチドは、保持部材から放出することができる。ポリヌクレオチドは、約7.5Mbp未満のサイズを有することが好ましい。

30

【0142】

液体は、第1液体であり、保持部材から液体の実質的に全てを除去する際、保持部材を第2液体と接触させることを含む。

保持部材を第2液体と接触させる際、熱作動式圧力源を作動させて、圧力を台2液体に加えることを含むことができる。保持部材を第2液体と接触させる際、熱作動式弁を開放して、第2液体を保持部材と連通させることを含むことができる。

第2液体は、約50マイクロリットル未満の体積を有し、洗剤（例えば、SDS）を含んでいる。

【0143】

40

保持部材は、ポリヌクレオチドを優先的にポリメラーゼ連鎖反応インヒビタに結合するように構成されている複合体を有する表面を含むとよい（このようなインヒビタは、例えば、ヘモグロビン、ペプチド、糞便複合体、フミン酸、粘性複合体、DNA結合蛋白質、サッカリドを含む）。

表面は、ポリリシン（例えば、ポリ-L-リシン及び/又はポリ-D-リシン）又はPEIを含むとよい。

【0144】

ポリヌクレオチドを保持部材から放出する際、保持部材を少なくとも約50℃（例えば、約65℃）の温度に加熱することを含むとよい。温度は、加熱の間保持部材の存在下において液体を沸騰させるには不十分とするとよい。温度は、100℃以下とするとよい（

50

例えば、100 未満、約97 以下)。温度は、約10分未満の間(例えば、約5分未満、約3分未満)維持するとよい。放出は、保持部材の遠心分離を伴わずに行うとよい。

【0145】

ある種の実施形態では、PCRインヒビタを臨床サンプルから迅速に除去して、PCRの準備ができたサンプルを作成することができる。したがって、本方法は、インヒビタを実質的に排除することができるポリヌクレオチド含有サンプルの調合を含むとよい。このようなサンプルは、例えば、熱、化学、超音波、機械、静電、及びその他の溶解技法から得られる、生のライセートから調合するとよい。サンプルは、遠心分離を伴わずに調合するとよい。サンプルは、他の微小流体デバイスを用いて、又は規模を大きくして調合してもよい。

10

【0146】

保持部材は、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅のような、更に別の処理のためにポリヌクレオチド・サンプルを調合するために用いてもよい。ある種の実施形態では、90%よりも多いポリヌクレオチドがサンプル内に存在すると、保持部材に結合させ、放出し、回収することができる。

ある種の実施形態では、約10分未満(例えば、約7.5分未満、約5分未満、又は約3分未満)でポリヌクレオチドを保持部材に結合し、放出し、回収することができる。

【0147】

ポリヌクレオチド、保持部材、及び/又はインヒビタを遠心分離にかけなくとも、ポリヌクレオチドを保持部材に結合し、放出し、回収することもできる。

20

ポリヌクレオチド及びインヒビタを分離するには、一般に、ポリヌクレオチド、インヒビタ、処理領域、及び/又は保持部材を沈殿(例えば、遠心分離)させることを除外する。

【0148】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、ポリメラーゼ酵素と複数のヌクレオチドとを含むPCR試薬混合物を含むことができる。PCR試薬混合物は、1つ以上の凍結乾燥ペレットの形態をなすことができ、微小流体ネットワークは、PCRペレットを液体と接触させてPCR試薬混合物溶液を作成するように構成することができる。

【0149】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、外部熱源からの熱をPCR試薬混合物及び中和したポリヌクレオチド・サンプルと、中和ポリヌクレオチド・サンプルからPCRアンプリコンを作成するのに適した熱サイクル条件の下で、結合するように構成することができる。

30

種々の実施形態では、PCR試薬混合物は、更に、陽性制御プラスミド(positive control plasmid)及びプラスミドの少なくとも一部のために選択した蛍光原混成プローブを含むことができる。

【0150】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、陰性制御ポリヌクレオチドを含むことができ、微小流体ネットワークは、中和ポリヌクレオチド・サンプルのPCRアンプリコン及び陰性制御ポリヌクレオチドのPCRアンプリコンを独立して作成するのに適した熱サイクル条件の下で、中和ポリヌクレオチド・サンプル及び陰性制御ポリヌクレオチドの各々を独立してPCR試薬混合物と接触させるように構成することができる。

40

【0151】

種々の実施形態では、微小流体カートリッジは、ポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる少なくとも1つのプローブを含むことができ、微小流体カートリッジは、中和ポリヌクレオチド・サンプル又はそのPCRアンプリコンをプローブと接触させるように構成することができる。プローブは、蛍光原混成プローブとすることができる。蛍光原混成プローブは、蛍光レポータ染料(fluorescent reporter dye)及び蛍光消光染料に結合されたポリヌクレオチド・シーケンスを含むことができる。PCR試薬混合物は、更に、陽性制御プラスミドと、プラスミドの少なくとも一部のために選択したプ

50

ラスミド蛍光原混成プローブとを含むことができ、微量流体カートリッジは、蛍光原混成プローブ及びプラスミド蛍光原混成プローブの独立した光学的検出を可能にするように構成することができる。

【 0 1 5 2 】

種々の実施形態では、プローブは、有機体、例えば、デオキシリボ核酸又はリボ核酸ポリヌクレオチドを用いるいずれの有機体の特徴をも示すことができるポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる。つまり、プローブはいずれの有機体にも選択することができる。適した有機体は、ほ乳類（ヒトを含む）、鳥類、は虫類、両生類、魚類、家畜、飼育動物、野生動物、絶滅した有機体、バクテリア、菌類、ウイルス、植物等を含む。また、プローブは、それら自体のポリヌクレオチドを用いる有機体、例えば、ミトコンドリアの成分のために選択的とすることもできる。実施形態の中には、プローブは、微小有機体、例えば、食品生産に用いられる有機体（発酵製品において用いられるイースト、チーズに用いられるカビ又はバクテリア等）又は病原体（例えば、ヒト、家畜又は野生動物、家禽又は野生鳥類等の）に用いられる有機体のために選択的とすることができる場合もある。実施形態の中には、プローブが、グラム陽性バクテリア、グラム陰性バクテリア、イースト、菌類、原生動物、及びウイルスから成る一群から選択した有機体のために選択的とすることができる場合もある。

【 0 1 5 3 】

種々の実施形態では、プローブは、*Staphylococcus* spp、例えば、*S. エピダーミディ*ス(*S. epidermidis*)、*S. オーレウス*(*S. aureus*)、耐メチシリン・スタフィロコッカス・オーレウス (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA))、耐バンコミシン・スタフィロコッカス (*Vancomycin-resistant Staphylococcus*) ; *S. ピオジーンズ*(*S. pyogenes*)、*S. アガラクティエ*(*S. agalactiae*)のようなストレプトコッカス(*Streptococcus*) (例えば、*S. グループ A*、*S. グループ B*、*S. グループ C*、*S. グループ D*又は*S. グループ G*) (*hemolytic. Group A, B, C, D or G*) ; *E. フェーカリス*(*E. faecalis*)、*E. デュランズ*(*E. durans*)及び*E. フェーシウム*(*E. faecium*) (以前の*S. フェーカリス*(*S. faecalis*))、*S. デュランズ*(*S. durans*)、*S. フェーシウム*(*S. faecium*) ; ノネンテロコッカル・グループDストレプトコッチ(*nonenterococcal group D streptococci*)、例えば、*S. ボビス*(*S. bovis*)、及び*S. エクイーズ*(*S. equines*) ; ストレプトコッチ・ヴィリダンス(*Streptococci viridans*)、例えば、*S. ミュータンズ*(*S. mutans.*)、*S. サンギス*(*S. sanguis*)、*S. サリパリアス*(*S. salivarius*)、*S. ミチア*(*S. mitior*)、*A. ミレリー*(*A. milleri*)、*S. コンステラタス*(*S. constellatus*)、*S. インターミディウス*(*S. intermedius*)、及び*S. アンギノス*(*S. anginosus*) ; *S. イニエ*(*S. iniae*) ; *S. ニューモニエ*(*S. pneumoniae*) ; *ネイセリア*(*Neisseria*)、例えば、*N. メニンジタイズ*(*N. meningitides*)、*N. ゴノローエ*(*N. Gonorrhoeae*)、サブプロフィック・ネイセリア s p (*saprophytic Neisseria sp*) ; *エリシペロスリクス*(*Erysipelothrix*)、例えば、*E. ルシオパティエ*(*E. rhusiopathiae*) ; *リステリア* s p p (*Listeria spp*)、例えば、*L. モノシトジェン*(*L. monocytogenes*)、希に*L. イヴァノヴィイ*(*L. ivanovii*)、及び*L. シーリゲリ*(*L. seeligeri*) ; *バシラス*(*Bacillus*)、例えば、*B. アンスラシス*(*B. anthracis*)、*B. セレウス*(*B. cereus*)、*B. サブティリス*(*B. subtilis*)、*B. サブティラス・ニガー*(*B. subtilus niger*)、*B. サリンジーシス*(*B. thuringiensis*) ; *ノカードシア・アステロイズ*(*Nocardia asteroides*) ; *レジオネラ*(*Legionella*)、例えば、*L. ニューモノフィリア*(*L. pneumonophilia*)、*ニューモシスティス*(*Pneimocystis*)、例えば、*P. カリニイ*(*P. carinii*) ; *サルモネラ*(*Salmonella*)、*シゲーラ*(*Shigella*)、*エシェリキア*(*Escherichia*) のようなエンテロバクテリアセエ(*Enterobacteriaceae*) (例えば、*E. コリ*(*E. coli*)、*E. コリ* O 1 5 7 (*E. coli* O157) : H 7) ; *クレブシーラ*(*Klebsiella*)、*エンテロバクター*(*Enterobacter*)、*セラティア*(*Serratia*)、*プロテウス*(*Proteus*)、*モルガネラ*(*Morganella*)、*プロビデンシア*(*Providencia*)、*エルシニア*(*Yersinia*)等、例えば、*サルモネラ*(*Salmonella*)、例えば、*S. ティフィ*(*S. typhi*)、*S. パラティフィ* A、B (*S. paratyphi A, B*) (*S. ショットミュレリ*(*S. schottmuelleri*))、及び C (*S. ヒルシュフェルディ*

10

20

30

40

50

(*S. hirschfeldii*)、*S. ダブリン* *S* コレレースイス(*S. dublin S choleraesuis*)、*S. エンテリティディス*(*S. enteritidis*)、*S. ティフィムリウム*(*S. typhimurium*)、*S. ハイデルベルグ*(*S. heidelberg*)、*S. ニューポート*(*S. newport*)、*S. インファンティス*(*S. infantis*)、*S. アゴナ*(*S. agona*)、*S. モンテビデオ*(*S. montevideo*)、及び *S. サンポール*(*S. saint-paul*) ; *シゲラ*(*Shigella*)、例えば、*S. フレックスネリ*(*S. flexneri*)、*S. ソネイ*(*S. sonnei*)、*S. ボイディイ*(*S. boydii*)、*S. ディセンテリエ*(*S. dysenteriae*)のような、サブグループ：A、B、C、及びD ; *プロテウス*(*Proteus*) (*P. ミラビリス*(*P. mirabilis*)、*P. ブルガリス*(*P. vulgaris*)、及び *P. ミクソファシア* *ンズ*(*P. myxofaciens*)、*モーガネラ*(*Morganella*) (*M. モーガニイ*(*M. morganii*) ; *プロビ* *デンシア*(*Providencia*) (*P. レットゲリ*(*P. rettgeri*)、*P. アルカリファシエンス*(*P. alcalifaciens*)、及び *P. スチュアーティ*(*P. stuartii*) ; *イエルシニア*(*Yersinia*)、
 10 例えば、*Y. ペスティス*(*Y. pestis*)、*Y. エンテロコリチカ*(*Y. enterocolitica*) ; *ヘモ* *フィラス*(*Haemophilus*)、例えば、*H. インフルエンゼ*(*H. influenzae*)、*H. パラインフ* *ルエンゼ*(*H. parainfluenzae*)、*H. アフロフィラス*(*H. aphrophilus*)、*H. デュクレイ* *(H. ducreyi)* ; *ブルセラ*(*Brucella*)、例えば、*B. アボータス*(*B. abortus*)、*B. メリ* *テンシス*(*B. melitensis*)、*B. スイス*(*B. suis*)、*B. カニス*(*B. canis*) ; *フランシセ* *ラ*(*Francisella*)、例えば、*F. チュラレンシス*(*F. tularensis*) ; *シュードモナス*(*Pseudomonas*)、
 20 例えば、*P. エルギノサ*(*P. aeruginosa*)、*P. ポーシモビリス*(*P. paucimobilis*)、*P. ピュティダ*(*P. putida*)、*P. フルオレセンス*(*P. fluorescens*)、*P. アシドボ* *ランス*(*P. acidovorans*)、*パークホルデリア* (*シュードモナス*) *シュードマレイ*(*Burkholderia* *(Pseudomonas) pseudomallei*)。 *パークホルデリア*・*マレイ*(*Burkholderia mallei*)、
パークホルデリア・*セパシア*(*Burkholderia cepacia*)、及び *ステノトロフォマナス*・*マル* *トフィリア*(*Stenotrophomonas maltophilia*) ; *カンピロバクタ*(*Campylobacter*)、例え
 ば、*C. フェツス*・*フェツス*(*C. fetus fetus*)、*C. ジェジュニ*(*C. jejuni*)、*C. ピロ* *リ*(*C. pylori*) (*ヘリコバクタ*・*ピロリ*(*Helicobacter pylori*)) ; *ビブリオ*(*Vibrio*)、例
 えば、*V. コレラ*(*V. cholerae*)、*V. パラヘモリティカス*(*V. parahaemolyticus*)、*V.* *ミニカス*(*V. mimicus*)、*V. アルギノリティカス*(*V. alginolyticus*)、*V. ホリセ*(*V.* *hollisae*)、*V. ヴルニフィカス*(*V. vulnificus*)、及び凝着不可の *ビブリオ* ; *クロスト* *リディア*(*Clostridia*)、例えば、*C. パーFRINGENS*(*C. perfringens*)、*C. テタニ*(*C.* *tetani*)、*C. ディフィシル*(*C. difficile*)、*C. ボツリヌス*(*C. botulinum*) ; *アンチ* *ノミセス*(*Actinomyces*)、例えば、*A. イスラエリ*(*A. israelii*) ; *バクテロイズ*(*Bacteroides*)、
 30 例えば、*B. フラジリス*(*B. fragilis*)、*B. テタイオタオミクロン*(*B. thetaio* *taomicron*)、*B. ディスタサニス*(*B. distasonis*)、*B. ブルガツス*(*B. vulgatus*)、*B.* *オヴァテュス*(*B. ovatus*)、*B. カツケ*(*B. caccae*)、及び *B. マーデ*(*B. merdae*) ; *プレ* *ボトラ*(*Prevotella*)、例えば、*P. メラニノゲニカ*(*p. melaninogenca*) ; *ジーナス*・*フソ* *バクテリウム*(genus *Fusobacterium*) ; *トレポネマ*(*Treponema*)、例えば、*T. パリダム*・*サ* *ブスペシース*・*エンデミカム*(*T. pallidum* *subspecies endemicum*)、*T. パリダム*・*サ* *ブスペシース*・*パーテニュー*(*T. pallidum* *subspecies pertenuis*)、*T. カラテウム*(*T. c* *arateum*)、
 40 及び *T. パリダム*・*サブスペシース*・*パリダム*(*T. pallidum* *subspecies pallidum*) ; *ジーナス*・*ボレリア*(genus *Borrelia*)、例えば、*B. バーグドローフェリ*(*B. bur* *gdorferi*) ; *ジーナス*・*レプトスピラ*(genus *Leptospira*) ; *ストレプトバシラス*(*Streptobacillus*)、
 例えば、*S. モニリフォーミス*(*S. moniliformis*) ; *スピリラム*(*Spirillum*)、
 例えば、*S. ミヌス*(*S. minus*) ; *ミコバクテリウム*(*Mycobacterium*)、例えば、*M. ツベ* *ルクロシス*(*M. tuberculosis*)、*M. ボビス*(*M. bovis*)、*M. アフリカナム*(*M. africanum*)、
M. アヴィウス(*M. avium*)、*M. イントラセルレア*(*M. intracellulare*)、*M. カンサ* *シ*(*M. kansasii*)、*M. ゼノピ*(*M. xenopi*)、*M. マリナム*(*M. marinum*)、*M. ウルセラン* *ス*(*M. ulcerans*)、*M. フォーテユイタム*・*コンプレックス*(*M. fortuitum* *complex*) (*M.* *フォーテユイタム*(*M. fortuitum*)及び *M. ケロネイ*(*M. chelonae*))、*M. レブラエ*(*M. leprae*)、
M. アシアティクム(*M. asiaticum*)、*M. ケロネイ*・*スブスプ*・*アブセサス* *(M. chelonae* *ubsp. abscessus)*、*M. ファラックス*(*M. fallax*)、*M. フォーテユイタム* 50

(*M. fortuitum*)、*M. マルモエンセ* (*M. malmoense*)、*M. シモイデイ* (*M. shimoidei*)、*M. シミア* (*M. simiae*)、*M. スズルガイ* (*M. szulgai*)、*M. ゼノピ* (*M. xenopi*) ; ミコプラズマ (*Mycoplasma*)、例えば、*M. ホミニス* (*M. hominis*)、*M. オラレ* (*M. orale*)、*M. サリバリウム* (*M. salivarium*)、*M. ファーメンタンス* (*M. fermentans*)、*M. ニューモニア* (*M. pneumoniae*)、*M. ボビス* (*M. bovis*)、*M. ツベルクロシス* (*M. tuberculosis*)、*M. アヴィウム* (*M. avium*)、*M. レプレ* (*M. leprae*) ; ミコプラズマ (*Mycoplasma*)、例えば、*M. ジェニタリウム* (*M. genitalium*) ; ユレアプラスマ (*Ureaplasma*)、例えば、*U. ユレアリティクム* (*U. urealyticum*) ; トリコモナス (*Trichomonas*)、例えば、*T. ヴァジナリス* (*T. vaginalis*) ; クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、例えば、*C. ネオフォーマンス* (*C. neoformans*) ; ヒストプラズマ (*Histoplasma*)、例えば、*H. カプスラタム* (*H. capsulatum*) ; カンディダ (*Candida*)、例えば、*C. アルビカンス* (*C. albicans*) ; アスペルジルス *sp* (*Aspergillus sp*) ; コクシディオイデス (*Coccidioides*)、例えば、*C. イミティス* (*C. immitis*) ; プラストミセス (*Blastomyces*)、例えば、*B. ダーマティティディス* (*B. dermatitidis*) ; パラコクシディオイデス (*Paracoccidioides*)、例えば、*P. ブラジリエンシス* (*P. brasiliensis*) ; ペニシリウム (*Penicillium*)、例えば、*P. マーネフェイ* (*P. marneffeii*) ; スポロスリクス (*Sporothrix*)、例えば、*S. シェンキー* (*S. schenckii*) ; リゾプス (*Rhizopus*)、リゾムコア (*Rhizomucor*)、アブシディア (*Absidia*)、及びバシディオボルス (*Basidiobolus*) ; ビポラリス (*Bipolaris*)、クラドフィアロフォラ (*Cladophialophora*)、クラドスポリウム (*Cladosporium*)、ドレシエラ (*Drechslera*)、エクゾフィリア (*Exophiala*)、フォンセカエ (*Fonsecaea*)、フィアロフォラ (*Phialophora*)、キシロヒファ (*Xylohypha*)、オクロコニス (*Ochroconis*)、リノクラディエラ (*Rhinocladiella*)、スコレコバシディウム (*Scolecobasidium*)、及びワンジーラ (*Wangiella*) によって生ずる病気 ; トリコスポロン (*Trichosporon*)、例えば、*T. ベイジェリ* (*T. beigelii*) ; プラストシゾミセス (*Blastoschizomyces*)、例えば、*B. カピタツス* (*B. capitatus*) ; プラスモディウム (*Plasmodium*)、例えば、*P. ファルシパルム* (*P. falciparum*)、*P. ヴィヴァックス* (*P. vivax*)、*P. オヴァレ* (*P. ovale*)、及び *P. マラリエ* (*P. malariae*) ; バベシア *sp* (*Babesia sp*) ; ジーナス・トリパノソマのプロトゾア (protozoa of the genus trypanosome)、例えば、*T. クルジ* (*T. cruzi*) ; レイシュマニア、例えば、*L. ドノヴァニ* (*L. donovani*)、*L. メイジャ* *L. トロピカ* (*L. major L. tropica*)、*L. メキシカナ* (*L. mexicana*)、*L. ブラジリエンシス* (*L. braziliensis*)、*L. ヴィアニア・ブラジリエンシス* (*L. viannia braziliensis*) ; トクソプラズマ (*Toxoplasma*)、例えば、*T. ゴンディイ* (*T. gondii*) ; ジェネラ・ネグリエラ (genera *Naegleria*) 又はアカンサモエバ (*Acanthamoeba*) のアモエバス (*Amoebas*) ; エンタモエバ・ヒストリティカ (*Entamoeba histolytica*) ; ジアルディア・ランブリア (*Giardia lamblia*) ; ジーナス・クリプトスポリディウム (genus *Cryptosporidium*)、例えば、*C. パーヴム* (*C. parvum*) ; イソスポラ・ベリ (*Isospora belli*) ; シクロスポラ・カイエタネシス (*Cyclospora cayetanensis*) ; アスカリス・ランブリコイズ (*Ascaris lumbricoides*) ; トリチュリス・トリチウラ (*Trichuris trichiura*) ; アンシロストマ・デュオデナエ (*Ancylostoma duodenale*) 又はネクター・アメリカヌス (*Necator americanus*) ; ストロングロイデス・ステルコラリス・トクソカラ (*Strongyloides stercoralis Toxocara*)、例えば、*T. カニス* (*T. canis*)、*T. カティス* (*T. cati*) ; ベイリサスカリス (*Baylisascaris*)、例えば、*B. プロシオニス* (*B. procyonis*) ; トリチネラ (*Trichinella*)、例えば、*T. スピラリス* (*T. spiralis*) ; ドラクンクラス (*Dracunculus*)、例えば、*D. メディネンシス* (*D. medinensis*) ; ジーナス・フィラリオイデア (genus *Filarioidea*) ; ウツエレリア・バンクローフティ (*Wuchereria bancrofti*) ; プリンジア (*Brugia*)、例えば、*B. マライ* (*B. malayi*) 又は *B. テイモリ* (*B. timori*) ; オンコセルカ・ヴォルヴルス (*Onchocerca volvulus*) ; ロアロア (*Loa loa*) ; ディロフィアリア・インミティス (*Dirofilaria immitis*) ; ジーナス・シストソマ (genus *Schistosoma*)、例えば、*S. ジャポニクム* (*S. japonicum*)、*S. マンソニ* (*S. mansoni*)、*S. メコンジ* (*S. mekongi*)、*S. インターカラツム* (*S. intercalatum*)、*S. ヘモトビウム*

10

20

30

40

50

(*S. haematobium*) ; パラゴニムス(*Paragonimus*)、例えば、*P. ウェスターマニ*(*P. Westermani*)、*P. スキリアビニ*(*P. Skriabini*) ; クロノーチス・シネンシス(*Clonorchis sinensis*) ; ファシオラ・ヘパティカ(*Fasciola hepatica*) ; オピストホーチス *s p* (*Opisthorchis sp*) ; ファシオロプシス・バスキ(*Fasciolopsis buski*) ; ディフィロボツリウム・ラツム(*Diphyllobothrium latum*) ; テニア(*Taenia*)、例えば、*T. サジナタ*(*T. saginata*)、*T. ソリウム*(*T. solium*) ; エキノコッカス(*Echinococcus*)、例えば、*E. グラヌロス*(*E. granulosus*)、*E. ムルチロクラリス*(*E. multilocularis*) ; ピコマウイルス(*Picomaviruses*)、リノウイルス・エコウイルス(*rhinoviruses echoviruses*)、コックスサキエウイルス(*coxsackieviruses*)、インフルエンザ・ウイルス(*influenza virus*) ; パラミクソウイルス(*paramyxoviruses*)、例えば、タイプ 1、2、3、及び 4 ; アドノウイルス(*adnoviruses*) ; ヘルペスウイルス(*Herpesviruses*)、例えば、*H S V - 1* 及び *H S V - 2* ; ヴァリセラ・ゾスタ・ウイルス(*varicella-zoster virus*) ; ヒト T - リンファトロフィック・ウイルス(*human T-lymphotrophic virus*) (タイプ I 及びタイプ II) ; アーボウイルス(*Arboviruses*) 及び アレナウイルス(*Arnaviruses*) ; トガヴィリダエ(*Togaviridae*)、フラヴィヴィリダエ(*Flaviridae*)、ブニャヴィリダエ(*Bunyaviridae*)、レオヴィリダエ(*Reoviridae*) ; フラヴィウイルス(*Flavivirus*) ; ハンタウイルス(*Hantavirus*) ; ウィルス性脳炎(*Viral encephalitis*) (アルファウイルス(*alphaviruses*)、例えば、*ヴェネズレラン・エクイン・エンセファリティス*(*Venezuelan equine encephalitis*)、*イースタン・エクイン・エンセファリティス*(*eastern equine encephalitis*)、*ウェスタン・エクイン・エンセファリティス*(*western equine encephalitis*) ; ウィルス性出血熱(*Viral hemorrhagic fevers*) (フィロウイルス(*filoviruses*)、例えば、*エボラ*(*Eboia*)、*マーバーグ*(*Marburg*)、及び *アレナウイルス*(*arenaviruses*)、例えば、*ラッサ*(*Lassa*)、*マチュポ*(*Machupo*) ; 天然痘 (*ヴィリオラ*(*variola*)) ; レトロウイルス(*retroviruses*)、例えば、*ヒト免疫不全ウイルス 1* 及び *2* ; *ヒト乳頭腫ウイルス (H P V)* タイプ 6、11、16、18、31、33、及び 35 から成る一群から選択した有機体の特徴を示すことができるポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる。

【 0 1 5 4 】

種々の実施形態では、プローブは、*シュードモナ・アエルジノサ*(*Pseudomonas aeruginosa*)、*プロテウス・ミラビリス*(*Proteus mirabilis*)、*クレブシエラ・オキシトカ*(*Klebsiella oxytoca*)、*クレブシエラ・ニューモニエ*(*Klebsiella pneumoniae*)、*エシェリチア・コリ*(*Escherichia coli*)、*アシネトバクテル・バウマンニ*(*Acinetobacter Baumannii*)、*セラティア・マルセセンス*(*Serratia marcescens*)、*エンテロバクタ・アエロジェネス*(*Enterobacter aerogenes*)、*エンテロコッカス・ファエシウム*(*Enterococcus faecium*)、*耐ヴァコミシン・エンテロコッカス*(*vacomycin-resistant enterococcus (VRE)*)、*スタフィロコッカス・アウレウス*(*Staphylococcus aureus*)、*耐メセシリン・スタフィロコッカス・アウレウス*(*methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA)*)、*ストレプトコッカス・ヴィリダンス*(*Streptococcus viridans*)、*リステリア・モノシトジェネス*(*Listeria monocytogenes*)、*エンテロコッカス s p p .* (*Enterococcus spp.*)、*ストレプトコッカス・グループ B*(*Streptococcus Group B*)、*ストレプトコッカス・グループ C*(*Streptococcus Group C*)、*ストレプトコッカス・グループ G*(*Streptococcus Group G*)、*ストレプトコッカス・グループ F*(*Streptococcus Group F*)、*エンテロコッカス・ファエカリス*(*Enterococcus Faecalis*)、*ストレプトコッカス・ニューモニエ*(*Streptococcus pneumoniae*)、*スタフィロコッカス・エピデルミディス*(*Staphylococcus epidermidis*)、*ガルデネララ・ヴァジナリス*(*Gardenerella vaginalis*)、*マイクロコッカス s p s .* (*Micrococcus spp.*)、*ハエモフィルス・インフルエンゼ*(*Haemophilus influenzae*)、*ネイセリア・ゴノルホエエ*(*Neisseria gonorrhoeae*)、*モラクセラ・カタラリス*(*Moraxella catarrhalis*)、*サルモネラ s p s .* (*Salmonella spp.*)、*クラミディア・トラコマティス*(*Chlamydia trachomatis*)、*ペプトストレプトコッカス生成物*(*Peptostreptococcus productus*)、*ペプトストレプトコッカス・アナエロビウス*(*Peptostreptococcus anaerobius*)、*ラクトバ*

10

20

30

40

50

シルス・フェルメンツム(Lactobacillus fermentum)、ユーバクテリウム・レンテュム(Eu bacterium lentum)、カンディダ・グラブラタ(Candida glabrata)、カンディダ・アルビカンス(Candida albicans)、クラミディア s p p . (Chlamydia spp.)、カンプロバクタ s p p . (Camplobacter spp.)、サルモネラ s p . (Salmonella sp.)、天然痘(smallpox) (ヴィリオラ・マジョール) (viriola major)、イエルシナ・ペスティス(Yersina Pestis)、ヘルペス・シンプレクス・ヴィルス I (Herpes Simplex Virus I)(HSV I)、及びヘルペス・シンプレクス・ヴィルス I I (Herpes Simplex Virus II)(HSV II)から成る一群から選択した有機体を特徴付けるポリヌクレオチド・シーケンスのために選択的とすることができる。

【 0 1 5 5 】

10

種々の実施形態では、プローブを、グループ B ストレプトコッカスの特徴を示すポリヌクレオチド・シーケンスのために選択することができる。

【 0 1 5 6 】

また、本技術は、流体の運動を抑制する構成要素を有する微小流体カートリッジも備えている。この構成要素は、チャンネルと、チャンネルの第 1 側に配置した第 1 熱応答物質 (T R S) 質量体と、チャンネルの第 1 側とは逆になるチャンネルの第 2 側に配置した第 2 T R S 質量体と、第 1 T R S 質量体と関連付けられている気体圧力源とを備えている。気体圧力源を作動させることにより、第 1 T R S 質量体を第 2 T R S 質量体に送り込み、チャンネルを遮断する。

【 0 1 5 7 】

20

微小流体カートリッジは、第 2 T R S 質量体と関連付けられている第 2 気体圧力源を含むことができる。第 2 気体圧力源を作動させることによって、第 2 T R S 質量体を第 1 T R S 質量体に送り込む。第 1 及び第 2 T R S 質量体の少なくとも一方 (例えば、双方) は、ワックスとすることができる。

【 0 1 5 8 】

微小流体カートリッジの別の態様は、微小流体カートリッジのチャンネルを遮断する構成要素を含む。T R S の質量体を加熱し、チャンネルを横切って (例えば、気体圧力によって) 第 2 T R S 質量体に送り込むことができる。また、第 2 T R S 質量体を第 1 T R S 質量体に向けて送り込むことができる (例えば、気体圧力によって)。

【 0 1 5 9 】

30

微小流体カートリッジの別の態様は、アクチュエータである。このアクチュエータは、チャンネルと、チャンネルに接続されている室と、室内に配される封入液体の少なくとも 1 つのリザーバと、室内部においてリザーバを包囲する気体とを含む。室を加熱することによって、封入液体のリザーバが膨張し、気体を加圧する。通例、この液体の沸点は約 9 0 以下である。この液体は、約 1 0 個以下の炭素原子を有する炭化水素とするとよい。液体は、ポリマによって封入するとよい。

【 0 1 6 0 】

アクチュエータは、多数の封入液体のリザーバを含み、室内に配することができる。多数のリザーバは、固体 (例えば、ワックス) の中に分散することができる。多数のリザーバは、可撓性エンクロージャ (例えば、可撓性の袋) の中に配することもできる。

40

【 0 1 6 1 】

微小流体カートリッジの別の態様は、デバイスの室内部において気体を加圧して、微小流体デバイスのチャンネル内において液体を移動させるのに十分な気体圧力を発生させることを含む。通例、気体を加圧すると、室内部に配置されている少なくとも 1 つの封入気体のリザーバが膨張する。少なくとも 1 つのリザーバを膨張させるには、室を加熱することを含むことができる。気体を加圧するには、多数の封入液体のリザーバを膨張させることを含むことができる。

【 0 1 6 2 】

ここで用いるための微小流体カートリッジの別の態様は、第 1 及び第 2 液体体積を合体 (例えば、混合) することを含む。本デバイスは、デバイスの第 1 及び第 2 チャンネルを分

50

離する、温度応答物質 (T R S) の質量体 (mass) を含む。デバイスは、第 1 チャネルに沿って第 1 液体を移動させて、第 1 液体の一部 (例えば、中央部分) が T R S に隣接できるようにし、第 2 液体を第 2 チャネルに沿って移動させて、第 2 液体の一部 (例えば、中央部分) が T R S に隣接できるように構成することができる。熱源を作動させて T R S を移動させる (例えば、溶解、分散、崩壊によって) ことができる。第 1 及び第 2 液体の中央部分は、通例、合体しており、気体界面によって分離されていない。通例、第 1 液体の部分集合及び第 2 液体の部分集合を合体させることができる。液体は、混合チャネルに沿って移動するときに混合する。液体合体すると、少なくとも 2 液滴長だけ移動し、層間挿入及び横断方向核酸 (微小チャネルの長さに対して垂直) によって、適正な混合が得られ、混合のために長手方向の拡散のみを拠り所とする必要はない (例えば、"Mathematical modeling of drop mixing in a slit-type microchannel" (スリット型微小チャネルにおける滴下混合の数学的モデリング)、K Handique, et al., J. Micromech. Microeng., 11 548-554 (2001) も参照のこと。この内容はここで引用したことにより本願にも含まれるものとする)。混合液滴を一滴長ずつ移動させることによって、後端液滴の中央を先端液滴の先頭に移動させ、次いでチャネルの壁に向けて移動させる。液滴の後端では、液体が壁から液滴の中心に向かって移動する。この液滴の運動によって、2 つの液体間に層間挿入が生ずる。本方法を余分な回数繰り返すことにより、更に多くの液滴長にわたってというように、より多くの層間挿入を達成することができる。

10

【 0 1 6 3 】

更に、微小流体カートリッジは、凍結乾燥試薬粒子も含む。実施形態によっては、凍結乾燥粒子は、多数の更に小さい粒子を含み、各々が、P C R インヒビタと比較してポリヌクレオチドと優先的に連合する複数の受容体を有する。また (あるいは)、凍結乾燥粒子は、細胞を溶解してポリヌクレオチドを放出するように構成されている溶解試薬 (例えば、酵素) も含むことができる。また (あるいは)、凍結乾燥粒子は、蛋白質を劣化させる酵素 (例えば、プロテアーゼ) も含むことができる。

20

【 0 1 6 4 】

細胞は、例えば、微小流体液滴において、細胞の溶液を合体することによって溶解することができる、凍結乾燥粒子はこれによって粒子を再構成する。再構成した溶解試薬は、細胞を溶解する。ポリヌクレオチドは、更に小さい粒子の受容体と連合する。溶解の間、溶液を加熱するとよい (例えば、ヒート・ランプのようなランプを用いて放射的に、又は接

30

触熱源によって)。

実施形態によっては、凍結乾燥粒子が、P C R を実行するために試薬 (例えば、プライマ、制御プラスミド、ポリメラーゼ酵素) を含む場合もある。

【 0 1 6 5 】

微小流体カートリッジの別の態様は、液体 (例えば、溶剤、緩衝液、試薬、又はその組み合わせ) を保持することができる液体リザーバを含む。一般に、リザーバは、国際出願公開第 W O 2 0 0 6 / 0 7 9 0 8 2 号に更に記載されているような、以下の特徴の 1 つ以上を有することができる。

