

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504356
(P2017-504356A)

(43) 公表日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B029
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
C12P 19/34 (2006.01)	C12P 19/34 A	4B064
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-561062 (P2016-561062)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月25日 (2014.12.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月16日 (2016.8.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2014/094914
 (87) 国際公開番号 W02015/096763
 (87) 国際公開日 平成27年7月2日 (2015.7.2)
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2013/090425
 (32) 優先日 平成25年12月25日 (2013.12.25)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 516190264
 コヨーテ バイオサイエンス カンパニー
 , リミテッド
 中華人民共和国 100083 ベイジン
 , ハイディエン, チュアンイエ ゾン
 ル ナンバー36 5ティーエイチ フロ
 ア, ルーム 511
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸増幅のための方法およびシステム

(57) 【要約】

本開示は、核酸試料を増幅および分析するための方法およびシステムを提供する。一実施形態では、本方法は、(a) 生体試料と、デオキシリボ核酸 (DNA) 増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) 逆転写酵素、(ii) DNAポリメラーゼ、および(iii) 標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと、(b) 反応器中の反応混合物を、各サイクルが、(i) 60秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 60秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、標的RNAの存在を示す増幅DNA産物を生成し、それによって標的RNAを増幅することを含む。

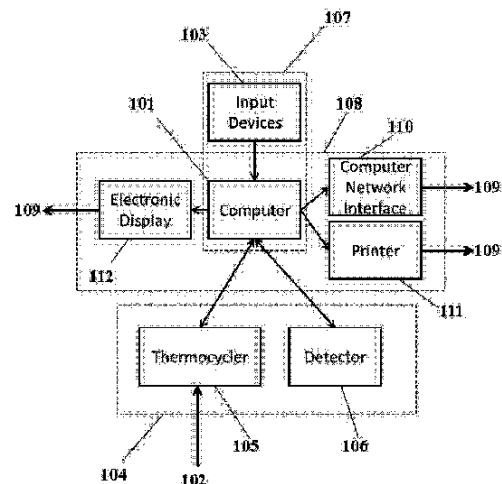


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸 (RNA) を増幅する方法であって、

(a) 前記生体試料と、デオキシリボ核酸 (DNA) 増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) 逆転写酵素、(ii) DNA ポリメラーゼ、および (iii) 前記標的 RNA のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと、

(b) 前記反応器中の前記反応混合物を、各サイクルが、(i) 60 秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で前記反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 60 秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で前記反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、前記標的 RNA の存在を示す増幅 DNA 産物を生成し、それによって前記標的 RNA を増幅することと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記試薬が、前記増幅 DNA 産物の存在を示す検出可能なシグナルを生じるレポーター剤をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記検出可能なシグナルの強度が、前記増幅 DNA 産物または標的 RNA の量に比例する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記レポーター剤が色素である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記プライマーセットが、1 種または複数のプライマーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記セットが、前記標的 RNA に相補的である鎖を生成するための第 1 のプライマーを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的 RNA がウイルス RNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記反応器が、ボディおよびキャップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記反応器が、ピペットチップのフォーマットを採る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記反応器が、反応器のアレイの一部である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記反応器が、流体操作デバイスによって個々にアドレス可能である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記反応器が、2 つまたはそれ超の熱ゾーンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記変性化温度が、約 90 ~ 100 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記変性化温度が、約 92 ~ 95 である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記伸長温度が、約 35 ~ 72 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記伸長温度が、約 45 ~ 65 である、請求項 15 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 17】
前記変性化継続時間が、30秒未満またはそれに等しい、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 18】
前記伸長継続時間が、30秒未満またはそれに等しい、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 19】
前記標的RNAが、ステップ(a)の前に濃縮にかけられていない、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 20】
ステップ(a)において、前記生体試料が、RNA抽出にかけられていない、請求項1に記載の方法。 10
- 【請求項 21】
ステップ(a)の前またはその間に前記反応器に溶解剤を添加するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 22】
前記生体試料が、前記対象に由来する生体液である、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記増幅することが、40未満のサイクル閾値(Ct)で、前記生体試料中の前記標的RNAの存在を示す検出可能量のDNA産物を生じる、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 24】
前記増幅することが、10分またはそれ未満の時間で前記生体試料中の前記標的RNAの存在を示す検出可能量のDNA産物を生じる、請求項1に記載の方法。 20
- 【請求項 25】
前記反応器が封じられている、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記DNA増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項1に記載の方法。
- 【請求項 27】
前記ポリメラーゼ連鎖反応が、ネステッドポリメラーゼ連鎖反応である、請求項26に記載の方法。
- 【請求項 28】
前記標的RNAが、前記プライマーエクステンション反応の1つまたは複数のサイクル中に前記生体試料から放出される、請求項1に記載の方法。 30
- 【請求項 29】
対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸(RNA)を増幅する方法であって、
(a)前記対象から得られた前記生体試料を受け取ることと；
(b)前記生体試料と、逆転写増幅、および任意選択でデオキシリボ核酸(DNA)増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)逆転写酵素、および(ii)前記標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；
(c)前記反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、前記生体試料中の前記標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を得ることと； 40
(d)(c)の前記量の増幅DNA産物を検出することと；
(e)レシピエントに前記量の増幅DNA産物に関する情報を出力することと
を含み、
(a)~(e)を完了するための時間は、約30分未満またはそれに等しい、方法。
- 【請求項 30】
前記レシピエントが、治療医師、製薬会社、または前記対象である、請求項29に記載の方法。
- 【請求項 31】 50

(b) が DNA 増幅を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

(c) が、30 サイクルまたはそれ未満で行われる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記情報が、レポートとして出力される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記情報が、電子ディスプレイに出力される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 35】

前記時間が、10 分未満またはそれに等しい、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 36】

対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅する方法であって、

(a) 前記生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) デオキシリボ核酸 (DNA) ポリメラーゼ、および任意選択で逆転写酵素、ならびに (ii) 前記標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；

(b) 前記反応器中の前記反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i) 変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で前記反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で前記反応混合物をインキュベートする 2 つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、前記変性化条件および / または前記伸長条件に関して前記複数のうちの少なくとも 1 つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、前記生体試料中の前記標的核酸の存在を示す増幅産物を生成することを含む、方法。

【請求項 37】

前記標的核酸がリボ核酸である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記試薬が、デオキシリボ核酸増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

(b) において、前記増幅産物が、増幅デオキシリボ核酸産物である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

(a) において、前記生体試料が精製されていない、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

(a) において、前記生体試料が濃縮されている、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

(a) において、前記生体試料が希釈されている、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 43】

(b) の前に前記標的核酸を 1 つまたは複数の変性化条件に付すことをさらに含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 44】

前記 1 つまたは複数の変性化条件が、変性化温度プロファイルおよび変性化剤から選択される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記複数のシリーズのプライマーエクステンション反応の第 1 のシリーズと第 2 のシリーズとの間で前記標的核酸を 1 つまたは複数の変性化条件に付すことをさらに含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 46】

前記個々のシリーズが、変性化温度と伸長温度との間のランピングレート、変性化温度、変性化継続時間、伸長温度、および伸長継続時間の少なくともいずれか 1 つに関して異

10

20

30

40

50

なる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 47】

前記個々のシリーズが、変性化温度と伸長温度との間のランピングレート、変性化温度、変性化継続時間、伸長温度、および伸長継続時間の少なくともいずれか 2 つに関して異なる、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記複数のシリーズのプライマーエクステンション反応が、第 1 のシリーズおよび第 2 のシリーズを含み、前記第 1 のシリーズは、10 超のサイクルを含み、前記第 1 のシリーズの各サイクルは、(i) 前記反応混合物を約 92 ~ 95 で 30 秒以下にわたってインキュベートし、その後、(ii) 前記反応混合物を約 35 ~ 65 で 1 分以下にわたってインキュベートすることを含み、前記第 2 のシリーズは、10 超のサイクルを含み、前記第 2 のシリーズの各サイクルは、(i) 前記反応混合物を約 92 ~ 95 で 30 秒以下にわたってインキュベートし、その後、(ii) 前記反応混合物を約 40 ~ 60 で 1 分以下にわたってインキュベートすることを含む、請求項 36 に記載の方法。

10

【請求項 49】

前記複数のシリーズのプライマーエクステンション反応が、同等の変性化および伸長条件下での単一のシリーズのプライマーエクステンション反応と比較して、より低いサイクル閾値で前記生体試料中の前記標的核酸の存在を示す検出可能量の増幅産物を生じる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 50】

(b) の前に、90 ~ 100 の予熱温度で、10 分以下の予熱継続時間にわたって前記生体試料を予熱することをさらに含む、請求項 36 に記載の方法。

20

【請求項 51】

前記予熱継続時間が 1 分以下である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸 (RNA) を増幅するためのシステムであって、

(a) 前記生体試料中の前記標的 RNA を増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；

(b) 増幅モジュールであって、前記ユーザーリクエストに応じて；

前記生体試料と、デオキシリボ核酸 (DNA) 増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) 逆転写酵素、(ii) DNA ポリメラーゼ、および (iii) 前記標的 RNA のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；

30

前記反応器中の前記反応混合物を、各サイクルが、(i) 60 秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で前記反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 60 秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で前記反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、前記標的 RNA の存在を示す増幅 DNA 産物を生成し、それによって前記標的 RNA を増幅する増幅モジュール；ならびに

40

(c) 前記増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、レシピエントに前記標的 RNA または前記 DNA 産物に関する情報を出力する、出力モジュールを含む、システム。

【請求項 53】

対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸 (RNA) を増幅するためのシステムであって、

(a) 前記生体試料中の前記標的 RNA を増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；

(b) 増幅モジュールであって、前記ユーザーリクエストに応じて；

50

(i) 前記対象から得られた前記生体試料と、逆転写増幅および任意選択でデオキシリボ核酸 (D N A) 増幅を行うのに必要な試薬であって、(1) 逆転写酵素および(2) 前記標的 R N A のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；

(i i) 前記反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、前記生体試料中の前記標的 R N A の存在を示す検出可能量の増幅 D N A 産物を得；

(i i i) (i i i) の前記量の増幅 D N A 産物を検出し；

(i v) レシピエントに前記量の増幅 D N A 産物に関する情報を出力する増幅モジュールであって、

(i) ~ (i v) を完了するための時間は、約 3 0 分未満またはそれに等しい、増幅モジュール；ならびに

(c) 前記増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、前記情報をレシピエントに伝達する、出力モジュールを含む、システム。

【請求項 5 4】

対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅するためのシステムであって、

(a) 前記生体試料中の前記標的核酸を増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；

(b) 増幅モジュールであって、前記ユーザーリクエストに応じて；

前記生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) D N A ポリメラーゼおよび任意選択で逆転写酵素、ならびに(i i) 前記標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；

前記反応器中の前記反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i) 変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で前記反応混合物をインキュベートし、その後、(i i) 伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で前記反応混合物をインキュベートする 2 つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、前記変性化条件および/または前記伸長条件に関して前記複数のうちの少なくとも 1 つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、前記生体試料中の前記標的核酸の存在を示す増幅産物を生成する、増幅モジュール；ならびに

(c) 前記増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、前記標的核酸または前記増幅産物に関する情報をレシピエントに出力する、出力モジュールを含む、システム。

【請求項 5 5】

1 つまたは複数のコンピュータープロセッサによって実行されると、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸 (R N A) を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピューター可読媒体であって、前記方法は、

(a) 前記生体試料と、デオキシリボ核酸 (D N A) 増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) 逆転写酵素、(i i) D N A ポリメラーゼ、および(i i i) 前記標的 R N A のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと、

(b) 前記反応器中の前記反応混合物を、各サイクルが、(i) 6 0 秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で前記反応混合物をインキュベートし、その後、(i i) 6 0 秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で前記反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、前記標的 R N A の存在を示す増幅 D N A 産物を生成し、それによって前記標的 R N A を増幅することと

を含む、コンピューター可読媒体。

【請求項 5 6】

1 つまたは複数のコンピュータープロセッサによって実行されると、対象から直接得

10

20

30

40

50

られる生体試料中に存在する標的リボ核酸 (RNA) を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピューター可読媒体であって、前記方法は、

(a) 前記対象から得られた前記生体試料を受け取ることと；

(b) 前記生体試料と、逆転写増幅、および任意選択でデオキシリボ核酸 (DNA) 増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) 逆転写酵素、および(ii) 前記標的 RNA のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；

(c) 前記反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、前記生体試料中の前記標的 RNA の存在を示す検出可能量の増幅 DNA 産物を得ることと；

(d) (c) の前記量の DNA 産物を検出することと；

(e) レシピエントに前記量の DNA 産物に関する情報を出力することとを含み、

(a) ~ (e) を完了するための時間は、約 30 分未満またはそれに等しい、コンピューター可読媒体。

【請求項 57】

1 つまたは複数のコンピュータープロセッサによって実行されると、対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピューター可読媒体であって、前記方法は、

(a) 前記生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) DNA ポリメラーゼ、および任意選択で逆転写酵素、ならびに(ii) 前記標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；

(b) 前記反応器中の前記反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i) 変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で前記反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で前記反応混合物をインキュベートする 2 つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、前記変性化条件および / または前記伸長条件に関して前記複数のうちの少なくとも 1 つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、前記生体試料中の前記標的核酸の存在を示す増幅産物を生成することとを含む、コンピューター可読媒体。

【請求項 58】

対象から得られる生体試料中の標的核酸を増幅するためのシステムであって、

前記生体試料中の前記標的核酸を増幅する増幅プロトコールを実行するのにユーザーがアクセス可能なグラフィカル要素を表示するユーザーインターフェースを含む電子ディスプレイスクリーン；および

前記電子ディスプレイスクリーンにカップリングされ、前記ユーザーが前記グラフィカル要素を選択すると前記増幅プロトコールを実行するようにプログラムされたコンピュータープロセッサであって、前記増幅プロトコールは、

前記生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬とを含む反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i) 変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で前記反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で前記反応混合物をインキュベートする 2 つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、前記変性化条件および / または前記伸長条件に関して前記複数のうちの少なくとも 1 つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、前記生体試料中の前記標的核酸の存在を示す増幅産物を生成することを含む、コンピュータープロセッサを含む、システム。

【請求項 59】

前記増幅プロトコールが、前記標的核酸のためのプライマーセットを選択することをさ

10

20

30

40

50

らに含む、請求項 5 8 に記載のシステム。

【請求項 6 0】

前記試薬が、(i)デオキシリボ核酸(DNA)ポリメラーゼおよび任意選択で逆転写酵素、ならびに(i i)前記標的核酸のためのプライマーセットを含む、請求項 5 8 に記載のシステム。

【請求項 6 1】

前記ユーザーインターフェースが、複数のグラフィカル要素を表示し、前記グラフィカル要素のそれぞれが、複数の増幅プロトコールの中の所与の増幅プロトコールに関連している、請求項 5 8 に記載のシステム。

【請求項 6 2】

前記グラフィカル要素のそれぞれが、疾患と関連しており、前記複数の増幅プロトコールの中の所与の増幅プロトコールが、前記対象における前記疾患の存在をアッセイすることに向けられている、請求項 6 1 に記載のシステム。

【請求項 6 3】

前記疾患が、ウイルスと関連している、請求項 6 2 に記載のシステム。

【請求項 6 4】

前記ウイルスが RNA ウイルスである、請求項 6 3 に記載のシステム。

【請求項 6 5】

前記ウイルスが DNA ウイルスである、請求項 6 3 に記載のシステム。

【請求項 6 6】

前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス I (HIV I)、ヒト免疫不全ウイルス II (HIV II)、オルソミクソウイルス、エボラウイルス、デングウイルス、インフルエンザウイルス、ヘペウイルス、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、D 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、G 型肝炎ウイルス、エプスタイン - バーウイルス、単核球症ウイルス、サイトメガロウイルス、SARS ウイルス、西ナイル熱ウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、アデノウイルス、および水痘ウイルスからなる群から選択される、請求項 6 3 に記載のシステム。

【請求項 6 7】

前記インフルエンザウイルスが、H1N1 ウイルス、H3N2 ウイルス、H7N9 ウイルス、および H5N1 ウイルスからなる群から選択される、請求項 6 6 に記載のシステム。

【請求項 6 8】

前記アデノウイルスが、アデノウイルス 5 5 型 (ADV 5 5) またはアデノウイルス 7 型 (ADV 7) である、請求項 6 6 に記載のシステム。

【請求項 6 9】

前記 C 型肝炎ウイルスが、アーマード RNA - C 型肝炎ウイルス (RNA - HCV) である、請求項 6 6 に記載のシステム。

【請求項 7 0】

前記疾患が、病原性細菌または病原性原虫と関連している、請求項 6 1 に記載のシステム。

【請求項 7 1】

前記病原性細菌が、Mycobacterium tuberculosis である、請求項 6 8 に記載のシステム。

【請求項 7 2】

前記病原性原虫が Plasmodium である、請求項 6 8 に記載のシステム。

【請求項 7 3】

前記標的核酸が、疾患と関連している、請求項 5 8 に記載のシステム。

【請求項 7 4】

前記増幅プロトコールが、前記増幅産物の存在に基づいて前記疾患の存在をアッセイすることに向けられている、請求項 7 3 に記載のシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 75】

前記疾患が、ウイルスと関連している、請求項 73 に記載のシステム。

【請求項 76】

前記ウイルスが RNA ウイルスである、請求項 75 に記載のシステム。

【請求項 77】

前記ウイルスが DNA ウイルスである、請求項 75 に記載のシステム。

【請求項 78】

前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス I (HIV I)、ヒト免疫不全ウイルス II (HIV II)、オルソミクソウイルス、エボラウイルス、デングウイルス、インフルエンザウイルス、ヘペウイルス、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、D 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、G 型肝炎ウイルス、エプスタイン - バーウイルス、単核球症ウイルス、サイトメガロウイルス、SARS ウイルス、西ナイル熱ウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、アデノウイルス、および水痘ウイルスからなる群から選択される、請求項 75 に記載のシステム。

10

【請求項 79】

前記インフルエンザウイルスが、H1N1 ウイルス、H3N2 ウイルス、H7N9 ウイルス、および H5N1 ウイルスからなる群から選択される、請求項 78 に記載のシステム。

【請求項 80】

前記アデノウイルスが、アデノウイルス 55 型 (ADV55) またはアデノウイルス 7 型 (ADV7) である、請求項 78 に記載のシステム。

20

【請求項 81】

前記 C 型肝炎ウイルスが、アーマード RNA - C 型肝炎ウイルス (RNA - HCV) である、請求項 78 に記載のシステム。

【請求項 82】

前記疾患が、病原性細菌または病原性原虫と関連している、請求項 73 に記載のシステム。

【請求項 83】

前記病原性細菌が、Mycobacterium tuberculosis である、請求項 82 に記載のシステム。

30

【請求項 84】

前記病原性原虫が Plasmodium である、請求項 82 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2013 年 12 月 25 日に出願された特許協力条約出願第 PCT/CN2013/090425 号に基づく優先権を主張し、この出願は、すべての目的についてその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

40

【0002】

核酸増幅法は、生体試料などの複合混合物から目的の核酸の選択された増幅および識別を可能にする。生体試料中の核酸を検出するために、生体試料は、典型的には、生体試料の他の成分ならびに核酸および/または増幅を妨害し得る他の作用物質から核酸を単離するために処理される。生体試料から目的の核酸を単離した後、目的の核酸を、例えば、サーマルサイクリングベース手法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)）などの当技術分野で公知の増幅法を介して増幅することができる。目的の核酸を増幅した後、増幅の産物を検出することができ、検出の結果を最終使用者が解明することができる。しかし、核酸を増幅する前の生体試料からの核酸の抽出は、時間のかかるものであり得、全体としてプロセスの時間効率を低減する。

50

【0003】

ポイントオブケア（POC）検査は、劣った実験室でのインフラストラクチャを伴ったリソースの限られた設定において、または実験室結果の受領の遅延および患者をフォローアップすることの潜在的な複雑化がある遠隔地において、感染性疾患の検出および管理を改善する潜在性を有する。POC検査は、最先端の医療施設を、1回の訪問中に患者にサンプルツーンサー結果を届けることをより可能にすることもできる。しかし、POCの方法およびデバイスの非効率性は、実現することができることを制限する。例えば、複合試料タイプ（例えば、生体試料）からの核酸（例えば、病原体の）調製は、多数の処理ステップおよび後続の検査を手作業で実施するのに、専用の実験室スペースで高度に熟練した人員を必然的に伴い、結果の報告は、数時間後、または数日後にさえ行われる。

10

【0004】

したがって、複合試料タイプから核酸を分析するための迅速な、正確な方法およびデバイスの必要性が存在する。このような方法およびデバイスは、例えば、疾患の核酸を介して検出可能な疾患の速いサンプルツーンサー検出および管理を実現することにおいて有用であり得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、RNAおよびDNA分子などの核酸を効率的に増幅するための方法およびシステムを提供する。増幅核酸産物は、迅速に、かつ良好な感度で検出することができる。

20

【0006】

一態様では、本開示は、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸（RNA）を増幅する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、（a）生体試料と、デオキシリボ核酸（DNA）増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、（i）逆転写酵素、（ii）DNAポリメラーゼ、および（iii）標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと、（b）反応器中の反応混合物を、各サイクルが、（i）60秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で反応混合物をインキュベートし、その後、（ii）60秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、標的RNAの存在を示す増幅DNA産物を生成し、それによって標的RNAを増幅することを含む。別の実施形態では、本方法は、（a）対象から得られた生体試料を受け取ることと；（b）生体試料と、逆転写増幅、および任意選択でデオキシリボ核酸（DNA）増幅を行うのに必要な試薬であって、（i）逆転写酵素、および（ii）標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；（c）反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を得ることと；（d）（c）のその量の増幅DNA産物を検出することと；レシピエントにその量の増幅DNA産物に関する情報を出力することとを含み、（a）～（e）を完了するための時間は、約30分未満またはそれに等しい。一部の実施形態では、時間は、20分未満もしくはそれに等しく、10分未満もしくはそれに等しく、または5分未満もしくはそれに等しい。

30

40

【0007】

一部の実施形態では、試薬は、増幅DNA産物の存在を示す検出可能なシグナルを生じるレポーター剤をさらに含む。一部の実施形態では、検出可能なシグナルの強度は、増幅DNA産物または標的RNAの量に比例する。一部の実施形態では、レポーター剤は、色素である。一部の実施形態では、プライマーセットは、1種または複数のプライマーを含む。一部の実施形態では、プライマーセットは、標的RNAに相補的である鎖を生成するための第1のプライマーを含む。一部の実施形態では、プライマーセットは、標的RNAの少なくとも一部に相補的であるDNA産物に相補的である鎖を生成するための第2のプライマーを含む。一部の実施形態では、標的RNAは、ウイルスRNAである。一部の実

50

施形態では、ウイルスRNAは、対象に対して病原性である。一部の実施形態では、ウイルスRNAは、HIV I、HIV II、エボラウイルス、デングウイルス、オルソミクソウイルス、ヘペウイルス、ならびにノまたはA、B、C（例えば、アーマード（armored）RNA-HCVウイルス）、D、およびE型肝炎のウイルスからなる群から選択される。

【0008】

一部の実施形態では、反応器は、ボディおよびキャップを含む。一部の実施形態では、キャップは、脱着可能である。一部の実施形態では、反応器は、ピペットチップのフォーマットを採る。一部の実施形態では、反応器は、反応器のアレイの一部である。一部の実施形態では、反応器のアレイの反応器部分は、流体操作デバイスによって個々にアドレス可能である。一部の実施形態では、反応器は、2つまたはそれ超の熱ゾーンを含む。一部の実施形態では、反応器は、封じられており、任意選択で密閉されている。

10

【0009】

一部の実施形態では、変性化温度は、約90～100、または約92～95である。一部の実施形態では、伸長温度は、約35～72、または約45～65である。一部の実施形態では、変性化継続時間は、30秒未満またはそれに等しい。一部の実施形態では、伸長継続時間は、30秒未満またはそれに等しい。

【0010】

一部の実施形態では、標的RNAは、生体試料と、デオキシリボ核酸（DNA）増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬とを含む反応器を準備する前に濃縮にかけられていない。一部の実施形態では、生体試料は、生体試料と、デオキシリボ核酸（DNA）増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬とを含む反応器を準備するとき、RNA抽出にかけられていない。一部の実施形態では、本方法は、生体試料と、デオキシリボ核酸（DNA）増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬とを含む反応器を準備する前、またはそれを準備している間に反応器に溶解剤を添加するステップをさらに含む。一部の実施形態では、溶解剤は、緩衝液を含む。一部の実施形態では、標的RNAは、プライマーエクステンション反応の1つまたは複数のサイクル中に生体試料から放出される。

20

【0011】

一部の実施形態では、生体試料は、対象に由来する生体液である。一部の実施形態では、生体試料は、呼気、血液、尿、糞便、唾液、脳脊髄液、および汗からなる群から選択される。

30

【0012】

一部の実施形態では、DNA増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応を介するものである。一部の実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応は、ネステッドポリメラーゼ連鎖反応である。一部の実施形態では、DNA増幅は、線形増幅である。一部の実施形態では、増幅することにより、50未満、40未満、30未満、20未満、10未満、または5未満のサイクル閾値（Ct）で生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量のDNA産物が生じる。一部の実施形態では、増幅することにより、30分もしくはそれ未満、20分もしくはそれ未満、または10分もしくはそれ未満の時間で生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量のDNA産物が生じる。一部の実施形態では、増幅は、非エマルジョンベースである。

40

【0013】

一部の実施形態では、レシピエントは、治療医師、製薬会社、または対象である。一部の実施形態では、生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を得るために反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付すことは、30サイクルもしくはそれ未満、20サイクルもしくはそれ未満、または10サイクルもしくはそれ未満内で行われる。一部の実施形態では、検出は、光学的検出、静電的検出、または電気化学的検出である。一部の実施形態では、本方法は、生体試料と、逆転写増幅およびデオキシリボ核酸（DNA）増幅を行うのに必要な試薬とを含む反応器を準備することを含む。

50

【0014】

一部の実施形態では、情報は、レポートとして出力される。一部の実施形態では、レポートは、電子レポートである。一部の実施形態では、情報は、電子ディスプレイに出力される。

【0015】

別の態様では、本開示は、対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅する方法を提供する。本方法は、(a)生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)デオキシリボ核酸(DNA)ポリメラーゼ、および任意選択で逆転写酵素、ならびに(ii)標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；(b)反応器中の反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i)変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的核酸の存在を示す増幅産物を生成することを含む。

10

【0016】

一部の実施形態では、標的核酸は、リボ核酸である。一部の実施形態では、試薬は、デオキシリボ核酸増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要である。一部の実施形態では、増幅産物は、増幅デオキシリボ核酸産物である。一部の実施形態では、生体試料は、(a)において精製されない。一部の実施形態では、本方法は、(b)の前に標的核酸を1つまたは複数の変性化条件に付すことをさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の変性化条件は、変性化温度プロファイルおよび変性化剤から選択される。

20

【0017】

一部の実施形態では、生体試料は、希釈される。これは、阻害を最小限にすることを助ける場合がある。一部の実施形態では、生体試料は、濃縮される。これは、感度を増大させ、または別段に改善することを助ける場合がある。

【0018】

一部の実施形態では、本方法は、標的核酸を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応の第1のシリーズと第2のシリーズとの間に1つまたは複数の変性化条件に付すことをさらに含む。一部の実施形態では、個々のシリーズは、変性化温度と伸長温度との間のランピングレート、変性化温度、変性化継続時間、伸長温度、および伸長継続時間のうちの少なくとも任意の1つ、少なくとも任意の2つ、少なくとも任意の3つ、少なくとも任意の4つに関して異なる。一部の実施形態では、個々のシリーズは、変性化温度と伸長温度との間のランピングレート、変性化温度、変性化継続時間、伸長温度、および伸長継続時間に関して異なる。

30

【0019】

一部の実施形態では、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応は、第1のシリーズおよび第2のシリーズを含み、第1のシリーズは、10超のサイクルを含み、第1のシリーズの各サイクルは、(i)反応混合物を約92 ~ 95 で30秒以下にわたってインキュベートし、その後、(ii)反応混合物を約35 ~ 65 で1分以下にわたってインキュベートすることを含み、第2のシリーズは、10超のサイクルを含み、第2のシリーズの各サイクルは、(i)反応混合物を約92 ~ 95 で30秒以下にわたってインキュベートし、その後、(ii)反応混合物を約40 ~ 60 で1分以下にわたってインキュベートすることを含む。

40

【0020】

一部の実施形態では、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応は、同等の変性化および伸長条件下での単一のシリーズのプライマーエクステンション反応と比較して、より低いサイクル閾値で生体試料中の標的核酸の存在を示す検出可能量の増幅産物を生

50

じる。一部の実施形態では、本方法は、(b)の前に、90 ~ 100 の予熱温度で、10分、2分、または1分以下の予熱継続時間にわたって生体試料を予熱することをさらに含む。一部の実施形態では、予熱温度は、92 ~ 95 である。一部の実施形態では、予熱継続時間は、約30秒以下である。

【0021】

別の態様では、本開示は、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸 (RNA) を増幅するシステムを提供する。一実施形態では、システムは、(a) 生体試料中の標的RNAを増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；(b) ユーザーリクエストに応じて：生体試料と、デオキシリボ核酸 (DNA) 増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) 逆転写酵素、(ii) DNAポリメラーゼ、および(iii) 標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；反応器中の反応混合物を、各サイクルが、(i) 変性化温度で60秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 伸長温度で60秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、標的RNAの存在を示す増幅DNA産物を生成し、それによって標的RNAを増幅する増幅モジュール；ならびに(c) 増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、レシピエントに標的RNAまたはDNA産物に関する情報を出力する、出力モジュールを含む。

10

【0022】

別の実施形態では、システムは、(a) 生体試料中の標的RNAを増幅するためにユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；(b) ユーザーリクエストに応じて：(i) 対象から得られた生体試料と、逆転写増幅および任意選択でデオキシリボ核酸 (DNA) 増幅を行うのに必要な試薬であって、(1) 逆転写酵素、および(2) 標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；(ii) 反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を生じ；(iii) (iii) のその量の増幅DNA産物を検出し；(iv) レシピエントにその量の増幅DNA産物に関する情報を出力する増幅モジュールであって、(i) ~ (iv) を完了するための時間は、約30分未満またはそれに等しい、増幅モジュール；ならびに(c) 増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、レシピエントに情報を伝達する、出力モジュールを含む。一部の実施形態では、出力モジュールは、電子ディスプレイである。一部の実施形態では、電子ディスプレイは、ユーザーインターフェースを含む。一部の実施形態では、出力モジュールは、コンピューターネットワークに作動可能にカップリングした通信インターフェースである。

20

30

【0023】

別の態様では、本開示は、対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅するためのシステムを提供する。システムは、(a) 生体試料中の標的核酸を増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；(b) ユーザーリクエストに応じて：生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i) DNAポリメラーゼ、および任意選択で逆転写酵素、ならびに(ii) 標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；反応器中の反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i) 変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii) 伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的核酸の存在を示す増幅産物を生成する増幅モジュール；ならびに(c) 増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、レシピエントに核酸または増

40

50

幅産物に関する情報を出力する、出力モジュールを含む。

【0024】

別の態様では、本開示は、1つまたは複数のコンピュータプロセッサによって実行されると、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸(RNA)を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピュータ可読媒体を提供する。一実施形態では、本方法は、(a)反応混合物を得るために、生体試料と、デオキシリボ核酸(DNA)増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)逆転写酵素、(ii)DNAポリメラーゼ、および(iii)標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備することと、(b)反応器中の反応混合物を、各サイクルが、(i)60秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)60秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、標的RNAの存在を示す増幅DNA産物を生成し、それによって標的RNAを増幅することを含む。

10

【0025】

別の実施形態では、本方法は、(a)対象から得られた生体試料を受け取ることと；(b)反応混合物を得るために、生体試料と、逆転写増幅、および任意選択でデオキシリボ核酸(DNA)増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)逆転写酵素、および(ii)標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備することと；(c)反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を得ることと；(d)(c)のその量のDNA産物を検出することと；(e)レシピエントにその量のDNA産物に関する情報を出力することとを含み、(a)~(e)を完了するための時間の量は、約30分未満またはそれに等しい。

20

【0026】

別の態様では、本開示は、1つまたは複数のコンピュータプロセッサによって実行されると、対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピュータ可読媒体を提供する。一実施形態では、本方法は、(a)生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)DNAポリメラーゼおよび任意選択で逆転写酵素、ならびに(ii)標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；(b)反応器中の反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i)変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、標的核酸に由来する増幅産物を生成することを含む。

30

【0027】

本開示の追加の態様は、対象から得られる生体試料中の標的核酸を増幅するためのシステムを提供する。システムは、生体試料中の標的核酸を増幅する増幅プロトコルを実行するのにユーザーがアクセス可能なグラフィカル要素を表示するユーザーインターフェースを含む電子ディスプレイスクリーンを含み得る。システムは、電子ディスプレイスクリーンにカップリングされ、ユーザーがグラフィカル要素を選択すると増幅プロトコルを実行するようにプログラムされたコンピュータプロセッサも含み得る。増幅プロトコルは、生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬とを含む反応混合物を複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的核酸の存在を示す増幅産物を生成することを含むことができる。プライマーエクステンション反応の各シリーズは、変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長

40

50

条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含むことができる。個々のシリーズは、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なる場合がある。

【0028】

一部の実施形態では、増幅プロトコールは、標的核酸のためのプライマーセットを選択することをさらに含むことができる。一部の実施形態では、試薬は、デオキシリボ核酸(DNA)ポリメラーゼ、任意選択の逆転写酵素、および標的核酸のためのプライマーセットを含み得る。一部の実施形態では、ユーザーインターフェースは、複数のグラフィカル要素を表示することができる。グラフィカル要素のそれぞれは、複数の増幅プロトコールの中の所与の増幅プロトコールに関連していることができる。一部の実施形態では、グラフィカル要素のそれぞれは、疾患と関連している場合がある。複数の増幅プロトコールの中の所与の増幅プロトコールは、対象における疾患の存在をアッセイすることに向けられ得る。一部の実施形態では、疾患は、ウイルス、例えば、RNAウイルスまたはDNAウイルスなどに関連している場合がある。一部の実施形態では、ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルスI(HIV I)、ヒト免疫不全ウイルスII(HIV II)、オルソミクソウイルス、エボラウイルス、デングウイルス、インフルエンザウイルス、ヘペウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、単核球症ウイルス、サイトメガロウイルス、SARSウイルス、西ナイル熱ウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、アデノウイルス、および水痘ウイルスからなる群から選択され得る。一部の実施形態では、インフルエンザウイルスは、H1N1ウイルス、H3N2ウイルス、H7N9ウイルス、およびH5N1ウイルスからなる群から選択され得る。一部の実施形態では、アデノウイルスは、アデノウイルス55型(ADV55)またはアデノウイルス7型(ADV7)であり得る。一部の実施形態では、C型肝炎ウイルスは、アーマードRNA-C型肝炎ウイルス(RNA-HCV)であり得る。一部の実施形態では、疾患は、病原性細菌(例えば、Mycobacterium tuberculosis)または病原性原虫(例えば、Plasmodium)と関連している場合がある。

10

20

【0029】

一部の実施形態では、標的核酸は、疾患と関連している場合がある。一部の実施形態では、増幅プロトコールは、増幅産物の存在に基づいて疾患の存在をアッセイすることに向けられ得る。一部の実施形態では、疾患は、ウイルス、例えば、RNAウイルスまたはDNAウイルスなどに関連している場合がある。一部の実施形態では、ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルスI(HIV I)、ヒト免疫不全ウイルスII(HIV II)、オルソミクソウイルス、エボラウイルス、デングウイルス、インフルエンザウイルス、ヘペウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、単核球症ウイルス、サイトメガロウイルス、SARSウイルス、西ナイル熱ウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、アデノウイルス、および水痘ウイルスからなる群から選択され得る。一部の実施形態では、インフルエンザウイルスは、H1N1ウイルス、H3N2ウイルス、H7N9ウイルス、およびH5N1ウイルスからなる群から選択され得る。一部の実施形態では、アデノウイルスは、アデノウイルス55型(ADV55)またはアデノウイルス7型(ADV7)であり得る。一部の実施形態では、C型肝炎ウイルスは、アーマードRNA-C型肝炎ウイルス(RNA-HCV)であり得る。一部の実施形態では、疾患は、病原性細菌(例えば、Mycobacterium tuberculosis)または病原性原虫(例えば、Plasmodium)と関連している場合がある。

30

40

【0030】

本開示の追加の態様および利点は、本開示の単に例示的な実施形態が示され、記載されている以下の詳細な説明から当業者に直ちに明らかとなる。認識されることになるように

50

、本開示は、本開示から逸脱することなく、他のおよび異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、様々な明白な観点において改変が可能である。したがって、図面および記載は、本質的に例示的であると見なされるべきであり、限定的であると見なされるべきでない。

【0031】

参照による組込み

本明細書で述べられるすべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許または特許出願が参照により組み込まれるように具体的に、かつ個々に示されているのと同じ程度に参照により本明細書に組み込まれている。