リザーバは、当該リザーバ内部の容積を減少させるように操作 (例えば、押圧又は押下) することができる壁を含むことができる。例えば、リザーバは、液体を放出するためにリザーバの別の部分 (例えば、壁の一部) を裂く穿孔部材 (例えば、針状又はそれ以外の、先が尖った又は尖鋭な部材) を含むことができる。穿孔部材は、リザーバの内部にあり、穿孔部材がリザーバの内面 (例えば、壁) から外に向かって壁を裂くようにすることができる。

40

【 0 1 6 6 】

一般に、壁は液体又は蒸気の通過に抵抗する。実施形態によっては、壁が伸縮性に欠ける場合もある。壁は可撓性があるとよい。壁は、例えば、金属層、例えば、箔層、ポリマ、又はその組み合わせを含み積層体であるとよい。壁は、真空成形によって形成するとよい (例えば、真空及び熱を材料層に食わせて、成型面に対して層を引き延ばす)。成型面は、壁に全体的に凸状面を設けることができるように、凹状であるとよい。

50

【0167】

リザーバが保持する液体の例には、水、及び1つ以上の塩（例えば、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、トリス緩衝液(Tris buffer)、又はその組み合わせ）を含む水溶液が含まれる。リザーバは、液体（例えば、実質的にその気化を生ずることなく）をある時間期間（例えば、少なくとも6カ月又は少なくとも1年）保管することができる。実施形態によっては、1年で10重量%未満（例えば、約5%未満）の液体が気化する。

【0168】

穿孔部材は、リザーバの壁の一体部分であってもよい。例えば、リザーバは、内部突起を有する壁を含むことができ、この内部突起がリザーバ内の液体と接触することができる。また、リザーバは、穿孔部材と対向する第2壁も含む。作動中、穿孔部材を駆動して第2壁を貫通し（例えば、内側から外側に向けて）、液体を放出することができる。

10

【0169】

実施形態によっては、リザーバが保管する液体の最大量を約1ml未満とすることができる。例えば、リザーバは、約500マイクロリットル（例えば、300マイクロリットル以下）を保持することができる。一般に、リザーバは、少なくとも約25マイクロリットル（例えば、少なくとも約50マイクロリットル）を保持する。リザーバは、意図する液体量の約10%以内（例えば、 $50 \pm 5 \mu\text{l}$ ）で導入することができる。

【0170】

リザーバは、実質的に空気がない（例えば、実質的に気体がない）ことが可能な所定量の液体を配出することができる。液体を導入するとき、実質的に空気及び/又は気体がない液体は、微小流体デバイス内にある液体の移動を妨害するような大きな気泡を殆ど又は全く生成しない。リザーバ内部に穿孔部材を用いることによって、リザーバが実質的に空気及び/又は気体がない液体を配出する能力を高めることができる。

20

【0171】

実施形態によっては、押圧によって液体を開放するためにリザーバを作動させることができる場合がある（例えば、ヒトの指又は親指で、あるいは機械的圧力作動によって）。圧力はリザーバの壁に直接加えてもよく、又は穿孔部材を有するプランジヤに加えてもよい。種々の実施形態では、リザーバを作動させるためには、最低限の圧力で済ませることができる。複数のリザーバを同時に又は順次作動させる（又は押下する）ために、自動化したシステムを用いることができる。

30

【0172】

リザーバの作動には、穿孔部材を駆動してリザーバの壁を貫通させることを含むとよい。実施形態によっては、リザーバが穿孔部材を含まないこともある。代わりに、リザーバ内部で発生する内部圧力がリザーバの壁を裂いて、液体を微小流体デバイスに進入させる。

【0173】

リザーバを作動させて液体を微小流体デバイスに導入すると、液体は一般にはリザーバに引き返すことはない。例えば、作動時に、リザーバの容積がある最小値に減少する場合があるが、一般には液体をリザーバに引き戻すように増大することはない。例えば、リザーバは、作動時に、押しつぶされたままになっていると考えられる。このような実施形態では、可撓性がある壁は、可撓性があってもよいが、ヒステリシス、弾力性、又は伸展性はなくてもよい。あるいは又はそれと共に、リザーバは、液体を全く引き戻すことなく、ベントから空気を引き込んでよい。

40

【0174】

リザーバは、その中にある試薬の反応性及び組成を保存する（例えば、リザーバの中にある化学薬品は、6カ月又は1年にわたって反応性の変化を殆ど又は全く呈しないことも可能である）。

リザーバの可撓壁は、化学薬品の侵出を制限又は防止することができる。リザーバは、微小流体カートリッジとは独立して組み立て、次いで微小流体カートリッジに固着することができる。

50

ポリヌクレオチドを処理するための微小流体カートリッジの例

【0175】

図10を参照すると、ここに記載するシステムと共に用いるのに適した微小流体カートリッジ200の一例の一部は、微小流体ネットワーク201を定める第1、第2、及び第3層205、207、及び209を含む。微小流体ネットワーク201は、検出すべき1つ以上のポリヌクレオチドを含むサンプルを処理するように構成されている種々の構成要素を有する。カートリッジ200は、通例、サンプルを処理する際、とりわけ、判定すべきポリヌクレオチドの濃度を高める、及び/又は判定すべきポリヌクレオチドの濃度に対して、インヒビタの濃度を低下させる。カートリッジ200の種々の特徴は、無差別に組み込むこと、又は適した修正を加えて、種々のその他の動作と合わせてポリヌクレオチドの処理を実行するカートリッジの代わりに構成に組み込むこともできる。

10

【0176】

カートリッジの製作

微小流体カートリッジ200は、所望通りに製作することができる。通例、層205、207、及び209は、ポリマ材で形成することができる。ネットワーク201の構成要素は、通例、層207、209を成型する(例えば、射出成型する)ことによって形成することができる。層205は、通例、ネットワーク201の構成要素を封止するために層207に固着する(例えば、接着及び/又は熱着)ことができる可撓性ポリマ材(例えば、積層体)とすることができる。層207及び209は、接着剤を用いて互いに接着することができる。本願に適したカートリッジ製作の別の方法が、2006年11月14日に

20

【0177】

微小流量ネットワーク

ネットワーク201の構成要素の配列例は、米国特許出願公開第2006/0166233号に更に記載されているように、次の通りである。この出願の内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。

【0178】

ネットワーク201は、サンプル材料をネットワークに導入することができる入口202と、処理したサンプルをネットワーク201から取り出すことができる(例えば、ネットワークから放出又は抽出する)出口236とを含む。チャンネル204が、入口202と合流点255との間を繋いでいる。弁206をチャンネル204に沿って位置付けることができる。リザーバ・チャンネル240が、合流点255とアクチュエータ244との間を繋いでいる。ゲート242及び246をチャンネル240に沿って位置付けることができる。チャンネル257が、合流点255と合流点259との間を繋いでいる。弁208をチャンネル257に沿って位置付けることができる。リザーバ・チャンネル246が、合流点259とアクチュエータ248との間を繋いでいる。ゲート250及び252をチャンネル246に沿って位置付けることができる。チャンネル261が、合流点259と合流点263との間を繋いでいる。弁210及び疎水性ベント212を、チャンネル261に沿って位置付けることができる。チャンネル256が、合流点263とアクチュエータ254との間を繋いでいる。ゲート258をチャンネル256に沿って位置付けることができる。

30

40

【0179】

チャンネル214が、合流点263と処理室220との間を繋いでおり、処理室220は入口265及び出口267を有する。チャンネル228が、処理室の出口267と廃棄物リザーバ232との間を繋いでいる。弁234をチャンネル228に沿って位置付けることができる。チャンネル230が、処理室の出口267と出口236との間を繋いでいる。

微小流体ネットワーク201の個々の構成要素について、以下のように更に説明する。

【0180】

処理室

図11も参照すると、処理室220は、第1条件集合(例えば、第1温度及び/又は第

50

1 pH)の下ではサンプルのポリヌクレオチドを保持し、第2条件集合(例えば、第2の高い温度、及び/又は第2のアルカリ側のpH)の下ではポリヌクレオチドを放出するように構成されている複数の粒子(例えば、ビーズ、微小球体)218を含む。通例、サンプル内に存在するかもしれないインヒビタと比較して、ポリヌクレオチドを優先的に保持することができる。粒子218は、保持部材216(例えば、カラム)として構成することができ、処理領域220の入口265及び出口267間で移動する場合、サンプル材料(例えば、ポリヌクレオチド)はここを通過しなければならない。

【0181】

フィルタ219が、粒子218が処理領域220の下流に流れることを防止する。チャンネル287は、フィルタ219を出口267と接続する。フィルタ219は、入口265の断面積よりも大きくすることができる表面区域を処理領域220内部に有する。例えば、実施形態によっては、処理室220内部のフィルタ219の表面積の出口265の断面積(この断面積は、通例、チャンネル214の断面積とほぼ同一である)に対する比率は、少なくとも約5(例えば、少なくとも約10、少なくとも約20、すくなくとも約30)とすることができる。実施形態によっては、処理領域220内部のフィルタ219の表面積は、少なくとも約 1 mm^2 (例えば、約 2 mm^2 、少なくとも約 3 mm^2)とすることができる。実施形態によっては、入口265及び/又はチャンネル214の断面積は、約 0.25 mm^2 以下(例えば、約 0.2 mm^2 以下、約 0.15 mm^2 以下、約 0.1 mm^2 以下)とすることができる。処理室220を通過する材料に対して、フィルタ219が示す表面積が大きい程、処理領域の目詰まりを防止するのに役立つつつ、処理領域の無効容積(以下で説明する)の著しい増大を回避する。

【0182】

粒子218は、ポリヌクレオチドを保持する(インヒビタと比較して優先的に)少なくとも1つの受容体によって改質することができる。通例、受容体は、約9.5以下のpH(例えば、約9.0以下、約8.75以下、約8.5以下)を有する液体からポリヌクレオチドを保持する。サンプル溶液が処理室220を通過すると、ポリヌクレオチドを保持することができつつ、液体及びその他の溶液成分(例えば、インヒビタ)を殆ど保持せず(例えば、全く保持せず)処理領域から排出することができる。一般に、受容体は、pHが約10以上(例えば、約10.5以上、約11.0以上)になることができると、ポリヌクレオチドを放出する。その結果、受容体改質粒子からポリヌクレオチドを、周囲の液体に放出することができる。

【0183】

粒子218上の受容体の例には、例えば、ポリアミド(例えば、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリ-DL-オルニシンのようなポリカチオン・ポリアミド)及びPEIが含まれる。他の受容体には、例えば、インターカレータ(intercalator)、ポリ-インターカレータ(poly-intercalator)、マイナ・グループ・ポリアミン(例えば、スベルミジン)、複数のアミノ酸を備えているホモポリマ及びコポリマ、並びにその組み合わせが含まれる。実施形態によっては、受容体の平均分子量は、少なくとも約5,000Da(例えば、少なくとも約7,500Da、少なくとも約15,000Da)である。実施形態によっては、受容体は、アミド結合によって粒子表面に付着したポリリシン受容体とすることができる。

【0184】

ある実施形態では、粒子218上の受容体は、ペプチド結合を切断するプロテアーゼ酵素(例えば、プロナーゼ(pronase)のようなエンド-及びエクソ-プロテアーゼの混合体)による劣化のような、酵素劣化に対して抵抗力を有することができる。耐プロテアーゼ受容体の例には、例えば、ポリ-D-リシン、及び酵素攻撃を受けやすい受容体の鏡像体となることのできるその他の受容耐が含まれる。

【0185】

粒子218は、通例、受容体を連合させることができる材料で形成することができる。粒子218を形成することができる材料の例には、受容体を付着するように改質すること

10

20

30

40

50

ができるポリマ材が含まれる。典型的なポリマ材は、受容体を付着するために利用可能なカルボキシル基及び/又はアミノ基を供給する、又は供給するように改質することができる。ポリマ材の例には、例えば、ポリスチレン、ラテックス・ポリマ（例えば、ポリカルボキシレート被覆ラテックス）、ポリアクリルアミド、酸化ポリエチレン、及びその派生物が含まれる。粒子218を形成するために用いることができるポリマ材は、Mathiowitz et al.,の米国特許第6,235,313号に記載されている。この特許の内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。他の材料には、ガラス、シリカ、アガロース、及びアミノ-プロピル-トリ-エトキシ-シラン(APESS)改質材料が含まれる。

【0186】

10

適した受容体で改質することができる粒子の例には、カルボキシル粒子（例えば、カルボキシレート改質磁気ビーズ（セラ-マグ磁気カルボキシレート改質ビーズ、Part#3008050250、セラダイン(Seradyn)）、及びPolyscience, カタログ番号09850 (catalog no. 09850)から入手可能なポリビーズ・カルボキシレート改質微小球体が含まれる。実施形態によっては、受容体がポリ-D-リシンを含み、ビーズがポリマ（例えば、ポリカルボキシレート被覆ラテックス）を備えている場合もある。別の実施形態では、受容体はPEIを含む。

【0187】

一般に、粒子の質量の、当該粒子が保持するポリヌクレオチドの質量に対する比率は、約25以下又は以上（例えば、約20以下、約10以下）とすることができる。例えば、実施形態によっては、約1グラムの粒子が約100ミリグラムのポリヌクレオチドを保持する。

20

【0188】

通例、入口265とフィルタ219との間の処理室220（粒子218を含む）の全容積は、約15マイクロリットル以下（例えば、約10マイクロリットル以下、約5マイクロリットル以下、約2.5マイクロリットル以下、約2マイクロリットル以下）とすることができる。実施形態の一例では、処理領域220の全容積は、約2.3マイクロリットルとすることができる。実施形態によっては、粒子218が処理領域220の全容積の少なくとも約10パーセント（例えば、少なくとも約15パーセント）を占める場合がある。実施形態によっては、粒子218が処理室220の全容積の約75パーセント以下（例えば、約50パーセント以下、約35パーセント以下）を占める場合がある。

30

【0189】

実施形態によっては、液体が自由に占めることができる処理室220の容積（例えば、粒子218間の隙間を含む処理室220の空隙容積(void volume)）は、全容積から粒子が占める容積を減算した値にほぼ等しくすることができる。通例、処理領域220の空隙容積は、約10マイクロリットル以下（例えば、約7.5マイクロリットル以下、約5マイクロリットル以下、約2.5マイクロリットル以下、約2マイクロリットル以下）とすることができる。実施形態によっては、空隙容積は、約50ナノリットル以上（例えば、約100ナノリットル以上、約250ナノリットル以上）とすることができる。例えば、実施形態の一例では、処理室220の全容積は約2.3マイクロリットルとすることができ、粒子が占める容積は約0.3マイクロリットルとすることができ、液体が自由に占める容積（空隙容積）は、約2マイクロリットルとすることができる。

40

【0190】

粒子218は、通例、平均直径が約20ミクロン以下（例えば、約15ミクロン以下、約10ミクロン以下）である。実施形態によっては、粒子218の平均直径が少なくとも約4ミクロン（例えば、少なくとも約6ミクロン、少なくとも約8ミクロン）である場合もある。

【0191】

実施形態によっては、フィルタ219と出口267との間にあるチャネル287の容積は、処理室220の空隙容積よりもかなり小さくすることができる。例えば、実施形態に

50

よっては、フィルタ 2 1 9 と出口 2 6 7 との間にあるチャンネル 2 8 7 の容積は、空隙容積の約 3 5 % 以下（例えば、約 2 5 % 以下、約 2 0 % 以下）とすることができる。実施形態の一例では、フィルタ 2 1 9 と出口 2 6 7 との間にあるチャンネル 2 8 7 の容積は、約 5 0 0 ナノリットルとすることができる。

【 0 1 9 2 】

粒子密度は、通例、少なくともミリリットル当たり約 10^8 粒子（例えば、ミリリットル当たり約 10^9 粒子）とすることができる。例えば、全容積が約 1 マイクロリットルである処理領域では、約 10^3 個のビーズを含むことができる。

フィルタ 2 1 9 は、通例、粒子 2 1 8 の直径よりも直径が小さい孔を有する。実施形態の一例では、フィルタ 2 1 9 の孔は、平均約 8 ミクロンの幅を有し、粒子 2 1 8 の平均直径は約 1 0 ミクロンである。

10

【 0 1 9 3 】

実施形態によっては、粒子の少なくとも一部（例えば、全部）が磁性であることができる。代替実施形態では、粒子の殆ど（例えば、全部）が磁性でない。

実施形態によっては、粒子の少なくとも一部（例えば、全部）が固体であることができる。実施形態によっては、粒子の少なくとも一部（例えば全部）が多孔性であることができる（例えば、粒子は、その内部に少なくとも部分的に達するチャンネルを有することができる）。

【 0 1 9 4 】

微小流体ネットワーク 2 0 1 において見出すことができるその他の構成要素は次の通りである。

20

チャンネル

微小流体ネットワーク 2 0 1 のチャンネルは、通例、少なくとも 1 つのミリメートル未満の断面寸法を有する。例えば、ネットワーク 2 0 1 のチャンネルの幅及び / 又は深さは、約 1 mm 以下（例えば、7 5 0 ミクロン以下、約 5 0 0 ミクロン以下、約 2 5 0 ミクロン以下）とすることができる。

弁

【 0 1 9 5 】

弁は、常時開放状態を有する構成要素であり、弁の一方側（例えば、弁の上流側）の位置から、弁の他方側（例えば、弁の下流側）の位置にチャンネルに沿って材料が通過することを可能にする。作動時に、弁は閉鎖状態に遷移し、材料がチャンネルに沿って弁の一方側から他方側に通過するのを妨げる。例えば、図 1 0 において、弁 2 0 6 は、熱応答物質（TRS）の質量体 2 5 1 を含み、TRS は、第 1 温度では比較的不動であり、第 2 温度では良く移動することができる（例えば、パラフィン・ワックス、はんだなどのような、通例、約 6 0 、約 7 5 、又は約 9 0 というように、融点が既知の、相遷移材料（PTM））。室 2 5 3 は、質量体 2 5 1 と気体連通することができる。室 2 5 3 内で気体（例えば、空気）を加熱し、TRS の質量体 2 5 1 を第 2 温度に加熱すると、室 2 5 3 内の気体圧力によって、質量体 2 5 1 がチャンネル 2 0 4 の中に移動して、材料がそれに沿って通過するのを遮断する。ネットワーク 2 0 1 のその他の弁も、弁 2 0 6 と同様の構造を有し、同様に動作する。

30

40

【 0 1 9 6 】

TRS の質量体は、本質的に、固体質量体、又は共同して通路を遮断する小さな粒子の集合体とすることができる。TRS の例には、共晶合金（例えば、はんだ）、ワックス（例えば、オレフィン）、ポリマ、プラスチック、及びその組み合わせが含まれる。第 1 及び第 2 温度は、カートリッジ 2 0 0 のポリマ層のような材料を損傷する程には高くない温度にすることができる。一般に、第 2 温度は約 9 0 未満とすることができ、第 1 温度は第 2 温度未満（例えば、約 7 0 以下）とすることができる。

【 0 1 9 7 】

ゲートは、当該ゲートの一方側の位置からゲートの他方側にチャンネルを沿って材料を通過させない閉鎖状態と、当該ゲートの一方側の位置からゲートの他方側にチャンネルを沿っ

50

て材料を通過させる開放状態とを有することができる構成要素とすることができる。開放ゲートを作動させると、閉鎖状態にゲートを遷移させることができ、閉鎖状態では、ゲートの一方側（例えば、ゲートの上流側）からゲートの他方側（例えば、ゲートの下流側）に材料を通過させない。作動時に、閉鎖ゲートは、開放状態に遷移することができ、開放状態では、ゲートの一方側（例えば、ゲートの上流側）からゲートの他方側（例えば、ゲートの下流側）に材料を通過させる。例えば、図10におけるゲート242は、合流点255とチャンネル240との間における材料の通過を妨害するように位置付けられたTRSの質量体271を含む。質量体271を第2温度に加熱すると、質量体は状態が変化し（例えば、溶融、分散、断片化、及び/又は溶解によって）、合流点255とチャンネル240との間の材料の通過を許容する。

10

【0198】

種々の実施形態では、微小流体ネットワーク201は、図12Aに示すような狭いゲート380を含むことができ、ワックス装填孔384からゲート合流点386までワックスを装填するために用いられるゲート装填チャンネル382を狭くすることができる（例えば、幅が約150 μm 、深さが約100ミクロン）。ゲート合流部386の上流チャンネル388及び下流チャンネル390は、ワックスがゲート合流部386において確実に停止するのを補助するために、広く（例えば、500 μm まで）そして深く（例えば、500 μm まで）作ることができる。溶融しゲート合流部386から外部に移動するゲート材料の量は、ゲート380の最適な開口度を得るためには、最小限に抑えるとよい。カートリッジ外部のヒータを用いて、ゲート380において熱反応物質を溶融してもよいので、ヒータの位置がずれていると、ゲート装填チャンネル382内にあるワックスも溶融する可能性がある。したがって、装填チャンネルの寸法を狭くすることによって、ゲート開放の信頼性を高めることができる。ゲート合流部386及びゲート装填チャンネル382において溶融するワックスの量が過剰な場合、ゲート合流部386に隣接する下流チャンネル390の断面積を大きくすれば、ゲート380の開放の間、ワックスが下流チャンネル390を未詰まりさせるのを防止することができる。ゲート合流部386における上流チャンネル388の寸法は、ゲート製造中に正しいワックスの装填を確保するために、下流チャンネル390と同様に作ることができる。

20

【0199】

種々の実施形態では、ゲートは、図12Bに示すようなベント・ゲート392のように、ネットワーク内部のゲートの有効面積即ちフットプリントを最小にするように構成することができる。ネットワーク内部のゲートの有効面積即ちフットプリントを最小にすることにより、所与の微小流体ネットワークの密度を高めることができ、これによって部品毎のコストを低減し、ネットワークの小型化を図り、ネットワークのチャンネル長又は容積を最小に抑える等が可能となる。微小流体ネットワークの具体的なレイアウトに応じて、更に別の構成も可能であるが、図面には明示的には示さない。

30

【0200】

図10の微小流体カートリッジでは、ゲート242及び246間のチャンネル240の一部が、液体（例えば、水、有機液体、又はその組み合わせ）を保持するように構成されている流体リザーバ279を形成する。保存の間、ゲート242及び246は流体リザーバ内における液体の気化を抑制する（例えば、防止する）。カートリッジ200の動作中、リザーバ279の液体は、粒子218（図11）と連合するポリヌクレオチドを残しながら、処理領域220からインヒビタを除去する洗浄液として用いることができる。通例、洗浄液は、1つ以上の追加成分（例えば、緩衝液、キレータ、界面活性剤、洗剤、塩基、酸、又はその組み合わせ）を有する溶液とすることができる。溶液の例には、例えば、pH8.0の10~50mMトリス(Tris)、0.5~2mMのEDTA、及び0.5%~2%SDSの溶液、pH8.0の10~50mMのトリス、0.5~2mMのEDTA、及び0.5~2%トリトン(Triton)X-100の溶液が含まれる。

40

【0201】

流体リザーバ281からゲート250及び252の間にあるチャンネル247の一部は、

50

気化を抑制又は防止して液体（例えば、溶液）を保持するリザーバ279のように構成されている。カートリッジ200の動作中、リザーバ281の液体は、通例、放出液(release liquid)として用いることができ、この中に、粒子218が保持していたポリヌクレオチドを放出することができる。放出液の一例は、例えば、濃度が約2mM水酸化物（例えば、約2mMのNaOH）及び約500mM水酸化物（例えば、約500mMのNaOH）水酸化溶液（例えば、H₂O溶液）とすることができる。実施形態によっては、リザーバ281内の液体は、濃度が約25mM以下の水酸化物溶液（例えば、濃度が約15mMの水酸化物）とすることができる。

【0202】

通例、リザーバ279、281は、各々、少なくとも約0.375マイクロリットルの液体（例えば、少なくとも約0.750マイクロリットル、少なくとも約1.25マイクロリットル、少なくとも約2.5マイクロリットル）を独立して保持する。実施形態によっては、リザーバ279、281は、各々、約7.5マイクロリットル以下の液体（例えば、約5マイクロリットル以下、約4マイクロリットル以下、約3マイクロリットル以下）を独立して保持する。

【0203】

アクチュエータ

アクチュエータは、ネットワーク、例えば、ネットワーク201における1つの場所と他の場所との間で材料（例えば、サンプル材料及び/又は試薬材料）を移動させることができる気体圧力を供給する構成要素とすることができる。例えば、図13を参照すると、アクチュエータ244は、内部に熱膨張材料（TEM）の質量体273を有する室272を含む。加熱すると、TEMが膨張して、室272内部の自由容積が減少し、室272内部の質量体273を包囲する気体（例えば、空気）を加圧する。通例、ネットワーク201におけるゲート246及び242のようなゲートを、アクチュエータ244によって作動させることができる。その結果、加圧気体が流体リザーバ279内にある液体を合流部255に向けて送り出す。実施形態によっては、アクチュエータ244が約3psi（例えば、少なくとも約4psi、少なくとも約5psi）の圧力差を、アクチュエータと合流部255との間に発生することができる。

【0204】

図13に示す一実施形態では、TEMは、キャリア277内に分散した複数の封止液体リザーバ（例えば、球体）275を含む。通例、液体は、容器（例えば、塩化ビニリデン、アクリロニトリル、及びメチルメタクリレートのようなモノマで形成したポリマ容器）内に封止された高蒸気圧液体（例えば、イソブタン及び/又はイソペンタン）とすることができる。キャリア277は、リザーバをチャンネル240に沿って通過させずに、リザーバ275の膨張を許容するプロパティ（例えば、可撓性及び/又は高温における軟化（例えば、溶融）性）を有する。実施形態によっては、キャリア277はワックス（オレフィン）又は適したガラス繊維温度を有するポリマとすることができる。通例、リザーバは、少なくとも約25重量パーセント（例えば、少なくとも約35重量パーセント、少なくとも約50重量パーセント）のTEMを構成する。実施形態によっては、リザーバが約75重量パーセント以下（例えば、約65重量パーセント以下、約50重量パーセント以下）のTEMを構成する場合もある。適した封止液体リザーバは、Expancel（Akzo Nobel社）から入手することができる。

【0205】

TEMを加熱することができる場合（例えば、少なくとも約50の温度まで（例えば、少なくとも約75又は少なくとも約90まで）、液体は気化し、各封止リザーバ及び質量体273の体積を増大させる。キャリア277は軟化して、質量体273を膨張させる。通例、TEMは、作動中に、約150未満（例えば、約125以下、約110以下、約100以下）の温度まで加熱することができる。実施形態によっては、TEMの体積は、少なくとも約5倍（例えば、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍）に膨張する。

10

20

30

40

50

【0206】

ベント

疎水ベント（例えば、ベント212）は、気体がチャネルから出ていくことを可能にしつつ、液体がチャネルから出ていくのを制限する（例えば、防止する）構造とすることができる。通例、疎水ベントは、チャネルの壁を定める多孔性疎水材（例えば、Osmonicsからの多孔性疎水メンブレンのような、多孔性フィルタ）の層を含む。以下で説明するが、疎水ベントは、サンプルの微小液滴をネットワーク201内部の所望の場所に位置付けるために用いることができる。

【0207】

本技術の疎水ベントは、これらから逃げる空気の量を最大にしつつ、ベント面の下にあるチャネルの容積を最小にすることができるよう構成することが好ましい。したがって、表面積が大きな疎水性メンブレンと、ベント面の下に浅い断面の微小チャネルとを有するように、ベントを構成することが好ましい。

10

【0208】

疎水ベントは、通例、チャネルに沿って、少なくとも約2.5mm（例えば、少なくとも約5mm、少なくとも約7.5mm）の長さを有する。疎水ベントの長さは、通例、疎水ベント内部にあるチャネルの深さよりも少なくとも約5倍（例えば、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍）大きくすることができる。例えば、実施形態によっては、疎水ベント内部のチャネルの深さは、約300ミクロン以下（例えば、約250ミクロン以下、約200ミクロン以下、約150ミクロン以下）とすることができる。

20

【0209】

疎水ベント内部にあるチャネルの深さは、通例、疎水ベントの上流及び下流側にあるチャネルの深さの約75%以下（例えば、約65%以下、約60%以下）とすることができる。例えば、実施形態によっては、疎水ベント内部のチャネル深さは、約150ミクロンとすることができ、疎水ベントの上流及び下流側のチャネル深さは約250ミクロンとすることができる。

【0210】

疎水ベント内部にあるチャネルの幅は、通例、当該ベントの上流側及び当該ベントの下流側にあるチャネルの幅よりも少なくとも約25%広く（例えば、少なくとも約50%広く）とすることができる。例えば、実施形態の一例では、疎水ベント内部にあるチャネルの幅は、約400ミクロンとすることができ、ベントから上流及び下流側の幅は、約250ミクロンとすることができる。

30

【0211】

使用中、カートリッジ200は、通例、カートリッジの種々の構成要素（例えば、弁、ゲート、アクチュエータ、及び処理領域220）を動作させるように構成されている熱源のアレイと熱的に連動させることができる。実施形態によっては、熱源を、以下で更に説明するようなシステム内のプロセッサによって制御することができ、使用中にカートリッジを収容し監視するように動作する。プロセッサ（例えば、マイクロプロセッサ）は、所望のプロトコルに応じて、熱源を個々にそして異なる時点で作動させるように構成されている。ここで用いる又は修正するのに適した、微小流量カートリッジを動作させるように構成されているプロセッサは、2001年3月28日に出願した米国特許出願第09/819,105号（現在では、米国特許第7,010,391号）に記載されている。この特許の内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。別の実施形態では、熱源はカートリッジ自体と一体化することができる。

40

【0212】

カートリッジ200は、以下のように動作させるとよい。ネットワーク201の弁は、開放状態で製作することができる。ネットワーク201のゲートは閉鎖状態で製作することができる。ここで更に説明するような生物サンプルのような、ポリヌクレオチドを含む流体サンプルを、入口202を通じてネットワーク201に導入することができる。例えば、サンプルは、ルアー取付具(Luer fitting)を有するシリンジを用いて導入することが

50

できる。シリンジは、圧力を供給しサンプルをまずネットワーク 201 内部に移動させる。サンプルは、チャンネル 204、257、261、及び 214 に沿って、処理領域 220 の入口 265 まで進む。サンプルは、処理領域 220 を通過し、出口 267 から排出し、チャンネル 228 に沿って廃棄物室 232 まで進む。サンプルの後端縁（例えば、上流側液体 - 気体界面）が疎水ベント 212 に達したときに、導入デバイス（例えば、シリンジ）によって供給される圧力をネットワーク 201 から放出して、サンプルのそれ以上の運動を停止させることができる。

【0213】

通例、導入するサンプル量は、約 500 マイクロリットル以下（例えば、約 250 マイクロリットル以下、約 100 マイクロリットル以下、約 50 マイクロリットル以下、約 25 マイクロリットル以下、約 10 マイクロリットル以下）とすることができる。実施形態によっては、サンプルの量は約 2 マイクロリットル以下（例えば、約 0.5 マイクロリットル以下）とすることもできる。

10

【0214】

処理領域 220 に入ったポリヌクレオチドは、粒子 218 間の隙間を通り抜ける。サンプルのポリヌクレオチドは、保持部材 216 と接触し、サンプルの液体、及びある種のその他のサンプル成分（例えば、インヒビタ）と比較して優先的に保持することができる。通例、保持部材 220 は、処理領域 220 に入ったサンプルの中にあるポリヌクレオチドの内、少なくとも約 50% のポリヌクレオチド（例えば、少なくとも約 75%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%）を保持する。サンプルの液体及びサンプルの中にあるインヒビタは、出口 267 を通って処理領域 220 から出て、廃棄物室 232 に入る。処理領域 220 は、通例、サンプルの導入中は約 50 以下（例えば、約 30 以下）の温度とすることができる。

20

【0215】

処理は継続して、保持部材 216 をリザーバ 279 の液体で洗浄して、残留するインヒビタを、保持部材 216 が保持するポリヌクレオチドから分離する。保持部材 216 を洗浄するには、弁 206 を閉鎖することができ、第 1 リザーバ 240 のゲート 242、246 を開放することができる。アクチュエータ 244 を作動させて、リザーバ 279 内にある洗浄液をチャンネル 257、261、及び 214 に沿って移動させ、処理領域 220 を通過させ、廃棄物リザーバ 232 に入れる。洗浄液は、チャンネル 204、257、261、及び 214 の中に残留している可能性があるサンプルを、処理領域を通過して、廃棄物室 232 の中まで移動させる。一旦洗浄液の後端縁がベント 212 に達したなら、アクチュエータ 244 が発生する気体圧力を発散させることができ、液体のそれ以上の運動を停止させることができる。

30

【0216】

アクチュエータ 244 によって処理領域 220 を通過して移動する洗浄液の体積は、通例、処理領域 220 の空隙容積の少なくとも約 2 倍（例えば、空隙容積の少なくとも約 3 倍）とすることができ、空隙容積の約 10 倍以下（例えば、空隙容積の約 5 倍以下）とすることができる。処理領域は、通例、洗浄中約 50 以下の温度（例えば、約 30 以下）とすることができる。洗浄液の例には、この中のリザーバ 279 及び 281 に関して記載した液体が含まれる。

40

【0217】

処理は継続して、保持部材 216 からポリヌクレオチドを放出する。通例、ポリヌクレオチドを放出する前に、リザーバ 279 からの洗浄液をリザーバ 281 からの放出液（例えば、水酸化物溶液）と交換することができる。弁 208 を閉鎖することができ、ゲート 250、252 を開放することができる。アクチュエータ 248 を作動し、これによって、リザーバ 281 内部にある放出液をチャンネル 261、214 に沿って処理領域 220 内にまで移動させ、保持部材 216 と接触させる。リザーバ 281 からの放出液の後端縁が疎水ベント 212 に達したときに、アクチュエータ 248 が発生する圧力を発散させて、液体のそれ以上の運動を停止させることができる。アクチュエータ 248 によって処理領

50

域 2 2 0 を通過して移動させる液体の体積は、通例、少なくとも処理領域 2 2 0 の空隙容積とほぼ等しく（例えば、空隙容積の少なくとも約 2 倍）することができ、空隙容積の約 1 0 倍以下（例えば、空隙容積の約 5 倍以下）とすることができる。

【 0 2 1 8 】

一旦ポリヌクレオチドを保持した保持部材 2 1 6 がリザーバ 2 8 1 からの液体と接触すると、放出ステップを通例実行することができる。通例、放出は、処理領域 2 1 6 内にある放出液を加熱することを含む。一般に、液体は、保持部材が存在する液体を沸騰させるには不十分な温度まで加熱することができる。実施形態によっては、温度は 1 0 0 以下（例えば、1 0 0 未満、約 9 7 以下）とすることができる。実施形態によっては、温度は約 6 5 以上（例えば、約 7 5 以上、約 8 0 以上、約 9 0 以上）とすることができる。実施形態によっては、温度を約 1 分以上（例えば、約 2 分以上、約 5 分以上、約 1 0 分以上）維持する。実施形態によっては、温度は約 3 0 分（例えば、約 1 5 分以下、約 1 0 分以下、約 5 分以下）維持する可能性もある。実施形態の一例では、処理領域 2 2 0 を約 6 5 及び 9 0 の間（例えば、約 7 0 まで）まで、約 1 及び 7 分（例えば、約 2 分間）の間加熱することができる。このような温度及び時間は、サンプルに応じて変化し、したがって当業者が選択することができる。

10

【 0 2 1 9 】

ポリヌクレオチドは、処理領域 2 2 0 内にある液体の中に放出することができる（例えば、ポリヌクレオチドは、通例、処理領域 2 2 0 の空隙容積とほぼ同じ体積を有する量の放出液に放出することができる）。通例、ポリヌクレオチドは、約 1 0 マイクロリットル以下（例えば、約 5 マイクロリットル以下、約 2 . 5 マイクロリットル以下）の液体に放出することができる。