【0032】

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲における特定性ととも示されている。本発明の特徴および利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用されている例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明、および添付の図面（本明細書でまた、「図（Figure）」および「図（Fig）」）を参照することによって得られることになる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は、例示的なシステムを表す概略図である。

【0034】

【図2】図2 A および 2 B は、実施例 1 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0035】

【図3】図3 A および 3 B は、実施例 1 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0036】

【図4】図4 A および 4 B は、実施例 2 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0037】

【図5】図5は、実施例3に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0038】

【図6】図6 A および 6 B は、実施例 4 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0039】

【図7】図7 A および 7 B は、実施例 4 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0040】

【図8】図8 A および 8 B は、実施例 4 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0041】

【図9】図9 A および 9 B は、実施例 4 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0042】

【図10】図10 A および 10 B は、実施例 4 に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0043】

【図11】図11は、実施例5に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0044】

【図12】図12は、実施例5に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0045】

10

20

30

40

50

【図13】図13は、実施例7に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0046】

【図14】図14は、実施例9に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0047】

【図15】図15Aおよび15Bは、実施例10に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0048】

【図16】図16Aおよび16Bは、実施例10に記載した例示的な核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

10

【0049】

【図17】図17は、実施例11に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0050】

【図18】図18は、実施例12に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0051】

【図19A】図19Aおよび図19Bは、実施例13に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【図19B】図19Aおよび図19Bは、実施例13に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

20

【0052】

【図20】図20は、実施例14に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0053】

【図21】図21は、実施例15に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0054】

【図22A】図22Aおよび図22Bは、実施例17に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【図22B】図22Aおよび図22Bは、実施例17に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0055】

30

【図23A】図23A、図23B、および図23Cは、実施例18に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【図23B】図23A、図23B、および図23Cは、実施例18に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【図23C】図23A、図23B、および図23Cは、実施例18に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0056】

【図24A】図24Aおよび図24Bは、実施例19に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【図24B】図24Aおよび図24Bは、実施例19に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

40

【0057】

【図25A】図25Aおよび図25Bは、実施例19に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【図25B】図25Aおよび図25Bは、実施例19に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0058】

【図26A】図26Aおよび図26Bは、実施例20に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【図26B】図26Aおよび図26Bは、実施例20に記載した核酸増幅反応の結果を表

50

すグラフである。

【0059】

【図27】図27は、実施例21に記載した核酸増幅反応の結果を表すグラフである。

【0060】

【図28A】図28Aは、例示的なユーザーインターフェースを有する例示的な電子ディスプレイの概略図である。

【0061】

【図28B】図28Bは、例示的なユーザーインターフェースを有する例示的な電子ディスプレイの概略図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0062】

本発明の様々な実施形態を本明細書に示し、記載してきたが、このような実施形態は、単なる例として提供されていることが当業者に明白となるであろう。数多くのバリエーション、変更、および置換が、本発明から逸脱することなく当業者に想起され得る。本明細書に記載した本発明の実施形態の様々な代替案が使用され得ることが理解されるべきである。

【0063】

本明細書および特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、脈絡による別段の明らかな要求のない限り、複数形の言及を含む。例えば、用語「細胞(a cell)」は、細胞の混合物を含めた複数の細胞を含む。

20

【0064】

本明細書において、用語「増幅すること」および「増幅」は、互換的に使用され、一般に、核酸の1つまたは複数のコピーまたは「増幅産物」を生成することを指す。用語「DNA増幅」は一般に、DNA分子または「増幅DNA産物」の1つまたは複数のコピーを生成することを指す。用語「逆転写増幅」は一般に、逆転写酵素の作用を介したリボ核酸(RNA)鋳型からのデオキシリボ核酸(DNA)の生成を指す。

【0065】

本明細書において、用語「サイクル閾値」または「Ct」は一般に、増幅産物に起因する検出可能なシグナルの増大がバックグラウンドシグナルの上の統計的に有意なレベルに到達するサーモサイクリング中のサイクルを指す。

30

【0066】

本明細書において、用語「変性化」および「変性」は、互換的に使用され、一般に、二本鎖核酸のヘリックス構造の完全または部分的な巻き戻し、および一部の 경우에는、一本鎖核酸の二次構造の巻き戻しを指す。変性は、病原体の細胞壁(複数可)またはウイルスのシェルの不活化、および阻害剤のタンパク質(複数可)の不活化を含み得る。変性が起こり得る条件には、一般に変性が起こることが可能になる温度を指す「変性温度」、および一般に変性が行われることに割り当てられる時間を指す「変性継続時間」が含まれる。

【0067】

本明細書において、用語「伸長」は一般に、鋳型指向様式での核酸へのヌクレオチドの組込みを指す。伸長は、酵素、例えば、ポリメラーゼまたは逆転写酵素などの助けを介して起こり得る。伸長が起こり得る条件には、一般に伸長が起こることが可能になる温度を指す「伸長温度」、および一般に伸長が行われることに割り当てられる時間を指す「伸長継続時間」が含まれる。

40

【0068】

本明細書において、用語「核酸」は一般に、デオキシリボヌクレオチド(dNTP)もしくはリボヌクレオチド(rNTP)、またはこれらの類似体の任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。核酸は、任意の3次元構造を有し得、公知または未知の任意の機能を実施し得る。核酸の非限定的な例としては、DNA、RNA、遺伝子または遺伝子断片のコード領域または非コード領域、連鎖解析から定義される遺伝子座(loci)(遺伝子座(locus))、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トラン

50

スファ－RNA、リボソームRNA、短鎖干渉RNA (siRNA)、ショートヘアピンRNA、(shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、リボザイム、cDNA、組換え核酸、分枝核酸、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマーがある。核酸は、1つまたは複数の修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、核酸をアセンブリーする前または後に行われ得る。核酸のヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されていてもよい。核酸は、レポーター剤とのコンジュゲーションまたは結合などによって重合後にさらに修飾され得る。

【0069】

本明細書において、用語「プライマーエクステンション反応」は一般に、二本鎖核酸の変性化、変性核酸の一方または両方の鎖へのプライマーの結合、その後のプライマー（複数可）の伸長を指す。

【0070】

本明細書において、用語「反応混合物」は一般に、核酸増幅（例えば、DNA増幅、RNA増幅）を完了するのに必要な試薬を含む組成物を指し、このような試薬の非限定例としては、標的RNAまたは標的DNAに対して特異性を有するプライマーセット、RNAの逆転写から生成されるDNA、DNAポリメラーゼ、逆転写酵素（例えば、RNAの逆転写のための）、適当な緩衝液（双性イオン緩衝液を含む）、補助因子（例えば、二価および一価陽イオン）、dNTP、ならびに他の酵素（例えば、ウラシル-DNAグリコシラーゼ（UNG））などがある。一部の 경우에는、反応混合物は、1種または複数のレポーター剤も含むことができる。

【0071】

本明細書において、「レポーター剤」は一般に、その存在または非存在を増幅産物の存在を検出するのに使用することができる検出可能なシグナルを生じる組成物を指す。

【0072】

本明細書において、用語「標的核酸」は一般に、その存在、量、および/もしくは配列、またはこれらの1つもしくは複数の変化が判定されるように望まれているヌクレオチド配列を有する核酸分子の出発集団中の一核酸分子を指す。標的核酸は、DNA、RNA、およびこれらの類似体を含めた任意のタイプの核酸であり得る。本明細書において、「標的リボ核酸（RNA）」は一般に、RNAである標的核酸を指す。本明細書において、「標的デオキシリボ核酸（DNA）」は一般に、DNAである標的核酸を指す。

【0073】

本明細書において、用語「対象」は一般に、検査可能または検出可能な遺伝情報を有するエンティティまたは媒体を指す。対象は、人または個体であり得る。対象は、例えば、哺乳動物などの脊椎動物であり得る。哺乳動物の非限定的な例としては、マウス、サル、ヒト、家畜、競技動物、およびペットがある。対象の他の例としては、食物、植物、土壌、および水がある。

【0074】

一態様では、本開示は、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸（RNA）を増幅する方法を提供する。本方法は、（a）反応混合物を得るために、生体試料と、デオキシリボ核酸（DNA）増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、（i）逆転写酵素、（ii）DNAポリメラーゼ、および（iii）標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備することと、（b）反応器中の反応混合物を、各サイクルが、（i）60秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で反応混合物をインキュベートし、その後、（ii）60秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、標的RNAの存在を示す増幅DNA産物を生成し、それによって標的RNAを増幅することを含む。

【0075】

10

20

30

40

50

別の態様では、本開示は、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸（RNA）を増幅する方法を提供する。本方法は、（a）対象から得られた生体試料を受け取ることと；（b）反応混合物を得るために、生体試料と、逆転写増幅、および任意選択でデオキシリボ核酸（DNA）増幅を行うのに必要な試薬であって、（i）逆転写酵素、および（ii）標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備することと；（c）反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を得ることと；（d）（c）のその量の増幅DNA産物を検出することと；（e）レシピエントにその量の増幅DNA産物に関する情報を出力することとを含み、（a）～（e）を完了するための時間の量は、約30分未満またはそれに等しい。

10

【0076】

一態様では、本開示は、対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅する方法を提供する。本方法は、（a）反応混合物を得るために、生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、（i）デオキシリボ核酸（DNA）ポリメラーゼ、および任意選択で逆転写酵素、ならびに（ii）標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備することと；（b）反応器中の反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、（i）変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、（ii）伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的核酸の存在を示す増幅産物を生成することを含む。

20

【0077】

様々な態様のいずれにおいても、対象から得られる生体試料に由来する核酸が増幅される。一部の場合では、生体試料は、対象から直接得られる。対象から直接得られる生体試料は一般に、さらなる処理のために対象から生体試料を収集するのに使用される任意の手段を例外として、対象から得られた後に、さらに処理されていない生体試料を指す。例えば、血液は、対象の循環系にアクセスし、対象から血液を取り出し（例えば、針を介して）、容器内に取り出した血液を入れることによって対象から直接得られる。容器は、血液試料がさらなる分析に有用であるように試薬（例えば、抗血液凝固剤）を含み得る。別の例では、対象の口咽頭表面上の上皮細胞にアクセスするのにスワブが使用される場合がある。対象から生体試料を得た後、生体試料を含有するスワブを流体（例えば、緩衝液）と接触させてスワブから生体液を収集することができる。

30

【0078】

一部の実施形態では、生体試料は、反応器内に供給されるとき、精製されていない。一部の実施形態では、生体試料の核酸は、生体試料が反応器に供給されるとき、抽出されていない。例えば、生体試料中のRNAまたはDNAは、反応器に生体試料を供給するとき、生体試料から抽出されていなくてもよい。さらに、一部の実施形態では、生体試料中に存在する標的核酸（例えば、標的RNAまたは標的DNA）は、反応器に生体試料を供給する前に濃縮されていなくてもよい。

40

【0079】

核酸を含む任意の適当な生体試料を対象から得ることができる。生体試料は、固形物（例えば、生物組織）であってもよく、または流体（例えば、生体液）であってもよい。一般に、生体液として、生命体と関連した任意の流体を挙げることができる。生体試料の非限定的な例としては、対象の任意の解剖学的位置（例えば、組織、循環系、骨髄）から得られる血液（もしくは血液の成分 - 例えば、白血球、赤血球、血小板）、対象の任意の解剖学的位置から得られる細胞、皮膚、心臓、肺、腎臓、呼吸、骨髄、糞便、精液、膿液、腫瘍性組織に由来する間質液、乳房、膵臓、脳脊髄液、組織、咽頭スワブ、生検、胎盤流体、羊水、肝臓、筋肉、平滑筋、膀胱、胆嚢、結腸、腸、脳、腔流体（cavity fluid）

50

d)、痰、膿汁、微生物叢 (microbiota)、胎便、母乳、前立腺、食道、甲状腺、血清、唾液、尿、胃液および消化液、涙、眼液、汗、粘液、耳あか、油状物、腺分泌物、脊髄液、毛髪、爪、皮膚細胞、血漿、鼻腔スワブもしくは上咽頭洗浄液 (nasopharyngeal wash)、脊髄液、臍帯血、エンファティック流体 (emphatic fluid)、ならびに/または他の排泄物もしくは体組織がある。

【0080】

生体試料は、当技術分野で公知の任意の手段によって対象から得ることができる。対象から直接生体試料を得るための手段の非限定的な例としては、循環系へのアクセス (例えば、シリンジまたは他の針を介して静脈内または動脈内に)、分泌された生体試料 (例えば、糞便、尿、痰、唾液など) の収集、外科的 (例えば、生検)、スワビング (例えば、

10

【0081】

様々な態様のいずれにおいても、標的核酸が増幅されて増幅産物が生成される。標的核酸は、標的RNAまたは標的DNAであり得る。標的核酸が標的RNAである場合には、標的RNAは、本明細書の他の場所で記載されるRNAのタイプを含めて、任意のタイプのRNAであり得る。一部の実施形態では、標的RNAは、ウイルスRNAである。一部の実施形態では、ウイルスRNAは、対象に対して病原性であり得る。病原性ウイルスRNAの非限定的な例としては、ヒト免疫不全ウイルスI (HIV I)、ヒト免疫不全ウイルスII (HIV II)、オルソミクソウイルス、エボラウイルス、デングウイルス、インフルエンザウイルス (例えば、H1N1、H3N2、H7N9、またはH5N1)、ヘペウイルス (hepesvirus)、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎 (例えば、アーマードRNA - HCVウイルス) ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、エプスタイン - バーウイルス、単核球症ウイルス、サイトメガロウイルス、SARSウイルス、西ナイル熱ウイルス、ポリオウイルス、および麻疹ウイルスがある。

20

【0082】

標的核酸が標的DNAである場合には、標的DNAは、本明細書の他の場所で記載されるDNAのタイプを含めて、任意のタイプのDNAであり得る。一部の実施形態では、標的DNAは、ウイルスDNAである。一部の実施形態では、ウイルスDNAは、対象に対して病原性であり得る。DNAウイルスの非限定的な例としては、単純ヘルペスウイルス、天然痘、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス55型、アデノウイルス7型)、および水痘 (Varicella) ウイルス (例えば、水痘 (chickenpox)) がある。一部の 경우에는、標的DNAは、細菌DNAであり得る。細菌DNAは、例えば、結核を引き起こすことが知られている細菌である *Mycobacterium tuberculosis* などの対象に対して病原性である細菌に由来し得る。一部の 경우에는、標的DNAは、病原性原虫、例えば、マラリアを引き起こし得る *Plasmodium* タイプの1種または複数の原虫などに由来するDNAであり得る。

30

【0083】

本開示の様々な態様のいずれにおいても、対象から得られる生体試料は、反応混合物を得るために反応器内に核酸増幅に必要な試薬とともに提供される。任意の適当な反応器が使用され得る。一部の実施形態では、反応器は、内面、外面、開放端、および対向する閉端を含み得るボディを含む。一部の実施形態では、反応器は、キャップを含み得る。キャップは、その開放端でボディと接触するように構成することができ、その結果接触が行われるとき、反応器の開放端は閉じられる。一部の 경우에는、キャップは、反応器と永続的に付随しており、その結果これは、開いた構成および閉じた構成で反応器に付いたままである。一部の 경우에는、キャップは、脱着可能であり、その結果、反応器が開いているとき、キャップは、反応器から分離される。一部の実施形態では、反応器は、封じられており、任意選択で密閉されている場合がある。

40

【0084】

50

反応器は、様々なサイズ、形状、重量、および構成のものであり得る。一部の例では、反応器は、円形または長円形の管状形状をしている場合がある。一部の実施形態では、反応器は、矩形、正方形、菱形、環状、楕円、または三角形の形状をしている場合がある。反応器は、規則正しく成形され、または不規則に成形され得る。一部の実施形態では、反応器の閉端は、先細りした、丸みを帯びた、または平らな表面を有しうる。反応器のタイプの非限定的な例としては、チューブ、ウェル、キャピラリー管、カートリッジ、キューベット、遠心管、またはピペットチップがある。反応器は、任意の適当な材料で構築することができ、このような材料の非限定的な例としては、ガラス、金属、プラスチック、およびこれらの組合せがある。

【0085】

一部の実施形態では、反応器は、反応器のアレイの一部である。反応器のアレイは、方法を自動化し、かつ/またはいくつもの試料を同時に処理するのに特に有用であり得る。例えば、反応器は、いくつかのウェルで構成されるマイクロウェルプレートの一ウェルであり得る。別の例では、反応器は、サーモサイクラーのサーマルブロックのウェル中にホールドされている場合があり、ここでサーマルサイクルのブロックは、それぞれが試料容器を受け取ることができる多重のウェルを含む。反応器から構成されるアレイは、任意の適切な数の反応器を含み得る。例えば、アレイは、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、35、48、96、144、384、またはそれ超の反応器を含み得る。反応器のアレイの反応器部分はまた、流体操作デバイスによって個々にアドレス可能であり得、その結果流体操作デバイスは、反応器を正確に識別し、適切な流体材料を反応器中に分注することができる。流体操作デバイスは、流体材料の反応器への添加を自動化することにおいて有用であり得る。

【0086】

一部の実施形態では、反応器は、多重の熱ゾーンを含み得る。反応器内の熱ゾーンは、反応器の異なる領域を異なる温度サイクリング条件に曝露することによって実現され得る。例えば、反応器は、上側の熱ゾーンおよび下側の熱ゾーンを含み得る。上側の熱ゾーンは、核酸増幅のための反応混合物を得るのに必要な生体試料および試薬を受け取ることができる場合がある。次いで反応混合物を第1のサーモサイクリングプロトコールに付すことができる。所望の数のサイクルの後、例えば、反応混合物を徐々に、しかし連続的に上側の熱ゾーンから下側の熱ゾーンに流すことができる。下側の熱ゾーンでは、次いで反応混合物は、上側の熱ゾーンにおけるものと異なる第2のサーモサイクリングプロトコールの所望の数のサイクルに付される。このような戦略は、ネステッドPCRがDNAを増幅するのに使用されるとき、特に有用であり得る。一部の実施形態では、熱ゾーンは、反応器内の熱感受性層化材料(thermal sensitive layering material)を活用して反応器内に創製することができる。このような場合では、熱感受性層化材料の加熱を使用して、1つの熱ゾーンから次の熱ゾーンに反応混合物を放出することができる。一部の実施形態では、反応器は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれ超の熱ゾーンを含む。