20

【 0 2 2 0 】

ある種の実施形態では、処理領域 2 2 0 を通して移動させた元のサンプルの体積の、ポリヌクレオチドを放出することができる液体の体積に対する比率は、少なくとも約 1 0 （例えば、少なくとも約 5 0 、少なくとも約 1 0 0 、少なくとも約 2 5 0 、少なくとも約 5 0 0 、少なくとも約 1 0 0 0 ）とすることができる。実施形態によっては、約 2 m l の体積を有するサンプルからのポリヌクレオチドを処理領域内に保持し、約 4 マイクロリットル以下（例えば、約 3 マイクロリットル以下、約 2 マイクロリットル以下、約 1 マイクロリットル以下）の液体に放出することができる。

30

【 0 2 2 1 】

ポリヌクレオチドを放出することができる液体は、通例、処理領域 2 2 0 に入ったサンプルの中にあるポリヌクレオチドの少なくとも約 5 0 % （例えば、少なくとも約 7 5 % 、少なくとも約 8 5 % 、少なくとも約 9 0 % ）を含む。放出液の中にあるポリヌクレオチドの濃度は、元のサンプルにおけるよりも高い場合がある。何故なら、放出液の体積は、通例、処理領域を通じて移動させて元の液体サンプルの体積よりも少なくなっている可能性があるからである。例えば、放出液におけるポリヌクレオチドの濃度は、カートリッジ 2 0 0 に導入したサンプルにおけるポリヌクレオチドの濃度よりも、少なくとも約 1 0 倍大きい（例えば、少なくとも約 2 5 倍大きい、少なくとも約 1 0 0 倍大きい）場合もある。ポリヌクレオチドを放出することができる液体の中にあるインヒビタの濃度は、一般に、元の流体サンプルにおけるインヒビタの濃度よりも、ポリヌクレオチドに対する増幅効率を増大させるのに十分な量だけ少なくすることができる。

40

【 0 2 2 2 】

ポリヌクレオチド含有サンプルを処理領域 2 2 0 に導入してから、ポリヌクレオチドを放出液に放出するまでの時間間隔は、通例、約 1 5 分以下（例えば、約 1 0 分以下、約 5 分以下）とすることができる。

【 0 2 2 3 】

放出したポリヌクレオチドを含む液体は、以下のように、処理領域 2 2 0 から除去するとよい。弁 2 1 0 及び 2 3 4 を閉鎖することができる。ゲート 2 3 8 及び 2 5 8 を開放することができる。アクチュエータ 2 5 4 を作動させて、圧力を発生することができる。こ

50

の圧力が、液体及びポリヌクレオチドを処理領域 220 から、チャンネル 230 の中へ、そして出口 236 に向けて移動させる。ポリヌクレオチドを含む液体は、例えば、シリンジ又は自動化したサンプリング・デバイスを用いて、除去することができる。ポリヌクレオチド放出の間に保持部材 216 と接触する液体に応じて、放出したポリヌクレオチドを含む溶液を、ある量の緩衝液（例えば、pH 8.0 の等しい体積の 20 ~ 50 mM トリス-HCl 緩衝剤）によって中和するとよい場合もある。

【0224】

ポリヌクレオチドの放出について、加熱ステップを含むように説明したが、ポリヌクレオチドは加熱しなくても放出することができる。例えば、実施形態によっては、リザーバ 281 の液体は、追加の加熱を必要とせずに、常温において保持部材からポリヌクレオチドを放出するイオン強度、pH、表面活性剤濃度、組成 (composition)、又はその組み合わせを有する。

10

【0225】

ポリヌクレオチドについて、処理領域 220 の中にある 1 種類の液体の体積の中に放出するように説明したが、別の構成を用いることもできる。例えば、ポリヌクレオチドは、流体の処理領域 220 への導入及び/又は通過と同時に（段階毎又は連続的）放出することもできる。このような実施形態では、ポリヌクレオチドは、処理領域 220 の空隙容積の約 10 倍以下（例えば、約 7.5 倍以下、約 5 倍以下、約 2.5 倍以下、約 2 倍以下）の体積を有する液体に放出することもできる。

【0226】

20

リザーバ 279、281 について、第 1 及び第 2 ゲートの間で液体を保持するように説明したが、別の構成を用いることもできる。例えば、リザーバ毎の液体を、全体的に透水性のないメンブレンによってネットワーク 201 から分離したパウチ（例えば、この中で更に説明するような、プリスタ・パック (blister pack)）の中に保持してもよい。パウチは、使用中にアクチュエータ 244、248 が液体を移動させることができるときに、ユーザがメンブレンを裂いて、液体をリザーバ 279、281 の中に注入することができるように構成することができる。

【0227】

処理領域について、マイクロリットル目盛りの寸法を有するように説明したが、他の寸法を用いることもできる。例えば、インヒビタに対してポリヌクレオチドを優先的に保持するように構成した表面（例えば、粒子）を有する処理領域が、大きな容積（例えば、数十マイクロリットル以上、少なくとも約 1 ミリリットル以上）を有してもよい。実施形態によっては、処理領域がベンチ・トップ目盛り (bench-top scale) を有する場合もある。

30

【0228】

処理領域 220 について、多数の表面改質粒子で形成した保持部材を有するように説明したが、別の構成を用いることもできる。例えば、実施形態によっては、処理領域 220 が、多数の開口（例えば、孔及び/又はチャンネル）を有し、それをポリヌクレオチドが通過する多孔性部材（例えば、フィルタ、多孔性メンブレン、又はゲル・マトリクス）として構成した保持部材を含む場合もある。ポリヌクレオチドを優先的に保持するように、多孔性部材の表面を改質することができる。例えば、Osmonics から入手可能なフィルタ・メンブレンは、表面改質し、処理領域 220 内部にポリヌクレオチドを保持するために用いることができるポリマで形成することができる。実施形態によっては、処理領域 220 は、複数の表面（壁又はパッフル）を有し、これをサンプルが通過するように構成した保持部材を含む場合もある。壁又はパッフルは、ポリヌクレオチドを優先的に保持するように改質することができる。

40

【0229】

処理領域 220 について、微小流体ネットワークの構成要素として説明したが、別の構成を用いることもできる。例えば、実施形態によっては、保持部材を、処理のために、処理領域から別の場所に除去することができる。例えば、ある場所で保持部材を、ポリヌクレオチド及びインヒビタを含む混合物と接触させ、次いで別の場所に移動させて、ここで

50

ポリヌクレオチドを保持部材から除去することができる。

【0230】

リザーバ275は、キャリア内に分散するように示したが、別の構成を用いてもよい。例えば、リザーバ275を可撓性のあるエンクロージャ（例えば、メンブレン、例えば、袋のようなエンクロージャ）の中に密封することができる。実施形態によっては、リザーバは室272の中で固定されていないことも可能である。このような実施形態では、アクチュエータ244は、リザーバ275の通過を可能にするには小さすぎるが、気体が室272から出ていくことができる程に大きな孔を有する多孔性部材を含むとよい。

溶解室を有する微小流体カートリッジの例

【0231】

種々の構成要素を有する更に別の微小流体カートリッジが、Parunak, et al.,によって2004年3月17日に出願した米国仮特許出願第60/553,553号、及び米国特許出願公開第2005-0084424号に記載されている。これらの出願の内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。

【0232】

微小流体カートリッジについて、既に細胞から放出されたポリヌクレオチドを受け取るように構成されていると説明したが、ここで用いる微小流体カートリッジは、細胞からポリヌクレオチドを放出するように構成することもできる（例えば、セルを溶解することによって）。例えば、図14A、図14B、図15A、及び図15Bを参照すると、微小流体カートリッジ300は、サンプル溶解室302を含み、この中で細胞を溶解してポリヌクレオチドをその中で放出することができる。更に、微小流体カートリッジ300は、基板層L1~L3、微小流体ネットワーク304（図14Aには、その一部のみが見られる）、及び液体試薬リザーバR1~R4も含む。液体試薬リザーバR1~R4は、液体試薬を保持し（例えば、サンプル材料を処理するために）、試薬ポートPR1~PR4によってネットワーク304に接続することができる。したがって、微小流体カートリッジ300は、自己充足型環境とすることができ、軌道、細胞溶解、ポリヌクレオチド分離、増幅前処理、増幅、及びサンプル検出のステップを実行するために必要な試薬及び材料全てを備えている。実施形態によっては、1つ以上の必要な試薬が混合されているサンプルを導入する。その場合、残留する試薬をカートリッジ上に保管する。試薬及びその他の材料は、カートリッジ300上において、液体試薬リザーバR1~R4、微小流体ネットワークの中にある微小流体チャンネル又は室、及び/又は溶解室302に保管してもよい。

【0233】

ネットワーク304は、実質的に層L2及びL3の間に定義することができるが、3つの層L1~L3の全ての間にある部分に広がっている。微小流体ネットワーク304は、この中で更に説明するような種々の微小流体構成要素を含み、チャンネルCi、弁Vi、二重弁V'i、ゲートGi、混合ゲートMGi、ベントHi、気体アクチュエータ（例えば、ポンプ）Pi、第1処理領域B1、第2処理領域B2、検出ゾーンDi、空気ベントAVi、及び廃棄物ゾーンWiを含む。

【0234】

図15A、図15Bは、微小流体ネットワーク304の一例の2つの相補的な半分を示す。尚、ネットワークを2つの別個の半分に分割することは、任意であり、純粹に図示を容易にするために過ぎないことは、当業者には言外であろう。図15A、図15Bに示す構成要素の配列は一例であり、同じ構成要素の異なる幾何学的配列、又は異なる構成要素の異なる配列のような、別のこのような配列も、ここに説明するステップを遂行するために、当業者によって組み立てることができることは、当業者には言外であろう。

【0235】

通例、ネットワーク304の構成要素は熱的に作動させることができる。図16に見られるように、熱源ネットワーク312の一例は、微小流体ネットワーク304の種々の熱作動構成要素に対応する場所を有する熱源（例えば、抵抗性熱源）を含む。例えば、熱源HPiの場所は、アクチュエータPiの場所に対応し、熱源HG iの場所はゲートGi及

10

20

30

40

50

び混合ゲートM G iの場所に対応し、熱源H V iの場所は、弁V i及び二重弁V ' iの場所に対応し、熱源H D iの場所は処理室D i、ネットワーク3 0 4の全ての場所に対応する。使用中、カートリッジ3 0 0の構成要素は、ネットワーク3 1 2の対応する熱源に熱的に接触して配置することができ、カートリッジ2 0 0について先に説明したように、通例、プロセッサを用いて動作させることができる。熱源ネットワーク3 1 2は、カートリッジ2 0 0について説明したように、カートリッジ3 0 0と一体であっても、別個であっても可能である。例えば、熱源ネットワーク3 1 2を、受容ベイ2 0 1 4の直下等に、内部に配置されているカートリッジのネットワークと位置が合うように、加熱モジュール2 0 2 0に一体化することができる。

【0 2 3 6】

微小流体カートリッジ3 0 0のその他の構成要素は、次の通りである。
空気バント

空気バントA V iは、ネットワーク3 0 4内部における液体の移動によって変位した気体（例えば、空気）を発散させて、圧力の蓄積が液体の所望の移動を妨げないようにすることができる。例えば、空気バントA V 2は、バントA V 2を通過する液体の下流において気体を発散させることによって、液体をチャンネルC 1 4に沿ってチャンネルC 1 6の中まで移動させる。

弁

【0 2 3 7】

弁V iは、常時開放状態を有し、弁の一方側（例えば、弁の上流側）における位置から、弁の他方側（例えば、弁の下流側）における位置まで、チャンネルに沿って材料を通過させることができる。弁V iは、微小流体カートリッジ2 0 0の弁と同様の構造を有することができる、この中において更に説明する。

【0 2 3 8】

図1 7及び図1 8に見られるように、二重弁V ' iも常時開放状態を有し、弁の一方側（例えば、弁の上流側）における位置から、弁の他方側（例えば、弁の下流側）における位置まで、チャンネルに沿って材料を通過させることができる。図1 7及び図1 8の二重弁V 1 1 'を例にあげると、二重弁V i 'はT R Sの第1及び第2質量体3 1 4、3 1 6（例えば、共晶合金又はワックス）を含み、これらはチャンネル（例えば、チャンネルC 1 4）のいずれかの側において互いに離間されている。通例、T R S質量体3 1 4、3 1 6は、互いにずらすことができる（例えば、T R S質量体の幅の約5 0 %以下の距離だけ）。開放した弁を通して移動する材料は、第1及び第2 T R S質量体3 1 4、3 1 6の間を通過する。各T R S質量体3 1 4、3 1 6は、それぞれの室3 1 8、3 2 0と関連付けることができ、室3 1 8、3 2 0は通例気体（例えば、空気）を含む。

【0 2 3 9】

二重弁V i 'のT R S質量体3 1 4、3 1 6及び室3 1 8、3 2 0は、熱源ネットワーク3 1 2の対応する熱源H V 1 1 'と熱的に接触することができる。熱源H V 1 1 'を動作させると、T R S質量体3 1 4、3 1 6は更に移動可能な第2状態（例えば、部分的熔融状態）に遷移し、室3 1 8、3 2 0内における気体の圧力を高める。気体圧力は、チャンネルC 1 1を横切るようにT R S質量体3 1 4、3 1 6を進ませて、弁H V 1 1 '（図1 8）を閉鎖させる。通例、質量体3 1 4、3 1 6は少なくとも部分的に合体して質量体3 2 2を形成し、これがチャンネルC 1 1を遮断する。

【0 2 4 0】

図1 5 A、図1 5 Bに戻って、ゲートG iは常時閉鎖状態を有することができる、ゲートの一方側における位置からゲートの他方側にチャンネルに沿って材料を通過させない。ゲートG iは、前述したカートリッジ2 0 0のゲートと同様の構造を有することができる。

【0 2 4 1】

微小流体ネットワークの一部の例について、図1 9 Aから図1 9 Dに見られるように、混合ゲートM G iは、液体の2つの体積をネットワーク3 0 4内部において合体（例えば、混合）させることができる。混合ゲートM G iについては、以下で更に説明する。

10

20

30

40

50

アクチュエータ

【0242】

アクチュエータ P_i は、ネットワーク 304 の 1 つの場所と別の場所との間で材料（例えば、サンプル材料及び / 又は試薬材料）を移動させる気体圧力を供給することができる。アクチュエータ P_i は、カートリッジ 200 のアクチュエータと形態が同様であることができる。例えば、各アクチュエータ P_i は、TEM の質量体 273 を有する室を含み、TEM の質量体 273 を加熱して室内で気体を加圧することができる。各アクチュエータ P_i は、液体がアクチュエータの室に入るのを防止する、対応するゲート G_i （例えば、アクチュエータ P_1 のゲート G_2 ）を含む。ゲートを作動させる（例えば、開放する）と、通例、アクチュエータの室内で発生した圧力を微小流体ネットワークに進入させることができる。

10

【0243】

廃棄物室

廃棄物室 W_i は、ネットワーク 304 内部における液体の操作（例えば、移動及び / 又は混合）の結果生ずる無駄な（例えば、溢れた）液体を収容することができる。通例、各廃棄物室 W_i には、空気ベントが付随しており、液体によって変位され室に入った気体を発散させる。

処理領域

【0244】

ネットワーク 304 の第 1 処理領域 B_1 は、ポリヌクレオチドを集中させ、サンプルのインヒビタから分離させる構成要素とすることができる。処理領域 B_1 は、カートリッジ 200 の処理領域 220 のように構成し動作させることができる。実施形態によっては、第 1 処理領域 B_1 が保持部材（例えば、多数の粒子（例えば、微小球体又はビーズ）、多孔性部材、多数の壁）を含む場合もあり、保持部材は、処理領域 220 について説明したように、1 つ以上の受容体によって少なくとも 1 つの表面が改質されている。例えば、受容体は、1 つ以上のポリアミド（例えば、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリ-DL-オルニシンのようなポリカチオン・ポリアミド）、又はポリエチレン・イミンを含むことができる。実施形態によっては、保持部材の粒子を溶解室 302 内に配することができ、サンプル材料と共に処理領域 B_1 に移動させることができる。

20

【0245】

第 2 処理領域 B_2 は、1 つ以上のポリヌクレオチドの存在を判定するために、材料（例えば、サンプル材料）を化合物（例えば、試薬）と合体させる構成要素とすることができる。実施形態によっては、化合物が 1 つ以上の PCR 試薬（例えば、プライマ、制御プラスミド、及びポリメラーゼ酵素）を含む場合がある。

30

【0246】

凍結乾燥粒子

実施形態によっては、1 つ以上のポリヌクレオチドの存在を判定するために化合物は、1 つ以上の凍結乾燥粒子（例えば、ペレット）として、 B_2 のような処理領域内に蓄積することができる。粒子は、一般に、室温（例えば、約 20 °C）で少なくとも約 6 カ月（例えば、少なくとも約 12 カ月）の保管寿命を有する。第 2 処理領域 B_2 に入った液体は、凍結乾燥化合物を溶解（例えば、復元）する。

40

【0247】

通例、処理領域 B_2 の凍結乾燥粒子は、平均体積が約 5 マイクロリットル以下（例えば、約 4 マイクロリットル以下、約 3 マイクロリットル以下、約 2 マイクロリットル以下）である。実施形態によっては、処理領域 B_2 の凍結乾燥粒子は、平均直径が約 4 mm 以下（例えば、約 3 mm 以下、約 2 mm 以下）である。実施形態の一例では、凍結乾燥粒子の平均体積は、約 2 マイクロリットルであり、平均直径は約 1.35 mm である。別の実施形態では、凍結乾燥粒子の直径は約 5 mm 以下（例えば、約 2.5 mm 以下、約 1.75 mm 以下）である。

【0248】

50

1つ以上のポリヌクレオチドの存在を判定する凍結乾燥粒子は、通例、多数の化合物を含む。実施形態によっては、凍結乾燥粒子は、ポリヌクレオチドの存在を判定するため及び/又はポリヌクレオチドの濃度を高めるために反応において用いられる1つ以上の化合物を含む。例えば、凍結乾燥粒子は、PCRによる等で、ポリヌクレオチドを増幅する1つ以上の酵素を含むことができる。

【0249】

凍結乾燥粒子の例には、グループBストレプトコッカス(GBS)バクテリアと関連のあるポリヌクレオチドを増幅のための試薬の例が含まれる。実施形態によっては、凍結乾燥粒子は、1つ以上のクリオプロテクタント、1つ以上の塩、1つ以上のプライマ(例えば、GBSプライマF及び/又はGBSプライマR)、1つ以上のプローブ(例えば、GBSプローブ-FAM)、1つ以上の内部制御プラスミド、1つ以上の特定性対照(specificity control)(例えば、GBSのPCRに対する対照のようなストレプトコッカス・ニューモニエDNA(*Streptococcus pneumoniae* DNA)、1つ以上のPCR試薬(例えば、dNTP及び/又はdUTP)、1つ以上の阻止(blocking)又は充填剤(例えば、非特定蛋白質(例えば、ボビン・セラム・アルブミン(BSA: bovine serum albumin)、RNAse A、又はゼラチン)、及びポリメラーゼ(例えば、グリセロールがないタク・ポリメラーゼ(Taq Polymerase))が含まれる。勿論、その他の成分(例えば、その他のプライマ及び/又は特定性対照)も、その他のポリヌクレオチドを増幅のために用いることができる。

【0250】

クリオプロテクタント(Cryoprotectant)は、一般に、凍結乾燥粒子の安定性を高めるのに役立つ、粒子の他の化合物に対する損傷を防止するのに役立つ(例えば、粒子の調合及び/又は保管中に酵素の変性を防止することによって)。実施形態によっては、クリオプロテクタントが1つ以上の糖(例えば、1つ以上のディサッカライド(dissacharides)(例えば、トレハロース(trehalose)、メリジトース(melizitose)、ラフィノーゼ(raffinose))及び/又は1つ以上のポリ・アルコール(例えば、マニトール(mannitol)、ソルビトール(sorbitol))を含む場合がある。

【0251】

凍結乾燥粒子は、所望通りに調合することができる。凍結乾燥粒子を作る方法は、粒子及びクリオプロテクタント(例えば、糖又はポリ・アルコール)の試薬の溶液を形成することを含む。通例、凍結乾燥粒子の化合物を溶剤(例えば、水)と合体させて溶液を作ることができ、次いで、この溶液を冷却した疎水面(例えば、ダイヤモンド膜又はポリテトラフルオルエチレン面)上に配することができる(例えば、1滴ずつ、ピペットによる等での離散分取(例えば、液滴))。一般に、表面の温度は、極低温剤の冷却槽を直下で使用する等によって、液体窒素の温度(例えば、約-150°F以下、約-200°F以下、約-275°F以下)付近まで低下させることができる。溶液は、極低温剤に接触せずに分与することができる。溶液は、離散粒子のように凍結する。凍結粒子を、通例凍結したままで、ペレットから溶液を除去する(例えば、昇華によって)のに十分な圧力及び時間だけ、真空状態に置くことができる。このような方法は、国際特許出願公開第WO2006/119280号に更に記載されている。その内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。

【0252】

一般に、粒子を作る元の溶液における化合物の濃度は、微小流体カートリッジにおいて復元するときよりも高くすることができる。通例、溶液の濃度の復元した濃度に対する比率は、少なくとも約3(例えば、少なくとも約4.5)とすることができる。実施形態によっては、この比率が約6である可能性もある。

【0253】

GBSの存在を示すポリヌクレオチドを増幅するための凍結乾燥ペレットを調合するための溶液の一例は、クリオプロテクタント(例えば、乾燥パウダのような120mgのトレハロース)、緩衝溶液(例えば、pH8.4の1Mトリス、2.5M KCl、

10

20

30

40

50

及び200mgのMgCl₂の溶液48マイクロリットル)、第1プライマ(例えば、1.92マイクロリットルの500マイクロモラーGBSプライマF(インヴィトロゲン(Invitrogen)))、第2プライマ(例えば、1.92マイクロリットルの500マイクロモラーGBSプライマR(インヴィトロゲン))、プローブ(例えば、1.92マイクロリットルの250マイクロモラーGBSプローブ-FAM(IDT/Biosearch Technologies(バイオサーチ・テクノロジー社)))、対照プローブ(例えば、1.92マイクロリットルの250マイクロモラー・カル・オレンジ(Cal Orange)560(Biosearch Technologies(バイオサーチ・テクノロジー社)))、プレート・プラスミド(例えば、0.6マイクロリットルのマイクロリットル当たり10⁵コピーのプラスミドの溶液)、特定性対照(例えば、1.2マイクロリットルのマイクロリットル当たり10ナノグラムのストレプトコッカス・ニューモニエDNA(ATCC)の溶液(例えば、マイクロリットル当たり約5,000,000コピー))、PCR試薬(例えば、4.8マイクロリットルのdNTP(中心)の100ミリモラー溶液)及び4マイクロリットルのdUTP(中心)の20ミリモラー溶液、充填剤(例えば、24マイクロリットルのBSA(インヴィトロゲン)のミリリットル当たり50ミリグラムの溶液)、ポリメラーゼ(例えば、60マイクロリットルのグリセロールがないタク・ポリメラーゼ(インヴィトロゲン/エッペンドルフ)のマイクロリットル当たり5Uの溶液)、並びに約400マイクロリットルの溶液を作るための溶剤(例えば、水)を組み合わせることによって作ることができる。前述のように、この溶液の約2マイクロリットル毎の約200の標本を凍結し、脱溶媒して、200個のペレットを作ることができる。復元すると、200の粒子がPCR試薬溶液を作り、

10

20

【0254】

試薬リザーバ

図14に見られるように、試薬リザーバR_iは、使用する準備ができるまで、ネットワーク304から分離した液体試薬(例えば、水、緩衝溶液、水酸化溶液)を保持するように構成することができる。リザーバR₁は、液体を保持するための封止空間330を規定するエンクロージャ329を含む。各空間330は、エンクロージャ329の下壁によって、試薬ポートR_{Pi}及びネットワーク304から分離することができる。キャッピング材341(例えば、積層体、接着剤、又はポリマ層)でエンクロージャの上壁を覆ってもよい。

30

【0255】

エンクロージャ329の一部は、各エンクロージャの下壁333に向かって方向付けられた作動メカニズム(例えば、穿孔部材331)として形成することができる。カートリッジ300を用いることができるとき、穿孔部材331を押下することによって試薬リザーバR_iを作動させて、壁333を穿孔することができる。穿孔部材331は、ユーザによって(例えば、親指で)、又はカートリッジ300を動作させるために用いられるオペレーティング・システムによって押下することができる。

【0256】

壁333は、通例、切り裂く又は穿孔することができる低透湿率を有する材料(例えば、アクラー(Aclar)、メタライズ(例えば、アルミニウム)積層体、プラスチック、又は箔積層体)で形成することができる。例えば、リザーバは約200マイクロリットルまで保持することができる。穿孔部材331は、その体積の一部(例えば、約25%まで)を占めてもよい。塩基の水酸化ナトリウムのような腐食性試薬と接触する可能性があるブリスタ内部の積層体の材料は、6から12カ月の露出の後であっても、腐食してはならない。

40

【0257】

一般に、リザーバR_iは、所望通りに形成し充填することができる。例えば、エンクロージャの上壁を下壁333に封止することができる(例えば、接着及び/又は熱封止)。例えば、穿孔部材331の下端にある開口によって、液体をリザーバに導入することができる。充填の後、(例えば、局在的加熱による熱封止、又は封止材(例えば、キャッピン

50

グ材料 3 4 1) の被着によって開口を封止することができる)。

【 0 2 5 8 】

壁 3 3 3 を穿孔することができる、リザーバからの流体はネットワーク 3 3 3 に入る。例えば、図 1 4 及び図 1 5 に見られるように、リザーバ R 2 からの液体は、ポート R P 2 を通ってネットワーク 3 0 4 に入り、チャンネル C 2 に沿って進む。ゲート G 3 は、液体がチャンネル C 8 に沿って通過するのを防止する。過剰な液体がチャンネル C 7 に沿って通過して、廃棄物室 W 2 に入る。リザーバ R 2 からの液体の後端縁が疎水ベント H 2 を通過するときに、リザーバ内に発生した圧力を発散させて、液体のこれ以上の運動を停止させることができる。その結果、ネットワーク 3 0 4 は、合流点 J 1 と合流点 J 2 との間にあるチャンネル C 2 の容積によって規定される体積を有する液体試薬の標本を受け取る。アクチュエータ P 1 を作動させることができると、この試薬の標本をネットワーク 3 0 4 内部で更に移動させることができる。試薬リザーバ R 1、R 3、及び R 4 を、対応するチャンネル、疎水ベント、及びアクチュエータと関連付けることができる。

10

【 0 2 5 9 】

図示の構成では、試薬リザーバ R 1 は、通例、処理領域 B 1 内部に保持されているポリヌクレオチドを放出するために放出液 (例えば、カートリッジ 2 0 0 について先に述べたような水酸化溶液) を保持する。試薬リザーバ R 2 は、通例、ポリヌクレオチドを放出する前に、処理領域 B 1 から保持しない化合物 (例えば、インヒビタ) を除去するために洗浄液 (例えば、カートリッジ 2 0 0 について先に述べたような緩衝溶液) を保持する。試薬リザーバ R 3 は、通例、中和緩衝液 (例えば、p H 8 . 0 の 2 5 ~ 5 0 m M の トリス - H C l 緩衝液) を保持する。試薬リザーバ R 4 は、通例、脱イオン水を保持する。

20

【 0 2 6 0 】

リザーバは、当該リザーバの壁に穿孔部材が形成されているように示したが、別の構成も可能である。例えば、実施形態によっては、リザーバが針状の穿孔部材を含み、これがリザーバの上壁を貫通して、リザーバの下壁に向かって封止空間内に達することもある。リザーバの上壁は、針状穿孔部材において (例えば、接着剤、エポキシによって) 封止することができる。使用中に、上壁を押下して、穿孔部材を押し進めて下壁を貫通させ、封止空間の中にある液体を微小流体ネットワークに進入させる。

【 0 2 6 1 】

リザーバは、作動メカニズム (例えば、穿孔部材) を含むように説明したが、別の構成も可能である。例えば、実施形態によっては、リザーバの封止空間の下壁は、微小流体ネットワークへの開口の上に被さる弱化部分を含むこともある。開口に被さる下壁の材料 (例えば、積層体、ポリマ膜、又は箔) は、封止空間内部にある液体の逸失を防止する程度に厚いが、内部の液体に圧力を加えたときに避ける程度に薄くすることができる。通例、開口を覆う材料は、隣接する材料よりも薄くすることができる。あるいは、又は加えて、下壁の周りの材料と比較して、弱化した材料を比較的的支持しないでおくことにより、この材料を形成することもできる。

30

【 0 2 6 2 】

リザーバは、封止空間の壁によって部分的に形成された封止空間を有するように説明したが、別の構成も可能である。例えば、図 2 0 A を参照すると、リザーバは、プランジャ状の作動メカニズム (例えば、穿孔部材 3 4 2) と、上層及び下層 3 4 4、3 4 5 をそれぞれ有する (例えば、上下積層体層) を有するガスカート状封止空間 3 4 3 を含む。液体は、上層と下層との間に封止することができる。封止空間は、支持構造 3 4 6 (例えば、ドーナツ状ガスカート) によって包囲することができ、支持構造は、その上下周面において封止空間を支持する。

40

【 0 2 6 3 】

図 2 0 B を参照すると、穿孔部材 3 4 2 が示されており、穿孔部材 3 4 2 が上下層双方を穿孔し、液体を微小流体ネットワークと連通させるまで押下している。プランジャに隣接するベント 3 4 6 が、穿孔部材と封止空間の上層との間に取り込まれた気体を、微小流体ネットワークの中に押し込むことなく、逃がすことができる。

50

図20Cを参照すると、穿孔部材342を最大限作動させた場合が示されている。穿孔部材の一部が、液体の対応する体積を封止空間から変位させ、所定の体積の液体を微小流体カートリッジに導入する。

【0264】

リザーバは、穿孔部材に対して固定とすることができる封止空間を有するように説明したが、別の構成も可能である。例えば、図21Aは、封止空間347を有するリザーバを示す。封止空間347は、作動メカニズムに対して固着（例えば、これと一体化）することができる。作動メカニズムは、可動部材348（例えば、プランジャ）と、封止空間に対して固定とすることができる穿孔部材支持部350によって支持されている穿孔部材349とを有する。通例、封止空間は、可動部材内部の空洞と、封止空間内に液体を封止する下壁351とによって規定することができる。穿孔部材は、可動部材を押下することができるときに、下壁を裂くように構成することができる。穿孔部材支持部は、可動部材の空洞に対して全体的に相補的な形状を有する。穿孔部材支持部は、微小流体ネットワークに接続されているチャンネル352を含み、密閉空間から放出した流体を、微小流体ネットワークに進入させる。

10

【0265】

図21Bを参照すると、可動部材が押下されており、穿孔部材が丁度封止空間の下層を裂いたところとなっている。図21Cを参照すると、リザーバは穿孔部材及び穿孔部材支持部上に最大に押下されている。リザーバから変位させられる流体の体積は、一般に、密閉空間に入る穿孔部材支持部の体積に対応する。チャンネル353によって、可動部材が変位させた空気を排出させる。

20

【0266】

リザーバは、当該リザーバの何らかの部分に対して固着することができる穿孔部材を有するように説明したが、別の構成も可能である。例えば、図22を参照すると、リザーバは、当該リザーバに対して固着しないことが可能な作動メカニズム354（例えば、針状穿孔部材のような穿孔部材）を含む。リザーバの封止空間355は、上壁356によって規定することができ、内部に微小流体ネットワークを規定することができる基板361の一部を貫通するチャンネル357を含む。封止空間の下壁358が、封止空間を微小流体ネットワークのチャンネル359から分離する。穿孔部材は、封止空間のチャンネル357を占有し、穿孔部材の穿孔先端360が下壁358に対抗して留まるようになっている。リザーバの上壁356を押下すると、穿孔部材354が下壁を貫通し、封止空間内にある液体を微小流体ネットワークの中に押し込むことになる。

30

【0267】

別の例として、図23A及び図23Bは、作動メカニズム（例えば、穿孔部材）を含むリザーバを示す。この作動メカニズムは、初期状態ではリザーバの上壁の内部に固着することができるが、リザーバの作動時に上壁から少なくとも部分的に分離する。

更に別の例として、図24A及び図24Bは、穿孔部材364を含むリザーバを示す。穿孔部材364は、初期状態ではリザーバの上壁366の内部365に固着することができるが、リザーバの作動時に実質的に上壁から分離する（例えば、完全に分離する）。

【0268】

40

リザーバについて、密閉空間を有し、これをリザーバの一部に固定又はそうでなければ一体化することができるように説明したが、別の構成も可能である。例えば、図25を参照すると、リザーバは、外壁368によって規定されたカプセル状密閉空間367を含む。外壁は、全体的に、低い透湿率を有する材料で形成することができる。また、リザーバは可動部材369を有する作動メカニズムも含む。可動部材369は穿孔部材370を有し、これが密閉空間を穿孔して中にある液体を放出する。液体はチャンネル372に沿って通過し、微小流体ネットワークに至る。チャンネル371は、他の場合では可動部材に取り込まれる気体（例えば、空気）を排出させる。

【0269】

リザーバについて、微小流体ネットワークへの入口を全体的に覆うように説明したが、

50

別の構成も可能である。例えば、図 26 を参照すると、リザーバは、内部に液体を蓄積することができる密閉空間 373 と、微小流体ネットワークに入口 376 に接続されている接続部 374 とを含む。密閉空間 373 及び接続部 374 は、切り裂き可能なシール 375 (例えば、弱いシール) によって分離することができる。一般に、切り裂き可能なシール 375 は、液体又は蒸気が密閉空間から出るのを防止する。しかしながら、液体に圧力を加えるときに (例えば、密閉空間の壁 377 を押下することによって)、切り裂き可能なシール 375 が裂けて、液体が弱いシールを通過して接続部に達し、更に微小流体ネットワーク 378 に入ることができる。

【0270】

穿孔部材を有するリザーバの更に別の実施形態を図 27A に示す。これは、外側シェル 2703 と、穿孔エレメント 2704 とを有するリザーバ 2701 を示し、双方とも同じ材料片で作ることができる。このような合体したシェル及び穿孔エレメントは、当業者には既知の多くのプロセスから形成することができる。特に好ましいプロセスは、真空熱形成及び射出成型とすることができる。穿孔エレメント 2704 は、全体的に円錐形状とすることができ、頂角がメンブレン 2702 に隣接し、その頂角は 0.040° を超過しないことが好ましい。外側シェルを押下することができるときに、穿孔エレメントは、メンブレン 2702 を穿孔してリザーバ 2701 から液体を放出する。代表的な寸法を図 27A に示す。リザーバは、上面を水平にすることができ、平坦な保護片 2705 が穿孔部材 2704 の円錐形の底面を覆うように組み立てるとよい。

【0271】

穿孔部材を有するリザーバの更に別の実施形態を図 27B に示す。これは、単体外側シェル 2712 及び穿孔エレメント 2714 を有するリザーバ 2711 を示す。このような合体したシェル及び穿孔エレメントは、当業者には既知の多くのプロセスから形成することができる。特に好ましいプロセスは、真空熱形成及び射出成型とすることができる。穿孔エレメント 2714 は、全体的に円錐台形状とすることができ、その狭い辺がメンブレン 2713 に隣接する。あるいは、穿孔エレメント 2714 は、数個の別個の穿孔エレメントを備え、円錐状空間内に配置することもできる。このような穿孔エレメントが 4 つあることができ、多数のエレメントがあることができることが好ましい。

【0272】

尚、図 27A 及び図 27B にインチ単位の十進量で示すリザーバの寸法、穿孔エレメント、シェル、及び成型品は、一例であることは言うまでもない。特に、寸法は、シェルがそれ自体の重量で潰れることがなく、通例、カートリッジの動作中に必要となったときに、穿孔部材の押下を妨げる程強くはないようにすることができる。

【0273】

更に、種々の実施形態の材料も、カートリッジの保管寿命が約 1 年となるように選択することができる。これによって、種々の材料の厚さは、これらが、拡散のような手段によって、所望の保管寿命期間中にその内部に収容する液体体積の 10% の消失を阻止するようにすることができる。

【0274】

好ましくは、リザーバの容積は、シェルを押下する前において、約 $150 \mu\text{l}$ とすることができる。シェルを押下したときでは、容積は、その元の容積の約半分に変形できることが好ましい。

【0275】

尚、プリスタ・パックに液体試薬を完全に充填し、気泡のための空間が残っていないと、プリスタには、好ましいよりもかなり大きな力を加えることが必要となる。したがって、プリスタは、通例、その容積の約 80 ~ 95% まで充填し、空気のために約 5 ~ 20%、通例では、10 ~ 15% の容積を確保しておく。つまり、一実施形態では、全容積が $200 \mu\text{l}$ のプリスタに 170ml の液体を充填する。

【0276】

溶解室

10

20

30

40

50

図14A及び図14Bに示したような溶解室302の一例は、タワー型の外形で示されており、微小流体カートリッジ300の面から突出している。溶解室302は、主要溶解室306と廃棄物室308とに分割することができる。一実施形態では、主要溶解室及び廃棄物室306、308は、互いに分離されているので、材料はこれらの室の一方から他方の室に通抜け、ネットワーク304の少なくとも一部を通過することはできない。主要溶解室306は、サンプルを室306に導入するサンプル入力ポートSP1、室306をネットワーク304に接続するサンプル出力ポートSP2、及びここに記載するように室306内部でサンプル材料と相互作用する凍結乾燥試薬LPを含む。ポートSP2は、図14Aでは、室302の底面にあるように示されている。図15Bは、微小流体ネットワーク304の残りに対するSP2の位置を示す。入力ポートSP1は、材料（例えば、

10

サンプル材料及び気体）を室306に進入させるが材料がポートSP1を通過して室308から出るとは制限する（例えば、防止する）一方向弁を含む。通例、ポートSP1は、気密封止を形成するためにサンプル入力デバイス（例えば、シリンジ）と嵌合するように構成されている取付具（例えば、ルアー取付具(Luer fitting)）を含む。主要室306は、通例、約5ミリリットル以下（例えば、約4ミリリットル以下）の容積を有する。使用前に、主要室306は、通例、気体（例えば、空気）で充填することができる。

【0277】

廃棄物室308は、液体が室308にネットワーク304から入ることができる廃棄物部W6と、室308に入る液体によって変位する気体が出ていくことができるベント310とを含む。

20

【0278】

溶解試薬粒子

溶解室302の乾燥凍結試薬粒子LPは、細胞からポリヌクレオチドを放出する（例えば、細胞を溶解することによって）ように構成されている1つ以上の化合物（例えば、試薬）を含む。例えば、粒子LPは、蛋白質（例えば、プロテイナーゼ、プロテアーゼ（例えば、プロナーゼ）、トリプシン、プロテイナーゼK、ファージ・リティック酵素（例えば、PlyGBS）、リゾジーム（例えば、ReadyLyseのような改質リゾジーム）、細胞特定酵素（例えば、グループBストリプトコッカスを溶解するためのミュタノリシン(mutanolysin)）を減少させる（例えば、変性させる）ように構成されている1つ以上の酵素を含むことができる。

30

【0279】

実施形態によっては、粒子LPは、代わりに又は加えて、インヒビタと比較してポリヌクレオチドを保持する成分を含むこともある。例えば、粒子LPは、カートリッジ200の処理室について先に述べたように、受容体で表面を改質した多数の粒子218を含むことができる。粒子LPは、表面改質粒子上の部位を結合するために、判定すべきポリヌクレオチドと競合する可能性があるポリヌクレオチドを減少させる酵素を含むことができる。例えば、判定すべきDNAと競合する可能性があるRNAを減少させるには、粒子LPはRNAase（例えば、RNAaseA、ISC BioExpress (Amresco)）のような酵素を含むとよい。

40

【0280】

実施形態の一例では、粒子LPは、クリオプロテカント、インヒビタと比較してポリヌクレオチドを保持するように受容体で改質した粒子、及び1つ以上の酵素を含む。

通例、粒子LPの平均体積は、約35マイクロリットル以下（例えば、約27.5マイクロリットル以下、約25マイクロリットル以下、約20マイクロリットル以下）である。実施形態によっては、粒子LPの平均直径が、約8mm以下（例えば、約5mm以下、約4mm以下）である場合もある。実施形態の一例では、凍結乾燥粒子はの平均体積は約20マイクロリットルであり、平均直径は約3.5mmである。

【0281】

粒子LPは、所望通りに調合することができる。通例、他の試薬粒子について先に述べたように、クリオプロテカント及び冷却した疎水面を用いて、粒子を調合する。例えば

50

、粒子LPを調合するための溶液は、約20ミリリットル作るためには、クリオプロテクトANT（例えば、6グラムのトレハロース）、受容体で改質した複数の粒子（例えば、約2ミリリットルのポリ-D-リシン受容体を有するカルボキシル改質粒子の懸濁液）、プロテアーゼ（例えば、約400ミリグラムのプロナーゼ）、RNAase（例えば、約30ミリグラムのRNAase A（ミリグラム当たり120Uの活量）、ペプチドグリカンを消化する酵素（例えば、ReadyLyse（例えば、160マイクロリットルのReadyLyseのマイクロリットル当たり30,000Uの溶液））、細胞特定酵素（例えば、ミュタノリシン（例えば、200マイクロリットルのミュタノリシンのマイクロリットル当たり50Uの溶液）、及び溶剤（例えば、水）を組み合わせることによって調合することができる。この溶液の約20マイクロリットル毎の約1,000個の標本を、前述のように、凍結しそして脱溶剤して、1,000個のペレットを作る。復元したとき、ペレットは、通例、合計約200ミリリットルの溶液を作るために用いることができる。

10

【0282】

微小流体カートリッジの動作例

使用中、カートリッジ300の種々の構成要素は、次のように動作することができる。ネットワーク304の弁Vi及び弁Vi'は、開放状態に構成することができる。ネットワーク304のゲートGi及び混合ゲートMGiは、閉鎖状態に構成することができる。試薬ポートR1~R4は、例えば、機械的な力を加えることによって押下して、先に説明したように、液体試薬をネットワーク304に導入することができる。サンプルは、ポートSP1を通じて溶解室302に導入し、主要溶解室306内において凍結乾燥粒子LPと合体することができる。通例、サンプルは、粒子（例えば、細胞）と緩衝溶液との組み合わせを含む。例えば、サンプルの一例は、約2部全血液(2 parts whole blood)から3部緩衝溶液(3 about parts buffer solution)（例えば、pH8.0の20mMトリス、1mMのEDTA、及び1%SDSの溶液）を含む。別のサンプル例は、グループBストレプトコッカ及び緩衝溶液（例えば、pH8.0の20mMのトリス、1mMのEDTA、及び1%トリトン(Triton)X-100の溶液）を含む。

20

【0283】

一般に、導入するサンプルの体積は、主要溶解室306の全容積よりも小さくすることができる。例えば、サンプルの体積は、室306の全容積の約50%以下（例えば、約35%以下、約30%以下）とするとよい。典型的なサンプルは、体積が約3ミリリットル以下（例えば、約1.5ミリリットル以下）である。一般に、ある体積の気体（例えば、空気）が、サンプルと共に主要室306に導入される可能性がある。通例、導入される気体の体積は、室306の全容積の約50%以下（例えば、約35%以下、約30%以下）とすることができる。サンプル及び気体の体積が合わさって、室306の中に既に入っている気体を加圧する。ポートSP1の弁307は、気体が室306から出るのを防止する。ゲートG3、G4、G8、及びG10は閉鎖状態にあるので、加圧サンプルがポートSP2を通してネットワーク304に入るのを防止することができる。

30

【0284】

サンプルは室306において粒子LPを溶解する。復元された溶解試薬（例えば、ReadyLyse、ミュタノリシン）がサンプルの細胞を溶解し始め、ポリヌクレオチドを放出する。その他の試薬（例えば、プロナーゼのようなプロテアーゼ酵素）がサンプルの中にあるインヒビタ（例えば、蛋白質）を減少又は変性させ始める。サンプルからのポリヌクレオチドが、粒子LPから放出された粒子218の受容体と連合（例えば、結合）し始める。通例、室306内では、溶解が行われている間、サンプルをある時間期間（例えば、約15分以下、約10分以下、約7分以下）加熱する（例えば、少なくとも約50℃まで、少なくとも約60℃まで）ことができる。実施形態によっては、光エネルギーを用いて、少なくとも部分的に、溶解室306の内容物を加熱することができる。例えば、カートリッジ300を動作させるために用いられる動作システムは、室306と熱的及び/又は光学的に接触するように配置した光源399（例えば、主に赤外線領域の光を放出するランプ）を含むことができる。このような光源は、ヒータ・モジュール2020、図7、参照番号2

40

50

046と共に示したものとすることができる。室306は、室306の内部におけるサンプルの温度を監視するために用いる温度センサTSを含む。ランプ出力は、センサTSによって決定した温度に基づいて、増減することができる。

【0285】

カートリッジ300の動作を続けると、G2を作動させて（例えば、開放する）、主要溶解室306のポートSP2と溶解廃棄物室308のポートW6との間に経路を設ける。経路は、チャンネルC9、チャンネルC8に沿って延び、処理領域B1を貫通し、チャンネルC11に至る。室306内の圧力が、溶解サンプル材料（ライセート、粒子218に結合したポリヌクレオチド、及びその他のサンプル成分を含有する）を通路に沿って送り出す。粒子218（ポリヌクレオチドを含む）を処理領域B1内に保持する（例えば、フィルタによって）ことができ、一方サンプルの液体及びその他の成分は廃棄物室308に流入する。ある時間期間の後（例えば、約2分及び約5分の間）、ゲートG1を開放することによって溶解室306内の圧力を発散させて、ポートSP2及びW6の間に第2経路を形成することができる。二重弁V1'及びV8'を閉鎖して、溶解室302をネットワーク304から分離することができる。

10

【0286】

カートリッジ300の動作は、続いて、ポンプP1を作動させ、ゲートG2、G3、及びG9を開放する。ポンプP1は、チャンネルC2の中にある洗浄液を合流点J1の下流に処理領域B1を通して、廃棄物室W5まで送り込む。洗浄液は、インヒビタ、及び粒子218によって保持されないその他の化合物を、処理領域B1から除去する。洗浄液の後端縁（例えば、上流側界面）が疎水ベントH14を通過したときに、アクチュエータP1からの圧力がネットワーク304から発散し、液体のそれ以上の運動を停止させる。二重弁V2'及びV9'を閉鎖することができる。

20

【0287】

動作は続いて、ポンプP2を作動させ、ゲートG6、G4、及びG8を開放して、放出液を試薬リザーバR1から処理領域B1に移動させ、粒子218と接触させる。空気ベントAV1は、放出液の移動に先だて、圧力を発散させる。疎水ベントH6は、放出液の後端縁の後で圧力を発散させ、放出液のそれ以上の運動を停止させる。二重弁V6'及びV10'を閉鎖することができる。

【0288】

動作は続いて、処理領域B1を加熱して（例えば、粒子218を加熱することによって）、粒子218からポリヌクレオチドを放出する。粒子は、カートリッジ200について先に説明したように、加熱することができる。通例、放出液は、約15mMの水酸化物（例えば、NaOH溶液）を含み、粒子を約70まで約2分加熱すると、粒子218からポリヌクレオチドを放出することができる。

30

【0289】

動作は続いて、ポンプP3を作動させ、ゲートG5及びG10を開放して、放出液を処理領域B1から下流に移動させる。空気ベントAV2が、放出液の下流側の気体圧力を発散し、液体がチャンネルC16に流入できるようにする。疎水ベントH8は、放出液の上流から圧力を発散して、それ以上の移動を停止させる。二重弁V11'及び弁V14を閉鎖することができる。

40

【0290】

図19Aから図19Dを参照すると、粒子218から放出されたポリヌクレオチドを含む放出液の一部と、試薬リザーバR3からの中和緩衝液とを混合するために、混合ゲートMG11を用いることができる。図19Aは、試薬リザーバR3を押下して中和緩衝液をネットワーク304に導入する前における混合ゲートMG11領域を示す。図19Bは、中和緩衝液をチャンネルC13及びC12に導入した後における混合ゲートMG11を示す。二重弁V13'を閉鎖すると、ネットワーク304を試薬リザーバR3から分離することができる。二重弁V12'を閉鎖すると、ネットワーク304を廃棄物室W3から分離することができる。中和緩衝液は、ゲートMG11のTRSの質量体324の一方側と

50

接触する。

【0291】

図19Cは、放出液をチャンネルC16内に移動させた後における混合ゲートMG11領域を示す。微小流体ネットワーク304の寸法（例えば、チャンネルの寸法、及び疎水ベントH8の位置）は、チャンネルC16及びC14の合流点J3及びJ4の間に位置する放出液の一部が、放出ステップの間粒子218と接触する液体の体積にほぼ対応するように構成することができる。実施形態によっては、合流点J3及びJ4の間に位置する液体の体積は、約5マイクロリットル未満（例えば、約4マイクロリットル以下、約2.5マイクロリットル以下）とすることができる。実施形態の一例では、合流点J3及びJ4の間にある放出液の体積は、約1.75マイクロリットルとすることができる。通例、合流点J3及びJ4の間にある液体は、処理領域B1に入ったサンプルの中にあるポリヌクレオチドの内、少なくとも約50%（少なくとも約75%、少なくとも約85%、少なくとも約90%）のポリヌクレオチドを含む。弁V14を閉鎖すると、ネットワーク304を空気ベントAV2から分離することができる。

10

【0292】

混合ゲートMG11を作動させる前に、合流点J4における放出液、及びチャンネルC13及びC12の間にある合流点J6における中和緩衝液を、TRSの質量体324によって分離することができる（例えば、液体は、通例、ある体積の気体によって離間されない）。放出液及び中和緩衝液を合体させるには、ポンプP4並びにゲートG12、G13、及びMG11を作動させることができる。ポンプP4は、合流点J5及びJ6の間にある中和液の体積、及び合流点J4及びJ3の間にある放出液の体積を混合チャンネルC15（図19D）の中に送り込む。TRSの質量体324は、通例、散乱及び/又は溶融して、2つの液体が合体することが可能になる。合体した液体は、下流側界面335（合流点J3によって形成された）と、上流側界面（合流点J5によって形成された）とを含む。これらの界面があるために、界面がない場合よりも効率の高い混合が可能となる（例えば、混合液の再循環）。図19Dにおいて見られるように、混合は、通例、2つの液体の界面付近で開始する。混合チャンネルC15は、通例、チャンネル内部にある合体した液体の全長と少なくともほぼ同じ長さ（例えば、少なくとも約2倍長い）とすることができる。

20

【0293】

放出液と合体する中和緩衝液の体積は、合流点J5及びJ6の間におけるチャンネルの寸法によって決定することができる。通例、合体させる中和液の体積は、合体させる放出液の体積とほぼ同じとすることができる。実施形態によっては、合流点J5及びJ6間に位置する液体の体積は、約5マイクロリットル未満（例えば、約4マイクロリットル以下、約2.5マイクロリットル以下）である。実施形態の一例では、合流点J5及びJ6の間にある放出液の体積は、約2.25マイクロリットルとすることができる（例えば、放出液及び中和緩衝液の総体積は約4マイクロリットルとすることができる）。

30

【0294】

図15A、15Bに戻り、合体した放出液及び中和緩衝液は、混合チャンネルC15に沿って移動し、チャンネルC32に流入する（空気ベントAV8によって下流側で脱気させる）。運動は、合体した液体の上流側界面が疎水ベントH11を通過するまで続く。疎水ベントH11は、アクチュエータP4からの圧力を発散させて、合体した液体のそれ以上の運動を停止させる。

40

【0295】

カートリッジ300の動作を続けると、試薬リザーバR4からの、水中で第2処理領域B2にある凍結乾燥PCR粒子を溶解するために、アクチュエータP5並びにゲートG14、G15、及びG17を作動させることができる。疎水ベントH10は、水の上流側にあるアクチュエータP5からの圧力を発散させて、それ以上の運動を停止させる。PCR-試薬ペレットの溶解は、通例、約2分以下で（例えば、約1分以下で）行われる。弁V17を閉鎖することができる。

【0296】

50

カートリッジ300の動作を続けると、凍結乾燥粒子の溶解化合物を処理領域B2からチャンネルC31に送り込むために、アクチュエータP6及びゲートG16を作動させることができ、溶解した試薬が混合して、均質に溶解した乾燥凍結粒子溶液を形成する。アクチュエータP6は、溶液をチャンネルC35及びC33の中に移動させる（空気ベントAV5によって下流側で脱気させる）。疎水ベントH9は、溶液の上流側でアクチュエータP6が発生した圧力を発散させて、それ以上の運動を停止させる。弁V18、V19、V20'、及びV22'を閉鎖することができる。

【0297】

カートリッジ300の動作を続けると、ゲートMG20とゲートG22との間にあるチャンネル32内にある中和放出液の一部と、ゲートG18及びMG20の間にあるチャンネルC35内にある溶解凍結乾燥粒子溶液の一部とを合体（例えば、混合）するために、アクチュエータP7並びにゲートG18、MG20、及びG22を作動させることができる。合体した液体は、混合チャンネルC37に沿って進み、検出領域D2に入る。空気ベントAV3が、混合液の下流側で気体圧力を発散させる。合体した液体の上流側界面が疎水ベントH13を通過するとき、アクチュエータP7からの圧力を発散させることができ、合体した液体は検出領域D2の中に位置することができる。

【0298】

MG2とゲートG23との間にある試薬リザーバR4からの水の一部を、ゲートG19及びMG2の間にあるチャンネルC33内にある溶解凍結乾燥粒子溶液の第2部分とを合体するために、アクチュエータP8並びにゲートMG2、G23、及びG19を作動させることができる。合体した液体は、混合チャンネルC41に沿って進み、検出領域D1に入る。空気ベントAV4が、合体した液体の下流側で気体圧力を発散させる。合体した液体の上流側界面が疎水ベントH12を通過するとき、アクチュエータP8からの圧力を発散させることができ、合体した液体は検出領域D1の中に位置することができる。

【0299】

カートリッジ300の動作を続けると、検出領域D1をネットワーク304から分離するために、二重弁V26'及びV27'を閉鎖することができる。検出領域D2をネットワーク304から分離するために、二重弁V24'及びV25'を閉鎖することができる。各検出領域の内容物（検出領域D2内にあるサンプル・ポリヌクレオチドを含む中和放出液、溶解凍結乾燥粒子溶液からのPCR試薬、及び検出領域D1における溶解凍結乾燥粒子溶液からのPCR試薬を含み脱イオン水）に対して加熱及び冷却ステップを実施して、ポリヌクレオチド（検出領域D2にある場合）を増幅することができる。各検出領域の二重弁は、加熱の間、検出領域の内容物の気化を防止する。増幅したポリヌクレオチドは、通例、蛍光検出を用いて検出することができる。つまり、通例検出領域D1、D2の一方又は双方の上には、窓（例えば、図9におけるような）があり、検出器が窓の上に配置されたときに、反応混合における蛍光物質からの蛍光の検出が可能となる。

【0300】

サンプルを処理する種々の段階を実行するカートリッジについて、ここでは全体的に平坦な外形を有するように示し説明したが、別の構成を用いることもでき、ここに記載する一体化システムと調和する。例えば、全体的に管状又は小瓶状の外形を有するカートリッジが、米国特許出願公開第2006-0166233号に記載されている。その内容は、ここで引用したことにより、本願にも含まれるものとする。

【0301】

実施例

以下の実施例は、例示であり、限定することは意図していない。

実施例1：ポリヌクレオチド処理装置

この非限定的な実施例では、図28から図40に示すように、装置、システム、微小流体カートリッジ、キット、方法、及びコンピュータ・プログラム生産物の種々の実施形態例について説明する。

【0302】

10

20

30

40

50

例えば、図 28 は、小型ベンチ・トップ・リアルタイム、ポリヌクレオチド分析システムとして動作することができる装置 800 の図である。このようなシステムは、ポリヌクレオチドに対して、例えば、1 つ以上の感染症の徴候を見つけるために患者からの検査サンプルに対して種々の検査を実行することができる。本装置は、例えば、医療環境から離れる前に患者を検査し所持する際に臨床要員を補助するために、臨床診断市場において用いるための、リアルタイム・ポリヌクレオチド分析システムとして機能することができる。装置 800 は、例えば、表示出力 802 を有する筐体、ハンドル 805 を有する蓋 804、及びバーコード・リーダー 806 を含むことができる。図 28 及び図 36 を参照すると、装置 800 は、受容ベイ 807 も含むことができ、これを蓋 804 によって覆うことができる。種々の実施形態では、装置 800 は、可搬型とすることができ、例えば、装置 800 は、重量を約 10 kg とすることができ、幅約 25 cm、奥行き約 40 cm、高さ約 33 cm の寸法を有することができる。

10

【0303】

装置 800 は、図 29 に示すサンプル・キット 810 と共に用いることができる。サンプル・キット 810 は、例えば、任意のラベル 813 (例えば、バーコード・ラベル) を有する微小流体カートリッジ 812、任意のラベル 815 9 例え、バーコード・ラベル) を有するサンプル・コンテナ 814、任意のフィルタ 818、任意のピペット先端 820、及び任意のシリンジ 82 を含むことができる。図 30 を参照すると、サンプル・キット 810 の 1 つ以上の構成要素 (例えば、微小流体カートリッジ 812) を、例えば、任意にアルゴン又は窒素のような不活性ガスを気密封止することができる、封止パウチ 824 の中に収めることができる。

20

【0304】

図 31 に示すように、微小流体カートリッジ 812 は、サンプル入口 826、複数の自己穿孔可能なりザーバ 828、リーシス・リザーバ 830、廃棄物リザーバ 832、任意のラベル 813 (例えば、バーコード)、及び位置合わせ部材 836 (例えば、面取りした角) を含むことができる。図 31 及び図 36 を参照すると、位置合わせ部材 836 は、装置 800 における受容ベイ 807 の相補位置合わせ部材機構 809 と一致することができる。装置 800 に挿入するとき、カートリッジ 812 の向きを決めやすくするために用いることができる。実施例によっては、微小流体カートリッジ 812 は、ヒータ/センサ・モジュール 842 におけるウェル 807 よりも多少小さくして (例えば、50 ~ 300

30

【0305】

図 32 及び図 33 を参照すると、微小流体カートリッジ 812 及び / 又はサンプル・コンテナ 814 上のラベル、例えば、バーコード 813 及び 815 を、通例検査を行う前に、例えば、手作業で又はバーコード・リーダー 806 を用いることによってラベル・コードを入力することによって、装置 800 によって記録することができる。

【0306】

サンプルを検査する準備において、キット 810 からのピペット先端 820 をシリンジ 822 に取り付けることができ、サンプル・コンテナ 814 からシリンジ 822 の中にサンプルを引き込むことができる。図 34 を参照すると、次に、サンプル入口 826 を通じて微小流体カートリッジ 812 のリーシス・リザーバ 830 にフィルタ 818 を取り付けることができ (例えば、サンプル入口 826 においてダックビル弁 (duckbill valve) を有するルアー・ロックを用いて)、シリンジ 822 の内容物 (例えば、サンプル/空気混合物) を、フィルタ 818 を通じて微小流体カートリッジ 812 に注入することができる。追加の空気 (例えば、1 ~ 3 mL) をシリンジ 822 に引き込むことができ (図 35 に示すように)、微小流体カートリッジ 812 を加圧できるようにする (例えば、周囲圧力に対して平方インチ (psi) 当たり 5 ~ 50 ポンド、典型的には、周囲圧力に対して 5 ~ 25 psi の間、更に典型的には 10 ~ 15 psi の間)。微小流体カートリッジ 812 は、緩衝液、試薬などを、例えば、リーシス・リザーバ 830 に、液体、固体、凍結乾燥

40

50

試薬ペレット等の形態で収容することができる。微小流体カートリッジ 8 1 2 を揺り動かして、注入したサンプルを緩衝液、試薬等と混合することができる。

【 0 3 0 7 】

図 3 5 を参照すると、微小流体カートリッジ 8 1 2 を加圧するには、シリンジ 8 2 2 及びフィルタ 8 1 8 を、追加の空気と共に用いることができる。微小流体カートリッジ 8 1 2 は、図 3 6 に示すように、装置 8 0 0 の受容ベイ 8 0 7 の中に配置することができ、微小流体カートリッジ 8 1 2 上の位置合わせ部材 8 3 6 と受容ベイ 8 0 7 の中にある相補的な位置合わせ部材 8 0 9 との間における相互作用のために、装置 8 0 0 の受容ベイ 8 0 7 には 1 つの向きでなければ据え付けることができない。

【 0 3 0 8 】

図 3 7 及び図 3 8 に示すように、装置 8 0 0 の蓋 8 0 4 を閉鎖すると、周囲の光をサンプル・ベイから遮断する役割を果たすことができる。加えて、蓋 8 0 4 を閉鎖すると、蓋の中に収容されている光学検出器を微小流体カートリッジ 8 1 2 に対して正しく位置付けることができる。また、装置の蓋 8 0 4 を閉鎖すると、圧力を微小流体カートリッジ 8 1 2 に加え、ウェル 8 0 7 における加熱/センサ・モジュール 8 4 2 との熱的接触を確保することができる。図 3 9 及び図 4 0 を参照すると、装置 8 0 0 の加熱/センサ・モジュール 8 4 2 は、洗浄、保守、又は特定の微小流体カートリッジ 8 1 2 のための特別な加熱段階との交換のために、着脱可能とすることができる。

【 0 3 0 9 】

実施例 2：ポリヌクレオチド処理装置

この非限定的な実施例では、装置、システム、微小流体カートリッジ、キット、方法、及びコンピュータ・プログラム生産物の種々の実施形態例、特に、方法及びコンピュータ・プログラム生産物の態様例に関する、実施例 1 に記載した装置 8 0 0 を用いる種々の態様について説明する。

【 0 3 1 0 】

図 2 8 から図 4 0 を参照すると、装置 8 0 0 は、制御ソフトウェアの形態としてコンピュータ・プログラム生産物を含む、又はこれと共に構成することができる。このソフトウェアは、分析に用いられておらず、装置 8 0 0 を差し込んでユーザの入力を待つことができるときに、「レディ・モード」(READY MODE) (例えば、スタンバイ・モード) を装置に設けることができる。操作者は、ハンドル 8 0 5 を用いて蓋 8 0 4 を滑らせてその最大開放位置まで開くことができる。ソフトウェア及び装置 8 0 0 は、表示出力 8 0 2 上に、蓋 8 0 4 が開いており、装置 8 0 0 の準備ができていことを示すように構成することができる。ソフトウェア及び装置 8 0 0 は、ハードウェア及び/又はソフトウェア自己検査を実行するように構成するとよい。ソフトウェア及び装置 8 0 0 は、例えば、タッチ・スクリーン・インターフェースを用いることによって(例えば、表示出力 8 0 2 上の数字キーボードのキーに触れることによって)、バーコード・リーダー 8 0 6 によって、ID バッジ上に見られるような、ユーザを表すバーコードを走査入力すること等により、ユーザにログインさせるために、ユーザ ID 及びパスワード画面の入力を要求するように構成するとよい。

【 0 3 1 1 】

次いで、ユーザは微小流体カートリッジ 8 1 2 及びサンプル・コンテナ 8 1 4 を封止パウチ 8 2 4 から取り出すことができる。ソフトウェア及び装置 8 0 0 は、いずれの検査を実行する前にも、図 3 2 及び図 3 3 におけるように、バーコード・リーダー 8 0 6 を用いて、微小流体カートリッジ 8 1 2 上のバーコード 8 1 3 及び/又はサンプル・コンテナ 8 1 4 上のバーコード 8 1 5 を走査入力することを要求するように構成するとよい。ソフトウェア及び装置 8 0 0 は、核酸検査を実行する前に、バーコードに基づいて、適格性検査を実行するように構成するとよい(例えば、微小流体カートリッジ 8 1 2 及びサンプル・コンテナ 8 1 4 が同じ封止パウチ 8 2 4 に入っていたか否か、キット 8 1 0 の有効期限が過ぎていないか、キット 8 1 0 を、ソフトウェア及び装置 8 0 0 等が行う特定の分析シーケンスと共に用いるように構成することができるか否か等を判定するため)。次に、表示出

10

20

30

40

50

力 8 0 2 は、患者識別子のような、入力を要求する画面に進むことができる。また、装置 8 0 0 は、バーコード・リーダ 8 0 6 を用いて、バーコード（例えば、患者に割り当てられて医療 ID プレスレット上にある）を走査することによって、患者情報を入力させてもよい。表示出力 8 0 2 は、例えば、既の実施した検査の結果、実施する検査についての選択肢等に関する情報を、ユーザに提供することができる。提供するとよい情報の例には、限定ではないが、検査判定（例えば、陽性 / 陰性結果）、内部制御結果（例えば、陽性及び / 又は陰性）、及び / 又は患者の結果 (patient results) を含む。この実施例では、ユーザを促して、装置 8 0 0 に、検査データを用いて、データを記録しプリンタ、記憶装置、又はコンピュータ等に出力するというような、追加のタスクを実行させるようにしてもよい。

10

【 0 3 1 2 】

ソフトウェア及び装置 8 0 0 の種々の実施形態は、ユーザに 1 つ以上の任意の機能を実行させるように構成することができる（例えば、装置 8 0 0 又はソフトウェアに対する調節）。任意の機能には、限定ではないが、ユーザ設定値の修正、ログアウト設定値の修正、システム・クロックの設定、表示設定値の修正、QC 要件の修正、報告の好みの設定、取り付けられたプリンタの環境設定、ネットワーク接続の環境設定、ネットワーク接続を通じたデータ送付、データ分析プロトコルの選択又は適応化等が含まれる。

【 0 3 1 3 】

種々の実施形態では、ソフトウェアは、ユーザ・インターフェース及びデバイス・ファームウェアを含むことができる。ユーザ・インターフェース・ソフトウェアは、ユーザとの相互作用の側面に対処することができ、限定ではないが、患者 / サンプル情報の入力、検査進展の監視、エラー警告、検査結果の印刷、結果のデータベースへのアップロード、ソフトウェアの更新等が含まれる。デバイス・ファームウェアは、分析検査中装置 8 0 0 を動作させることができ、検査とは関係ない包括部分と、実行する検査に特定の部分を含むことができる。検査特定部分（「プロトコル」）は、検査を遂行するために、微小流体動作及びその順序を指定することができる。図 4 1 A は、リアル・タイム熱センサ・データを表示するインターフェースの一例から取り込んだ画面を示す。図 4 1 B は、リアル・タイムの光学検出器のデータを表示するインターフェースの一例から取り込んだ画面を示す。

20

【 0 3 1 4 】

実施例 3：ポリヌクレオチド処理装置

この非限定的な実施例では、特許請求する装置、システム、微小流体カートリッジ、キット、方法、及びコンピュータ・プログラム生産物の種々の実施形態例について説明する。一実施形態では、図 2 8 に示す装置 8 0 0 は、病原菌（例えば、出産前の女性におけるグループ B ストレプトコッカス (GBS)）の迅速かつ正確な診断のための微小流体技術に基づく自己充足型、リアル・タイム PCR デバイスとすることができる。実施形態の一例では、微小流体カートリッジ 8 1 2（図 3 1）を設置することができる場合、装置 8 0 0 はカートリッジ上の動作を作動させること、PCR 増幅の生成物を検出及び分析すること、及び / 又は結果をグラフィカル・ユーザ・インターフェースに表示することができる。微小流体カートリッジ 8 1 2 は、複数の室及び / 又はサブユニットを含み、ユーザによる介入を抑えて又は介入なしに、種々のタスクを実行することができる。図 4 2 は、微小流体カートリッジ 8 1 2 の一例における種々の室及び / 又はサブユニットの模式図である。微小流体カートリッジ 8 1 2 は、サンプル入口 8 2 6 を通じて未処理の臨床サンプル（例えば、GBS の場合輸送緩衝液 (transport buffer) 内に浸漬した膣 / 直腸スワブ）を受け入れることができる。サンプル入口 8 2 6 は、ルアー型注入ポートとするとよい。ヒト及びバクテリアの細胞及びごみを含む臨床スワブ・サンプルは、定期的に 2 ml の輸送緩衝液の中に収集することができる。しかしながら、微小流体デバイス上では、小さい体積（例えば、数マイクロリットル程度）であると、容易に処理することができる。マクロ及びミクロ動作間にインターフェースを組み込むことにより、微小流体技術の臨床診断に適応させることが可能になる。サンプルを注入するとき、カートリッジを装置 8 0 0 内

30

40

50

に配すればよく、更に別の動作、例えば、サンプルの準備、試薬の計測/混合、及びPCR増幅/検出は、自動的に手を使わずに行うことができる。

【0315】

図43は、微小流体カートリッジ812の一例において実行することができるPCR及び検出に係るステップの模式図である。種々の実施形態では、PCRに基づく病原菌(例えば、膣/直腸スワブからのGBS)の検出及び診断のためにサンプルを処理するステップは、DNAを放出するための溶解(例えば、ポリヌクレオチドを放出するためのGBSの溶解)、DNAの捕獲及び濃縮、並びにPCR互換性のためにDNAを浄化するためのインヒビタ及びコンペティタ(competitor)の最小化を含むとよい。臨床サンプルの中にインヒビタがあると、サンプルの浄化によってそれらの影響を軽減することができなければ、PCRに基づく診断検査に対して誤った陰性結果を生ずる危険性が高まる可能性がある。

10

【0316】

細胞の溶解は、当技術分野では周知の方法、例えば、熱及び/又は化学的活性化によって行うことができる。実施形態によっては、1.0+/-0.2mLのサンプルをサンプル入口826を通じてリーシス・リザーバ830に注入することができた後に、装置800は、サンプルを湿性試薬貯蔵部838からの溶解試薬と混合させ、リーシス・リザーバ830において加熱させることができる(例えば、7分間)。このプロトコルを用いると、90%よりも高い溶解効率が、GBS及びその他のバクテリア細胞に達成されている。また、溶解試薬は、カチオニック・ポリアミド改質ポリヌクレオチド-ポリスチレン・ラテックス・ビーズ系DNA親和性マトリクス(例えば、保持部材821)も組み込み、溶解プロセスの間に放出されることもある、負に荷電されたDNAを捕獲することもできる。親和性ビーズは、非常に高い親和性で、負に荷電されたDNAに結合することができ、一方潜在的なPCRインヒビタは、結合できなくなるか、又は後続の洗浄ステップの間に除去することができる。

20

【0317】

実施形態の一例では、装置800は、「PCR対応」DNAを発生するために、生のサンプル・ライセート(例えば、GBSサンプル・ライセート)からのDNAの捕獲及び洗浄を自動化することもできる。リーシス・リザーバ830の内容物(例えば、1.0+/-0.2mLのサンプル及び試薬)をDNA処理室840に転送することができる。入力サンプルからのDNAが結合した親和性ビーズを、直列ビーズ・コラム(in-line bead column)(例えば、特定の孔の大きさを有するフィルタ)を用いて取り込むことができ、カートリッジ上のポンプを用いて親和性ビーズを洗浄し、緩衝液の交換を行うことにより、特定の結合されていない半分(moiety)及び溶解可能なインヒビタを除去することができる。結合したDNAは、既知の方法で、例えば、親和性ビーズを加熱する(例えば80まで)ことにより、及び/又は放出緩衝液を用いることによって、放出することができる。この単一ステップの放出で、非常に小さい体積(3~4µl)において無傷のDNAを復元することができ、これによって、元の目標DNAのかなりの濃縮を達成することができる。当技術分野では既知のその他の方法も、細胞溶解並びにDNA捕獲、洗浄、及び放出を遂行するために、本システムによって用いることができる。