【0087】

一部の実施形態では、熱ゾーンを含む反応器は、核酸増幅の前に生体試料を処理するのに使用され得る。例えば、溶解剤を、核酸増幅に必要な生体試料および試薬を添加する前に反応器の第1の熱ゾーンに添加してもよい。生体試料および試薬が溶解剤を含む反応器に添加される場合、生体試料(biological)内の種(例えば、細胞またはウイルス粒子)を溶解することができる反応混合物が得られる。代わりに、溶解剤は、生体試料および試薬と同時的に反応混合物の第1の熱ゾーンに添加することができる。溶解剤の作用に適した温度条件に第1の熱ゾーンを曝すことを、第1の熱ゾーン内の生体試料中の細胞およびウイルス粒子を溶解させるのに使用することができ、その結果生体試料中の核酸が反応混合物に放出される。溶解させた後、次いで反応混合物は、本明細書に記載の増幅法を使用して放出された核酸を増幅するために、反応器の第2の熱ゾーンに入ることが可能になり得る。

10

20

30

40

50

【0088】

溶解剤が望まれる場合では、市販の溶解剤を含めた当技術分野で公知の任意の適当な溶解剤が使用され得る。溶解剤の非限定例としては、Tris-HCl、EDTA、界面活性剤（例えば、Triton X-100、SDS）、リゾチーム、グルコラーゼ（glucolase）、プロテイナーゼE、ウイルスエンドリシン、エキソリシン、ザイモローゼ（zymolose）、リチカーゼ（lyticase）、プロテイナーゼK、バクテリオファージ由来のエンドリシンおよびエキソリシン、バクテリオファージPM2由来のエンドリシン、B subtilis バクテリオファージPBSX由来のエンドリシン、Lactobacillus プロファージLj928、Lj965由来のエンドリシン、バクテリオファージ15 Phiadh、Streptococcus pneumoniae バクテリオファージCp-I由来のエンドリシン、Streptococcus agalactiae バクテリオファージB30の二官能性ペプチドグリカン溶解素、プロファージ細菌由来のエンドリシンおよびエキソリシン、Listeria バクテリオファージ由来のエンドリシン、ホリン-エンドリシン、細胞20溶解遺伝子（cell 20 lysis gene）、holW MY Staphylococcus wameri MファージvarphiWMY、Staphylococcus wameri MファージvarphiWMYのIy5 WMY、ならびにこれらの組合せがある。一部の場合では、緩衝液は、溶解剤を含み得る（例えば、溶解緩衝液）。溶解緩衝液の一例は、水酸化ナトリウム（NaOH）である。

10

【0089】

当技術分野で公知の任意のタイプの核酸増幅反応を、標的核酸を増幅し、増幅産物を生成するのに使用することができる。さらに、核酸の増幅は、線形、指数関数的、またはこれらの組合せであり得る。増幅は、エマルジョンベースであってもよく、または非エマルジョンベースであってもよい。核酸増幅法の非限定的な例としては、逆転写、プライマーエクステンション、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、ヘリカーゼ依存性増幅、非対称増幅、ローリングサークル増幅、および多置換増幅（MDA）がある。一部の実施形態では、増幅産物は、DNAであり得る。標的RNAが増幅される場合では、DNAは、RNAの逆転写によって得ることができ、後続のDNAの増幅を使用して増幅DNA産物を生成することができる。増幅DNA産物は、生体試料中の標的RNAの存在を示すことができる。DNAが増幅される場合では、当技術分野で公知の任意のDNA増幅法が使用され得る。DNA増幅法の非限定的な例としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、PCRの変形（例えば、リアルタイムPCR、対立遺伝子特異的PCR、アセンブリーPCR、非対称PCR、デジタルPCR、エマルジョンPCR、ダイヤルアウトPCR（dial-out PCR）、ヘリカーゼ依存性PCR（helicase-dependent PCR）、ネステッドPCR、ホットスタートPCR、逆PCR、メチル化特異的PCR、ミニプライマーPCR、マルチプレックスPCR、ネステッドPCR、オーバーラップ-エクステンションPCR、熱非対称インタレースPCR（thermal asymmetric interlaced PCR）、タッチダウンPCR）、およびリガーゼ連鎖反応（LCR）がある。一部の場合では、DNA増幅は、線形である。一部の場合では、DNA増幅は、指数関数的である。一部の場合では、DNA増幅は、ネステッドPCRで実現され、これは、増幅DNA産物を検出する感度を改善することができる。

20

30

40

【0090】

様々な態様では、本明細書に記載の核酸増幅反応は、並行して行われる場合がある。一般に、並列の増幅反応は、同じ反応器内で、同じ時間に行われる増幅反応である。並列の核酸増幅反応は、例えば、反応器内に各核酸増幅反応に必要な試薬を含めて反応混合物を得、反応混合物を各核酸増幅反応（nucleic amplification reaction）に必要な条件に付すことによって行うことができる。例えば、逆転写増幅およびDNA増幅は、反応器内に両方の増幅法に必要な試薬を供給して反応混合物を得、反応混合物を両方の増幅反応を行うのに適した条件に付すことによって並行して行うことができる。RNAの逆転写から生成されるDNAを並行して増幅して、増幅DNA産物を生成することができる。任意の適当な数の核酸増幅反応を並行して行うことができる。一部の場合では、少なくとも1、

50

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ超の核酸増幅反応が並行して行われる。

【0091】

並行して核酸増幅反応を行うことの利点として、カップリングした核酸増幅反応同士間の速い移行を挙げることができる。例えば、標的核酸（例えば、標的RNA、標的DNA）を、並列の核酸増幅の加熱フェーズ中に生体試料から抽出または放出することができる。標的RNAの場合では、例えば、標的RNAを含む生体試料を加熱することができ、標的RNAを生体試料から放出することができる。放出された標的RNAは、逆転写を直ちに開始して（逆転写増幅を介して）、相補的DNAを生成することができる。次いで相補的DNAは、多くの場合数秒の程度で直ちに増幅され得る。生体試料からの標的RNAの放出と標的RNAの相補的DNAへの逆転写との間の短い時間は、逆転写および/またはDNA増幅を妨害し得る生体試料中の阻害剤の効果を最小限にするのに役立つ。10

【0092】

様々な態様のいずれにおいても、標的核酸に向けられたプライマーセットを利用して核酸増幅反応を行うことができる。プライマーセットは一般に、1種または複数のプライマーを含む。例えば、プライマーセットは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超のプライマーを含み得る。一部の場合では、プライマーセットは、異なる増幅産物または異なる核酸増幅反応に向けられたプライマーを含み得る。例えば、プライマーセットは、標的核酸の少なくとも一部に相補的である核酸産物の第1の鎖を生成するのに必要な第1のプライマー、および核酸産物の第1の鎖の少なくとも一部に相補的である核酸産物の第2の鎖を生成するのに必要な核酸鎖産物に相補的な第2のプライマーを含み得る。20

【0093】

例えば、プライマーセットは、標的RNAに向けられている場合がある。プライマーセットは、標的RNAの少なくとも一部に相補的である核酸産物の第1の鎖を生成するのに使用することができる第1のプライマーを含み得る。逆転写反応の場合では、核酸産物の第1の鎖は、DNAであり得る。プライマーセットは、核酸産物の第1の鎖の少なくとも一部に相補的である核酸産物の第2の鎖を生成するのに使用することができる第2のプライマーも含み得る。DNA増幅と並行して行われる逆転写反応の場合では、核酸産物の第2の鎖は、RNA鋳型から生成されるDNAの鎖に相補的である核酸（例えば、DNA）産物の鎖であり得る。30

【0094】

望まれる場合、任意の適当な数のプライマーセットを使用することができる。例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超のプライマーセットを使用することができる。多重のプライマーセットが使用される場合、1つまたは複数のプライマーセットは、特定の核酸増幅反応または増幅産物にそれぞれ対応し得る。

【0095】

一部の実施形態では、DNAポリメラーゼが使用される。市販のDNAポリメラーゼを含めた任意の適当なDNAポリメラーゼが使用され得る。DNAポリメラーゼは一般に、鋳型結合様式でDNAの鎖にヌクレオチドを組み込むことができる酵素を指す。DNAポリメラーゼの非限定的な例としては、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Tliポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、VENTポリメラーゼ、DEEPVENTポリメラーゼ、EX-Taqポリメラーゼ、LA-Taqポリメラーゼ、Expandポリメラーゼ、Ssoポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、白金Taqポリメラーゼ、Hi-Fiポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tflポリメラーゼ、PfuTuboポリメラーゼ、Pyrobestポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、クレノウ断片、ならびにこれらのバリエーション、修飾産物、および誘導体がある。ある特定のホットス 40 50

タートポリメラーゼについては、2分～10分にわたる94～95での変性ステップが要求される場合があり、これは、異なるポリメラーゼに基づいてサーマルプロファイルを変更し得る。

【0096】

一部の実施形態では、逆転写酵素が使用される。任意の適当な逆転写酵素が使用され得る。逆転写酵素は一般に、RNA鋳型に結合しているとき、DNAの鎖にヌクレオチドを組み込むことができる酵素を指す。逆転写酵素の非限定的な例としては、HIV-1逆転写酵素、M-MLV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、テロメラーゼ逆転写酵素、ならびにこれらのパリアント、修飾産物、および誘導体がある。

【0097】

様々な態様では、プライマーエクステンション反応が、増幅産物を生成するのに利用される。プライマーエクステンション反応は一般に、変性温度で変性継続時間にわたって反応混合物をインキュベートし、伸長温度で伸長継続時間にわたって反応混合物をインキュベートするサイクルを含む。

【0098】

変性温度は、例えば、分析される特定の生体試料、生体試料中の標的核酸の特定の源（例えば、ウイルス粒子、細菌）、使用される試薬、および/または所望の反応条件に応じて変動し得る。例えば、変性温度は、約80～約110であり得る。一部の例では、変性温度は、約90～約100であり得る。一部の例では、変性温度は、約90～約97であり得る。一部の例では、変性温度は、約92～約95であり得る。さらに他の例では、変性温度は、約80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100であり得る。

【0099】

変性継続時間は、例えば、分析される特定の生体試料、生体試料中の標的核酸の特定の源（例えば、ウイルス粒子、細菌）、使用される試薬、および/または所望の反応条件に応じて変動し得る。例えば、変性継続時間は、300秒、240秒、180秒、120秒、90秒、60秒、55秒、50秒、45秒、40秒、35秒、30秒、25秒、20秒、15秒、10秒、5秒、2秒、もしくは1秒未満、またはそれに等しい場合がある。例えば、変性継続時間は、120秒、90秒、60秒、55秒、50秒、45秒、40秒、35秒、30秒、25秒、20秒、15秒、10秒、5秒、2秒、または1秒以下であり得る。

【0100】

伸長温度は、例えば、分析される特定の生体試料、生体試料中の標的核酸の特定の源（例えば、ウイルス粒子、細菌）、使用される試薬、および/または所望の反応条件に応じて変動し得る。例えば、伸長温度は、約30～約80であり得る。一部の例では、伸長温度は、約35～約72であり得る。一部の例では、伸長温度は、約45～約65であり得る。一部の例では、伸長温度は、約35～約65であり得る。一部の例では、伸長温度は、約40～約60であり得る。一部の例では、伸長温度は、約50～約60であり得る。さらに他の例では、伸長温度は、約35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80であり得る。

【0101】

伸長継続時間は、例えば、分析される特定の生体試料、生体試料中の標的核酸の特定の源（例えば、ウイルス粒子、細菌）、使用される試薬、および/または所望の反応条件に応じて変動し得る。例えば、伸長継続時間は、300秒、240秒、180秒、120秒、90秒、60秒、55秒、50秒、45秒、40秒、35秒、30秒、25秒、20秒

10

20

30

40

50

、 15 秒、 10 秒、 5 秒、 2 秒、 もしくは 1 秒未満、 またはそれに等しい場合がある。 例
 えば、 伸長継続時間は、 120 秒、 90 秒、 60 秒、 55 秒、 50 秒、 45 秒、 40 秒、
 35 秒、 30 秒、 25 秒、 20 秒、 15 秒、 10 秒、 5 秒、 2 秒、 または 1 秒以下であり
 得る。

【 0 1 0 2 】

様々な態様のいずれにおいても、 多重のサイクルのプライマーエクステンション反応を
 行うことができる。 任意の適当な数のサイクルが行われ得る。 例えば、 行われるサイクル
 の数は、 約 100、 90、 80、 70、 60、 50、 40、 30、 20、 10、 または 5
 未満のサイクルであり得る。 行われるサイクルの数は、 検出可能な増幅産物（例えば、 生
 体試料中の標的 RNA の存在を示す検出可能量の増幅 DNA 産物）を得るのに必要なサイ
 クルの数（例えば、 サイクル閾値（Ct））に依存し得る。 例えば、 検出可能な増幅産物
 （例えば、 生体試料中の標的 RNA の存在を示す検出可能量の DNA 産物）を得るのに必
 要なサイクルの数は、 約 100 サイクル未満もしくは約 100 サイクル、 約 75 サイクル
 未満もしくは約 75 サイクル、 約 70 サイクル未満もしくは約 70 サイクル、 約 65 サイ
 クル未満もしくは約 65 サイクル、 約 60 サイクル未満もしくは約 60 サイクル、 約 55
 サイクル未満もしくは約 55 サイクル、 約 50 サイクル未満もしくは約 50 サイクル、 約
 40 サイクル未満もしくは約 40 サイクル、 約 35 サイクル未満もしくは約 35 サイクル
 、 約 30 サイクル未満もしくは約 30 サイクル、 約 25 サイクル未満もしくは約 25 サイ
 クル、 約 20 サイクル未満もしくは約 20 サイクル、 約 15 サイクル未満もしくは約 15
 サイクル、 約 10 サイクル未満もしくは約 10 サイクル、 または約 5 サイクル未満もしくは
 は約 5 サイクルであり得る。 さらに、 一部の実施形態では、 検出可能量の増幅可能な産物
 （例えば、 生体試料中の標的 RNA の存在を示す検出可能量の DNA 産物）は、 100、
 75、 70、 65、 60、 55、 50、 45、 40、 35、 30、 25、 20、 15、 1
 0、 または 5 未満のサイクル閾値（Ct）で得ることができる。

10

20

【 0 1 0 3 】

増幅が、 増幅される標的核酸の存在を示す検出可能量の増幅産物を生じる時間は、 標的
 核酸が得られた生体試料、 行われる特定の核酸増幅反応、 および望まれる増幅反応のサイ
 クルの特定の数に応じて変更することができる。 例えば、 標的核酸の増幅は、 120 分も
 しくはそれ未満； 90 分もしくはそれ未満； 60 分もしくはそれ未満； 50 分もしくはそれ
 未満； 45 分もしくはそれ未満； 40 分もしくはそれ未満； 35 分もしくはそれ未満；
 30 分もしくはそれ未満； 25 分もしくはそれ未満； 20 分もしくはそれ未満； 15 分も
 しくはそれ未満； 10 分もしくはそれ未満； または 5 分もしくはそれ未満の時間で標的核
 酸の存在を示す検出可能量の増幅産物を生じ得る。

30

【 0 1 0 4 】

一部の実施形態では、 標的 RNA の増幅は、 120 分もしくはそれ未満； 90 分もしく
 はそれ未満； 60 分もしくはそれ未満； 50 分もしくはそれ未満； 45 分もしくはそれ未
 満； 40 分もしくはそれ未満； 35 分もしくはそれ未満； 30 分もしくはそれ未満； 25
 分もしくはそれ未満； 20 分もしくはそれ未満； 15 分もしくはそれ未満； 10 分もしく
 はそれ未満； または 5 分もしくはそれ未満の時間で標的 RNA の存在を示す検出可能量の
 増幅 DNA 産物を生じ得る。

40

【 0 1 0 5 】

一部の実施形態では、 反応混合物は、 複数のシリーズのプライマーエクステンション反
 応に付される場合がある。 複数のうちの個々のシリーズは、 例えば、 本明細書の他の場所
 で記載した特定の変性および伸長条件によって特徴付けられる多重のサイクルの特定のプ
 ライマーエクステンション反応を含み得る。 一般に、 それぞれの個々のシリーズは、 例
 えば、 変性条件および / または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも 1 つの他の個々の
 シリーズと異なる。 個々のシリーズは、 例えば、 変性温度、 変性継続時間、 伸長温度
 、 および伸長継続時間のうちの任意の 1 つ、 2 つ、 3 つ、 または 4 つすべてに関して複数
 のシリーズのうちの別の個々のシリーズと異なり得る。 さらに、 複数のシリーズは、 例
 えば、 少なくとも約もしくは約 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ超の個

50

々のシリーズなどの任意の数の個々のシリーズを含み得る。

【0106】

例えば、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応は、第1のシリーズおよび第2のシリーズを含み得る。第1のシリーズは、例えば、10超のサイクルのプライマーエクステンション反応を含み得、第1のシリーズの各サイクルは、(i)約92 ~ 約95 で30秒以下にわたって反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)約35 ~ 約65 で約1分以下にわたって反応混合物をインキュベートすることを含む。第2のシリーズは、例えば、10超のサイクルのプライマーエクステンション反応を含み得、第2のシリーズの各サイクルは、(i)約92 ~ 約95 で30秒以下にわたって反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)約40 ~ 約60 で約1分以下にわたって反応混合物をインキュベートすることを含む。この特定の例では、第1および第2のシリーズは、その伸長温度条件が異なる。しかし、例は、限定的であるように意味しておらず、理由は、異なる伸長および変性化条件の任意の組合せを使用することができるためである。

10

【0107】

一部の実施形態では、ランピング時間(すなわち、サーマルサイクラーが1つの温度から別の温度に移行するのに要する時間)および/またはランピングレートは、増幅において重要な要因であり得る。例えば、増幅が標的核酸の存在を示す検出可能量の増幅産物を生じる温度および時間は、ランピングレートおよび/またはランピング時間に依りて変更することができる。ランピングレートは、増幅に使用される温度(複数可)および時間(複数可)に強い影響を与え得る。

20

【0108】

一部の場では、ランピング時間および/またはランピングレートは、サイクル同士間で異なり得る。しかし、いくつかの状況では、サイクル同士のランピング時間および/またはランピングレートは、同じであり得る。ランピング時間および/またはランピングレートは、処理されている試料(複数可)に基づいて調整することができる。

30

【0109】

一部の状況では、異なる温度間のランピング時間は、例えば、試料の特質および反応条件に基づいて決定することができる。正確な温度およびインキュベーション時間も、試料の特質および反応条件に基づいて決定することができる。一部の実施形態では、単一の試料を、多重のサーマルサイクルを使用して複数回処理する(増幅条件に付す)ことができ、各サーマルサイクルは、例えば、ランピング時間、温度、および/またはインキュベーション時間が異なる。次いで最良または最適のサーマルサイクルを、その特定の試料について選択することができる。これは、検査されている具体的な試料または試料の組合せにサーマルサイクルを適応させるロバストで効率的な方法をもたらす。

40

【0110】

一部の実施形態では、標的核酸は、プライマーエクステンション反応を開始する前に変性化条件に付される場合がある。複数のシリーズのプライマーエクステンション反応の場合では、標的核酸は、複数のシリーズを実行する前に変性化条件に付される場合があり、または複数のうちのシリーズの間に変性化条件に付される場合がある。例えば、標的核酸は、複数のシリーズのうちの第1のシリーズと第2のシリーズとの間に変性化条件に付される場合がある。このような変性化条件の非限定的な例としては、変性化温度プロファイル(例えば、1つまたは複数の変性化温度)および変性化剤がある。

【0111】

複数のシリーズのプライマーエクステンション反応を行うことの利点は、同等の変性化および伸長条件下で単一のシリーズのプライマーエクステンション反応と比較したとき、複数のシリーズ手法が、より低いサイクル閾値で生体試料中の標的核酸の存在を示す検出可能量の増幅産物を生じることであり得る。複数のシリーズのプライマーエクステンション反応を使用すると、同等の変性化および伸長条件下で単一のシリーズと比較したとき、少なくとも約もしくは約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%

50

、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、このようなサイクル閾値が低減され得る。

【0112】

一部の実施形態では、生体試料は、プライマーエクステンション反応を行う前に予熱される場合がある。生体試料が予熱される温度（例えば、予熱温度）および継続時間（例えば、予熱継続時間）は、例えば、分析されている特定の生体試料に応じて変動し得る。一部の例では、生体試料は、約60分、50分、40分、30分、25分、20分、15分、10分、9分、8分、7分、6分、5分、4分、3分、2分、1分、45秒、30秒、20秒、15秒、10秒、または5秒以下にわたって予熱され得る。一部の例では、生体試料は、約80 ~ 約110 の温度で予熱され得る。一部の例では、生体試料は、約90 ~ 約100 の温度で予熱され得る。一部の例では、生体試料は、約90 ~ 約97 の温度で予熱され得る。一部の例では、生体試料は、約92 ~ 約95 の温度で予熱され得る。さらに他の例では、生体試料は、約80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100 の温度で予熱され得る。

10

20

30

40

50

【0113】

一部の実施形態では、並列の核酸増幅を行うのに必要な試薬を含めた核酸増幅を行うのに必要な試薬は、その存在または非存在が増幅産物の存在を示す検出可能なシグナルを生じるレポーター剤も含み得る。検出可能なシグナルの強度は、増幅産物の量に比例し得る。一部の例では、最初に増幅された標的核酸と異なるタイプの核酸の増幅産物が生成される場合、検出可能なシグナルの強度は、最初に増幅された標的核酸の量に比例し得る。例えば、並列の逆転写および逆転写から得られるDNAの増幅を介して標的RNAを増幅する場合は、両方の反応に必要な試薬は、増幅DNA産物および/または増幅された標的RNAの存在を示す検出可能なシグナルを生じ得るレポーター剤も含む場合がある。検出可能なシグナルの強度は、増幅DNA産物および/または増幅された元の標的RNAの量に比例し得る。レポーター剤を使用すると、DNA増幅のためのリアルタイムPCRを含めたリアルタイム増幅法も可能になる。

【0114】

レポーター剤は、共有結合性または非共有結合性手段によって、増幅産物を含めた核酸と連結される場合がある。非共有結合性手段の非限定的な例としては、イオン相互作用、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、水素結合、およびこれらの組合せがある。一部の例では、レポーター剤は、最初の反応物に結合することができ、レポーター剤レベルの変化を使用して増幅産物を検出することができる。一部の例では、レポーター剤は、核酸増幅が進行する際にのみ検出可能（または非検出可能）であり得る。一部の例では、光学活性色素（例えば、蛍光色素）が、レポーター剤として使用され得る。色素の非限定的な例としては、SYBRグリーン、SYBRブルー、DAPI、ヨウ化プロピジウム（propidium iodine）、ホエスト（Hoeste）、SYBRゴールド、臭化エチジウム、アクリジン、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリフラビン、フルオロクマリン（fluorocoumanin）、エリプチシン、ダウノマイシン、クロロキン、ジスタマイシンD、クロモマイシン、ホミジウム、ミトラマイシン、ルテニウムポリピリジル、アントラマイシン、フェナントリジン、ならびにアクリジン、臭化エチジウム、ヨウ化プロピジウム、ヨウ化ヘキシジウム、ジヒドロエチジウム、エチジウムホモ二量体-1および-2、モノアジ化エチジウム（ethidium monoazide）、ならびにACMA、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580、DAPI、アクリジンオレンジ、7-AAD、アクチノマイシンD、LDS 751、ヒドロキシスチルブアミジン、SYTOXブルー、SYTOXグリーン、SYTOXオレンジ、POPO-1、POPO-3、YOYO-1、YOYO-3、TOTO-1、TOTO-3、JOJO-1、LOLO-1、BOBO-1、BOBO-3、PO-PRO-1、PO-PRO-3、BO-PRO-1、BO-PRO-3、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TO-PRO-5、JO-PRO-1、LO-PRO-1、YO-PRO-1、YO-PRO

- 3、PicoGreen、OliGreen、RiboGreen、SYBRゴールド、SYBRグリーンI、SYBRグリーンII、SYBR DX、SYTO-40、-41、-42、-43、-44、-45(青色)、SYTO-13、-16、-24、-21、-23、-12、-11、-20、-22、-15、-14、-25(緑色)、SYTO-81、-80、-82、-83、-84、-85(橙色)、SYTO-64、-17、-59、-61、-62、-60、-63(赤色)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)、ローダミン、テトラメチルローダミン、R-フィコエリトリン、Cy-2、Cy-3、Cy-3.5、Cy-5、Cy5.5、Cy-7、テキサスレッド、Phar-Red、アロフィコシアニン(APC)、SybrグリーンI、SybrグリーンII、Sybrゴールド、CellTrackerグリーン、7-AAD、エチジウムホモ二量体I、エチジウムホモ二量体II、エチジウムホモ二量体III、臭化エチジウム、ウンベリフェロン、エオシン、緑色蛍光タンパク質、エリトロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、カスケードブルー、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、ユウロピウムおよびテルビウムを含むものなどの蛍光性ランタニド錯体、カルボキシテトラクロロフルオレセイン(carboxytetrachloro fluorescein)、5および/もしくは6-カルボキシフルオレセイン(FAM)、5-(もしくは6-)ヨードアセトアミドフルオレセイン、5-{[2(および3)-5-(アセチルメルカプト)-スクシニル]アミノ}フルオレセイン(SAMSA-フルオレセイン)、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、5および/もしくは6カルボキシローダミン(ROX)、7-アミノ-メチル-クマリン、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸(AMCA)、BODIPYフルオロフォア、8-メトキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸三ナトリウム塩、3,6-ジスルホネート-4-アミノ-ナフタルイミド、フィコピリタンパク質、AlexaFluor350、405、430、488、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750、および790色素、DyLight350、405、488、550、594、633、650、680、755、および800色素、または他のフルオロフォアがある。

10

20

30

40

50

【0115】

一部の実施形態では、レポーター剤は、増幅産物とハイブリダイズしたとき光学的に活性である配列特異的オリゴヌクレオチドプローブであり得る。プローブの増幅産物への配列特異的結合に起因して、オリゴヌクレオチドプローブを使用すると、検出の特異性および感度を増大させることができる。プローブは、本明細書に記載の光学活性レポーター剤(例えば、色素)のいずれかに連結され得、付随する色素の光学活性を遮断することができるクエンチャーも含み得る。レポーター剤として有用に使用され得るプローブの非限定的な例としては、TaqManプローブ、TaqMan Tamarraプローブ、TaqMan MGBプローブ、またはLionプローブがある。

【0116】

一部の実施形態では、レポーター剤は、プローブ上に隣接して位置した光学活性色素(例えば、蛍光色素)およびクエンチャーを含むRNAオリゴヌクレオチド(oligonucleotide)プローブであり得る。色素がクエンチャーと近接近すると、色素の光学活性が遮断され得る。プローブは、増幅される標的配列に結合する場合がある。増幅中にDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性でプローブが分解すると、クエンチャーと色素が分離され、遊離色素は、その光学活性を回復し、それは、引き続いて検出することができる。

【0117】

一部の実施形態では、レポーター剤は、分子ビーコンであり得る。分子ビーコンは、例えば、ヘアピンコンホメーションでオリゴヌクレオチドの一端で連結されたクエンチャーを含む。オリゴヌクレオチドの他端では、例えば、蛍光色素などの光学活性色素である。ヘアピン構成では、光学活性色素およびクエンチャーは、クエンチャーが色素の光学活性を遮断することができるように、十分近くに近接される。しかし、増幅産物とハイブリダ

イズすると、オリゴヌクレオチドは、線形コンホメーションを帯び、増幅産物上の標的配列とハイブリダイズする。オリゴヌクレオチドが線形化すると、光学活性色素およびクエンチャーが分離し、その結果光学活性が復活され、検出され得る。増幅産物上の標的配列に対する分子ビーコンの配列特異性は、検出の特異性および感度を改善することができる。

【0118】

一部の実施形態では、レポーター剤は、放射性種であり得る。放射性種の非限定的な例としては、 ^{14}C 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $\text{Tc}99\text{m}$ 、 ^{35}S 、または ^3H がある。

【0119】

一部の実施形態では、レポーター剤は、検出可能なシグナルを生成することができる酵素であり得る。検出可能なシグナルは、酵素の活性によって、酵素の基質または酵素が複数の基質を有する場合には特定の基質とともに生成され得る。レポーター剤として使用され得る酵素の非限定的な例としては、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、 I^2 -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、およびルシフェラーゼがある。

【0120】

様々な態様では、増幅産物（例えば、増幅DNA産物、増幅RNA産物）が検出され得る。増幅DNAを含めた増幅産物の検出は、当技術分野で公知の任意の適当な検出法を用いて達成することができる。使用される検出法の特定のタイプは、例えば、特定の増幅産物、増幅に使用される反応器のタイプ、反応混合物中の他の試薬、レポーター剤が反応混合物中に含まれているか否か、およびレポーター剤が使用される場合、使用されるレポーター剤の特定のタイプに依存する場合がある。検出法の非限定的な例としては、光学的検出、分光学的検出、静電氣的検出、電気化学的検出などがある。光学的検出法としては、それだけに限らないが、蛍光定量法およびUV-可視吸光度がある。分光学的検出法としては、それだけに限らないが、質量分析、核磁気共鳴(NMR)分光法、および赤外分光法がある。静電氣的検出法としては、それだけに限らないが、例えば、ゲル電気泳動などのゲルベース技法がある。電気化学的検出法としては、それだけに限らないが、増幅産物を高速液体クロマトグラフィーで分離した後の増幅産物の電気化学的検出がある。

【0121】

様々な態様のいずれにおいても、方法の要素を完了するのに要求される時間は、方法の特定のステップに応じて変動し得る。例えば、方法の要素を完了するための時間は、約5分~約120分であり得る。他の例では、方法の要素を完了するための時間は、約5分~約60分であり得る。他の例では、方法の要素を完了するための時間は、約5分~約30分であり得る。他の例では、方法の要素を完了するための時間は、120分未満もしくはそれに等しい、90分未満もしくはそれに等しい、75分未満もしくはそれに等しい、60分未満もしくはそれに等しい、45分未満もしくはそれに等しい、40分未満もしくはそれに等しい、35分未満もしくはそれに等しい、30分未満もしくはそれに等しい、25分未満もしくはそれに等しい、20分未満もしくはそれに等しい、15分未満もしくはそれに等しい、10分未満もしくはそれに等しい、または5分未満もしくはそれに等しい場合がある。

【0122】

一部の実施形態では、増幅産物（例えば、増幅DNA産物）の存在および/または量に関する情報は、レシピエントに出力され得る。増幅産物に関する情報は、当技術分野で公知の任意の適当な手段を介して出力され得る。一部の実施形態では、このような情報は、レシピエントに口頭で提供される場合がある。一部の実施形態では、このような情報は、レポートで提供される場合がある。レポートは、任意の数の所望の要素を含み得、非限定的な例としては、対象に関する情報（例えば、性別、年齢、人種、健康状態など）の生データ、処理データ（例えば、グラフ表示（例えば、図、チャート、データの表、データの概要）、決定したサイクル閾値、標的ポリヌクレオチドの出発量の計算）、標的核酸の存

10

20

30

40

50

在についての結論、診断情報、予後情報、疾患情報など、およびこれらの組合せがある。レポートは、印刷されたレポート（例えば、ハードコピー）として提供されてもよく、または電子レポートとして提供されてもよい。一部の実施形態では、電子レポートが提供される場合を含めて、このような情報は、電子ディスプレイ（例えば、電子ディスプレイスクリーン）、例えば、モニターまたはテレビなど、増幅産物を得るのに使用されるユニットと作動可能に連結されたスクリーン、タブレットコンピュータスクリーン、モバイルデバイススクリーンなどを介して出力され得る。印刷されたレポートおよび電子レポートはともに、それぞれファイルまたはデータベースに保管することができ、その結果これらは、将来のレポートとの比較にアクセス可能である。

【0123】

さらに、レポートは、例えば、ネットワーク接続、無線接続、またはインターネット接続を含めた任意の適当な通信媒体を使用して地元の場所または遠隔地におけるレシピエントに伝達することができる。一部の実施形態では、レポートは、レシピエントのデバイス、例えば、パーソナルコンピューター、電話、タブレット、または他のデバイスなどに送ることができる。レポートは、オンラインで閲覧され、レシピエントのデバイスに保存され、または印刷される場合がある。レポートは、情報を伝達するための任意の他の適当な手段によって伝達することもでき、非限定的な例としては、レシピエントが受信および/またはレビューするためにハードコピーレポートを郵送することがある。

【0124】

さらに、このような情報は、様々なタイプのレシピエントに出力され得る。このようなレシピエントの非限定的な例としては、生体試料が得られた対象、医師、対象を処置している医師、臨床試験のための臨床モニター、看護師、研究者、検査技師、製薬会社の代表、ヘルスケア企業、バイオテクノロジー企業、病院、人間の援助団体、ヘルスケアマネージャー、電子システム（例えば、対象の医療記録を記憶する、例えば、1つもしくは複数のコンピューターおよび/または1種もしくは複数のコンピューターサーバー）、公衆衛生の労働者、他の医療関係者、ならびに他の医療施設がある。

【0125】

一態様では、本開示は、本明細書に開示の方法のいずれかによって一方法を遂行するシステムを提供する。別の態様では、本開示は、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸（RNA）を増幅するシステムを提供する。システムは、（a）生体試料中の標的RNAを増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；（b）ユーザーリクエストに応じて：生体試料と、デオキシリボ核酸（DNA）増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、（i）逆転写酵素、（ii）DNAポリメラーゼ、および（iii）標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；反応器中の反応混合物を、各サイクルが、（i）変性化温度で60秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって反応混合物をインキュベートし、その後、（ii）伸長温度で60秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、標的RNAの存在を示す増幅DNA産物を生成し、それによって標的RNAを増幅する増幅モジュール；ならびに（c）増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、レシピエントに標的RNAまたはDNA産物に関する情報を出力する、出力モジュールを含む。

【0126】

別の態様では、本開示は、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸（RNA）を増幅するシステムを提供する。システムは、（a）生体試料中の標的RNAを増幅するためにユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；（b）ユーザーリクエストに応じて：（i）対象から得られた生体試料と、逆転写増幅および任意選択でデオキシリボ核酸（DNA）増幅を行うのに必要な試薬であって、（1）逆転写酵素、および（2）標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；（ii）反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付し

10

20

30

40

50

て、生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を生じ；(iii)(iii)のその量の増幅DNA産物を検出し；(iv)レシピエントにその量の増幅DNA産物に関する情報を入力する増幅モジュールであって、(i)～(iv)を完了するための時間の量は、約30分未満またはそれに等しい、増幅モジュール；ならびに(c)増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、レシピエントに情報を伝達する、出力モジュールを含む。

【0127】

別の態様では、本開示は、対象から得られる生体試料中に存在する標的核酸を増幅するためのシステムを提供する。システムは、(a)生体試料中の標的RNAを増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュール；(b)ユーザーリクエストに応じて：生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)DNAポリメラーゼ、および任意選択で逆転写酵素、ならびに(ii)標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応混合物を反応器内に受け取り；反応器中の反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i)変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的核酸の存在を示す増幅産物を生成する増幅モジュール；ならびに(c)増幅モジュールに作動可能にカップリングした出力モジュールであって、レシピエントに標的RNAまたはDNA産物に関する情報を入力する、出力モジュールを含む。

【0128】

別の態様では、本開示は、対象から得られる生体試料中の標的核酸を増幅するためのシステムを提供する。システムは、生体試料中の標的核酸を増幅する増幅プロトコルを実行するために、ユーザーがアクセス可能なグラフィカル要素を表示するユーザーインターフェースを有する電子ディスプレイスクリーンを含むことができる。システムは、電子ディスプレイスクリーンにカップリングされ、ユーザーがグラフィカル要素を選択すると増幅プロトコルを実行するようにプログラムされたコンピュータープロセッサ（本明細書の他の場所で記載したコンピュータープロセッサを有する任意の適当なデバイスを含む）も含むことができる。増幅プロトコルは、生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬とを含む反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して増幅産物を生成することを含み得る。増幅産物は、生体試料中の標的核酸の存在を示すことができる。さらに、プライマーエクステンション反応の各シリーズは、変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含むことができる。個々のシリーズは、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なり得る。

【0129】

一部の実施形態では、標的核酸は、疾患に関連している場合がある。疾患は、例えば、RNAウイルスまたはDNAウイルスに関連している場合がある。ウイルスの例は、本明細書の他の場所で示されている。一部の実施形態では、疾患は、本明細書の他の場所で記載した病原体の例を含めて、病原性細菌（例えば、*Mycobacterium tuberculosis*）または病原性原虫（例えば、マラリアにおけるような*Plasmodium*）と関連している場合がある。一部の実施形態では、増幅プロトコルは、増幅産物の存在に基づいて前記疾患の存在についてアッセイすることに向けることができる。