30

40

【0318】

ここに記載している実施例では、用いられるリアル・タイムPCR分析の基礎は、TaqMan(商標)分析であり、図44に模式的に動作を示す。しかしながら、当技術分野には既知の別の分析技法を用いてもよい(例えば、SYBR-緑I蛍光)。TaqMan(商標)PCR反応は、ある種のDNAポリメラーゼの5'ヌクラーゼ活動(nuclease activity)を利用して、PCRの間にTaqMan(商標)プローブを割る。TaqMan(商標)プローブは、当該プローブの5'-端部にリポータ染料を、そして当該プローブの3'-端部に消光染料を含有する。反応の間、プローブの劈開(cleavage)がリポータ染料及び消光染料を分離することができ、その結果リポータの蛍光を増大させることができる。PCR生成物の蓄積は、リポータ染料の蛍光の増加を監視することによって、直接検出することができる。プ

50

ローブが無傷の場合、レポータ染料が消光染料に近接すると、リポータが抑制される結果が得られる（蛍光放出は、フェルスタ型エネルギー転移によって生ずることができる）。PCRの間、対象のターゲットが存在することができれば、プローブは順及び逆プライマ部位(forward and reverse primer site)間でアニールすることができる。プローブがターゲットに混成する場合、DNAポリメラーゼは、通例、プローブをリポータと消光剤との間で裂くことができる。次いで、プローブの断片をターゲットから変位させることができ、ストランド(strand)のポリマ化は継続することができる。プローブの3' - 端部を遮断して、PCRの間プローブの拡張を防止することができる。

【0319】

このプロセスは、通例、例えば熱サイクル毎に行うことができ、生成物の指数的蓄積と干渉してはならない。蛍光信号の増大は、通例、ターゲット・シーケンスがプローブに対して相補的になることができ、PCRの間増幅することができれば、検出することができる。TaqMan（商標）分析は、2倍の厳格さを提供することができ（プライマは通例結合し、プローブは通例ターゲット・シーケンスに結合する）、したがって、いずれの非特定の増幅の検出も低減又は解消することができる。

【0320】

GBS（ストレプトコッカス・アガラクティエ）に合わせたリアル・タイムPCRプライマ及びプローブのセットを、臨床サンプルを用いて設計し検査した。PCR試薬は、CAMPF係数(CAMP factor)をエンコードする位置328及び451の間にあるcfb遺伝子の部分に特定の1対の混成プリマを含むことができる(Christie, Atkins and Munch-Petersen、例えば、Boll Ist Sieroter Milan, (1955 Jul.-Aug.); 34(7-8):441-52を参照のこと)。CAMPF係数は、拡散可能な細胞外蛋白質であり、GBSの大多数によって生成される。CAMPF係数をエンコードする遺伝子、即ち、cfb遺伝子(GenBankアクセス番号: X72754)は、GBS分離株(isolate)に存在する可能性があり、GBSのPCRに基づく識別の発現(development)に用いられている(Danbing K., et al., (2000), Clinical Chemistry, 46, 324-331)。更に、一例では、蛍光測定を用いることによってプライマ間で増幅されたシーケンスを認識し、リアル・タイムの検出を可能にするために、特定のTaqMan（商標）型蛍光プローブも設計及び検査されている。

【0321】

DNA浄化プロセスを評価し、実行時における本プライマの性能を監視するために、陽性内部対照プラスミド(positive internal control plasmid)（例えば、図45に示す）を採用することができる。種々の実施形態では、以下のように内部対照プラスミドを組み立てるために特定のGBSプライマを採用した。特定のPCRプライマによって包囲した1片のランダムDNAシーケンスを、オリゴヌクレオチド合成によって発生した。このシーケンスと他のDNAシーケンス、特に、Genbankにおいて入手可能なStrep. agalactiae DNA（ストレプ・アガラクティエDNA）との間におけるいずれの可能な相同も慎重にチェックした。このシーケンスから発生するアンプリコンを認識するように蛍光原TaqMan（商標）型プローブを設計し、GBSターゲット・シーケンスDNA（FAM又は類似品）に用いたものとは異なる蛍光体(Cal Orange 560又は類似品)を、同時二重色蛍光検出に用いた。ある種の実施形態では、GBS特定増幅に重大な悪影響を及ぼすことなく内部対照生成物の増幅を可能にするために、PCR反応に含まれる内部対照プラスミドの量を最適化した。実施例によっては、以前に指定した相互反応性検査リストに含まれる病原体及びGBS DNAから純化したDNAを用いて、内部対照に対するプローブの特定性も検査し、PCRによって最適化した。

【0322】

実施形態の一例では、微小流体体積を用いて迅速な熱サイクルを実行するロバストなシステムを設計し、開発し、微小流体形式で実現した。収容することができる微小流体体積は、約0.01 µlから約10 µlまでの範囲を取り、下限に対する主な制限は、検出感度である。体積の例は、0.5 ~ 4.5 µlの範囲である。更に別の体積例は、2 µlである。図41A及び図41Bは、装置800の出力例（例えば、接触感応LCD846上

10

20

30

40

50

において見られる)の画面撮影を示す。図41Aは、迅速熱サイクルを受けている微小流体PCRモジュールを示し、図41Bは、リアル・タイムPCR分析を示す。このデータは、装置800のユーザに入手可能にすることができ、あるいは隠すこともできる。この場合、GBSカートリッジも、2つのPCR室を収容するように設計されており、基板上の陰性対照を組み込み、結果の忠実度を改善するために、サンプルを流出させることを考慮している。実施例によっては、化学薬品を最適化し、互換性のある検出システムを開発して、二色多重PCRを可能にすることによって、サンプル準備の効率及び関連する計装の適正な性能をチェックするための内部陽性対照の使用を容易にした。熱質量が非常に小さく、効率的なフィードバック制御に基づくアルゴリズムのために、超高速熱サイクルを実行し、典型的な50サイクルPCRを約20分で完了できるようにすることを可能にする

10

【0323】

種々の実施形態では、PCRを実行するために、いずれの数(例えば、0、1、2、又は全て)の試薬でも、凍結乾燥形式でカートリッジ上に組み込むことができる。使用時に、凍結乾燥PCR試薬を、例えば、脱イオン化水を用いて復元することができる。脱イオン化水は、プリスタ形式で(例えば、自己穿孔可能リザーバ828に)微小流体カートリッジ812上に貯蔵することもできる。復元したPCR試薬は、例えば、2部分に分別することができる。種々の実施形態では、PCR対応DNA(サンプル準備モジュールの出力)を1つの標本に混合し、リアル・タイムPCR(サンプルPCR)のために第1PCRチャンネルに送ることができる。非ターゲットDNAを含有するDI水を、PCR試薬の第2標本と混合することができ、陰性対照としての機能を果たすために、別のPCR室(陰性PCR)に送ることができる。

20

【0324】

実施例4：ポリヌクレオチド処理装置

種々の実施形態において、微小流体システム(例えば、微小流体カートリッジ812)は、液体液滴を移動/混合するための微小ポンプ、熱始動生物化学反応を行うための微小リアクタ、及び液体圧送動作の制御を可能とし、更に熱サイクルの間PCR室のようなカートリッジの領域を分離するための微小弁又は微小ゲートというような構成要素を含むことができる。

30

【0325】

実施形態によっては、液体液滴(liquid drop)取扱システムを用いて、熱的に作動させるポンプ(例えば、熱-空気圧送)に基づく液体サンプルの注入及び運動を生成することができる。熱的に作動させるポンプは、機械的弁を用いずに、電子的に動作させてもよい。例えば、主要チャンネルに接続することができる室の内側に取り込んだ空気を加熱することにより、熱-空気圧送のために大きな空気圧力を発生することができる。空気の温度を上昇させると、室内部の圧力を上昇させて、液滴を放出し(標本を測定する)、それを所望の場所まで移動させるのに十分に高い圧力までに行うことができる。この技法は、カートリッジ上作動メカニズムとして実装することができ、例えば、成型室、チャンネル、及びヒータを用いるとよい。通例、これは機械的移動部品を回避することができ、製作を容易にすることができる。図46は、前述の液滴取扱システムを用いて2つの流体(「A」-青、及び「B」-オレンジ色)の混合を示す実証の写真を示す。圧力ポンプP1及びP2を正確に制御して起動することができ、チャンネルMに沿って交互回転離散液滴として、液体を移動させることができ、チャンネルMにおいてこれらは混合し、最終的に室Cの中に入れることができ、ここでPCRを実施することができる。

40

【0326】

実施形態によっては、気体、容易に気化可能な液体(例えば、1気圧では25及び100の間で気化可能)のような熱膨張材料、及び/又は熱膨張ポリマ(例えば、エクспанセル(Expancel))を熱作動ポンプ(例えば、熱空気式空気室)に導入することもでき

50

、5 p s i よりも大きな差圧を抑制するためのポンプ・サイズを最小に抑えることができる。これらの材料は、閾値温度に達することができるときには、例えば、100%以上に膨張することができ、部分的又は完全に熱空気室を充填し、更に空気の圧縮を生じさせる。

【0327】

例えば、図47A及び図47Bは、相遷移材料(P T M)510(パラフィン・ワックス、はんだ、エクспанセル等のような、融点が分かっているP T M(例えば、60 / 75 / 90))に基づく熱作動ポンプ500を、閉鎖(図47A)及び開放(図47B)構成にした場合を示す。P T M510は、特定の場所に制約することができる。この特定の場所は、P T M510(通例、約50~100 μ l)を積層体上に配した封止室512とすることができる。ポンプを120よりも高い温度に加熱すると、P T M510は非可逆的に膨張し(その本来のサイズの40倍まで)、室512内部の空気を圧縮し、空気を室から変位させ、隣接するゲート514を開放させる。図47C及び図47Dは、ゲート515を動作させるために作動させることができるポンプ501の別の例を、室513内にあるエクспанセル・ポリマ511と共に示す。

10

【0328】

微小流体カートリッジ812に入力する臨床サンプルの一例は、約1ミリリットルの体積を有することができる。細胞の酵素/熱溶解の後、放出されたDNAを親和性マイクロビーズに結合することができる。これらのマイクロビームのサイズは、例えば、10ミクロン程度とすることができる。種々の実施形態では、全量が数百万個の範囲のビーズを、DNA濃縮のために、微小流体カートリッジ812毎に用いることができる。場合によっては、数分(例えば、3分)の内に数平方ミリメートル(孔サイズは8ミクロン)の直列フィルタ区域に対抗してビーズを濃縮するために、10 p s i(例えば、10 p s i, 11 p s i、又は15 p s i)の最小圧力を用いてもよい。この圧力は、例えば、余分な空気(例えば、1~3 mL)を微小流体カートリッジ812のバルク・リーシス・室に注入することによって発生することができる。実施形態によっては、一方向ダックビル弁を、ルアー入口に用いると、空気圧力が入口を通過して逃げるのを最小に抑えるか又は防止することができる。

20

【0329】

計器の使用中に計器のスライダによって試薬プリスタ・ドームを押下することによって、サンプルの準備及びP C R反応に用いることができる試薬を、微小流体ネットワーク内に圧送することができる。

30

【0330】

実施形態例では、細胞溶解、DNA捕獲、及びリアル・タイムP C Rを実行するために通例用いられる酵素をペレットの中に凍結乾燥させ、カートリッジの異なる場所に貯蔵することができる。ペレットを微小流体カートリッジ812の中、例えば、窒素浄化室又は熱ゲートによって微小チャネルのいずれかの端部で封止したチャネル構造に格納することによって、空気の接触を最小に抑えることができる。サンプルの準備、試薬水和、及びP C Rに通例用いられる干渉液は、密閉封止した試薬プリスタ(例えば、自己穿孔可能なりザーバ828)に貯蔵することができる。試薬プリスタを作るために用いられる材料は、高い水分蒸気障壁を有することができる、1年に及びカートリッジの保管の間に液体の逸失を最小に抑えることができる。燐送サンプル及び種々の洗浄緩衝液から生ずる廃棄物は、カートリッジ基板上の室及び微小チャネル(通例、漏れを防止することができる廃棄物リザーバ832)に貯蔵することができる。

40

【0331】

実施例5：リアル・タイムP C Rの態様

高精度のリアル・タイムP C Rに基づく病原体(例えば、出産前の女性におけるグループBストレプトコッカス(G B S)定着)の診断に用いることができる複数のステップを、図48に示すような、単体の微小流体技術に基づく使い捨てカートリッジに統合した。このようなカートリッジにおいて「サンプル入力；結果出力」型動作で実行することがで

50

きるステップの例には、一括溶解(bulk lysis)、DNA捕獲、洗浄、及び放出、並びにPCR準備及び実行が含まれる。このカートリッジの種々の実施形態では、サンプル及び試薬は、微小流体カートリッジ812(図31に示すような)自体に収容することができ、通例、例えば、サンプルをデバイスに注入する行為の間を除いて、手作業での動作との相互作用は不要である。処理の間に形成され取り込まれた空気を除去するために、最大限の効果が得られるように位置付けた疎水ベントを含ませることができ、分析に通例用いられる試薬は、カートリッジ内に凍結乾燥ビーズとして収めることができる。復元に必要な液体は、使用時に放出(release)するプリスタ・パウチに貯蔵することができる。

【0332】

種々の実施形態では、シリンジを収容するためのルアー取付具を有することができるサンプル入口826を通して、サンプル(例えば、GBSサンプル)を導入することができる。サンプルからの生不純物の少なくとも一部を除去するために、プレフィルタ(例えば、シリンジに取り付ける)を用いることができ、実施形態によっては、加熱及び/又は溶解酵素を用いて、サンプル(例えば、1mL)を溶解室において溶解することができる。妨害蛋白質物及び競合RNA分子を除去するために、プロナーゼ、プロティナーゼK、及びRNAaseAのような酵素を(例えば、溶解ステップの間に)用いることができる。図49を参照すると、DNA捕獲ビーズも、マスタ・ミックス(master mix)に含めることができる。溶解液体サンプル(例えば、親和性ビーズに結合したGBS及び/又はその他のDNAを含有する)を、溶解室の出口から微小流体カートリッジに逆流させることができる。実施例によっては、望ましくないごみや過剰な液体を廃棄物室に送ることができる間、DNAを捕獲した親和性ビーズを直列フィルタによって保持することができる。このような実施形態では、用いるビーズは、非磁性体でも磁性体でもよく、フィルタは、粒子をサイズで判別するように選択する。別の実施形態では、ビーズは磁性体であり、磁力線を問題の場所に集中させるように構成した磁場を加えることによって、室又はチャンネルのような、微小流体カートリッジの特定の場所に集中させる。用いる磁石は、サンプル分析の間の指定した時点にオン及びオフに切り換えるようにプロセッサによって制御するような、電磁石とするとよい。あるいは、磁石は、必要なときに適所に入出力させるような、永久磁石としてもよい。

【0333】

実施形態によっては、廃棄物室にシメティコン(simeticone)のような発泡防止剤を装備する。液体は高速で廃棄物室に入り、廃棄物室内にある空気と混合すると発泡するので、廃棄物室では激しい気泡形成が生ずる可能性がある。泡が廃棄物室から溢れ出すと望ましくない。発泡防止剤があれば、この現象を軽減することができる。発泡防止剤は、パウダ、タブレット、ペレット、又は粒子形態で存在することができる。

【0334】

実施形態によっては、ビーズを洗浄して、非結合及び非特定の結合物を除去することができ、浄化したDNAを小容積($\sim 3 \mu\text{l}$)の区分室内に放出し、濃縮する(例えば、約300倍に)ことができる。種々の実施形態では、濃縮したDNAは、次に、しかるべきPCR試薬と混合すること、及び/又はリアル・タイムPCRのためにPCRチャンネルに送ることができる。内部対照プラスミド(その同系プローブと共に)も、第1PCRチャンネルに含めてもよく、陽性対照として作用することができる。第2PCRチャンネル(存在する場合)では、非ターゲットDNAを含有するDI水及び内部対照を、PCR試薬と共に混合し、陰性対照として作用することができる。

【0335】

ユーザは、サンプルを、一括溶解サンプルで、ルアー・ダックビル弁(例えば、サンプル入口826)を通じて導入し、軽く振ってリーシス試薬ペレットを溶解し、余分な量の空気(例えば、0.25~0.75mL)を溶解室に導入し、溶解室を過剰に加圧する。次の式のように、室容積 V_{chamber} を有する溶解室内に発生する絶対圧力(P)は、注入する液体サンプルの量 V_{sample} 、及び注入する余分な空気の量 V_{extraAir} と関係がある。

10

20

30

40

50

$$P = P_{\text{atm}}(V_{\text{chamber}} - V_{\text{sample}}) / (V_{\text{chamber}} + V_{\text{sample}} + V_{\text{extraAir}})$$

【0336】

次いで、微小流体カートリッジ812を装置800の中に入れて、スライダ・モジュール848を閉鎖することができる。閉鎖するとき、スライダ・モジュール848は試薬ブリスタ（例えば、自己穿孔可能リザーバ828）を押圧し、これらを破裂させて試薬（例えば、洗浄緩衝液、放出緩衝液、中和緩衝液、及び水）を、試薬を含むチャンネルに放出させる。

【0337】

種々の実施形態では、装置800は、以下のステップのいずれか又は全てを実行することができる。次に、図50A～図50Jを参照すると、種々のエレメントは、図15A及び図15Bにおける同じ参照番号によって発見することができる。図50Aを参照すると、4つの試薬を保持するチャンネルのいずれかの側にある弁（V3、V4、V5、V7、V12、V13、V15、V16、V23）を閉鎖し、一括溶解ランプを活性化して、一括溶解室を、例えば、60に7分間（例えば、フィードバックのために図50Bにおける温度センサLを用いて）加熱することができる。図50Bを参照すると、ゲートG1を開放して、所定の時間量（例えば、サンプルの種類に応じて2～5分）の間液体（ライセート、DNA親和性ビーズに結合したDNA等を含有する）を、ビーズ捕獲フィルタを通じて、廃棄物室に排出することができる。DNAビーズは、直列フィルタで捕らえることができるが、他の液体は廃棄物室まで流れていく。ゲートG7を開放すると、溶解室内の過剰な液体及びノ又は圧力を、廃棄物室に発散させることができる。弁V1及びV8を閉鎖すると、溶解室及び廃棄物室をそれぞれ閉塞することができる。

【0338】

図50Cを参照すると、実施例によっては、ポンプE1を用いて洗浄緩衝液をビーズ・コラムを通して圧送し、ゲートG2、G3、及びG9を開放して、洗浄緩衝剤を疎水ベントH2の下流側に移すことによって、捕らえたビーズを洗浄するとよい。洗浄緩衝チャンネル（例えば、V2）、及び洗浄緩衝廃棄物（例えば、V9）を分離する弁を閉鎖することができる。

【0339】

図50Dを参照すると、ポンプE2を用いることによって放出緩衝液を圧送し、ゲートG6、G4、及びG8を開放してビーズ・コラムを充填し、放出緩衝液を空気ベントH1の下流に移すことができる。放出緩衝液チャンネル（例えば、V6）及びビーズ・コラムの下流側のチャンネル（例えば、V10）を閉塞する弁を閉鎖し、ビーズを例えば70Cに2分間加熱することができる。これによってDNA親和性ビーズからDNAを放出することができる。

【0340】

図50Eを参照すると、ポンプE3を用いて、放出したDNAを圧送し、ゲートG5及びG10を開放して、疎水ベントH4の下流側に移すことができる。このとき、弁V11及びV14を閉鎖することができる。図50Fを参照すると、ポンプE4を用いゲートG12、G11、及びG13を開放することによって、放出したDNAの一部（合流点G11及びa1の間）、及び中和緩衝液の一部（G11及びa2の間）を混合することができる。a1及びa2間における複合液体プラグ(plug)の混合は、中和混合チャンネルを通してそれを圧送し、疎水ベントH4の下流側に移した後に行うとよい。G11は、ゼロ・デッド・ボリューム・ゲート(zero-dead volume gate)とするとよく、2つの液体プラグの融合中気泡を取り込むことなく、2つの液体チャンネルを互いに接近させる。中和サンプルの端部にある2つの弁（V21及びV22）を閉鎖することができ、ここで図50Gを参照すると、ポンプE5を用いてDI水を圧送し、ゲートG14、G15、及びG17を開放して、PCR-試薬ペレットを溶解する。この液体は、疎水ベントH12を用いて配置することができる。凍結乾燥PCR試薬ペレットの完全な溶解に十分な長い時間期間（例えば、約1分）の後、弁V17を閉鎖することができる。

【0341】

10

20

30

40

50

図50Hを参照すると、ポンプE6を用い、ゲートG16を開放することにより、溶解した酵素を、酵素混合チャンネルを通して圧送することができ、更に疎水ベントH5を用いて、流体の配置をし易くすることができる。種々の実施形態では、混合した酵素を、多数の反応のために、サンプルPCR混合部及び陰性PCR混合部に（例えば、等しい2部分に）分配することができ、そのときに弁V18、V20、及びV19を閉鎖すればよい。

【0342】

種々の実施形態では、図50Iを参照すると、ポンプE7を用いゲートG18、G20、及びG22を開放することによって、中和したDNAの一部（合流点G20及びb1の間）、及び酵素の一部（G20及びb2の間）を混合することができる。a1及びa2間における複合液体プラグの混合は、中和混合チャンネルを通して圧送し、疎水弁H6の下流側に移すことができた後に、行うことができる。ポンプE8を用いゲートG19、G21、及びG23を開放することによって、DI水の一部（合流点G21及びc1の間）及び酵素の一部（G21及びc2の間）を混合することができる。複合液体プラグの混合は、中和混合チャンネルを通して圧送し、疎水弁H7の下流側に移すことができた後に、c1及びc3間において行うことができる。

【0343】

図50Jを参照すると、弁V24、25、26、27は、実施例によっては、サンプルPCR及び陰性対照PCRを実行するために、閉鎖することができる。種々の実施形態では、スライドにおいて光学系を用いて光（例えば、蛍光）を検出することができる。実施例によっては、蛍光データに基づいて、ソフトウェアがサンプル内におけるターゲット（例えば、GBS）の存在を判定することができ、結果を報告することもできる。

【0344】

実施例6：ポリヌクレオチド処理装置

この非限定的な例は、前述の装置、システム、微小流体カートリッジ、キット、方法、及びコンピュータ・プログラム生産物の種々の実施形態例のCAD図を示し、更に説明する。

【0345】

図51は、レバー1210、ギア・ユニット1212、及び動力部材1214を有するレバー・アセンブリ1200の側面図を示す。アセンブリ1200は、装置の蓋を閉鎖するため、そして（動力部材1214によって）受容ベイ1217の中にある微小流体カートリッジ1216に力を加えるために用いることができる。この切欠図には1つの動力部材しか見えないが、いずれの数、例えば、4つでも用いることができる。動力部材は、例えば、図示のような手動ばね装荷アクチュエータ、自動機械式アクチュエータ、十分な機械的伸展性及び剛性を備えた材料（例えば、硬質エラストマ・プラグ）等とすることができる。微小流体カートリッジ1216に力を加えると、少なくとも約0.7psiから約7psi（約5及び約50キロパスカルの間）の圧力が、微小流体カートリッジ1216の表面に生ずる可能性がある。実施形態によっては、約2psi（約14キロパスカル）の場合もある。

【0346】

図52は、微小流体カートリッジ1216が受容ベイ1217に入っている、レバー・アセンブリ1200の側面図を示す。ヒート・ポンプ1219（例えば、図示のようなキセノン・バルブ）が、サンプル入りリザーバ1218に向けた放射熱源として機能することができ、この熱がリザーバ1218において細胞を溶解することができる。熱伝導性で、機械的な伸展性がある層1222を、微小流体カートリッジ1216と熱ステージ(the thermal stage)1224との間の界面に配することができる。通例、微小流体カートリッジ1216及び熱ステージ1224は、それぞれの界面上において平面であり、例えば、約100ミクロン以内、あるいは更に典型的には約25ミクロン以内で平面とすることができる。層1222は、微小流体カートリッジ1216と熱ステージ1224との間における熱結合を改善することができる。光検出エレメント1220は、微小流体カートリッジ1216の上面に向けることができる。

【0347】

図53は、受容ベイ1217の至近図を示す。

図54は、微小流体カートリッジ1216、熱伝導性、機械的伸展性層1222、及び熱ステージ1224間の界面の至近図を示す。

図55は、アセンブリ1200の上面図を示す。機械的部材1214に加えて、案内部材1226も用いることができる。

図56は、図55の至近図を示す。

【0348】

図57から図59は、作動時のレバー1210の一連の画像である。加えて、ギア・アセンブリ1212の中に、カム1228も示すことができ、これは動力部材1214に結合されているプレート1230に、レバー1210が力を加えることを可能にする。

図60及び図61は、自己穿孔可能リザーバ1228と、自己穿孔可能リザーバを作動させる機械的部材1230とを含む微小流体カートリッジ1216の図を示す。

【0349】

図62及び図63は、光検出エレメント1220のエレメントを示し、光源1232（例えば、発光ダイオード）、レンズ1234、光検出器1236（例えば、フォトダイオード）、及びフィルタ1238を含む。フィルタは、例えば、バンドパス・フィルタ、1つ以上の蛍光原プローブの吸収帯に対応する光源におけるフィルタ、及び蛍光原プローブの発光帯に対応する検出器におけるフィルタとすることができる。

【0350】

実施例7：保持部材の準備

濃度が約 10^{11} mL^{-1} のカルボキシル表面磁気ビーズ（改質セラ - マグ磁気カルボキシレート、部品番号#3008050250、Seradyn）を、pH 6.1の500 mMの2 - (N - モルフォリニオ) - エタンスルホン酸（MES：2-(N-Morpholinio)-ethanesulfonic acid）緩衝溶液において、N - ヒドロキシルサクシニミド（NHS：N-hydroxylsuccinimide）及び1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDAC）を用いて30分活性化した。活性化したビーズを、3,000 Da又は300,000 Da平均分子量のポリ - L - リシン（PLL）によって培養した。未結合PLLを除去するための2回の洗浄の後、ビーズは使用する準備ができた。

【0351】

実施例8：微小流体カートリッジ

図64及び図65を参照すると、ポリヌクレオチドのインヒビタからの分離を実証するために微小流体カートリッジ300を製作した。カートリッジ300は、第1及び第2基板部302'、304'を備えており、これらは、それぞれ、第1及び第2層302a'、302b'及び304a'、304b'を備えている。第1及び第2層302a'、302b'は、入口310'及び出口312'を備えているチャンネル306'を規定する。第1及び第2層304a'、304b'は、入口314'及び出口316'を備えているチャンネル308'を規定する。接着剤324'を用いて、第1及び第2基板部302'、304'を詰め合わせて、出口312'が入口314'と連通し、それらの間にフィルタ318'を位置付けるようにする。出口312'の一部に、先に準備した活性化ビーズを充填にて、保持部材（ビーズ）を備えた処理領域320'を設ける。接着剤326'によって固着したピペット322'（図66）によって、サンプルを導入し易くした。

【0352】

使用中、入口310'を通過して導入したサンプルは、チャンネルに沿って進み処理領域320'を通過した。過剰なサンプル材料は、チャンネル308'に沿って通過し、出口316'を通過してデバイス300'から排出した。ポリヌクレオチドは、インヒビタと比較して、優先的にビーズによって保持された。一旦サンプルを導入したなら、追加の液体、例えば、洗浄液及び/又は保持したポリヌクレオチドを放出する際に用いる液体を、入口326'を通じて導入した。

【0353】

10

20

30

40

50

実施例 9 : DNA の保持

約 1000 個のビーズを含む約 1 μ L の容積を有する処理領域を備えている各デバイスを準備することによって、デバイス 300 のポリ-L-リシン改質ビーズによるポリヌクレオチドの保持を実証した。約 15,000 及び 30,000 Da の間のポリ-L-リシンでビーズを改質した。各処理領域に、ニシン精子 DNA (濃度が約 20 mg/mL のサンプル 20 μ L) で充填することによって、ビーズ及び液体を接触させた。10 分間液体及びビーズが接触した後、液体を各処理領域から除去し、定量的リアル・タイム PCR を実行して、液体内にあるニシン精子 DNA の量を判定した。

【0354】

2 種類の制御を実施した。第 1 に、別の同一処理領域に、非改質ビーズ、即ち、活性化及びポリ-L-リシン培養ステップを除いてポリ-L-リシン・ビーズと同一のビーズを充填した。ニシン精子 DNA を含む液体をこれらのビーズと接触させ、10 分間定在させ、除去し、定量的リアル・タイム PCR にかけた。第 2 に、ニシン精子 DNA を含む液体 (「未処理の液体」) を定量的リアル・タイム PCR にかけた。

【0355】

図 66 を参照すると、第 1 及び第 2 制御は、本質的に同一の応答を呈し、非改質ビーズと接触させた液体及び未処理の液体においてニシン精子 DNA の存在を示した。3,000 個のポリ-L-リシン・ビーズと接触した液体の方が低い応答を呈し、改質ビーズがニシン精子 DNA の実質的に全てを保持していたことを示す。300,000 Da のポリ-L-リシン・ビーズと接触した液体の PCR 応答は、3,000 Da のビーズよりも少なくとも約 50% 大きい増幅応答を呈し、分子重量が小さい程、表面を改質すると、ニシン精子 DNA を保持する効率が高いことを示した。

【0356】

実施例 10 : ポリ-L-リシン改質ビーズからの DNA の放出

処理領域を有するデバイスに、3,000 Da のポリ-L-リシン改質ビーズを充填した。グループ B ストレプトコッカ (GBS) から得たポリヌクレオチドを含む液体をビーズと接触させ、ニシン精子 DNA について上述したように、10 分間培養した。この液体は、10 μ L の 20 mM トリス pH 8、1 mM の EDTA、1% トリトン X-100 緩衝液において、10,000 の GBS バクテリアを 97 の熱溶解に 3 分間かけることによって得た。

【0357】

10 分後、処理領域に約 10 μ L の洗浄溶液 (1% トリトン X 100 を含む pH 8.0 のトリス-EDTA) を流すことによって、ビーズと接触した液体を除去した。その後、約 1 μ L の 5 mM NaOH 溶液を処理領域に追加した。このプロセスによって、処理領域には、ビーズと接触した NaOH 溶液が充填した。ビーズと接触する溶液を 95 に加熱した。95 の加熱の 5 分後、処理領域の空隙容積の 3 倍に等しい体積の溶液によって処理領域を溶離することによって、ビーズと接触する溶液を除去した。

【0358】

図 67 を参照すると、溶液の標本 5 つに対して、定量的リアル・タイム PCR 増幅を行った。標本 E1、E2、及び E3 は、各々、約 1 μ L の液体を含有した。標本 L は、処理領域を通過した元のサンプルの液体に対応する。標本 W は、加熱しない洗浄溶液から得た液体であった。標本 E1 は、チャンネル 308 の容積にほぼ等しい、デバイス 300 の死空間に対応する。つまり、標本 E1 の液体は、チャンネル 308 の中にあり、加熱中ビーズと接触しなかった。この液体は、加熱前に処理領域を通過した。標本 E2 は、処理領域の中にあり、加熱中ビーズと接触した液体を含む。標本 E3 は、処理領域から標本 E2 を除去するために用いた液体を含む。

【0359】

図 67 に見られるように、初期サンプルにあった GBS DNA の 65% 超が、ビーズによって保持され、これらから放出された (標本 E2)。また、標本 E2 は、ビーズによって保持されていた DNA の 80% 超の放出を実証した。GBS DNA の約 18% 未満

10

20

30

40

50

が、捕獲されずに、処理領域を通過した。加熱しない洗浄溶液は、5%未満のGBS DNAを含んでいた(標本W)。

【0360】

実施例11：ポリヌクレオチド及びインヒビタの分離

頬の裏層からの口腔細胞は、ヒトの遺伝子材料(DNA)源を提供し、単独ヌクレオチド多形性(SNP: single nucleotide polymorphism)検出に用いることができる。口腔細胞を含むサンプルに対して、熱溶解を行い、細胞内部からDNAを放出させた。デバイス300を用いて、前述のような随伴するインヒビタからDNAを分離した。図67の標本E2に対応する洗浄済みサンプルに対して、ポリメラーゼ連鎖反応を行った。熱溶解から得られた対照(control)又は生サンプルも増幅した。

10

【0361】

図68を参照すると、洗浄したサンプルは、対照サンプルよりも少ないサイクルでかなり高いPCR応答を呈した。例えば、洗浄サンプルは、32サイクル以内で20の応答を超過したが、一方対象サンプルは同じ応答を得るには約45サイクルを要した。

【0362】

血液は、感染症因子、癌マーカー、及びその他の遺伝子マーカーの検出を含む種々の診断検査において、サンプル・マトリクスとして作用する。血液サンプルの中にあるヘモグロビンは、PCRの強力なインヒビタであり、文書に記載されている。2つの5ml血液サンプルを、20mMのpH8のトリス、1mMのEDTA、1%SDS緩衝液において溶解し、それぞれのデバイス300に導入した。デバイス300は、前述のように動作して、2つの洗浄サンプルを準備した。第3の5ml血液サンプルを溶解し、Gentra Systems社、MNの市販のDNA抽出方法Puregeneを用いて準備した。それぞれの洗浄済みサンプル、及び市販の抽出方法を実施したサンプルを、対立遺伝子判別分析(CYP2D6*4試薬、Applied Biosystems社、CA)に用いた。各サンプルは、約1mlの血液に対応する量のDNAを含有した。

20

【0363】

図69を参照すると、洗浄済みで市販の方法で抽出したサンプルは、同様のPCR応答を呈し、デバイス300の処理領域は効率的にインヒビタを血液サンプルから除去したことを実証した。

【0364】

実施例12：耐プロテアーゼ保持部材

更なる処理のためのポリヌクレオチド・サンプルの準備には、多くの場合、サンプルに対してプロテアーゼ処置を施すことがふくまれ、その場合、プロテアーゼがサンプル内の蛋白質のペプチド結合を裂いてしまう。プロテアーゼの一例に、生体内及び生体外プロテアーゼの混合物である、プロナーゼがある。プロナーゼは、殆どのペプチド結合を裂いてしまう。ポリ-L-リシンのような、ある種の受容体は、プロナーゼ及びその他のプロテアーゼによる破壊を受けやすい可能性がある。つまり、結合する受容体がプロテアーゼの影響を受けやすい場合、サンプルは、一般に、保持部材が存在する状態でプロテアーゼ処置を受けない。

30

【0365】

ポリ-D-リシン、ポリ-L-リシンの右旋性エナンチオ異性体は、プロナーゼ及びその他のプロテアーゼによる劈開に対して抵抗力がある。プロテアーゼ処置を受ける場合における結合ポリ-D-リシンを含む保持部材のDNAを保持する能力について、研究した。

40

【0366】

8つのサンプルを準備した。4つのサンプルから成る第1グループは、10µlの緩衝液の中に1000GBSの細胞を含有した。4つのサンプルから成る第2グループは、10µl緩衝液の中に100GBSの細胞を含有した。8つのサンプルの各々を97で3分間加熱して、GBS細胞を溶解した。加熱したサンプルから、4つのサンプル集合を作成した。各サンプル集合は、第1及び第2グループの各々から1つのサンプルを含んだ。各サンプル集合のサンプルを以下のように処置した。

【0367】

50

図70Aを参照すると、サンプル集合1のサンプルに対してプロナーゼ培養を行い、それぞれの蛋白質劈開サンプルを準備し、次いでこれらを加熱してプロテアーゼを不活性化した。蛋白質劈開、加熱サンプルをそれぞれの保持部材と接触させた。保持部材は、各々、ポリ-L-リシン改質ビーズの集合体を備えている。5分後、それぞれのビーズ集合体を、5マイクロリットルの5mM NaOH溶液で洗浄して、インヒビタ及び蛋白質劈開の生成物を結合DNAから分離した。それぞれのビーズ集合体を、各々、NaOH溶液の第2標本と接触させ、80℃まで2分間加熱して、DNAを放出した。DNAが放出された溶液を、等しい体積の緩衝液で中和した。中和した溶液を分析して、DNA復元の効率を判定した。結果を平均化し、図70Bに示す。

【0368】

10

サンプル集合2のサンプルに対して、プロナーゼ培養を行い、それぞれの蛋白質劈開サンプルを準備し、次いでこれらを加熱してプロテアーゼを不活性化した。蛋白質劈開、加熱サンプルを、それぞれの保持部材と接触させた。保持部材は、各々、ポリ-D-リシン改質ビーズの集合体を備えている。5分後、それぞれのビーズ集合体を、5マイクロリットルの5mM NaOH溶液で洗浄して、インヒビタ及び蛋白質劈開の生成物を結合DNAから分離した。それぞれのビーズ集合体を、各々、NaOH溶液の第2標本と接触させ、80℃まで2分間加熱して、DNAを放出した。DNAが放出された溶液を、等しい体積の緩衝液で中和した。中和した溶液を分析して、DNA復元の効率を判定した。結果を平均化し、図70Bに示す。

【0369】

20

サンプル集合3のサンプルに対して、プロナーゼ培養を行い、それぞれの蛋白質劈開サンプルを準備した。プロテアーゼは、熱的にも化学的にも不活性化しなかった。蛋白質劈開サンプルを、それぞれの保持部材と接触させた。保持部材は、各々、ポリ-L-リシン改質ビーズの集合体を備えている。5分後、それぞれのビーズ集合体を、5マイクロリットルの5mM NaOH溶液で洗浄して、インヒビタ及び蛋白質劈開の生成物を結合DNAから分離した。それぞれのビーズ集合体を、各々、NaOH溶液の第2標本と接触させ、80℃まで2分間加熱して、DNAを放出した。ポリヌクレオチドが放出された溶液を、各々、等しい体積の緩衝液で中和した。中和した溶液を分析して、DNA復元の効率を判定した。結果を平均化し、図70Bに示す。

【0370】

30

サンプル集合4のサンプルに対して、プロナーゼ培養を行い、それぞれの蛋白質劈開サンプルを準備した。プロテアーゼは、熱的にも化学的にも不活性化しなかった。蛋白質劈開サンプルを、それぞれの保持部材と接触させた。保持部材は、各々、ポリ-D-リシン改質ビーズの集合体を備えている。5分後、それぞれのビーズ集合体を、5マイクロリットルの5mM NaOH溶液で洗浄して、インヒビタ及び蛋白質劈開の生成物を結合DNAから分離した。それぞれのビーズ集合体を、各々、NaOH溶液の第2標本と接触させ、80℃まで2分間加熱して、DNAを放出した。ポリヌクレオチドが放出された溶液を、各々、等しい体積の緩衝液で中和した。中和した溶液を分析して、DNA復元の効率を判定した。結果を平均化し、図70Bに示す。

【0371】

40

図70Bに見られるように、サンプル集合4を用いると、平均してGBS細胞からのDNAの80%超が復元されており、これらのサンプルは、ポリ-D-リシン改質ビーズと接触し、プロテアーゼ不活性化を行わなかったビーズが存在する状態で、プロナーゼ培養が行われた。サンプル集合4の復元効率は、他のサンプルのいずれに対しても、2倍よりも高くなる可能性がある。具体的には、サンプル集合1、2、3、及び4の復元効率は、それぞれ、29%、32%、14%、及び81.5%であった。これらの効率は、DNAを保持する保持部材が存在する状態においてプロテアーゼ培養を行ったサンプルについて、高い復元効率を得ることができることを実証している。

【0372】

実施例13：ポリヌクレオチド処理装置の操作者取扱書

50

この非限定的な実施例では、操作者の取扱書の形態で、特に、グループBストレプトコッカス（GBS）のような、微小有機体の定量的検出のための微小流体PCR分析を含む単体カートリッジ・システムを対象とする、特許請求する装置、微小流体カートリッジ、キット、方法、及びコンピュータ・プログラム生産物の種々の実施形態について説明する。GBS分析に関する更に詳しい説明は、実施例14において呈示する。

【0373】

以下のサンプル準備キットを含むことが好ましい。

- 緩衝液及び防腐剤を含有するサンプル小瓶
- 患者自身が収集するための指示書が付属する収集スワブ
- 多数の（例えば、25個）フィルタ付きシリンジ
- 緩衝液を収容した小瓶
- 収集小瓶用患者IDラベル
- 3ccシリンジ
- この中で更に説明する微小流体カートリッジ

10

【0374】

以下の外部制御サンプル・キットを備えることが好ましい。

- 例えば、脱水形態のGBSバクテリアの検出サンプルの限度を含有する陽性対照スワブ被検物
- 小瓶上に陽性識別がある緩衝液を含有する小瓶
- 小瓶上に陰性識別がある緩衝液を含有する小瓶
- シリンジ

20

【0375】

機器：

バーコード・リーダを備えたシステムに、例えば、115V又は220Vの電源コードを差し込む。双方については、ここで更に説明する。

追加の任意選択機器

- USB接続を有するプリンタ
- 病院ネットワーク接続

【0376】

使用例及び使用の指示

この実施例における説明は、GBSの存在を調べるためのサンプル検査に適しており、その更に詳しい説明は、実施例14において提示する。

検査アプリケーションの説明

この中で更に説明するように、種々の病原体や微小有機体を検査するために、本装置及び材料を用いることができる。一例は、実施例14において更に説明するが、GBSを検査することである。検査は、実験室の手順にはさほど訓練されていない臨床家によって、患者の近くに設定して行うことができる。GBS検査のために継続して品質保証を行うためにシステムのユーザ・インターフェースにQCルーチンを組み込むことができる。また、検査を依頼した外科医が要求する時間枠以内にサンプル検査が行われるのであれば、検査は中央病院の「stat」実験室で行うこともできる。

40

【0377】

警告及び注意の例

GBSに特定のなその他の警告及び注意を実施例14に呈示する。

- ・実施形態によっては、患者を現在抗生物質で処置している場合、検査は病状の信頼できる指標とはならない場合がある。
- ・通例、使用期限が切れたカートリッジ/サンプル・キットの使用を避ける。
- ・通例、以前に開封したカートリッジの使用を避ける。空気及び水分に晒すと、試薬が劣化する可能性がある。サンプルを注入する準備ができる後まで、カートリッジを開封するのを回避する。
- ・通例、サンプルの準備には新しいシリンジ材料を用いる。

50

・通例、検査キットの中に用意されているスワブ及び緩衝液を用いる。実施形態によっては、他のブランドの収集スワブでは、検査性能を損なう場合もある。

・被検物を保管しなければならない場合、4 で24時間までの期間の冷蔵が指示されるのが通例である。

・通例、本システム及び被検物の成分を取り扱う間、保護服及び使い捨て手袋を用いる。

・通例、無菌技法を用いる。検査被検物又は検査材料の汚染を回避するために、新しい使い捨て手袋を用いることは、特に重要となる可能性がある。

・通例、サンプルを高圧で注入することを避ける。緩やかな注入が好ましい。

・通例、潜在的な感染被検物に対する安全病院手順にしたがって、統一予防策を用いて被検物を取り扱う。

・通例、システムを洗浄するときには、推奨された洗浄剤を用いる。

・通例、溢流が起きた場合、いずれの洗浄薬品で検査カートリッジを洗浄することも回避する。必要であれば、液体を除去するためには乾燥した実験室用ティッシュを用いる。

【0378】

【表1】

典型的な保管及び安定性条件

製品の説明	保管/使用条件	安定性	輸送条件
システム	5~35℃、 動作範囲	NA	-10~65℃
BGSサンプル採取キット	4~40℃、 凍結させない	有効期限	温度>4℃
緩衝液における患者又はQC被検物(湿性)	@15~30℃	8時間	
緩衝液における患者の被検物又はQC(湿性)	@4℃	24時間	
コンテナにおける患者の被検物(乾燥)	@15~30℃	24時間	
コンテナにおける患者の被検物(乾燥)	@4℃		
GBS携帯用アイスボックス-未開封	4~30℃、 凍結させない	有効期限	温度>4℃
GBSカートリッジ-未開封	使用禁止	最大60分	
GBS制御キット	15~30℃	有効期限	保護TBD

【0379】

被検物収集の一例

注意：スワブのDacron(商標)端部に指で触るのを避ける。

容器からスワブを取り出す。

過剰な腔分泌物を拭い去る。

スワブを2cm腔(腔)に挿入する。

同じスワブを1cm肛門(直腸)に挿入する。

乾燥させて保管する場合、スワブを輸送用パッケージに入れる。

【0380】

被検物準備の一例

検査材料及び被検物を取り扱うときは、無菌技法を用いる。

サンプル緩衝液が期限切れでないことを確認する。

1ccの緩衝液を収容する小瓶の中にスワブを20回勢い良く浸す。

スワブを取り出して破棄する。

臨床標準手順で要求されている場合、患者ID及び収集時刻を小瓶に記す。

注意：使用する準備ができるまで、カートリッジのパッケージを開封するのを避ける。
内蔵試薬は、光及び水分に感応する可能性がある。

【0381】

システム動作命令の一例

- ・システム・レディ画面を示すとよい。
- ・スクリーン・セーバを停止させるために、画面に触る。
- ・ハンドルを上げ、システムの蓋を開いて、開始する。
- ・一旦蓋を完全に開いて、「開放」インディケータがある場合、これがオンになると、システムの自己検査を開始することができる。
- ・以前の検査から残留しているいずれかの使用済みカートリッジがないか、システムを調べる。

10

- ・ユーザID及びパスワードを用いて、ログインする。
- ・サンプル収集小瓶のバーコードを走査する。
- ・検査カートリッジを開く。カートリッジ・バーコードを走査する。
- ・材料が期限切れの場合、及び/又は被検物小瓶及び検査材料が相応に一致しない場合、システムはエラー・メッセージを出すとよい。
- ・患者情報により、サンプルIDを確認する。
- ・必要であれば、患者ID及びその他の病院識別情報を入力する。

サンプルをカートリッジに転送する命令の一例

20

- ・新品の1対の手袋を着用する。
- ・サンプル小瓶をカウンタ上に置く。
- ・先端をシリンジに取り付ける。サンプル全体をシリンジに引き込む。加えて、2ccの空気をシリンジに引き込む。
- ・先端を取り外し、フィルタを取り付ける。
- ・シリンジを用いて、1ccのサンプル及び追加の2ccの空気をカートリッジに注入する。

・注意：サンプルからの跳ね返りを回避するために、サンプルに注入する際には弱い圧力を用いる。

- ・検査実行指示の一例は、次の通りである。
- ・ベレットが溶解するまで、カートリッジを前後にゆっくりと揺する。
- ・カートリッジをシステム上に置く。
- ・システムのカバーを閉じる。
- ・（検査は自動的に開始することができる。）
- ・結果。
- ・検査が完了したとき、表示又は印刷のために結果を利用可能とするとよい。
- ・材料の廃棄。使用したカートリッジ及び収集キットは、生物学的有害物質として取り扱うことができる。

30

【0382】

出荷のための材料の準備

40

通例、国際規格に記載されているように、カートリッジは生物学的有害物質保護材の中に包装しなければならない。

【0383】

システム洗浄手順の一例

10%漂白剤(0.5%次亜塩素酸ナトリウム)の溶液、続いて洗浄水濯ぎ洗いをを用いて、消毒し、潜在的なDNA汚染を低減することができる。

DNA汚染は、通例、漂白剤又はDNA汚染を解消するのに適した材料で洗浄することによって、遂行することができる。Chemicon(商標)核酸リムーバも、通常の消毒剤での洗浄の後に用いることができる。

通例、アルコール又は通常の衛生布では、計器のDNA汚染は低減しない。

50

【 0 3 8 4 】

試薬ロット検証の一例

目的 - カートリッジ及びサンプル・キット・ロットの評価、並びにシステム性能全体の検証。

推奨：カートリッジ又はサンプル・キットの新しいロットを受け取ったとき、品質管理を実施して、例えば、試薬セットが（１）外部対照(external control)及び（１）陰性外部対照を含むか否か確認することができる。

【 0 3 8 5 】

品質管理ルーチンの一例

外部陽性対照は、被検物準備ステップの感度及び分析を監視し較正する役割を果たし、偽りの陰性結果の危険性を最小限に抑えるために用いることができる。検査が失敗した場合、そのカートリッジ群からの結果を無効にすればよく、供給業者に報告すべきである。

目的 - サンプル取扱技法の評価を含むシステム性能全体の検証。検査は、ユーザが選択し予め設定した間隔で行うことができる。

推奨：検査を行うとき、（１）陽性外部対照及び（１）陰性外部対照を含むQCセットを実施し、QC検査で予期した結果が得られなかった場合、製造業者に連絡する。

【 0 3 8 6 】

品質管理ルーチン指令の例

- ・品質管理画面に移る。
- ・ユーザIDを入力する。
- ・画面上で指令される通りに、QC技法検証、新試薬ロット、規則的なQC実行サンプルを選択する。

【 0 3 8 7 】

システムの自己検査

本システムは、電源を投入するときに、システム起動検査を実行することができる。各患者検査サンプル又はQCサンプルの開始ルーチンとして、システムは、自己検査を実行して、例えば、電子回路、光学系、ヒータ及び温度センサが、意図したように機能しているか否か判断することができる。

【 0 3 8 8 】

内部対照の例（カートリッジ上）

分析に用いることができる試薬をカートリッジ上を含めれば、ユーザの取扱誤りや汚染の潜在的可能性を低減することができる。各微小流体カートリッジの中に、２種類のカートリッジ上陽性及び陰性対照方策(strategy)を組み込んで、個々のPCR分析性能を監視することができる。以下に２つの例を示す。

【 0 3 8 9 】

１）陽性内部対照プラスミド（ICP）：内部対照プラスミドは、PCR分析試薬の完全性に対する対照を規定し、被検物の中にPCR妨害物質があることの指標となることができる。即ち、これは偽りの陰性結果に対する対照となることができる。熱サイクルの間、この領域を増幅すると、双方のPCRレーンに別個の蛍光原信号が発生する場合がある。陽性サンプルがない状態で、内部対照シーケンスを増幅し損ねることは、試薬混合の失敗、又は被検物におけるPCRインヒビタの存在の指示となることができる。これは、計器上のエラー・コードによって示されるように、検査結果を無効にすることができる。「IND」を表示して、中間結果を報告することができる。

【 0 3 9 0 】

２）陰性内部対照PCRレーン：サンプルが全くない同じ混合からの試薬を用いて第２PCRを実施するために、並列レーンを用いることができる。これは、試薬の汚染による偽りの陽性結果に対する対照を規定することができる。陰性対象レーンにおける失敗結果は、結果を無効化することができ、計器上のエラー・コードによって示すことができる。「IND」を表示して、中間結果を報告することができる。

【 0 3 9 1 】

G B S DNA 検出のためのリアル・タイム P C R の一例

種々の実施形態では、検査は、臨床サンプルから復元した G B S の c f b 遺伝子シーケンスの増幅、及び増幅した D N A の検出のための蛍光原ターゲット特定混成化に、リアル・タイム・ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いることができる。c f b 遺伝子は、C A M P 係数、即ち、典型的に G B S 隔離集団に存在する拡散可能な細胞外蛋白質をエンコードする。グループ B ストレプトコッカス (G B S) 検出検査を一体化し、原料 - サンプル - 結果型の核酸増幅分析とすることができる。TaqMan 蛍光原プローブを用いて、P C R アンプリコンを検出することもできる。分析に用いられる試薬は、カートリッジに含ませると、ユーザの取扱謝りや汚染の潜在的可能性を低減することができる。

【 0 3 9 2 】

10

潜在的な注意の例

実施形態によっては、膣及び / 又は直腸被検物以外の被検物における、G B S DNA のようなターゲットを特定する適格性がない場合がある。尿及び血液の被検物は適していない場合がある。

実施形態によっては、抗生物質の処置を受けている患者は、この診断検査又はその他の診断検査では正しい診断を得ることができない場合がある。

実施形態によっては、微生物学者によるバクテリアの直接的な識別に適した G B S 培養が、本検査から得られない場合もある。実施形態によっては、ペニシリン・アレルギーのヒトに対する処置を推奨するために必要な罹患性結果が、本検査からは得られない場合がある。

20

【 0 3 9 3 】

潜在的な妨害物質の例

実施形態によっては、尿及び膣分泌物が大量に存在すると、検査を妨害する可能性がある。

通例、サンプルの血液、胎便、羊水汚染のような汚染物が検査を妨害する可能性はない。

通例、抗生物質以外の薬剤の妨害 (膣及び直腸分泌物に存在するような) は、この時点では、P C R を妨害することは知られていない。

【 0 3 9 4 】

性能特性及び解釈の例

30

図 7 1 のフロー・チャートは、結果を解釈するために計器における判断アルゴリズムが用いることができる判断基準集合の一例である。P C R 反応 (サンプル及び対照) は、問題のターゲットに対して、陽性又は陰性と解釈することができる。サンプルが決定的に陽性又は陰性が、あるいは不確定か判断するために、論理アルゴリズムを用いることができる。

【 0 3 9 5 】

相互反応物質の例

以下の有機体から分離したゲノム D N A を用いて、リアル・タイム P C R (Taqman 分析) によって、プライマ及びプローブの特定性を検査することができる。9 つの G B S セロタイプ (セロタイプ 1 a 、 1 b 、 1 c 、 I I 、 I I I 、 I V 、 V 、 V I 及び V I I 、 American Type Culture Collection and National Center for Streptococcus, Canada) 、 1 0 個の臨床 G B S 隔離集団、6 0 個の臨床サンプル、多種多様のグラム - 陽性及びグラム - 陰性バクテリア菌種、並びに 2 つのイースト菌種及び R S V タイプ 1 及び 2 。

40

【 0 3 9 6 】

微小有機体の例

病原体	タイプ
シュードモナ・アエルジノサ (Pseudomonas aeruginosa)	グラム - バクテリア
プロテウス・ミラビリス (Proteus mirabilis)	グラム - バクテリア
キープシエラ・オキシトカ (Kiebsiella oxytoca)	グラム - バクテリア
キープシエラ・ニューモニエ (Kiebsiella pneumoniae)	グラム - バクテリア

50

エシェリチア・コット(<i>Escherichia cot</i>) (臨床的隔離集団 1)	グラム - バクテリア	
エシェリチア・コリ(<i>Escherichia coli</i>) (臨床的隔離集団 2)	グラム - バクテリア	
アシネトバクテル・バウマンド(<i>Acinetobacter Baumann</i>)	グラム - バクテリア	
セラ・マルセセンス(<i>Serra. marcescens</i>)	グラム - バクテリア	
エンテバクタ・アエルジェネス(<i>Entembacter aerugenes</i>)	グラム + バクテリア	
エンテロコッカス・マックリーニ(<i>Enterococcus Maclean</i>)	グラム - バクテリア	
スタフィロコッカス・アウレウス(<i>Staphylococcus aureus</i>) (臨床的隔離集団 1)	グラム - バクテリア	
スタフィロコッカス・アウレウス(<i>Staphylococcus aureus</i>) (臨床的隔離集団 2)	グラム - バクテリア	10
ストレプトコッカス・ピオジーンズ(<i>Streptococcus pyogenes</i>)	グラム - バクテリア	
ストレプトコッカス・ヴィリダンス(<i>Streptococcus viridans</i>)	グラム - バクテリア	
リステナ・モノシトジェネス(<i>Listena monocytogenes</i>)	グラム - バクテリア	
エンテロコッカス s p s . (<i>Enterococcus sp.</i>)	グラム - バクテリア	
センディダ・グラブラタ(<i>Cendida glabrata</i>)	イースト	
カンディダ・アルビカンス(<i>Candida albicans</i>)	イースト	
ストレプトコッカス・グループ C (<i>Streptococcus Group C</i>)	グラム + バクテリア	
ストレプトコッカス・グループ G (<i>Streptococcus Group G</i>)	グラム + バクテリア	
ストレプトコッカス・グループ F (<i>Streptococcus Group F</i>)	グラム + バクテリア	
エンテロコッカス・フィーカリス(<i>Enterococcus Feecalis</i>)	グラム + バクテリア	20
ストレプトコッカス・ニューモニエ(<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	グラム + バクテリア	
スタフィロコカス・エピダーニディス (C -) (<i>Staphylococcus epiderrnidis (C-)</i>)	グラム + バクテリア	
ガルデネレラ・ヴァジナリス(<i>Gardenerella vaginalis</i>)	グラム + バクテリア	
ミクロコカス s p s . (<i>Micrococcus sp.</i>)	グラム + バクテリア	
ハエモフィルス・インフルエンザ° (<i>Haemophilus influenza°</i>)	グラム - バクテリア	
ネイセリア・ゴノルホエエ(<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	グラム - バクテリア	
モラクセラ・カタラリス(<i>Moraxella catarrahlis</i>)	グラム - バクテリア	
サルモネラ s p s . (<i>Salmonella sp.</i>)	グラム - バクテリア	
クラミサ・トレコマティス(<i>Chlamytha trechomatis</i>)	グラム - バクテリア	30
ペプトストレプトコッカス生成物(<i>Peptostreptococcus productus</i>)	グラム + バクテリア	
ペプトストレプトコッカス・アナエローベ(<i>Peptostreptococcus anaerobe</i>)	グラム + バクテリア	
ラクトバシルス・レンネンタム (<i>Lactobacillus lenmentum</i>)	グラム + バクテリア	
ユーバクテリウム・レンテュム(<i>Eubacterium lentum</i>)	グラム + バクテリア	
ヘルペス・シンプレクス・ヴィルス I (<i>Herpes Simplex Virus I</i>) (HSV I)	ウィルス	
ヘルペス・シンプレクス・ヴィルス I I (<i>Herpes Simplex Virus II</i>) (HSV II)	ウィルス	40

【 0 3 9 7 】

【表 2】
問題解決チャート例

問題	可能性のある原因	可能な処置
陽性対照が陰性結果を読み取る。他の指示はない。	サンプルが適正に処理されていない	サンプル採取方法を見直す。再検査。
	一括溶解が行われていない。試薬の劣化。	新たなカートリッジ・ロットで検査する。カートリッジの格納場所を見直す (<30℃)。ハンディラボに連絡する。
陰性対照が陽性を読み取る。他の指示はない。	汚染	計器を洗浄する。サンプル採取方法を見直す。再検査。
エラー：IND (不確定な結果－IC失敗)	IC失敗、PCRが行われていない。	新たなカートリッジ・ロットで検査する。
エラー：IND (不確定な結果)	きわどい結果－IC合格	新しい患者サンプルで再検査する。

10

【0398】

20

実施例 14：ポリヌクレオチド処理装置の操作者説明書

この非限定的実施例では、ユーザ指示の形式で、特に、グループ B ストレプトコッカスのような微小有機体の定性的検出を含む微小流体 PCR 分析において用いる微小流体カートリッジを対象として、特許請求する装置、微小流体カートリッジ、キット、方法、及びコンピュータ・プログラム生産物の種々の実施形態について説明する。

【0399】

グループ B ストレプトコッチ (GBS) の存在は、1990 年代以来敗血症、誕生後の赤ん坊を冒す肺炎、及び骨髄炎の防止が大きく進歩したにも拘わらず、重大な新生児感染の最大の原因であり続けている。GBS 検査システムは、膣 / 直腸サンプルにおけるグループ B ストレプトコッカス (GBS) DNA の迅速な定性的検出に用いることができる。

30

【0400】

使用例及び使用のための指示

種々の実施形態では、GBS 検査システムは、膣 / 直腸サンプルにおけるグループ B ストレプトコッカス (GBS) DNA のような、臨床サンプルにおける微小有機体の迅速な定性的検出に用いることができる。

【0401】

GBS 検査に用いるための典型的な指示には、CDC 指針 (Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Prenatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guideline from CDC. (疾病管理及び予防センター、出産前グループ B ストレプトコッカス疾病の予防、CDC からの改訂指針) Morbidity and Mortality Weekly Report, August 16, 2002; 51 (No. RR-11); 1-24) に記載されているように陣痛中における抗生物質処置の必要性を判断するために、産科患者に対する出産前看護養生における迅速な選別 (screening) 検査が含まれる。この検査は、看護の時点、又は産科患者の分娩中及び分娩後段階における迅速なターンアラウンド・サービスを備えた中央検査室において迅速な結果を出すことができる。また、この検査は、GBS 感染が疑われるいずれの被験者の膣又は直腸サンプルにおいて GBS DNA を検出するためにも用いることができる。A. Burns, Brian N. Johnson, Sundaresh N. Brahmasandra, Kalyan Handique, James R. Webster, Madhavi Krishnan, Timothy S. Sammarco, Piu M. Man, Darren Jones, Dylan Heldsinger, Carlos H. Mastrangelo, David T. Burke "An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device" (一体化ナノリットル DNA 分析装置) Science, Vol. 282, 16 October 1998

40

50

参照のこと。

【0402】

検査アプリケーションの説明

疾病管理及び防止センタは、陣痛及び分娩中における予防用抗生物質の必要性を判断するために、妊娠期間35～37週の全ての女性の膣/直腸GBS定着について全般的な出生前診査を推奨する。現在のCDC推奨は、培養に基づく検査方法(標準的培養方法)であり、通例、48～72時間で結果が得られるが、それと比較して、本検査では約30分で済む。本検査は、CAMP係数をエンコードする、確立した特定シーケンスであるGBSゲノムにおけるcfb遺伝子を特定するために、自動化したサンプル準備及びリアル・タイムPCRを利用することができる。CAMP係数は、GBS分離菌内に通例存在する余分な細胞蛋白質である。CAMP係数は、培養方法による臨床サンプルにおけるGBSバクテリアの推定特定に用いることができる。この検査は、実験室の手順にはさほど訓練されていない臨床家によって、患者の近くに設定して行うことができる。GBS検査のために継続して品質保証を行うために、ユーザ・インターフェースにQCルーチンを組み込むことができる。また、産科が要求する時間枠以内にサンプル検査が行われるのであれば、検査は中央病院の「stat」実験室で行うこともできる。

10

【0403】

可能性のある禁忌

GBS検査は、被検物収集スワブに含有するポリエステルに対してアレルギーのあるヒトには、禁忌を示す場合がある。

20

【0404】

警告及び注意の例

ここの警告は、実施例13に示した一般的な応用のそれらに追加するとよい。

- ・GBS検査は、ペニシリンにアレルギーがある女性に推奨される罹患性結果を与えない場合がある。

- ・IV抗生物質は通例分娩の少なくとも4時間前に開始する必要がある。そして分娩前GBSデータがない状態では、患者が病院の陣痛及び分娩区域に入ったら直ちにサンプルを収集して、GBS検査を開始することが重要となる場合がある。

- ・実施形態によっては、患者が現在抗生物質で治療を受けている場合、検査は疾病状態の指標にしては信頼性が低くなる場合もある。

30

- ・緩衝液は、防腐剤としてアジ化ナトリウムを含有する場合がある。摂取すると、健康被害が出る。

- ・通例、サンプリング及び緩衝液内の蓄積から、例えば、8時間以内に被検物を検査する。被検物を保管しなければならない状況では、4℃において24時間までの期間での冷蔵を用いるとよい。

- ・通例、有効期限が切れた検査材料の使用を回避する。

- ・通例、サンプルを注入する準備ができた後まで、カートリッジの開封を回避する。通例、保護用メタライズ・バッグを開封した場合、カートリッジの使用を回避する。実施形態によっては、光、空気、及び水分に晒すと、試薬が劣化する可能性がある。

- ・通例、検査キットに備えられているスワブ、シリンジ、及び緩衝液を用いる。実施形態によっては、GBS収集スワブの別のブランドでは、検査性能が阻害される可能性がある。

40

- ・通例、材料の使用は1回に限る。材料を再利用すると、誤った結果が得られる場合がある。

- ・検査の準備ができるまで、カートリッジのパッケージを開封するのを回避する。内蔵試薬は、光及び水分に感応する可能性がある。パッケージの封止が破れており、箔パウチがもはや伸びない(膨れている)場合、使用を回避する。

【0405】

サンプル収集キットの例

A. スワブ

50

- B . サンプル収集緩衝液を収容するチューブ
- C . カニューレ先端
- D . シリンジ (例えば、 3 c c)
- E . シリンジ・フィルタ
- F . G B S 微小流体カートリッジ

【 0 4 0 6 】

被検物収集及び緩衝液懸濁指令の例

- ・ 注意：通例、収集キットのみを用いる。スワブの端部に指で触れるのを避ける。
- ・ 容器からスワブを取り出す。
- ・ 過剰な腔分泌物を拭い去る。
- ・ スワブを 2 c m 腔 (腔) に挿入する。
- ・ 同じスワブを 1 c m 肛門 (直腸) に挿入する。
- ・ サンプル緩衝液 (B) の小瓶が期限切れでないことを確認する。
- ・ スワブ (A) を、緩衝液を収容した小瓶の中に浸漬して 2 0 回上下に激しく振る。
- ・ スワブを取り出し破棄する。
- ・ 患者の I D 情報を小瓶に記す。

10

【 0 4 0 7 】

検査用サンプル準備の例

- ・ カニューレ先端 (C) をシリンジ (D) に取り付けることができる。
- ・ サンプルの一部又は全部をシリンジの中に引き込む。
- ・ 加えて、空気 (例えば、 2 m l) も引き込んでよい。
- ・ カニューレ先端 (C) をフィルタ (E) と交換してもよい。
- ・ パッケージ上に印されている開封箇所から、カートリッジ・パッケージを開封することができる。
- ・ サンプル小瓶 (B) 及びカートリッジ (F) のバーコードを、システム・スキャナによって走査することができる。材料が期限切れの場合、システムは警告するとよい。
- ・ 必要であれば、患者識別情報を入力することができる。
- ・ カートリッジを平坦な表面に置くか、ルアーを用いて直立姿勢で平坦に保持する。通例、手順の間カートリッジのラベル側が上向きになっていることを確認する。
- ・ シリンジ/フィルタ・アセンブリを用いてサンプル (過剰な空気を含む) をカートリッジに注入することができる。弱い注入圧力を用いると、サンプルからの跳ね返りを避けることができる。
- ・ シリンジ/フィルタ・アセンブリをカートリッジから取り外すことができる。
- ・ サンプル室内部にあるペレットが溶解し混合するまで、約 1 0 回カートリッジを横に軽く揺ることができる。
- ・ カートリッジをシステム上に置くことができる。
- ・ システムのカバーを閉じ、ハンドルを下方位置で固定することができる (検査が自動的に開始してもよい) 。

20

30

【 0 4 0 8 】

結果

検査が完了したとき、結果を明確に表示するとよい。結果は、実験手順で決定した通りに、印刷又は格納することができる。

40

【 0 4 0 9 】

材料の処分例

カートリッジ及び収集キットは、生物的有害物質として扱わなければならない。

推奨する実験室品質管理ルーチンの例

【 0 4 1 0 】

検査検証の例

1 週間毎に、(1) 陽性外部対照及び (1) 陰性外部対照を実行することができる。Q C を、システムの総合システム性能を確認するように設定する。この手順は、新たなユー

50

ザを訓練する場合にも推奨する。

【0411】

品質管理ルーチン指令の例

表示画面上で、指令通りに、サンプルを走らせる(run)ことができる。QC検査で、予期した結果を得ることができなかつた場合、製造業者に連絡することができる。

外部陽性対照は、実行時にサンプル収集緩衝液によって復元したストレプトコッカス・アガラクチエ(GBS)細胞の凍結乾燥標本を含むことができる。外部陽性対照内にあるGBS細胞の数は、検査の最大検出可能限界(MDL)にほぼ等しくするとよい。

また、品質管理検査の例には、実施例14において説明した、システム自己検査QCも含む。

10

【0412】

内部対照(カートリッジ上)の例

分析用の典型的な試薬は、ユーザの取扱謝りや汚染の潜在性を低減するために、カートリッジに含めるとよい。2種類のカートリッジ上陽性及び陰性対照方策を、各微小流体カートリッジ内に組み込み、個々のPCR分析実施過程を監視することができる。

GBS用陽性内部対照プラスミドの一例は、cfb遺伝子からの順方向及び逆方向シーケンスが側面に位置する(flan)一意の39bp人工DNAシーケンスから成る96bp領域を含有する二重鎖円形DNA分子であり、この一意のシーケンスに特定の第2の別個の蛍光原プローブと共に、凍結乾燥マスタ・ミックス(master mix)に含めることができる。陽性GBSサンプルがない状態で、内部対照シーケンスを増幅できない場合、試薬混合の失敗又は被検物におけるPCRインヒビタの存在を示す可能性がある。

20

【0413】

GBS DNA検出のためのリアル・タイムPCRの例

この検査は、臨床サンプルから復元したGBSのcfb遺伝子シーケンスの増幅のために、リアル・タイム・ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用することができる。増幅したDNAの検出には、蛍光原特定Taqman(商標)プローブを用いることができる。cfb遺伝子は、CAMP係数をエンコードし、GBS分離菌の中に通例存在する拡散可能な細胞外蛋白質を分離する。グループBストレプトコッカス(GBS)検出検査は、核酸増幅分析の一体型の、原料-サンプル-結果型とするとよい。この分析のための典型的な試薬をカートリッジに含めれば、ユーザの取扱謝りや相互汚染の潜在性を低減することができる。

30

【0414】

可能な検査制限の例

実施形態によっては、検査システムは、膣及び/又は直腸被検物以外の被検物におけるGBS DNAを特定する適格性がない場合がある。例えば、実施形態によっては、尿及び血液の被検物は適していない場合がある。

実施形態によっては、抗生物質の治療を受けている患者は、正しいGBS診断が得られない場合もある。

実施形態によっては、微生物学者によるバクテリアの直接的な識別に適したGBS培養が、本検査から得られない場合もある。

40

【0415】

性能特性及び解釈の例

妊娠中の女性の10~30%に、GBSが定着している(colonize)。GBS定着のカットオフ(cut-off)は、cfb遺伝子シーケンスの増幅によって判定したDNA/サンプルの約1000コピーであると定められている。結果の解釈のための判断基準例の適用について、ユーザは図71のフロー・チャートを参照すること。この場合、問題のターゲットはGBS及びICプラスミドである。

【0416】

可能な妨害物質の例

実施形態によっては、尿又は膣分泌物、あるいは粘液が大量に存在すると、検査を妨害

50

する場合がある。

ある実施形態では、サンプルの血液、胎便、羊水汚染は、通例、検査を妨害する可能性はない。

ある実施形態では、抗生物質以外の薬剤の妨害（膣及び直腸分泌物に存在するような）は、この時点では、通例PCRを妨害することは知られていない。

【0417】

結果の解釈及び期待値の例

妊娠中の女性の10～30%に、GBSが定着している。GBS定着のカットオフ(cut-off)は、cfb遺伝子シーケンスの増幅によって判定したDNA/サンプルの約1000コピーであると定められている。

PCR反応は、GBS及び内部対照に対して陽性又は陰性として解釈することができる。サンプルが陽性又は陰性か、あるいは不確定か決定するために、論理アルゴリズムを用いてもよい。

【0418】

【表3】

保管及び安定性情報の例

説明	保管/使用条件	安定性
緩衝液内にある患者の被検物（湿性）	15～30℃	8時間
緩衝液内にある患者の被検物（湿性）	4℃	24時間
患者の被検物（乾燥保管）	15～30℃	24時間
GBSカートリッジ-未開封	4～30℃	期限日まで
GBSカートリッジ-開封後	使用禁止	最長60分