【0130】

一部の場では、ユーザーインターフェースは、グラフィカルユーザーインターフェースであり得る。さらに、ユーザーインターフェースは、1つまたは複数のグラフィカル要

10

20

30

40

50

素を含むことができる。グラフィカル要素は、画像および/または文字情報、例えば、写真、アイコン、およびテキストなどを含むことができる。グラフィカル要素は、ユーザーインターフェース上で様々なサイズおよび向きを有することができる。さらに、電子ディスプレイスクリーンは、本明細書の他の場所で記載した例を含む任意の適当な電子ディスプレイであり得る。電子ディスプレイスクリーンの非限定的な例としては、モニター、モバイルデバイススクリーン、ラップトップコンピュータスクリーン、テレビ、ポータブルビデオゲームシステムスクリーン、および計算機のスクリーンがある。一部の実施形態では、電子ディスプレイスクリーンは、タッチスクリーン（例えば、静電容量式または抵抗膜式タッチスクリーン）を含み得、その結果、電子ディスプレイスクリーンのユーザーインターフェース上に表示されるグラフィカル要素は、電子ディスプレイスクリーンにユーザーが触れることによって選択することができる。

10

【0131】

一部の実施形態では、増幅プロトコルは、標的核酸のためのプライマーセットを選択することをさらに含み得る。このような場合では、プライマーセットは、標的核酸分子の1つまたは複数の配列を増幅するように特別に設計されたプライマーセットであってもよい。一部の実施形態では、増幅プロトコルは、標的核酸分子の1つまたは複数の配列に特異的であるレポーター剤（例えば、光学活性種を含むオリゴヌクレオチドプローブまたは本明細書の他の場所で記載した他のタイプのレポーター剤）を選択することをさらに含み得る。さらに、一部の実施形態では、試薬は、本明細書の他の場所で記載した核酸増幅に必要な任意の適当な試薬、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）ポリメラーゼ、標的核酸のためのプライマーセット、（任意選択で）逆転写酵素などを含み得る。

20

【0132】

一部の実施形態では、ユーザーインターフェースは、複数のグラフィカル要素を表示することができる。グラフィカル要素のそれぞれは、複数の増幅プロトコルの中の所与の増幅プロトコルと関連していることができる。複数の増幅プロトコルのそれぞれは、プライマーエクステンション反応のシリーズの異なる組合せを含み得る。しかし一部の場では、ユーザーインターフェースは、同じ増幅プロトコルに関連した複数のグラフィカル要素を表示し得る。それぞれが所与の増幅プロトコルと関連した複数のグラフィカル要素を有するユーザーインターフェースの一例を図28Aに示す。図28Aに示したように、コンピュータプロセッサに付随した例示的な電子ディスプレイスクリーン2800は、ユーザーインターフェース2801を含む。ユーザーインターフェース2801は、グラフィカル要素2802、2803、および2804の表示を含む。グラフィカル要素のそれぞれを、特定の増幅プロトコルと関連していることができる（例えば、グラフィカル要素2802について、「プロトコル1」、グラフィカル要素2803について「プロトコル2」、およびグラフィカル要素2804について「プロトコル4」）。ユーザーが特定のグラフィカル要素を選択すると（例えば、電子ディスプレイスクリーン2800がユーザーインターフェースを有するタッチスクリーンを含む場合のユーザータッチ）、グラフィカル要素と関連した特定の増幅プロトコルを、付随したコンピュータプロセッサによって実行することができる。例えば、ユーザーがグラフィカル要素2803を選択する場合、増幅「プロトコル2」が、付随したコンピュータプロセッサによって実行される。3つのグラフィカル要素のみが図28Aの例示的なユーザーインターフェース2801に示されているのに対して、ユーザーインターフェースは、任意の適当な数のグラフィカル要素を有し得る。さらに、図28Aのユーザーインターフェース2801に示した各グラフィカル要素は、ただ1つの増幅プロトコルと関連しているのに対して、ユーザーインターフェースの各グラフィカル要素は、1つまたは複数の増幅プロトコル（例えば、一連の増幅プロトコル）に関連していることができ、その結果、付随したコンピュータプロセッサは、ユーザーがグラフィカル要素と対話した後、一連の増幅プロトコルを実行する。

30

40

【0133】

一部の実施形態では、グラフィカル要素のそれぞれは、疾患と関連している場合があり

50

、複数の増幅プロトコールの中の所与の増幅プロトコールは、対象における疾患の存在をアッセイすることに向けられている場合がある。したがって、このような場合では、ユーザーは、特定の疾患についてアッセイするための増幅プロトコール（または一連の増幅プロトコール）をランさせるためにグラフィカル要素を選択することができる。一部の実施形態では、疾患は、ウイルス、例えば、本明細書の他の場所で記載したウイルスの例を含めた任意のRNAウイルスまたはDNAウイルスなどに関連している場合がある。ウイルスの非限定的な例は、ヒト免疫不全ウイルスI（HIV I）、ヒト免疫不全ウイルスII（HIV II）、オルソミクソウイルス、エボラウイルス、デングウイルス、インフルエンザウイルス（例えば、H1N1ウイルス、H3N2ウイルス、H7N9ウイルス、またはH5N1ウイルス）、ヘペウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス（例えば、アーマードRNA-C型肝炎ウイルス（RNA-HCV））、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、単核球症ウイルス、サイトメガロウイルス、SARSウイルス、西ナイル熱ウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス55型（ADV55）、アデノウイルス7型（ADV7））、および水痘ウイルスがある。一部の実施形態では、疾患は、本明細書の他の場所で記載した病原体の例を含めて、病原性細菌（例えば、Mycobacterium tuberculosis）または病原性原虫（例えば、マラリアにおけるようなPlasmodium）と関連している場合がある。

10

20

【0134】

それぞれが所与の増幅プロトコールと関連している複数のグラフィカル要素を有するユーザーインターフェースの一例を、図28Bに示す。図28Bに示したように、コンピュータプロセッサと付随した例示的な電子ディスプレイスクリーン2810は、ユーザーインターフェース2811を含む。ユーザーインターフェース2811は、グラフィカル要素2812、2813、および2814の表示を含む。グラフィカル要素のそれぞれは、特定の疾患に関連している（例えば、グラフィカル要素2812について「エボラ」、グラフィカル要素2813について「H1N1」、およびグラフィカル要素2814について「Hep C」（C型肝炎））、すなわち、ひいては特定の疾患に向けられた1つまたは複数の増幅プロトコールに関連していることができる。ユーザーが特定のグラフィカル要素を選択すると（例えば、電子ディスプレイスクリーン2810がユーザーインターフェースを有するタッチスクリーンを含む場合のユーザータッチ）、グラフィカル要素と関連した疾患と関連した特定の増幅プロトコール（複数可）を、付随したコンピュータプロセッサによって実行することができる。例えば、ユーザーがグラフィカル要素2812と対話する場合、エボラウイルスについてアッセイすることと関連した1つまたは複数の増幅プロトコールを、付随したコンピュータプロセッサによって実行することができる。3つのグラフィカル要素のみが図28Bの例示的なユーザーインターフェース2811に示されているのに対して、ユーザーインターフェースは、それぞれが様々な疾患に対応する任意の適当な数のグラフィカル要素を有し得る。さらに、図28Bのユーザーインターフェース2811に示した各グラフィカル要素は、ただ1つの疾患と関連しているのに対して、ユーザーインターフェースの各グラフィカル要素は、1つまたは複数の疾患に関連していることができ、その結果、付随したコンピュータプロセッサは、ユーザーがグラフィカル要素を選択した後、一連の増幅プロトコール（例えば、特定の疾患に向けられたそれぞれ個々の増幅プロトコール）を実行する。例えば、グラフィカル要素は、エボラウイルスおよびH1N1ウイルスに対応している場合があり、その結果、このグラフィカル要素を選択すると、付随したコンピュータプロセッサは、エボラウイルスおよびH1N1ウイルスの両方のための増幅プロトコールを実行する。

30

40

【0135】

様々な態様では、システムは、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的核酸（例えば、標的RNA、標的DNA）を増幅するためのユーザーリクエストを受け取る入力モジュールを含む。このようなユーザーリクエストを受け入れることができる任意の適当

50

なモジュールが使用され得る。入力モジュールは、例えば、1つまたは複数のプロセッサを含むデバイスを含み得る。プロセッサ（例えば、コンピュータプロセッサ）を含むデバイスの非限定的な例は、デスクトップコンピューター、ラップトップコンピューター、タブレットコンピューター（例えば、Apple（登録商標）iPad（登録商標）、Samsung（登録商標）Galaxy Tab）、携帯電話、スマートフォン（例えば、Apple（登録商標）iPhone（登録商標）、Android（登録商標）対応電話）、パーソナルデジタルアシスタント（PDA）、ビデオゲームコンソール、テレビ、音楽再生デバイス（例えば、Apple（登録商標）iPod（登録商標））、ビデオ再生デバイス、ページャー、および計算機がある。プロセッサは、1つもしくは複数のコントローラー、演算部、および/もしくはコンピューターシステムの他のユニットに付随している場合があり、または望まれるファームウェア中に据え付けられている場合がある。ソフトウェアで遂行される場合、ルーチン（またはプログラム）は、任意のコンピューター可読メモリ、例えば、RAM、ROM、フラッシュメモリ、磁気ディスク、レーザーディスク（登録商標）、または他の記憶媒体中などに記憶され得る。同様に、このソフトウェアは、例えば、通信チャネル、例えば、電話線、インターネット、ローカルイントラネット、無線接続などによって、または可搬媒体、例えば、コンピューター可読ディスク、フラッシュドライブなどを介してを含めた任意の公知の送達方法を介してデバイスに送達され得る。様々なステップを様々なブロック、オペレーション、ツール、モジュール、またはテクニックとして遂行することができ、これらは、ひいては、ハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、またはこれらの任意の組合せで遂行することができる。ハードウェアで遂行される場合、ブロック、オペレーション、テクニックなどの一部またはすべては、例えば、カスタム集積回路（IC）、特定用途向け集積回路（ASIC）、フィールドプログラマブルロジックアレイ（FPGA）、プログラマブルロジックアレイ（PLA）などで遂行され得る。

10

20

30

40

50

【0136】

一部の実施形態では、入力モジュールは、標的核酸の増幅を実施するためのユーザーリクエストを受け取るように構成されている。入力モジュールは、直接に（例えば、ユーザーによって操作される入力デバイス、例えば、キーボード、マウス、もしくはタッチスクリーンなどによって）、または間接的に（例えば、インターネットによってを含めた有線接続もしくは無線接続によって）ユーザーリクエストを受け取ることができる。出力電子機器を介して、入力モジュールは、増幅モジュールにユーザーのリクエストを提供することができる。一部の実施形態では、入力モジュールは、ユーザーが標的核酸を増幅するためのリクエストを提供することを可能にするように構成されているグラフィカルユーザーインターフェース（GUI）などのユーザーインターフェース（UI）を含み得る。GUIは、テキストコンポーネント、グラフィカルコンポーネント、および/またはオーディオコンポーネントを含むことができる。GUIは、コンピュータプロセッサを含むデバイスのディスプレイを含めた電子ディスプレイに備えることができる。このようなディスプレイは、抵抗膜式または静電容量式タッチスクリーンを含み得る。

【0137】

ユーザーの非限定的な例としては、生体試料が得られた対象、医療関係者、臨床医（例えば、医者、看護師、検査技師）、実験室職員（例えば、病院の検査技師、研究科学者、製薬科学者）、臨床試験のための臨床モニター、またはヘルスケア産業におけるその他のユーザーがある。

【0138】

様々な態様では、システムは、入力モジュールによって受け取られたユーザーリクエストに応答して標的核酸またはその部分に対して核酸増幅反応を実施するための増幅モジュールを含む。増幅モジュールは、本明細書に記載の方法のいずれかを実行することができる場合があり、流体操作デバイス、1つまたは複数のサーモサイクラー、1つまたは複数の反応器（例えば、サーモサイクラーの熱ブロックのウェル）を受け取るための手段、増幅産物を検出することができる検出器（例えば、光検出器、分光学的検出器、電気化学検

出器)、ならびにレシピエントに増幅産物(例えば、増幅DNA産物)の存在および/または量に関する情報(例えば、生データ、処理されたデータ、または本明細書に記載の任意の他のタイプの情報)を出力するための手段のいずれかを含み得る。一部の 경우에는、増幅モジュールは、本明細書の他の場所で記載したコンピュータプロセッサを有するデバイスを含み得、適切なソフトウェアを活用して検出からの生データを分析することができる場合もある。さらに、一部の実施形態では、増幅モジュールは、入力モジュールから指示を受け取るのに必要な入力電子機器を含み得、出力モジュールと通信するのに必要な出力電子機器を含み得る。

【0139】

一部の実施形態では、反応器への材料の供給、核酸の増幅、増幅産物の検出、および情報の出力のうちの一つまたは複数のステップは、増幅モジュールによって自動化されている場合がある。一部の実施形態では、自動化は、一つまたは複数の流体ハンドラーおよび関連したソフトウェアの使用を含み得る。いくつかの市販の流体操作システムは、このようなプロセスの自動化を実施するのに利用することができる。このような流体ハンドラーの非限定的な例としては、Perkin-Elmer、Caliper Life Sciences、Tecan、Eppendorf、Apricot Design、およびVelocity 11からの流体ハンドラーがある。

10

【0140】

一部の実施形態では、増幅モジュールは、リアルタイム検出機器を含み得る。このような機器の非限定的な例としては、リアルタイムPCRサーモサイクラー、ABI PRISM (登録商標) 7000 Sequence Detection System、ABI PRISM (登録商標) 7700 Sequence Detection System、Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System(すべてApplied Biosystems製); LightCycler (商標) System (Roche Diagnostics GmbH); Mx3000P (商標) Real-Time PCR System、Mx3005P (商標) Real-Time PCR System、およびMx4000 (登録商標) Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene、La Jolla、Calif.); ならびに SmartCycler System (Cepheid、Fisher Scientificによって流通されている)がある。一部の実施形態では、増幅モジュールは、別の自動機器、例えば、COBAS (登録商標) AmpliPrep/COBAS (登録商標) TaqMan (登録商標) システム (Roche Molecular Systems)、TIGRIS DTSシステム (Hologic Gen-Probe、San Diego、CA)、PANTHERシステム (Hologic Gen-Probe、San Diego、CA)、BD MAX (商標) システム (Becton Dickinson)、GeneXpert System (Cepheid)、Filmarray (登録商標) (BioFire Diagnostics) システム、iCube システム、IDBoxシステム (Luminex)、Encompass MDx (商標) (Rheonix) システム、Liat (商標) Analyzer (IQuum) システム、Biocartis' Molecular Diagnostic Platform システム、Enigma (登録商標) MLシステム (Enigma Diagnostics)、T2 Dx (登録商標) システム (T2 Biosystems)、Verigene (登録商標) システム (NanoSphere)、Great Basin's Diagnostic System、Unyvero (商標) System (Curetis)、PanNATシステム (Miconics)、またはSpartan (商標) RXシステム (Spartan Bioscience) などを含み得る。

20

30

40

【0141】

50

様々な態様では、システムは、増幅モジュールに作動可能に接続された出力モジュールを含む。一部の実施形態では、出力モジュールは、入力モジュールのための上述したプロセッサを有するデバイスを含み得る。出力モジュールは、本明細書に記載の入力デバイスを含み得、かつ/または増幅モジュールと通信するための入力電子機器を含み得る。一部の実施形態では、出力モジュールは、電子ディスプレイ、一部の 경우에는、UIを含む電子ディスプレイであり得る。一部の実施形態では、出力モジュールは、例えば、インターネットなどのコンピューターネットワークに作動可能にカップリングした通信インターフェースである。一部の実施形態では、出力モジュールは、コンピューターネットワーク、無線ネットワーク、ローカルイントラネット、またはインターネットを含めた任意の適当な通信媒体を使用して地元の場所または遠隔地でレシピエントに情報を伝達することができる。一部の実施形態では、出力モジュールは、増幅モジュールから受け取ったデータを分析することができる。一部の 경우에는、出力モジュールは、レポートを作成し、レシピエントにレポートを伝達することができるレポートジェネレーターを含み、レポートは、本明細書の他の場所で記載した増幅産物の量および/または存在に関する任意の情報を含有する。一部の実施形態では、出力モジュールは、生データ、または増幅モジュールに含まれるソフトウェアによって実施されるデータ分析の形態などで、増幅モジュールから受け取った情報に回答して自動的に情報を伝達し得る。代わりに、出力モジュールは、ユーザーから指示を受け取った後に情報を伝達することができる。出力モジュールによって伝達された情報は、電子的に閲覧し、またはプリンターから印刷することができる。

10

20

【0142】

入力モジュール、増幅モジュール、および出力モジュールの1つまたは複数は、同じデバイス内に収められる場合があり、または同じコンポーネントの1つまたは複数を含み得る。例えば、増幅モジュールは、入力モジュール、出力モジュール、または両方も含み得る。他の例では、プロセッサを含むデバイスは、入力モジュールおよび出力モジュールの両方の中に含まれる場合がある。ユーザーは、標的核酸を増幅することをリクエストするためにデバイスを使用することができ、レシピエントに増幅産物に関する情報を伝達する手段として使用される場合もある。一部の 경우에는、プロセッサを含むデバイスは、3つすべてのモジュール内に含まれる場合があり、その結果、プロセッサを含むデバイスは、増幅モジュールまたは任意の他のモジュール内に含まれる器具類（例えば、サーモサイクラー、検出器、流体操作デバイス）を制御し、それに指示を提供し、それから情報を受け取るのにも使用され得る。

30

【0143】

本明細書に記載の方法によって標的核酸を増幅するための例示的なシステムは、図1に表されている。システムは、入力および出力モジュールの両方の一部として機能を果たし得るコンピューター101を含む。ユーザーは、核酸増幅の準備のできた反応混合物を含む反応器102を増幅モジュール104に入れる。増幅モジュールは、サーモサイクラー105および検出器106を含む。入力モジュール107は、反応混合物中の標的核酸を増幅するためのユーザーのリクエストを受け取ることができるコンピューター101および付随した入力デバイス103（例えば、キーボード、マウスなど）を含む。入力モジュール107は、ユーザーのリクエストを増幅モジュール104に伝え、核酸増幅がサーモサイクラー105内で始まる。増幅が進行するにつれて、増幅モジュールの検出器106が増幅産物を検出する。増幅産物に関する情報（例えば、検出器によって得られる生データ）は、検出器106からコンピューター101に伝達され、このコンピューターは、出力モジュール108のコンポーネントとしても機能を果たす。コンピューター101は、増幅モジュール104から情報を受け取り、情報に対して任意の追加の操作を実施し、次いで処理された情報を含むレポートを作成する。レポートが作成されると、次いでコンピューター101は、コンピューターネットワークインターフェース110を介するコンピューターネットワーク（例えば、イントラネット、インターネット）によって、プリンター111を介したハードコピーフォーマットで、またはコンピューター101に作動可能に連結された電子ディスプレイ112を介してそのエンドレシピエント109にレポ