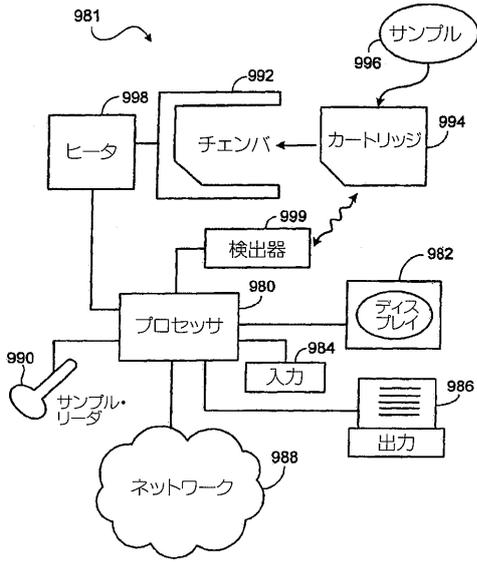
【0419】

この中で引用した各引例は、引用したことによりその全体が本願にも含まれることとし、米国特許第6,057,149号、第6,048,734号、第6,130,098号、第6,271,021号、第6,911,183号、第CA2,294,819号、第6,575,188号、第6,692,700号、第6,852,287号、及びカナダ特許出願第CA2,294,819号を含む。

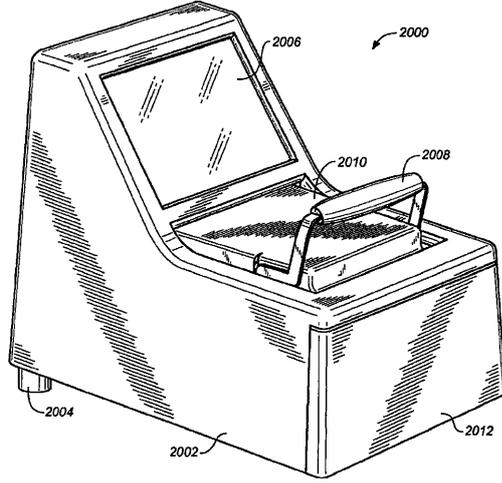
【0420】

以上、本技術の多数の実施形態について説明した。しかしながら、本技術の主旨及び範囲から逸脱することなく、種々の修正が可能であることは言うまでもない。したがって、他の実施形態も、以下の特許請求の範囲に該当するものとする。

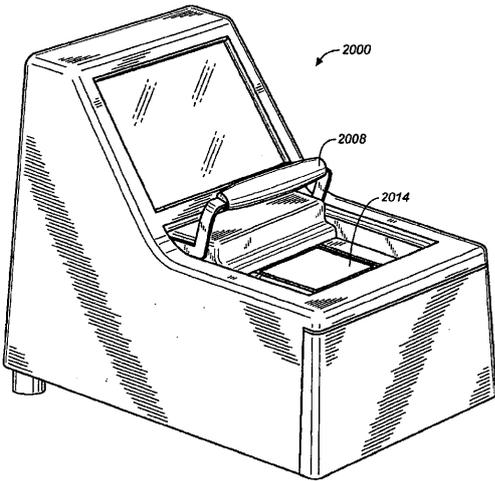
【図1】



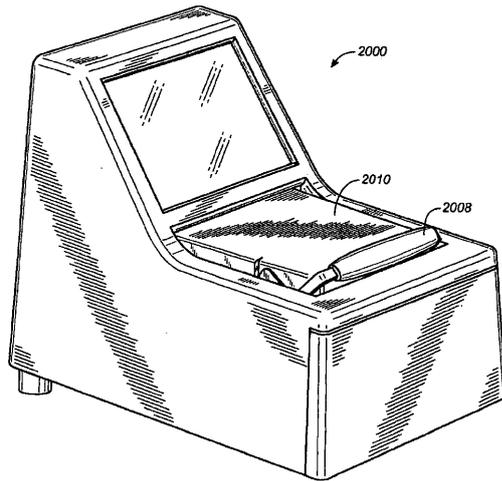
【図2A】



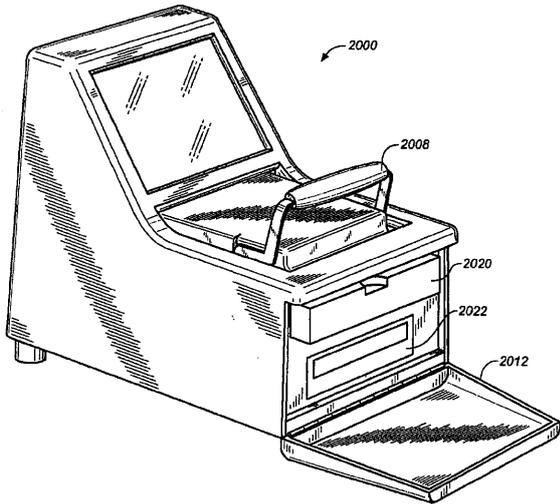
【図2B】



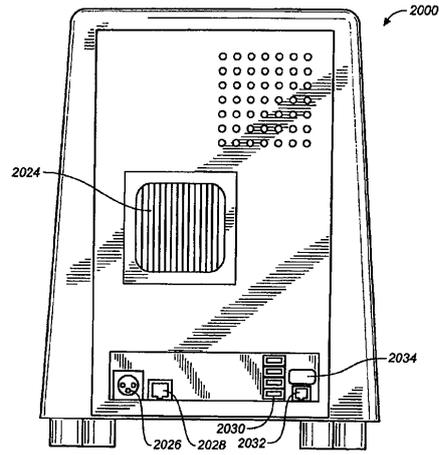
【図2C】



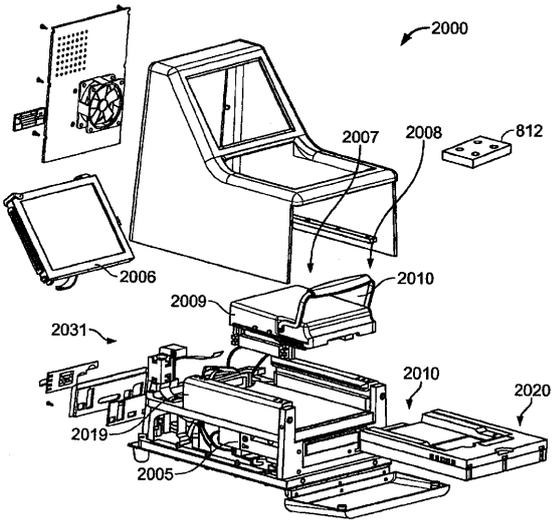
【図 2 D】



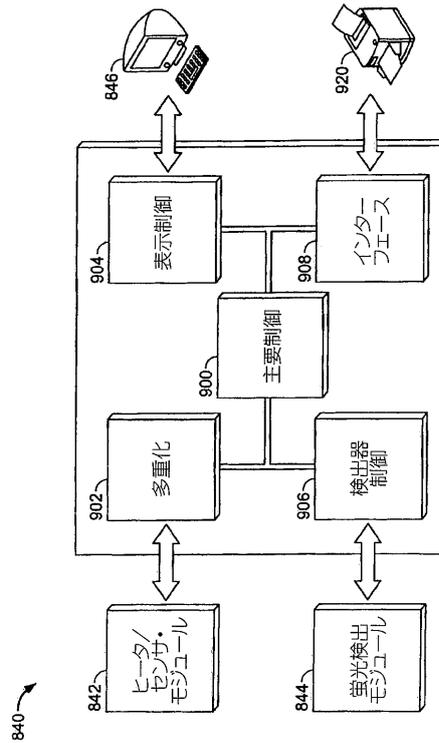
【図 2 E】



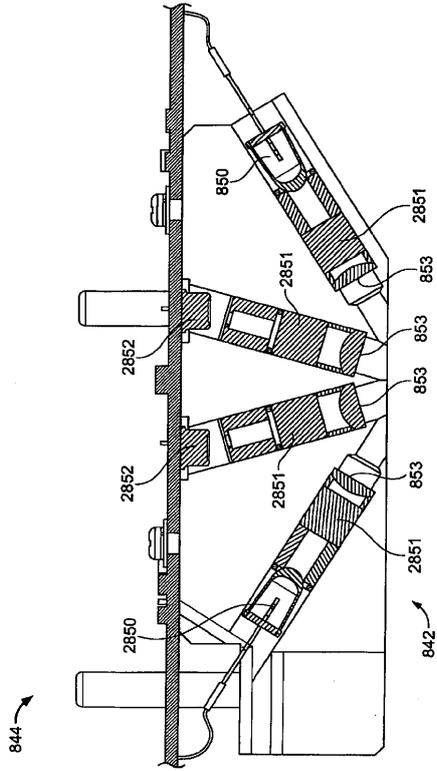
【図 3】



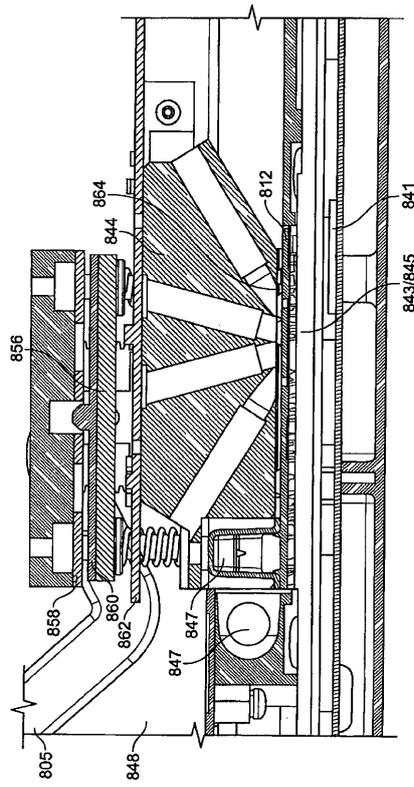
【図 4】



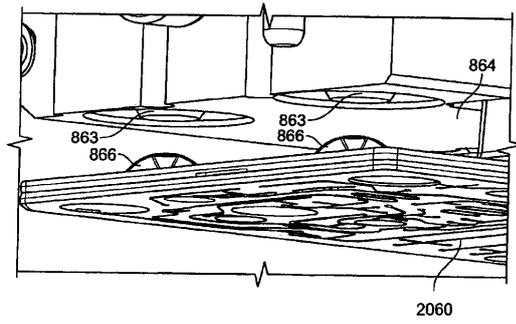
【図5】



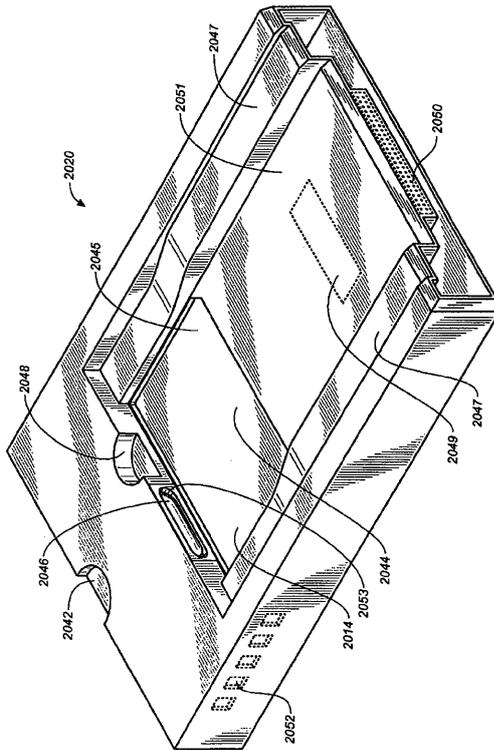
【図6A】



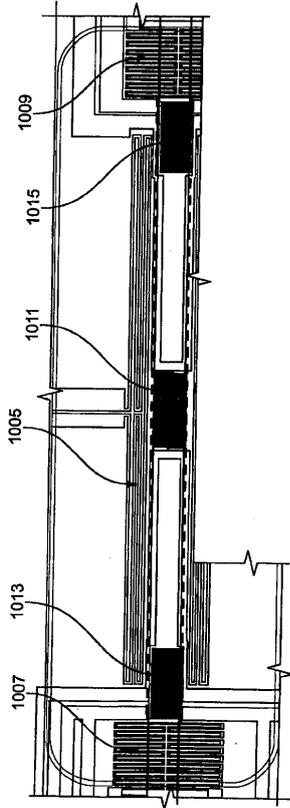
【図6B】



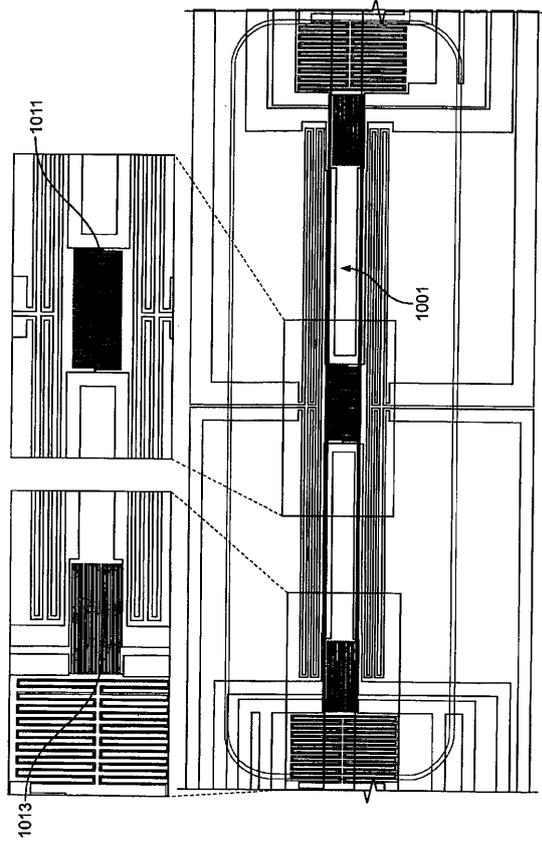
【図7】



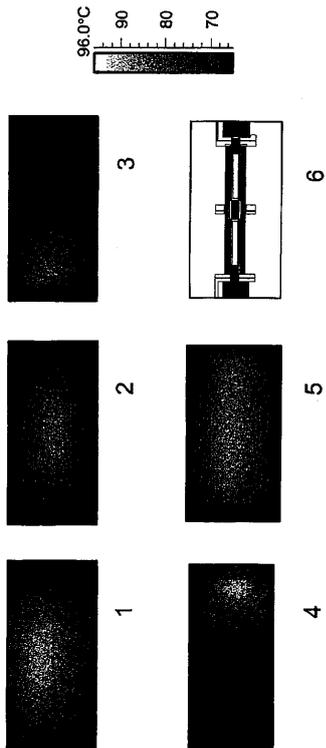
【 8 A 】



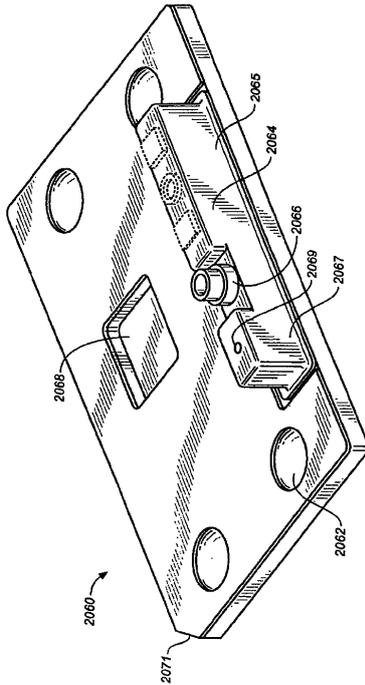
【 8 B 】



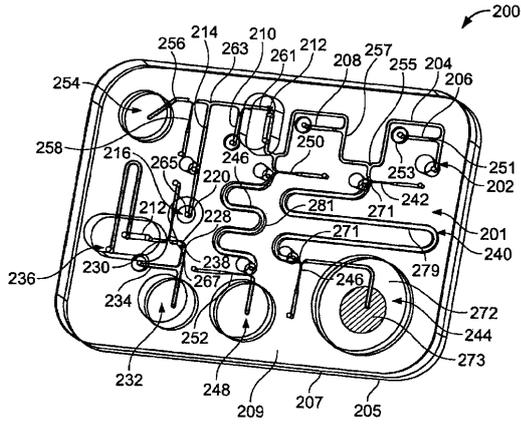
【 8 C 】



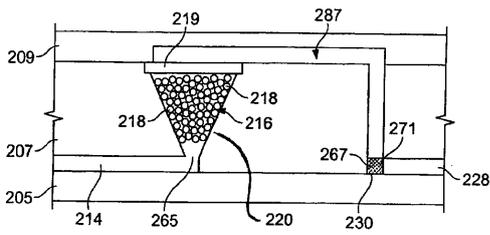
【 9 】



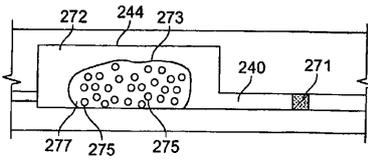
【図10】



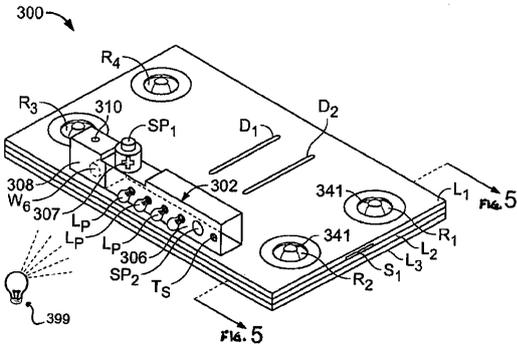
【図11】



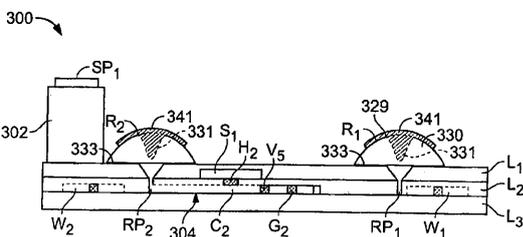
【図13】



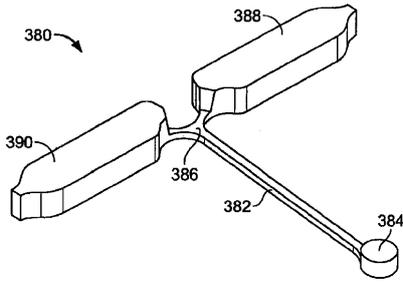
【図14A】



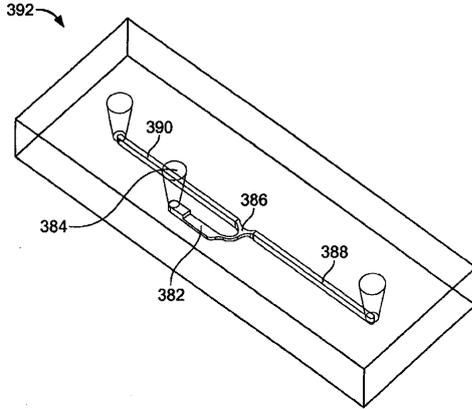
【図14B】



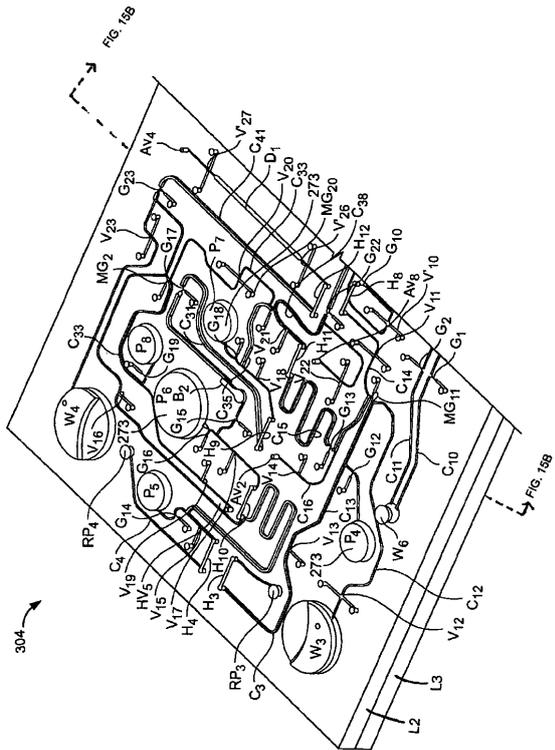
【図12A】



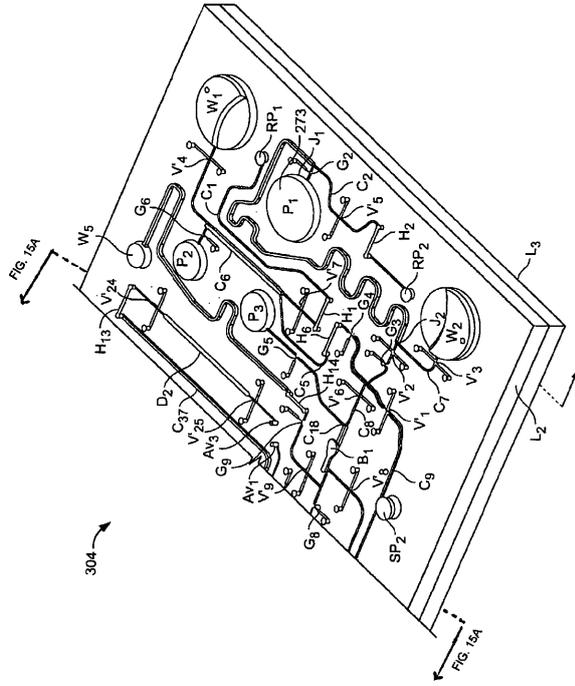
【図12B】



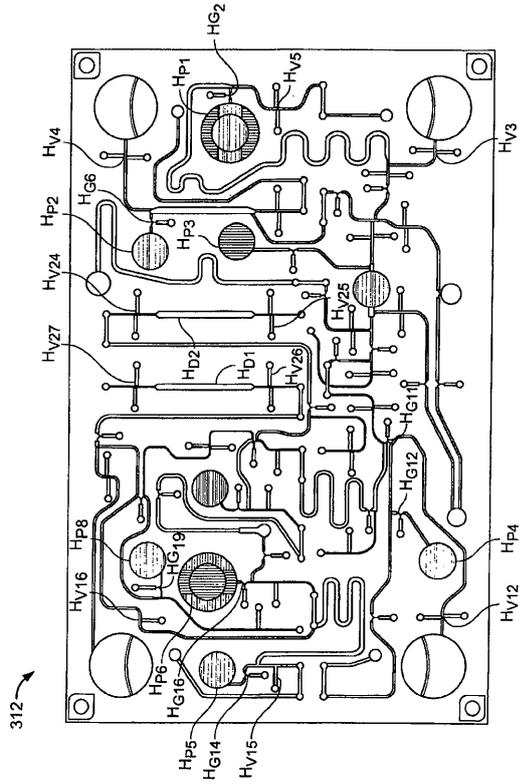
【図15A】



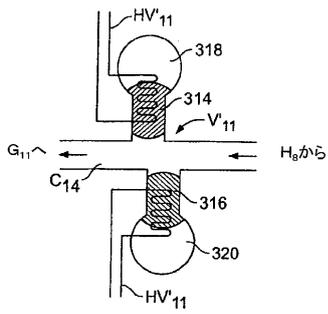
【 図 15 B 】



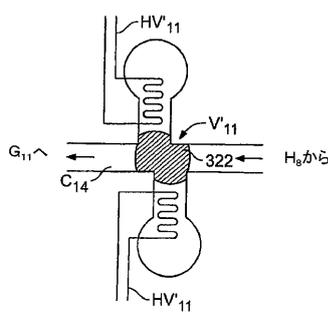
【 図 16 】



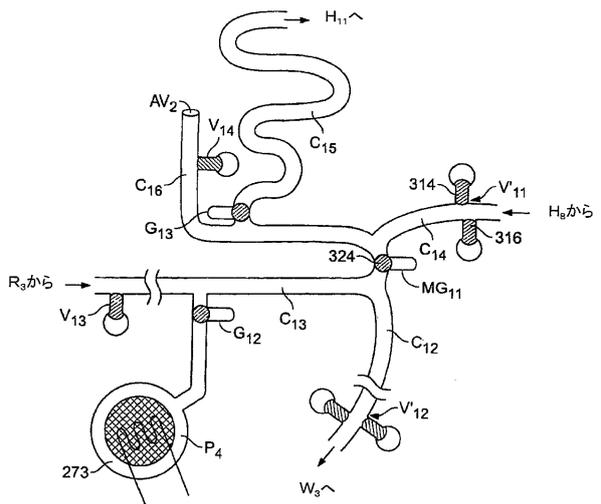
【 図 17 】



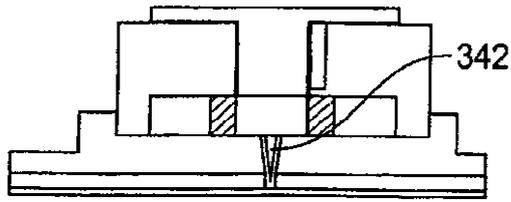
【 図 18 】



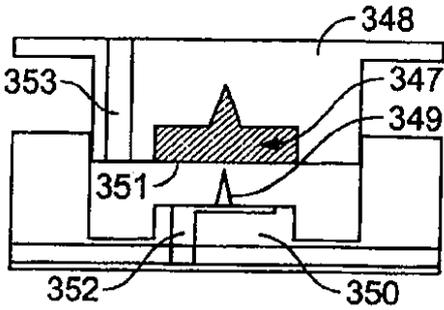
【 図 19 A 】



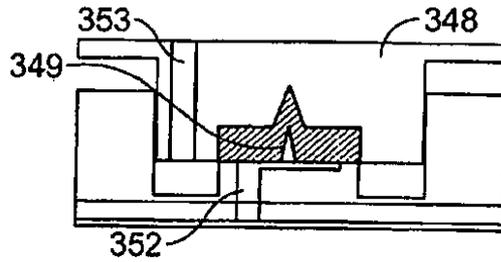
【図20C】



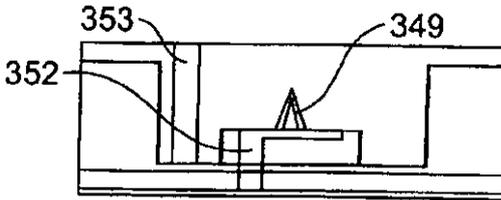
【図21A】



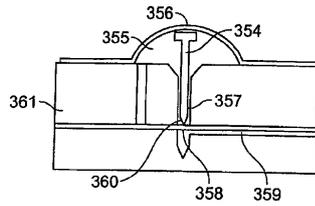
【図21B】



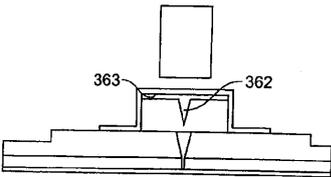
【図21C】



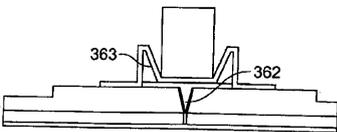
【図22】



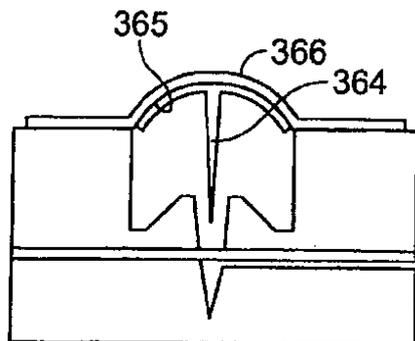
【図23A】



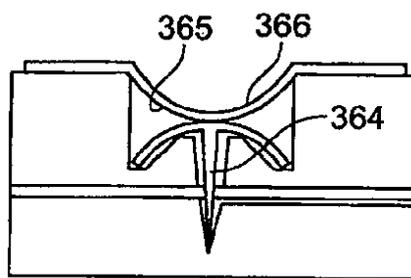
【図23B】



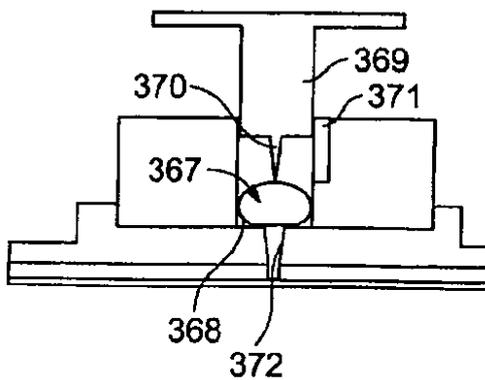
【図24A】



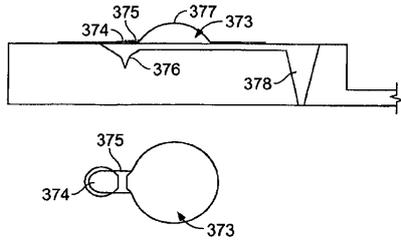
【図24B】



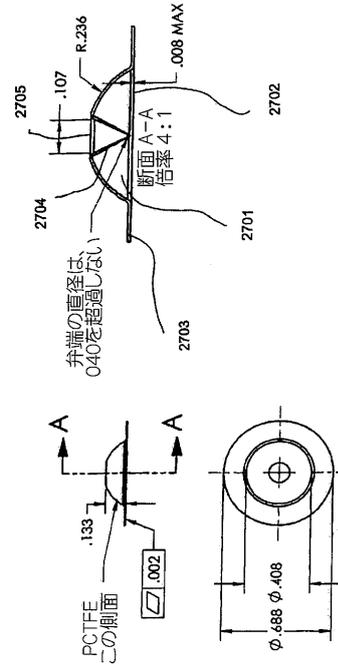
【図25】



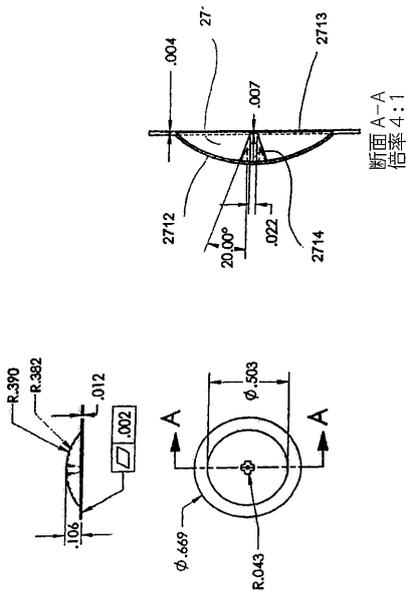
【図 26】



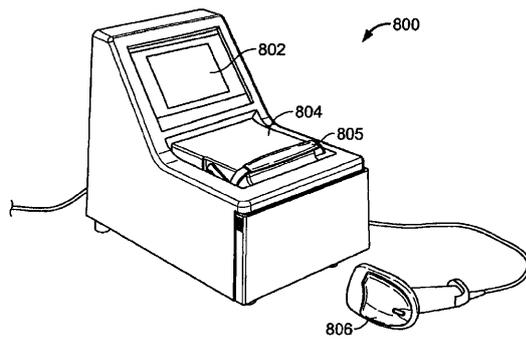
【図 27 A】



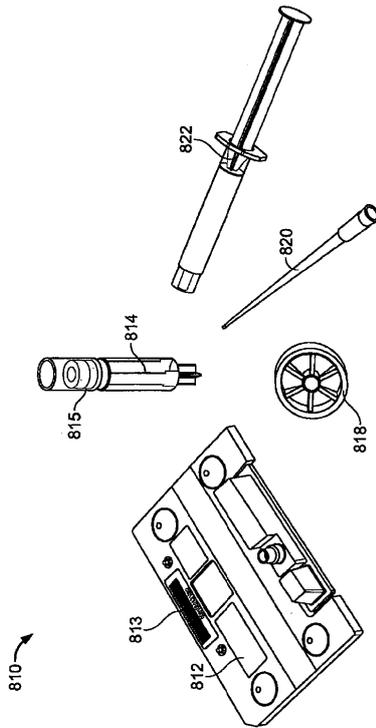
【図 27 B】



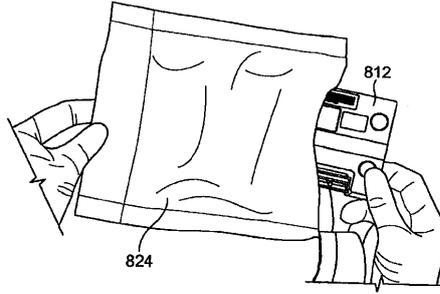
【図 28】



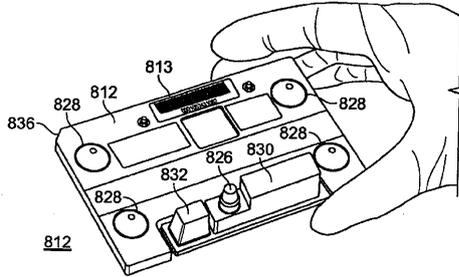
【 図 29 】



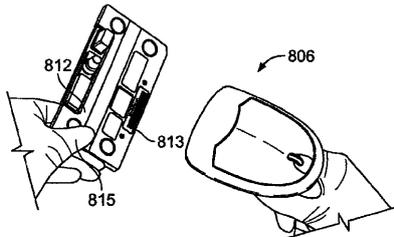
【 図 30 】



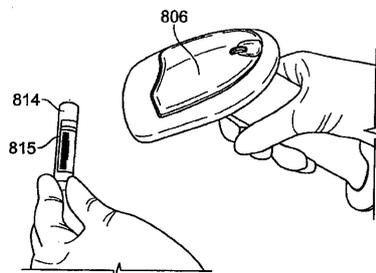
【 図 31 】



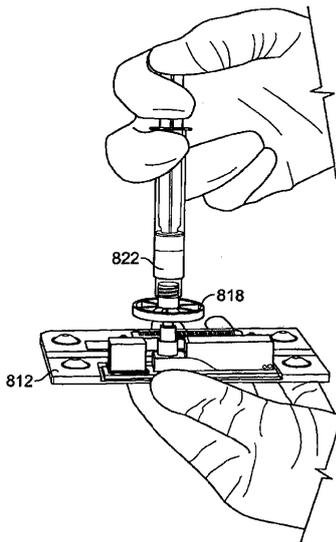
【 図 32 】



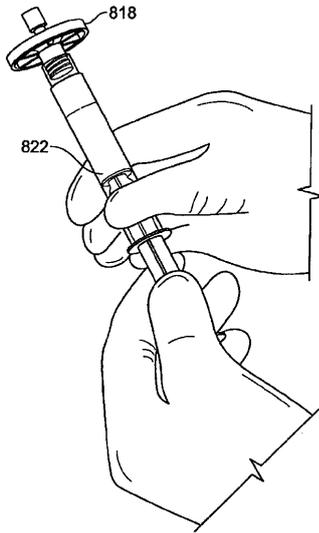
【 図 33 】



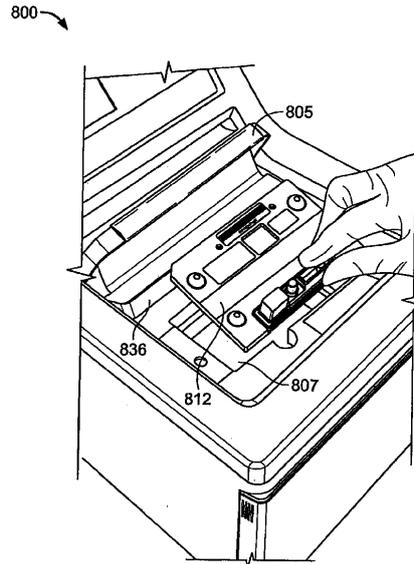
【 図 34 】



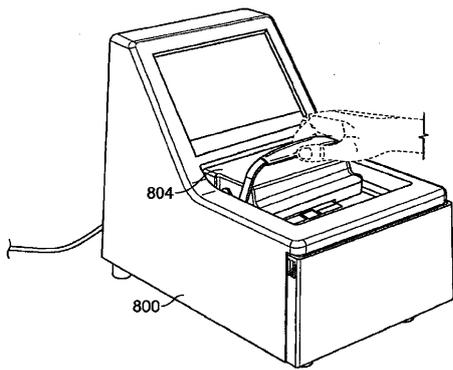
【 3 5 】



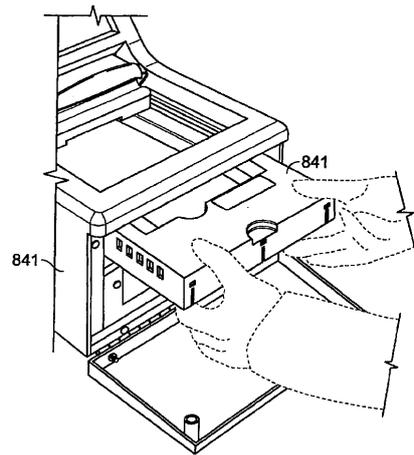
【 3 6 】



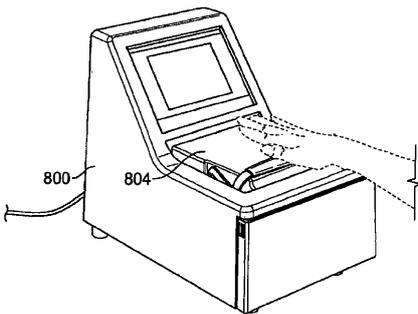
【 3 7 】



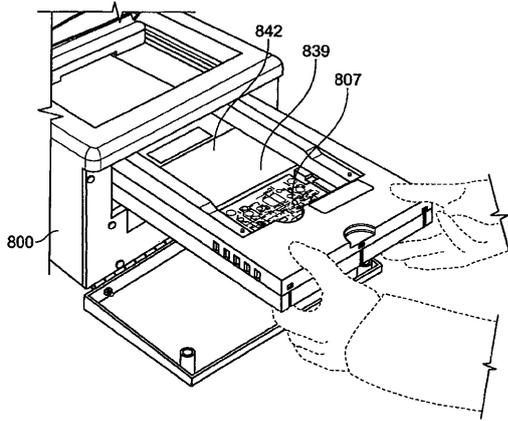
【 3 9 】



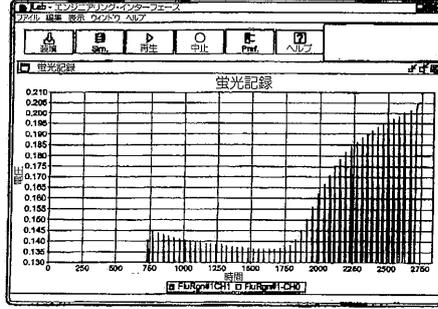
【 3 8 】



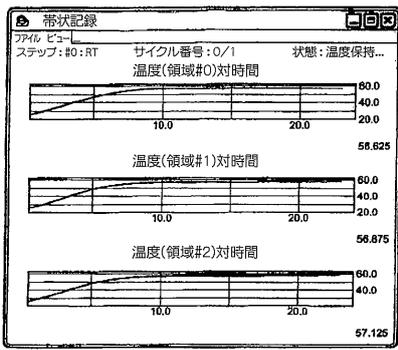
【図40】



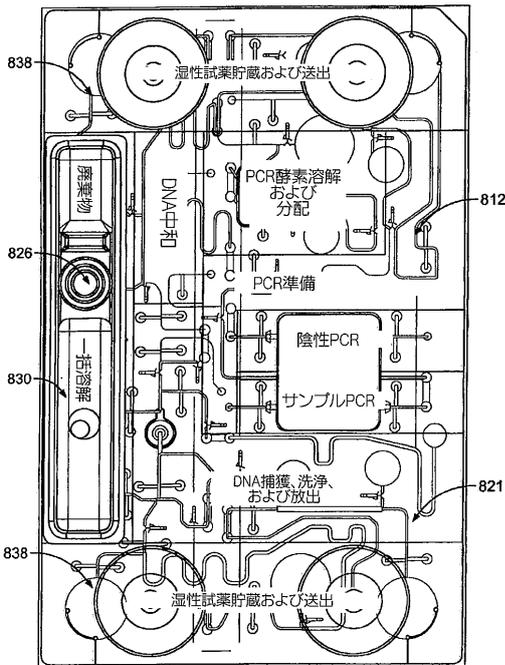
【図41B】



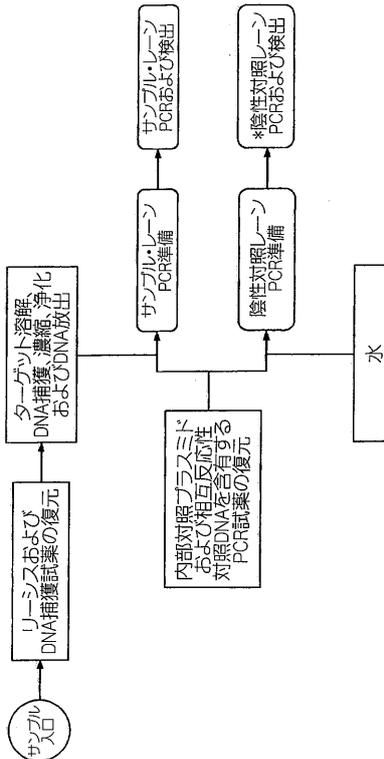
【図41A】



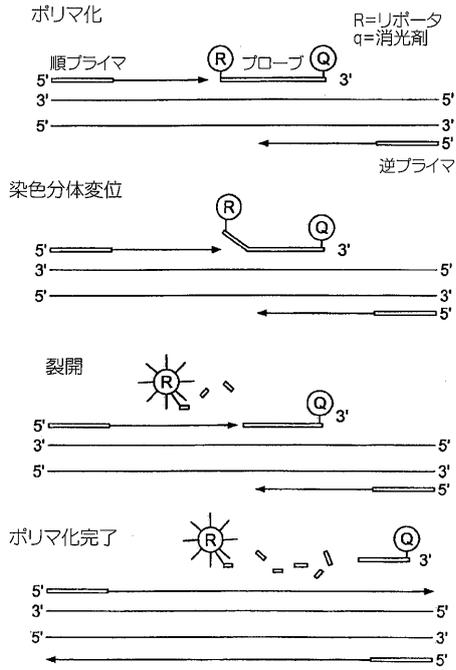
【図42】



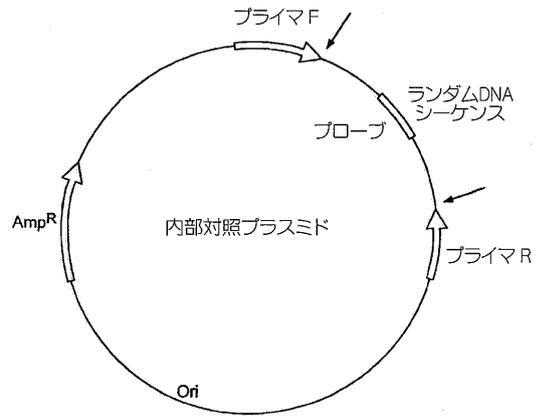
【図43】



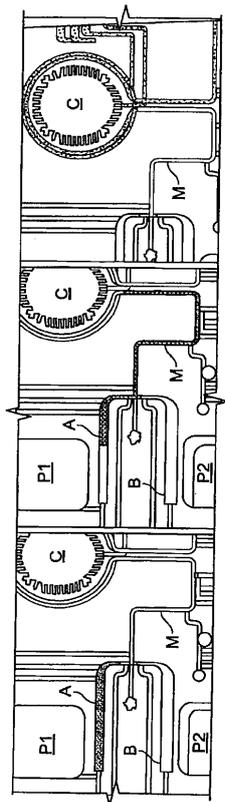
【図44】



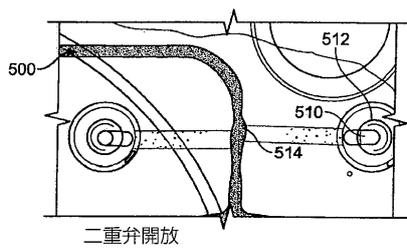
【図45】



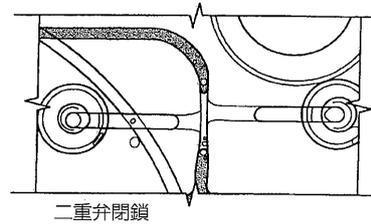
【図46】



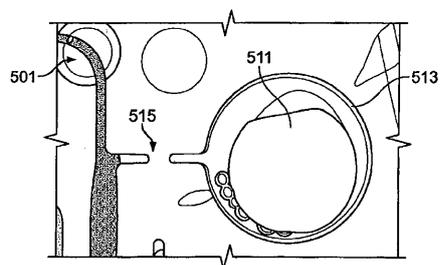
【図47A】



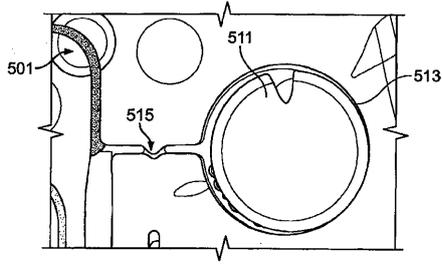
【図47B】



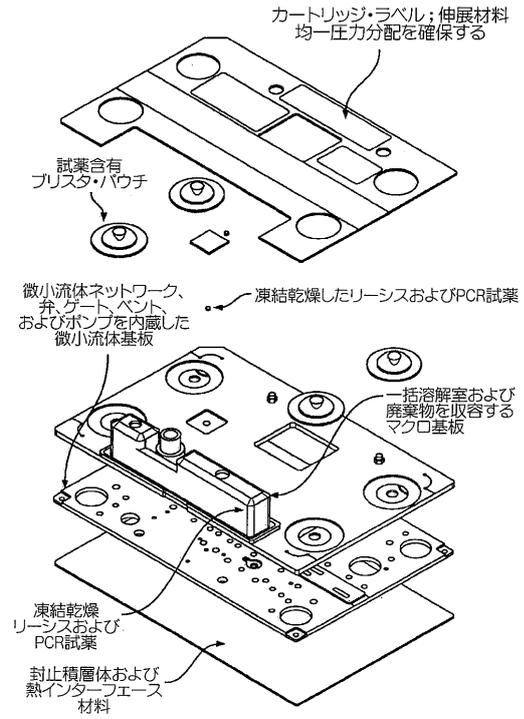
【図47C】



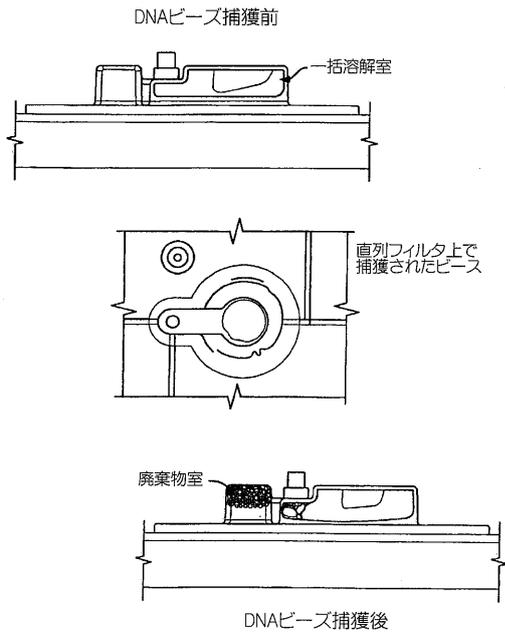
【図47D】



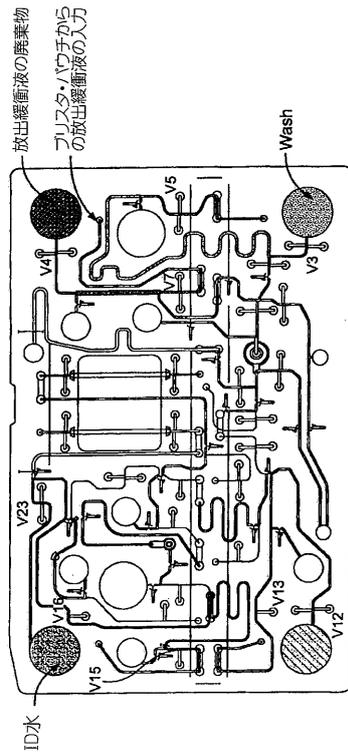
【図48】



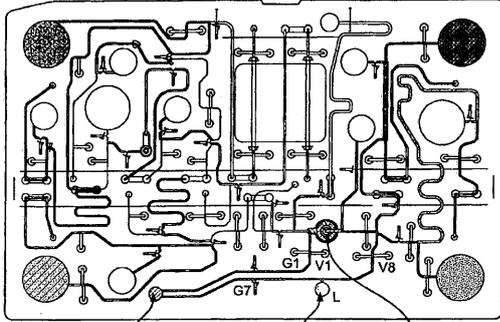
【図49】



【図50A】

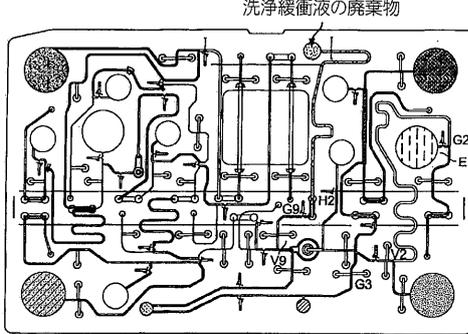


【図50B】



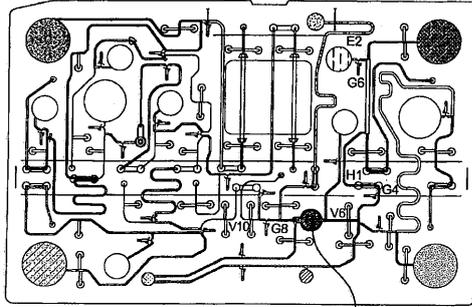
廃棄物の入口 一括溶解室からの出口 直列フィルタ

【図50C】



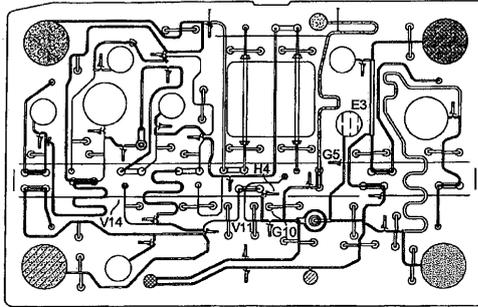
洗浄緩衝液の廃棄物

【図50D】

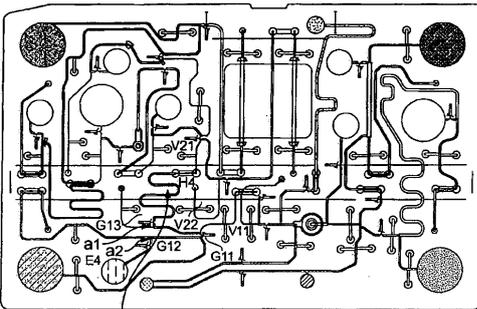


ビーズ・コラム

【図50E】

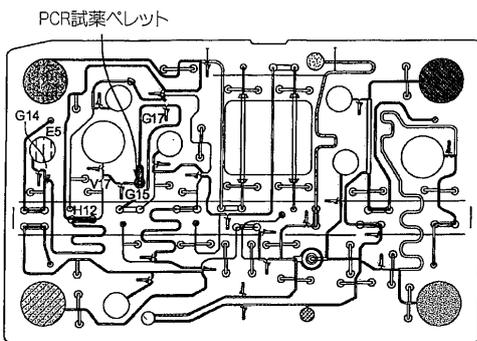


【図50F】



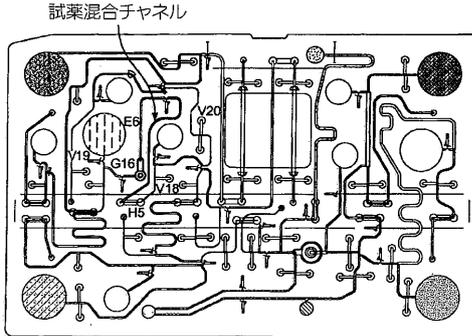
中和混合チャネル

【図50G】



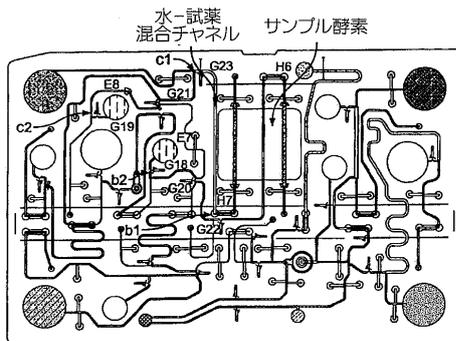
PCR試薬ペレット

【図50H】



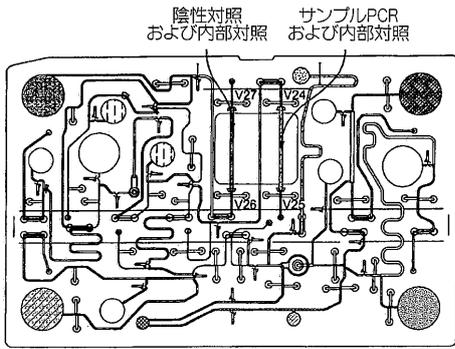
試薬混合チャネル

【図50I】

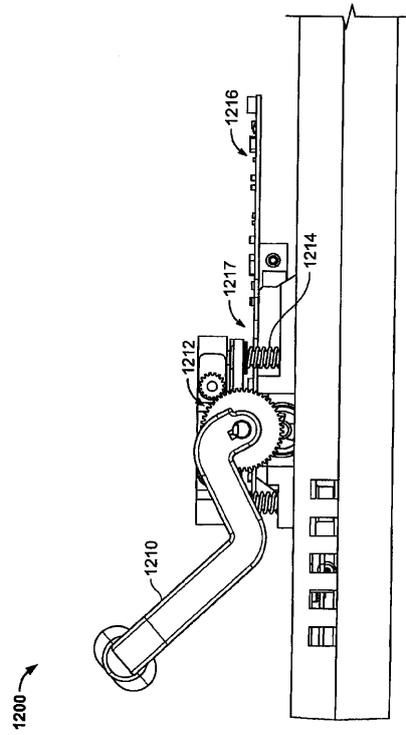


水-試薬混合チャネル サンプル酵素

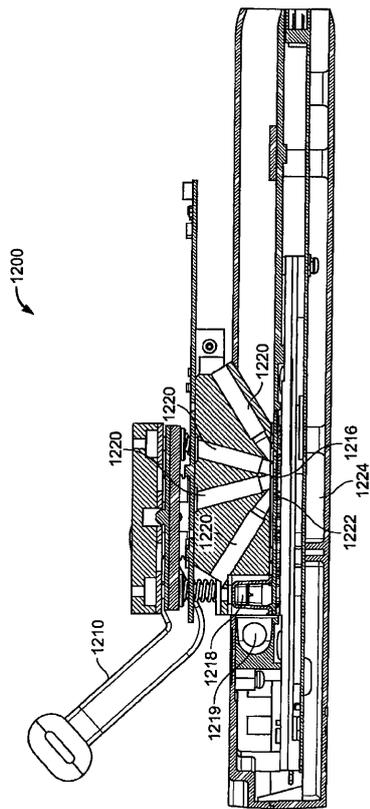
【図50J】



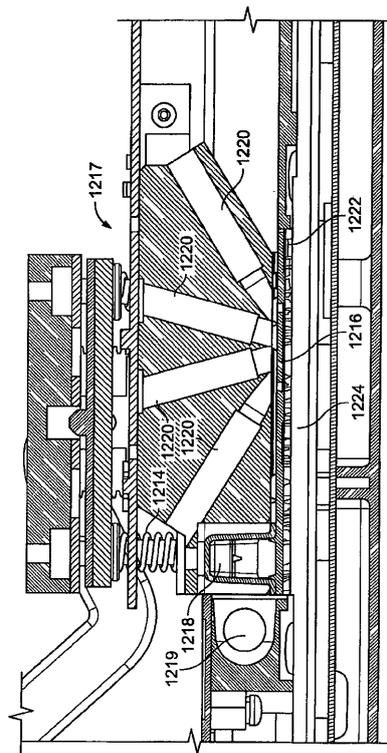
【図51】



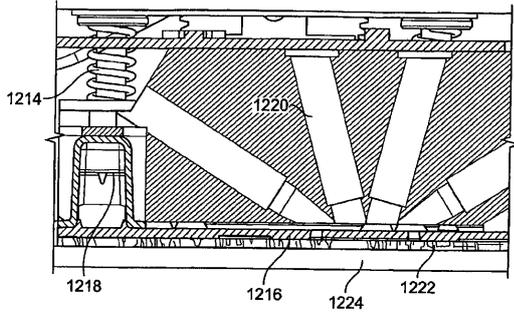
【図52】



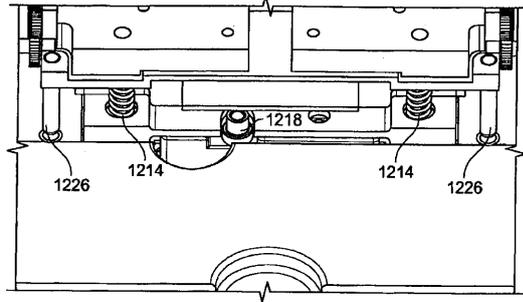
【図53】



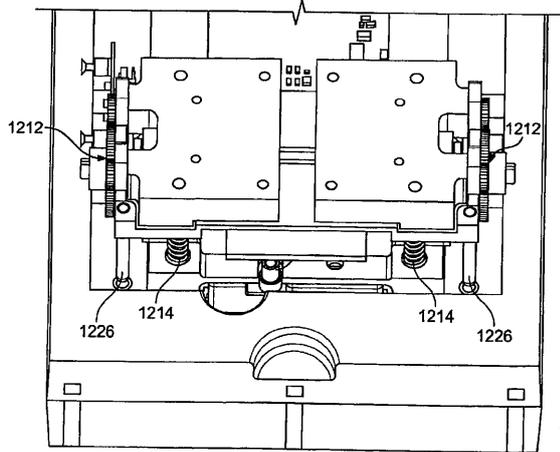
【図54】



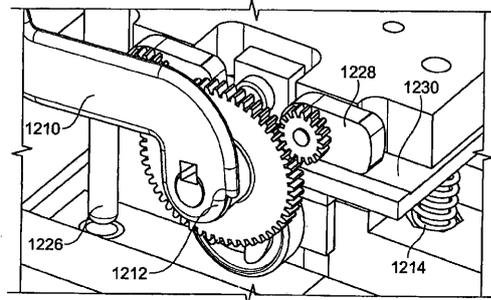
【図56】



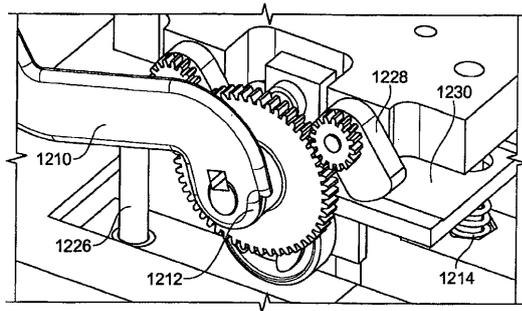
【図55】



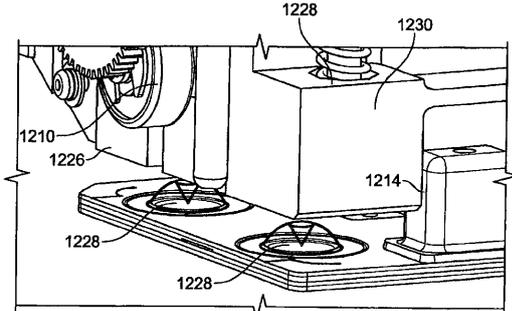
【図57】



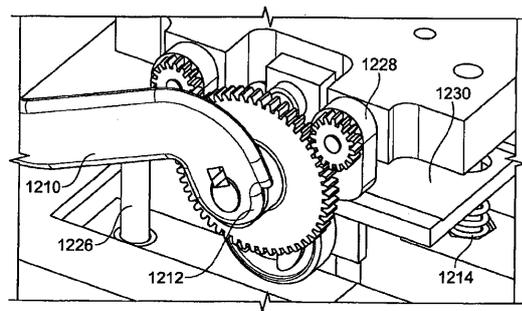
【図58】



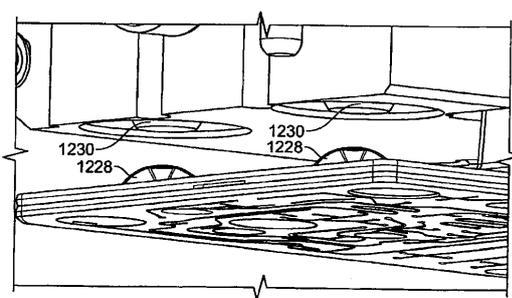
【図60】



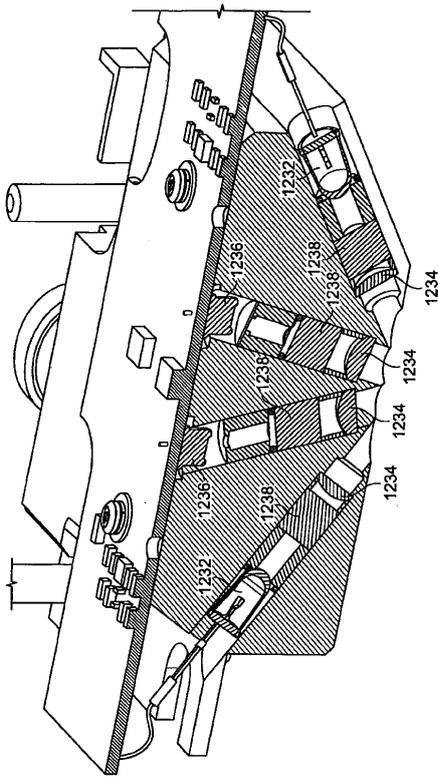
【図59】



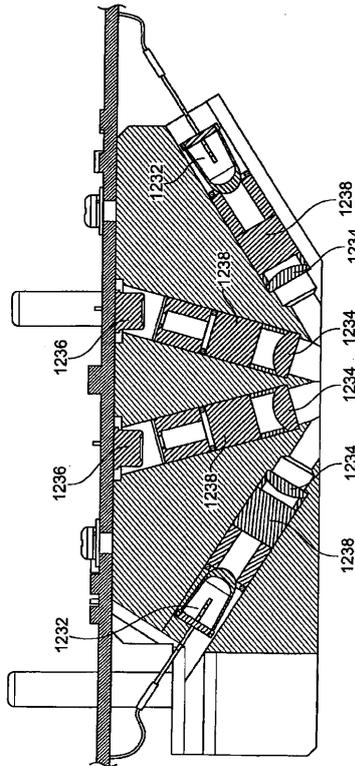
【図61】



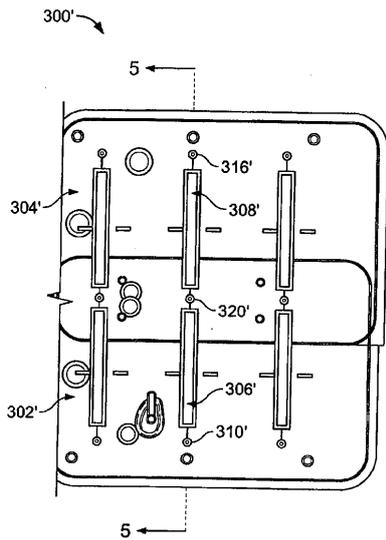
【図62】



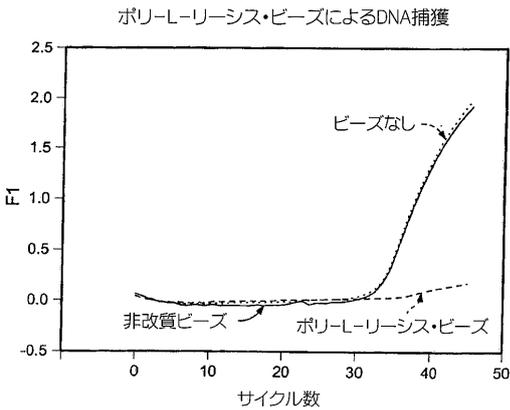
【図63】



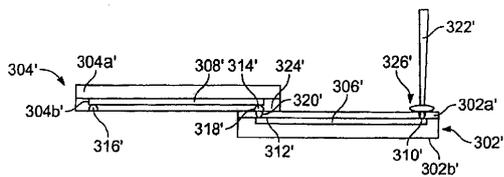
【図64】



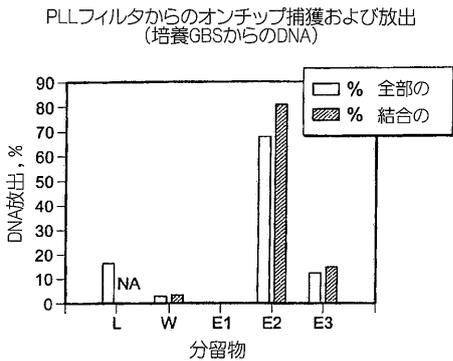
【図66】



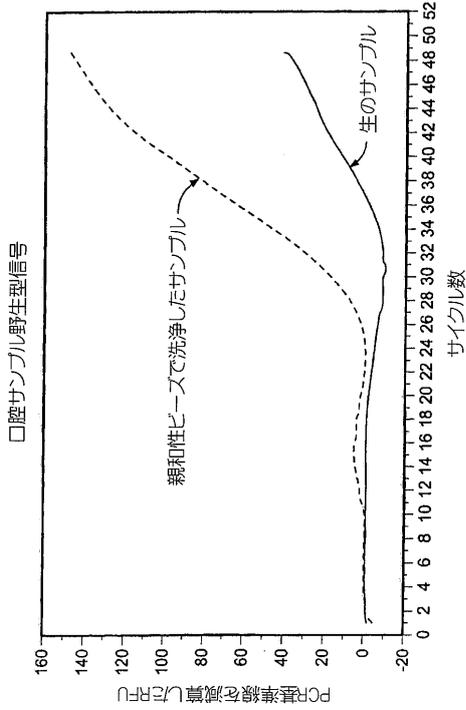
【図65】



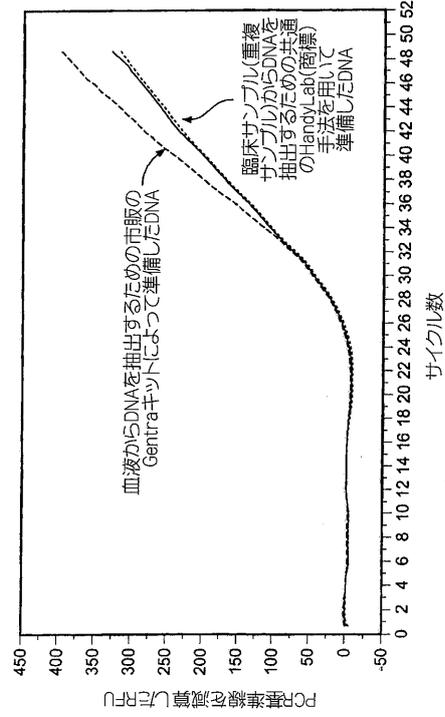
【図67】



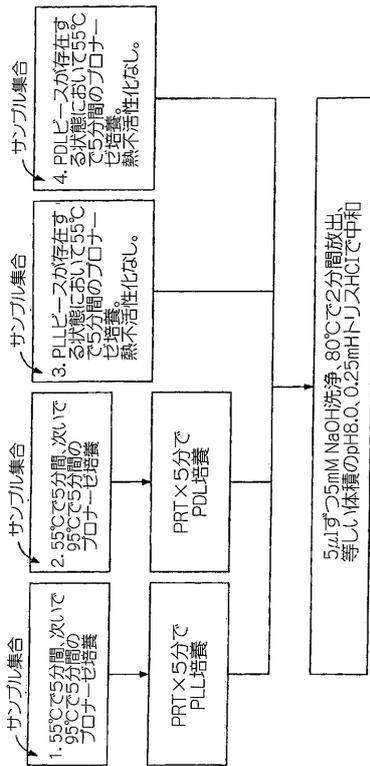
【 図 6 8 】



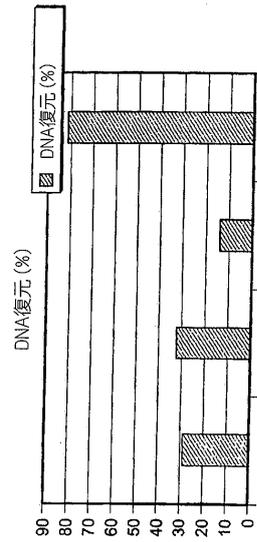
【 図 6 9 】



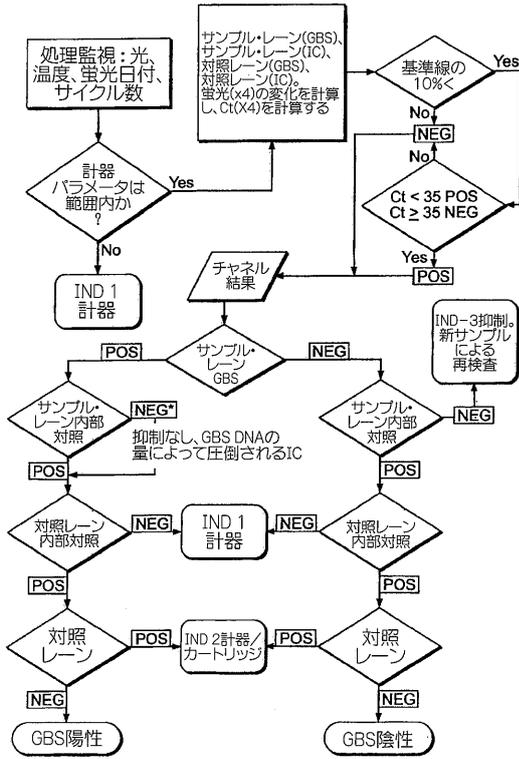
【 図 7 0 A 】



【 図 7 0 B 】



【図71】



フロントページの続き

- (72)発明者 ハンディケ, カリアン
アメリカ合衆国ミシガン州48197, イブシランティ, ハンプシャー・レイン 5570
- (72)発明者 ブラーマサンドラ, サンダレシュ・エヌ
アメリカ合衆国ミシガン州48103, アン・アーバー, サイオ・リッジ 1509
- (72)発明者 ギャネサン, カーシク
アメリカ合衆国ミシガン州48103, アン・アーバー, ダンディー・ドライブ 2484
- (72)発明者 ウ, ベティ
アメリカ合衆国ミシガン州48187, キヤントン, レッド・ラン・ドライブ 48295
- (72)発明者 ファドク, ニキル
アメリカ合衆国ミシガン州48103, アン・アーバー, ウェイマーケット・ドライブ 636
- (72)発明者 パルナック, ジーン
アメリカ合衆国ミシガン州48176, セイリン, ヒースリッジ・ドライブ 6624
- (72)発明者 ウィリアムズ, ジェフ
アメリカ合衆国ミシガン州48118, チェルシー, マキシミアン・コート 861

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 福井 悟
審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第2005/108620(WO, A2)
米国特許出願公開第2006/0057629(US, A1)
米国特許出願公開第2005/0202504(US, A1)
特表2005-518825(JP, A)
特表2005-253466(JP, A)
特表2009-531064(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M1/00-3/10
C12Q1/00-1/70