40

50

ートを伝達する。一部の場合では、電子ディスプレイ 112。

【0144】

一態様では、本開示は、1つまたは複数のプロセッサによって実行されると、本明細書に開示の方法のいずれかによる一方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピューター可読媒体を提供する。別の態様では、本開示は、1つまたは複数のコンピュータープロセッサによって実行されると、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸(RNA)を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピューター可読媒体であって、方法は、a)生体試料と、デオキシリボ核酸(DNA)増幅と並行して逆転写増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)逆転写酵素、(ii)DNAポリメラーゼ、および(iii)標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと、(b)反応器中の反応混合物を、各サイクルが、(i)60秒未満またはそれに等しい変性化継続時間にわたって変性化温度で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)60秒未満またはそれに等しい伸長継続時間にわたって伸長温度で反応混合物をインキュベートすることを含む、多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、標的RNAの存在を示す増幅DNA産物を生成し、それによって標的RNAを増幅することを含む、コンピューター可読媒体を提供する。

10

【0145】

別の態様では、本開示は、1つまたは複数のコンピュータープロセッサによって実行されると、対象から直接得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸(RNA)を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピューター可読媒体であって、方法は、(a)対象から得られた生体試料を受け取ることと；(b)生体試料と、逆転写増幅、および任意選択でデオキシリボ核酸(DNA)増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)逆転写酵素および(ii)標的RNAのためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；(c)反応混合物を多重のサイクルのプライマーエクステンション反応に付して、生体試料中の標的RNAの存在を示す検出可能量の増幅DNA産物を得ることと；(d)(c)のその量のDNA産物を検出することと；(e)レシピエントにその量のDNA産物に関する情報を出力することとを含み、(a)~(e)を完了するための時間は、約30分未満またはそれに等しい、コンピューター可読媒体を提供する。

20

【0146】

一態様では、本開示は、1つまたは複数のコンピュータープロセッサによって実行されると、対象から得られる生体試料中に存在する標的リボ核酸(RNA)を増幅する方法を遂行する機械実行可能コードを含むコンピューター可読媒体であって、方法は、(a)生体試料と、核酸増幅を行うのに必要な試薬であって、(i)DNAポリメラーゼおよび任意選択で逆転写酵素、ならびに(ii)標的核酸のためのプライマーセットを含む、試薬とを含む反応器を準備して、反応混合物を得ることと；(b)反応器中の反応混合物を、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応であって、各シリーズが、(i)変性化温度および変性化継続時間によって特徴付けられる変性化条件下で反応混合物をインキュベートし、その後、(ii)伸長温度および伸長継続時間によって特徴付けられる伸長条件下で反応混合物をインキュベートする2つまたはそれ超のサイクルを含み、個々のシリーズが、変性化条件および/または伸長条件に関して複数のうちの少なくとも1つの他の個々のシリーズと異なる、複数のシリーズのプライマーエクステンション反応に付して、標的核酸に由来する増幅産物を生成することを含む、コンピューター可読媒体を提供する。

30

40

【0147】

コンピューター可読媒体は、それだけに限らないが、実体のある(または非一時的)記憶媒体、搬送波媒体、または物理的な伝送媒体を含めた多くの形態を採り得る。非揮発性記憶媒体としては、例えば、計算ステップ、処理ステップなどを遂行するのに使用されるような任意のコンピューター(複数可)などの中の記憶デバイスのいずれかなどの光学または磁気ディスクがある。揮発性記憶媒体としては、コンピューターのメインメモリな

50

どのダイナミックメモリがある。実体のある伝送媒体としては、コンピューターシステム内にバスを含むワイヤーを含めた、同軸ケーブル；銅線および光ファイバーがある。搬送波伝送媒体は、無線周波数（RF）および赤外（IR）データ通信中に生成されるものなどの電気信号もしくは電磁信号、または音波もしくは光波の形態を採ることができる。したがって、コンピューター可読媒体の一般的な形態としては、例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、任意の他の磁性媒体、CD-ROM、DVD、もしくはDVD-ROM、任意の他の光媒体、パンチカード、紙テープ、穴のパターンを有する任意の他の物理的記憶媒体、RAM、PROM、およびEPROM、FLASH-EPROM、任意の他のメモリーチップもしくはカートリッジ、搬送波輸送データもしくはインストラクション、このような搬送波を輸送するケーブルもしくはリンク、またはコンピューターがプログラミングコードおよび/もしくはデータを読むことができる任意の他の媒体がある。コンピューター可読媒体のこれらの形態の多くは、実行のために1つまたは複数のインストラクションの1つまたは複数のシーケンスをプロセッサに搬送することに関与している場合がある。

【実施例】

【0148】

（実施例1）

ウイルスストック試料および生体試料中の核酸の増幅および検出

増幅および検出実験を実施して、ウイルス標準試料および生体試料から得られた結果を比較した。RNAウイルス病原体を含む生体試料およびウイルス病原体の標準試料を、病原体のRNAが増幅されるように増幅条件に付した。一連の実験を、H3N2およびH1N1（2007）インフルエンザウイルスのそれぞれについて行った。各生体試料は、口咽頭スワブを介して対象から直接得た。各ウイルス標準試料は、ウイルスを含む原液の連続希釈液として得た。H3N2およびH1N1（2007）の濃度は、 10^6 IU/mLであった。H5N1およびH1N1（2007）については、1/2、1/20、1/200、1/2000、および1/20000の希釈液を増幅にかけた。各実験セットにおいて、陰性対照（例えば、ウイルスRNAを含まない試料）も増幅にかけた。

【0149】

各試料5マイクロリットルを、ウイルスRNAの逆転写を行うのに必要な試薬および逆転写から得られる相補的DNAの増幅（例えば、並列の核酸増幅）を完了するのに必要な試薬と25μLの反応管中で組み合わせた。逆転写およびDNA増幅を行うのに必要な試薬は、逆転写酵素（例えば、SensiscriptおよびOmniscript転写酵素）、DNAポリメラーゼ（例えば、HotStarTaq DNAポリメラーゼ）、およびdNTPを含む市販の予混合物（例えば、Qiagen One-Step RT-PCRまたはOne-Step RT-qPCRキット）として供給した。さらに、反応管に、増幅DNA産物を検出するためのFAM色素を含むTaqManプローブも含めた。増幅DNA産物を生成するために、リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、95で5分、その後45で20分、その後95で2分、その後95で5秒と55で30秒の40サイクルを含む変性化および伸長条件のプロトコールに従って、各反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

【0150】

H3N2の増幅結果を図2にグラフで表し（図2Aは、様々なウイルス標準試料に対応し、図2Bは、生体試料に対応する）、H1N1（2007）の増幅結果を図3にグラフで表す（図3Aは、様々なウイルス標準試料に対応し、図3Bは、生体試料に対応する）。FAM色素の記録された蛍光をサイクルの数に対してプロットする。

【0151】

図2Aに示したように、H3N2ウイルス標準試料のそれぞれは、陰性対照に対して検出可能なシグナルを示し、Ct値は、18～32の範囲であった。図2Bに示したように、ウイルスH3N2生体試料のそれぞれは、陰性対照に対して検出可能なシグナルを示し、Ct値は、29～35の範囲であった。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 2 】

図 3 A に示したように、かつ 1 / 2 0 0 0 0 希釈液を例外として、H 1 N 1 (2 0 0 7) ウイルス標準試料のそれぞれは、陰性対照に対して検出可能なシグナルを示し、C t 値は、2 4 ~ 3 5 の範囲であった。図 3 B に示したように、H 1 N 1 (2 0 0 7) 生体試料のそれぞれは、陰性対照に対して検出可能なシグナルを示し、C t 値は、2 8 ~ 3 5 の範囲であった。

【 0 1 5 3 】

一般に、図 2 および図 3 に示したデータは、検査したウイルスを、良好な感度で、5 0 I U / m L という低い濃度で、4 対数の濃度範囲にわたって、約 4 0 以下のサイクル閾値で増幅 D N A 産物を介して検出することができたことを示す。さらに、データは、対象から得た生体試料から得たウイルス R N A の検出も同様の様式で検出することができたことも示す。

10

【 0 1 5 4 】

(実施例 2)

異なる緩衝系中のウイルス核酸の増幅および検出

増幅および検出実験を実施して、増幅のために異なる緩衝系を使用して得た結果を比較した。一連の実験は、2 つの異なる緩衝系、S 1 および S 2 について行った。S 1 緩衝液は、双性イオン緩衝剤および B S A を含んでおり、S 2 緩衝液は、双性イオン緩衝剤および水酸化ナトリウムを含んでいた。各緩衝液の実験は、ウイルスを含む原液の連続希釈液として得た一連の H 5 N 1 インフルエンザウイルス標準試料を使用して完了した。H 5 N 1 の濃度は、 $1 0^6$ I U / m L であった。1 / 2、1 / 2 0、1 / 2 0 0、1 / 2 0 0 0、1 / 2 0 0 0 0、1 / 2 0 0 0 0 0 の希釈液、および陰性対照を、増幅にかけた。

20

【 0 1 5 5 】

各試料 5 マイクロリットルを、ウイルス R N A の逆転写を行うのに必要な試薬および逆転写から得られる相補的 D N A の増幅 (例えば、並列の核酸増幅) を完了するのに必要な試薬と 2 5 μ L の反応管中で組み合わせた。逆転写および D N A 増幅を行うのに必要な試薬は、逆転写酵素、D N A ポリメラーゼ、d N T P、および適切な S 1 または S 2 緩衝液を含んでいた。さらに、反応管に、増幅 D N A 産物を検出するための F A M 色素を含む T a q M a n プローブも含めた。増幅 D N A 産物を生成するために、リアルタイム P C R サーマサイクラー内で、9 5 で 5 分、その後 4 5 で 2 0 分、その後 9 5 で 2 分、その後 9 5 で 5 秒と 5 5 で 3 0 秒の 4 0 サイクルを含む変性化および伸長条件のプロトコールに従って、各反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

30

【 0 1 5 6 】

緩衝系 S 1 の増幅結果を図 4 A にグラフで表す。緩衝系 S 2 の増幅結果を、図 4 B にグラフで表した。F A M 色素の記録された蛍光をサイクルの数に対してプロットする。

【 0 1 5 7 】

図 4 A に示したように、緩衝系 S 1 中で増幅させたウイルス標準試料のそれぞれは、陰性対照に対して検出可能なシグナルを示し、C t 値は、2 5 ~ 3 6 の範囲であった。図 4 B に示したように、緩衝液 S 2 中で増幅させたウイルス標準試料のそれぞれは、陰性対照に対して検出可能なシグナルを示し、C t 値は、2 5 ~ 3 5 の範囲であった。

40

【 0 1 5 8 】

一般に、図 4 に示したデータは、検査したウイルスを、良好な感度で、5 0 I U / m L という低い濃度で、5 対数の濃度範囲にわたって、約 4 0 以下のサイクル閾値で増幅 D N A 産物を介して検出することができたことを示す。さらに、データは、同様の増幅結果を、異なる緩衝系を用いて得ることができるとも示す。

【 0 1 5 9 】

(実施例 3)

血漿試料中の B 型肝炎ウイルス (H B V) の増幅および検出

増幅実験を実施して、生体試料中の標的核酸を検出する増幅法のロバスト性を判定した

50

。様々な濃度（例えば、1ミリリットル当たり50感染ユニット（IU/mL）、200 IU/mL、2000 IU/mL、20000 IU/mL）でB型肝炎ウイルス（HBV）を含む希釈したヒト血漿試料をそれぞれ増幅反応に付した。HBVは、RNA中間体を介して複製するDNAウイルスである。HBVは、DNAウイルスの直接PCRを介して検出可能である。複数の試料（ $n = 2 \sim 4$ ）を、陰性対照（例えば、HBVを含まない血漿）の複数の試料に加えて、各濃度について検査した。

【0160】

反応混合物を得るために50 μ L反応管中の、RNAの逆転写を行うのに必要な試薬および逆転写から得られる相補的DNAの増幅（例えば、並列の核酸増幅）を完了するのに必要な試薬を含む各試料2.5 μ L。逆転写およびDNA増幅を行うのに必要な試薬は、逆転写酵素（例えば、SensiscryptおよびOmnicrypt転写酵素）、DNAポリメラーゼ（例えば、HotStarTaq DNAポリメラーゼ）、およびdNTPを含む市販の予混合物（例えば、Qiagen One-Step RT-PCRまたはOne-Step RT-qPCRキット）として供給した。さらに、混合物に、増幅DNA産物を検出するためのFAM色素を含むTaqManプローブも含めた。また、反応混合物に、血漿中に見つかる増幅阻害剤の阻害作用を防止するための双性イオン緩衝剤およびウラシル-DNAグリコシラーゼ（UNG）酵素を含めた。リアルタイムPCRサーモサイクラー（thermocycler）内で、94 で1分、その後50 で10分、その後94 で2分、その後94 で5秒と58 で35秒の50サイクルを含む変性化および伸長条件のプロトコールに従って、各反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

10

20

【0161】

増幅結果を図5にグラフで表し、判定したCt値を表1に表化する。FAM色素の記録された相対蛍光単位（RFU）を、図5にサイクルの数に対してプロットする。図5および表1に示したように、HBVを検査した各濃度で検出することができ、サイクル閾値は、28.99～39.39の範囲であった。一般に、より高い濃度の試料は、より低いサイクル閾値に対応した。

【0162】

一般に、図5および表1に示したデータは、HBVを、良好な感度で、50 IU/mLという低い濃度で（検査した最低）、約40以下のサイクル閾値で増幅DNA産物を介して検出することができたことを示す。検査した最高の濃度（20000 IU/mL）は、検査した最低の濃度（50 IU/mL）より400倍濃縮されていたが、サイクル閾値は、より低い濃度について約25%だけより高く、増幅スキームが一般にロバストであったことを示す。

30

【表 1】

表 1: 実施例 3 における実験からの Ct の結果

試料番号	IU/mL	Ct
1	2000	33.09
2	50	39.39
3	2.00E+04	29
4	2000	32.97
5	200	35.51
6	2000	33.07
7	2.00E+04	30.03
8	200	35.78
9	50	37.91
10	2.00E+04	29.37
11	200	35.73
12	2.00E+04	28.99

10

20

【 0 1 6 3 】

(実施例 4)

生体試料中の核酸を増幅する前の生体試料の予熱、および一連の増幅反応

増幅実験を行って、検出感度に対する生体試料の予熱の効果を判定し、検出感度に対する多重のシリーズの増幅反応を使用する効果も判定した。

【 0 1 6 4 】

各反応混合物が病原性種 1 μ L、適切な核酸増幅反応（例えば、RNA 種について逆転写および DNA 増幅、ならびに DNA 種について DNA 増幅）を完了するのに必要な試薬、ならびに FAM 色素を含む TaqMan プローブを含む、20 の反応混合物 25 μ L を調製した。反応混合物のうち 4 つは、H1N1 (2007)（すなわち、RNA ウイルス）を含有し、反応混合物のうち 4 つは、H3N2（すなわち、RNA ウイルス）を含有し、反応混合物のうち 4 つは、H1N1 (2009) を含有し、反応混合物のうち 4 つは、結核 (TB)（すなわち、細菌試料）を含有し、反応混合物のうち 4 つは、アリューシャン病ウイルス (ADV)（すなわち、DNA ウイルス）を含有していた。H1N1 (2007)、H1N1 (2009)、H3N2、および ADV 病原性種は、対象から得た口咽頭スワブに由来した。TB は、細菌ストックから得た。

30

40

【 0 1 6 5 】

予熱および増幅プロトコルの様々な組合せを利用した。これらを表 2 に要約する。各病原性種の第 1 の反応混合物について、病原性種を 95 で 10 分予熱した後、反応混合物に添加した。反応混合物に病原性種を添加した後、リアルタイム PCR サーモサイクラー内で、95 で 2 分、その後 95 で 5 秒と 55 で 30 秒の 40 サイクルを含む変性化および伸長条件のプロトコールに従って反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。これらの反応混合物を PH - 1 混合物と呼ぶ。

【 0 1 6 6 】

各病原性種の第 2 の反応混合物について、病原性種を 50 で 30 分予熱した後、反応混合物に添加した。反応混合物に病原性種を添加した後、リアルタイム PCR サーモサイ

50

クラー内で、95 で2分、その後95 で5秒と55 で30秒の40サイクルを含む変性化および伸長条件のプロトコルに従って反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。これらの反応混合物をPH-2混合物と呼ぶ。

【0167】

各病原性種の第3の反応混合物について、病原性種は、反応混合物に添加する前に予熱しなかった。リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、95 で1分、その後55 で10分、その後95 で2分、その後95 で5秒と55 で30秒の40サイクルを含む変性化および伸長条件のプロトコルに従ってこれらの反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。これらの反応混合物をPTC-1混合物と呼ぶ。

10

【0168】

各病原性種の第4の反応混合物について、病原性種は、反応混合物に添加する前に予熱しなかった。これらの反応混合物を、各シリーズが変性化および伸長条件の多重のサイクルを含む、複数のシリーズの増幅反応を含むプロトコルに付した。リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、95 で1分、その後、シリーズ1(95 5秒間、1 / サイクルでステップダウンして60~50 の20秒、および60 10秒間)の10サイクル、その後95 2分間、その後シリーズ2(95 5秒間、55 30秒間)の40サイクルを含むプロトコルに従って反応混合物をインキュベートした。シリーズ1およびシリーズ2は、伸長温度および伸長継続時間が異なる。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。これらの反応混合物をPTC-2混合物と呼ぶ。

20

【表2】

表2:実施例4の実験条件

反応混合物のタイプ	プロトコル
PH-1	病原性種に95°Cで10分予熱した後、反応混合物に添加、次いで95°C 2分間、(95°C 5秒間、55°C 30秒間)×40サイクル
PH-2	病原性種(pathogenic)に50°Cで30分予熱した後、反応混合物に添加、次いで95°C 2分間、(95°C 5秒間、55°C 30秒間)×40サイクル
PTC-1	95°C 1分間、55°C 10分間、次いで95°C 2分間、(95°C 5秒間、55°C 30秒間)×40サイクル
PTC-2	95°C 1分間、(95°C 5秒間、1°C/サイクルでステップダウンして60~50°C 20秒間、60°C 10秒間)×10サイクル、次いで95°C 2分間、(95°C 5秒間、55°C 30秒間)×40サイクル

30

【0169】

各病原性種からの結果を、図6(H1N1(2007))、図7(H3N2)、図8(H1N1(2009))、図9(TB)、および図10(ADV)にグラフで表す。図6~10のそれぞれにおけるアイテムAは、反応混合物PH-1およびPH-2について得られた結果を表し、一方、図6~10のそれぞれにおけるアイテムBは、反応混合物PTC-1およびPTC-2について得られた結果を表す。各実験について判定したCt値を表3に要約する。Ct値は、PH-1およびPH-2 ADV反応混合物について判定することができず、図10Aに示したデータに相応する。

40

【0170】

表3に示したデータによれば、間のCt値は、PH-1とPH-2反応混合物の間で事実上同様であり、病原性種(または病原性種を含む生体試料)を一連の条件で予熱して同様の検出感度を得ることができることを示した。さらに、PTC-1反応混合物は、PH

50

- 1 および PH - 2 反応混合物について判定したものと同様の Ct 値を有していた。PTC - 1 および PH - 1 / PH - 2 プロトコルは、PTC - 1 が予熱ステップを含まなかったことを除いて同様であった。したがって、PTC - 1 データの PH - 1 / PH - 2 データとの比較は、病原性種を反応混合物に供給する前の病原性種の予熱は、良好な感度を伴った結果を得るのに必要でない場合があることを示す。しかし、一部の 경우에는、TB および ADV 試料について、予熱は、予熱なしより悪くさえなり得る。

【0171】

しかし、検査したすべての病原性種について、PTC - 2 の Ct 値は、PH - 1、PH - 2、または PTC - 1 のいずれよりも低かった。PTC - 1 および PTC - 2 のデータの比較は、反応混合物を、各シリーズが変性化および伸長条件の多重のサイクルを含む多重のシリーズの増幅反応に付すと、検出感度が改善され得ることを示す。

10

【表3】

表3:実施例4における実験からのCtの結果

タイプ	試料	PH-1 (Ct)	PH-2 (Ct)	PTC-1 (Ct)	PTC-2 (Ct)
RNAウイルス	H1N1(2007)	27	30	28	22
RNAウイルス	H3N2	34	33	32	23
RNAウイルス	H1N1(2009)	32	32	32	24
DNA細菌	TB	34	32	26	20
DNAウイルス	ADV	-	-	36	30

20

30

【0172】

(実施例5)

試料の多重化

増幅および検出実験を実施して、様々な増幅プロトコルをベンチマークし、多重化が実現され得るか否かを判定した。RNA (例えば、H1N1(2007)、H1N1(2009)、H3N2)、またはDNA (例えば、ADV、ヒトボカウイルス(HBoV)) ウイルス病原体、またはDNA細菌性病原体(例えば、TB)を含む生体試料を、様々な増幅条件に付した。各生体試料は、細菌ストックから得たTB試料を除いて、口咽頭スワブを介して対象から直接得た。各試料1マイクロリットルを、本明細書に記載するように核酸増幅を行い、増幅産物を検出するのに必要な試薬と25μL反応管中で組み合わせて反応混合物を得た。

40

【0173】

増幅プロトコルの多重化能力を評価するために、それぞれがH3N2、ADV、またはH3N2とADVの混合物の1つを含む、3つの反応混合物を、リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、94 で2分、45 で20分、94 で1分、その後94 で5秒と55 で35秒の50サイクルを含む増幅プロトコルに従ってインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

【0174】

実験の結果を、図11にグラフで表し、表4で以下に示す。図11に示したように、H3N2およびTBはともに、他方との組み合わせ、または他方の非存在下のとき同様に検

50

出することができた。ADVの非存在下では、26.03のCt値がH3N2反応混合物について記録され、H3N2の非存在下では、30.5のCt値がADV反応混合物について記録された。H3N2およびADVの両方を組み合わせて単一反応混合物にしたとき、26(H3N2)および30(ADV)のCt値が得られた。Ct値は、単一成分の反応混合物と比較したとき、組み合わせた反応混合物についてほぼ同一であった。結果は、多重化が良好な感度を伴って達成可能であり、RNAおよびDNA種の両方が検出され得ることを示す。

【表4】

表4:実施例5におけるH3N2およびADV多重化実験からの結果

タイプ	試料	Ct
RNAウイルス	H3N2	26.03
DNAウイルス	ADV	30.5
RNA&DNAウイルス	H3N2 & ADV	26(H3N2) & 30(ADV)

10

20

【0175】

増幅プロトコルの多重化能力を評価するための別の実験では、それぞれがH3N2、TB、またはH3N2とTBの混合物の1つを含む、3つの反応混合物を、リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、95で2分、その後95で5秒と55で30秒の40サイクルを含む増幅プロトコルに従ってインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

【0176】

実験の結果を、図12にグラフで表し、表5で以下に示す。図12に示したように、H3N2およびTBはともに、他方との組み合わせ、または他方の非存在下のとき同様に検出することができた。TBの非存在下では、32のCt値がH3N2反応混合物について記録され、H3N2の非存在下では、32のCt値がTB反応混合物について記録された。H3N2およびTBの両方を組み合わせて単一反応混合物にしたとき、29(H3N2)および30(TB)のCt値が得られた。Ct値は、単一成分の反応混合物と比較したとき、組み合わせた反応混合物について同様であった。結果は、多重化が良好な感度を伴って達成可能であり、RNAおよびDNA種の両方が多重化スキームで検出され得ることを示す。

30

【表5】

表5:実施例5におけるH3N2およびTB多重化実験からの結果

タイプ	試料	Ct
RNAウイルス	H3N2	32
DNAウイルス	TB	32
RNA&DNAウイルス	H3N2 & TB	29(H3N2) & 30(TB)

40

【0177】

(実施例6)

50

多重のシリーズの増幅反応のベンチマーキング

増幅および検出実験を実施して、多重のシリーズの増幅反応を含む様々な増幅プロトコールをベンチマークした。RNA（例えば、H1N1（2007）、H1N1（2009）、H3N2）、またはDNA（例えば、ADV、ヒトボカウイルス（HBoV）ウイルス病原体、またはDNA細菌性病原体（例えば、TB）を含む生体試料を、様々な増幅条件に付した。各生体試料は、細菌ストックから得たTB試料を除いて、口咽頭スワブを介して対象から直接得た。各試料1マイクロリットルを、本明細書に記載するように核酸増幅を行い、増幅産物を検出するのに必要な試薬と25μL反応管中で組み合わせて反応混合物を得た。

【0178】

実験の1つのセットでは、増幅混合物を、各シリーズが異なる変性および伸長条件を含む2つのシリーズの増幅反応を含む増幅プロトコールに付した。6つの反応混合物（H3N2を含む2つ、ADVを含む2つ、HBoVを含む2つ）を、リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、94 で1秒、その後シリーズ1（94 で1秒および45 で10秒）の11サイクル、その後95 で1分、その後シリーズ2（95 で5秒および55 で30秒）の40サイクルを含む増幅プロトコールに従ってインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

【0179】

実験の結果を表6で以下に示す。表6に示したように、判定したCt値は、8.35～23の範囲であった。結果は、多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコールは、良好な感度を実現するのに有用であり得ることを示す。さらに、結果は、RNAおよびDNA種の両方が多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコールを用いて検出され得ることも示す。

【表6】

表6:実施例6におけるH3N2、ADV、およびHBoV実験からの結果

タイプ	試料	Ct
RNAウイルス	H3N2-1	17
RNAウイルス	H3N2-2	20
DNAウイルス	ADV-1	18.8
DNAウイルス	ADV-2	23
DNAウイルス	HBoV-1	8.35
DNAウイルス	HBoV-2	18.37

【0180】

実験の別のセットでは、増幅混合物を、3つのシリーズの増幅反応であって、シリーズは、これらの変性および/または伸長条件に関して他と異なる、増幅反応を含む増幅プロトコールに付した。5つの反応混合物（sH1N1（2007）を含む1つ、H3N2を含む1つ、pH1N1（2009）を含む1つ、ADVを含む1つ、およびTBを含む1つ）を、リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、94 で1分、その後シリーズ1（94 で5秒、および1 / サイクルでステップダウンした60～50 で30秒）の5サイクル、その後シリーズ2（94 で5秒および50 で30秒）の5サイクル、その

後95 で2分、その後シリーズ3(95 で5秒および55 で30秒)の40サイクルを含む増幅プロトコルに従ってインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

【0181】

実験の結果を表7で以下に示す。表7に示したように、判定したCt値は、20~30の範囲であった。結果は、多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコルは、良好な感度を実現するのに有用であり得ることを示す。さらに、結果は、RNAおよびDNA種の両方が多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコルを用いて検出され得ることも示す。

【表7】

表7:実施例6におけるsH1N1(2007)、H3N2、pH1N1(2009)、ADV、およびTB実験からの結果

タイプ	試料	Ct
RNAウイルス	sH1N1(2007)	22
RNAウイルス	H3N2	23
RNAウイルス	pH1N1(2009)	24
DNAウイルス	ADV	30
DNA細菌	TB	20

10

20

【0182】

(実施例7)

多重のシリーズの増幅反応のベンチマーキング

増幅および検出実験を実施して、多重のシリーズの増幅反応を含む様々な増幅プロトコルをベンチマークした。H3N2を含む生体試料を様々な増幅条件に付した。各生体試料は、口咽頭スワブを介して対象から直接得た。各試料1マイクロリットルを、本明細書に記載するように核酸増幅を行い、増幅産物を検出するのに必要な試薬と25μL反応管中で組み合わせて反応混合物を得た。

30

【0183】

増幅混合物を、増幅プロトコルであって、一部が3つの異なる第1のシリーズの増幅反応の1つおよび同じ第2のシリーズを含み、3つの第1のシリーズは、第2のシリーズと異なる変性および伸長条件を含む、増幅プロトコルに付した。第1のシリーズおよび第2のシリーズのそれぞれは、多重のサイクルから構成した。第1のシリーズを伴わない、第2のシリーズのみを含む別の実験を行った。リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、H3N2を含む4つの反応混合物のそれぞれを、表8で以下に示した増幅プロトコルの1つに従ってインキュベートした。

40

【表 8】

表8:実施例7における実験プロトコール

反応混合物	プロトコール
1	94℃ 1分間、(シリーズ1A--94℃ 1秒間、45℃ 2分間)×5サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
2	80℃ 2分間、(シリーズ1B--80℃ 1秒間、45℃ 2分間)×5サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
3	80℃ 2分間、45℃ 30分間、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
4	94℃ 1秒間(シリーズ1C--94℃ 1秒間、45℃ 30秒間)×50サイクル、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル

10

【0184】

実験の結果を図13にグラフで表し、表9で以下に表化する。図13に示したように、反応混合物3が最高のCt値(28.59)を有していた。多重のシリーズを含むその他は、8.5~26.5の範囲のより低い値を有していた。結果は、多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコールは、良好な感度を実現するのに有用であり得ることを示す。さらに、結果は、多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコールは、単一のシリーズのみを含むプロトコールと比較したとき、より良好な感度を実現し得ることも示す。

20

【表 9】

表9:実施例7の実験結果

反応混合物	Ct
1	22.97
2	26.5
3	28.59
4	8.5

30

【0185】

(実施例8)

多重のシリーズの増幅反応のベンチマーキング

増幅および検出実験を実施して、多重のシリーズの増幅反応を含む様々な増幅プロトコールをベンチマークした。H3N2を含む生体試料を様々な増幅条件に付した。各生体試料は、口咽頭スワブを介して対象から直接得た。各試料1マイクロリットルを、本明細書に記載するように核酸増幅を行い、増幅産物を検出するのに必要な試薬と25μL反応管中で組み合わせて反応混合物を得た。

40

【0186】

増幅混合物を、増幅プロトコールであって、一部が6つの第1のシリーズの増幅反応の1つおよび同じ第2のシリーズを含み、6つの第1のシリーズは、第2のシリーズと異なる変性および伸長条件を含む、増幅プロトコールに付した。別の6つの実験を第1のシリーズを用いずに行った。リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、H3N2を含む12の反応混合物のそれぞれを、表10で以下に示した増幅プロトコールの1つに従ってインキュベートした。

【表 10】

表10:実施例8における実験プロトコール

反応混合物	プロトコール
1	95℃ 3分間、45℃ 5分間、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×40サイクル
2	95℃ 10分間、45℃ 5分間、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×40サイクル
3	95℃ 3分間、45℃ 20分間、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×40サイクル
4	95℃ 10分間、45℃ 20分間、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×40サイクル
5	95℃ 10分間、45℃ 3分間、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×40サイクル
6	45℃ 20分間、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×40サイクル
7	94℃ 2分間、(シリーズ1A--94℃ 1秒間、45℃ 10秒間)×10サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
8	94℃ 10秒間、(シリーズ1B--94℃ 1秒間、45℃ 10秒間)×10サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
9	94℃ 2分間(シリーズ1C--94℃ 10秒間、45℃ 20秒間)×10サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
10	94℃ 10秒間、(シリーズ1D--94℃ 10秒間、45℃ 20秒間)×10サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
11	94℃ 2分間、(シリーズ1E--94℃ 30秒間、45℃ 60秒間)×10サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル
12	94℃ 10秒間、(シリーズ1F--94℃ 30秒間、45℃ 60秒間)×10サイクル、95℃ 1分間、(シリーズ2--95℃ 5秒間、55℃ 30秒間)×50サイクル

10

20

30

【 0 1 8 7 】

実験の結果を、表 1 1 で以下に表化する。C t 値は、1 4 . 5 3 ~ 2 7 . 2 8 の範囲であり、反応混合物 2 ~ 5 は、検出された産物を有さなかった。一般的に言えば、多重のシリーズの増幅反応に付されなかった反応混合物は、検出可能な産物を有さなかったか、または多重のシリーズの増幅反応に付された反応混合物より高い C t 値を有していた。結果は、多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコールは、良好な感度を実現するのに有用であり得ることを示す。さらに、結果は、多重のシリーズの増幅反応を含むプロトコールは、単一のシリーズのみを含むプロトコールと比較したとき、より良好な感度を実現し得ることも示す。一部の場では、多重のシリーズの増幅反応は、検出可能量の増幅産物を生成するのに必要であり得る。

40

【表 1 1】

表11:実施例8の実験結果

反応混合物	Ct
1	26.03
2	-
3	-
4	-
5	-
6	27.28
7	21.64
8	19.56
9	17.2
10	14.53
11	19.2
12	-

10

【 0 1 8 8 】

(実施例 9)

20

精製および未精製試料での結果の比較

増幅および検出実験を実施して、精製および未精製試料で得た結果を比較した。H1N1を含む精製および未精製生体試料を増幅プロトコルに付した。各生体試料は、口咽頭スワブを介して対象から直接得た。各試料1マイクロリットルを、本明細書に記載するように核酸増幅を行い、増幅産物を検出するのに必要な試薬と25μL反応管中で組み合わせて反応混合物を得た。反応混合物のうち2つがカラム精製または磁気精製のうちの1つによって精製した試料を含む、3つの反応混合物を生成した。第3の反応混合物は、未精製試料から構成した。

【 0 1 8 9 】

リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、94 で2分、45 で20分、94 で1分、その後94 で5秒と55 で35秒の50サイクルを含む増幅プロトコルに従って反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

30

【 0 1 9 0 】

実験の結果を図14にグラフで表し、表12で以下に示す。表12に示したように、判定したCt値は、27~31の範囲であり、未精製試料と様々な手段によって精製した試料との間で同様であった。結果は、試料の精製は、同様の検出感度を実現するのに必要でない場合があることを示す。

【表 1 2】

表12:実施例9の実験結果

試料タイプ	Ct
カラム精製	31
磁気ビーズ精製	27
未精製	28

10

【 0 1 9 1】

(実施例 1 0)

全血および唾液試料の分析

増幅および検出実験を、H3N2ウイルス含有血液および唾液試料に対して実施した。4つの異なる試料を検査した。2つの試料は、全血または唾液試料のいずれかを含み、2つの試料は、全血または唾液試料のいずれかの10倍希釈液(PBS中)を含む。4つの試料のそれぞれを、ウイルスRNAの逆転写を行うのに必要な試薬および逆転写から得た相補的DNAの増幅を完了するのに必要な試薬と組み合わせた。逆転写およびDNA増幅を行うのに必要な試薬は、逆転写酵素(例えば、SensiscriptおよびOmni-script転写酵素)、DNAポリメラーゼ(例えば、HotStarTaq DNAポリメラーゼ)、およびdNTPを含む市販の予混合物(例えばTakara One-Step RT-PCRまたはOne-Step RT-qPCRキット)として供給した。さらに、反応管に、増幅DNA産物を検出するためのFAM色素を含むTaqManプローブも含めた。増幅DNA産物を生成するために、リアルタイムPCRサーモサイクラー内で、45で20分、その後94で2分、その後94で5秒と55で35秒の42サイクルを含む変性化および伸長条件のプロトコールに従って、各反応混合物をインキュベートした。増幅産物の検出は、インキュベーション中に行った。

20

30

【 0 1 9 2】

H3N2の増幅結果を、図15(図15Aは、希釈していない血液に対応し、図15Bは、希釈した血液に対応する)および図16(図16Aは、希釈していない唾液に対応し、図16Bは、希釈した唾液に対応する)にグラフで表す。FAM色素の記録された蛍光を、サイクルの数に対してプロットする。

【 0 1 9 3】

図15および図16に示したように、希釈していないおよび希釈した血液および唾液反応混合物はともに、検出可能なシグナルを示し、Ct値は、24~33の範囲であった。したがって、図15および16に示したデータは、希釈していない生体試料は、約40以下のCt値を伴って良好な感度で分析することができることを示す。さらに、データは、試料の希釈が分析に必要である場合では、増幅産物はまた、同様の様式で検出され得ることも示す。一部の場合では、試料からの阻害剤が多すぎる場合、希釈は、試料、例えば、全血からの阻害を排除する別の方法であり得る。

40

【 0 1 9 4】

(実施例 1 1)

ネステッドPCR

増幅および検出実験をH1N1ウイルス含有試料に対して実施する。8つの試料を検査する。試料はそれぞれ、H1N1(2007)ウイルスストックを含む。試料をそれぞれ

50

、以下の表13に示した希釈でPBS中に希釈する。ウイルスストックの濃度は、 1×10^6 IU/mLである。増幅DNA産物を生成するために、所与の試料を含む反応混合物を、変性化および伸長条件のプロトコールに従ってインキュベートする。プロトコールは、(i)第1のランにおいて、94 で1分間、その後94 で5秒と57 で10秒の10または15サイクル(以下の表13に示したように)のサーモサイクラー内での混合物の加熱、および(ii)第2のランにおいて、94 で1分間、その後94 で5秒と57 で30秒の35サイクルのサーモサイクラー内での混合物の加熱を含む。系列希釈(series dilution)試料1 μ Lを、25 μ L反応体積中のTakara One-step qPCR予混合物に添加する。ある特定のサイクルについての第1のランの後、反応からの1 μ Lを第2のランの反応混合物に添加する。H1N1の増幅結果を、図17にグラフで表す。図は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位(RFU)を示す。8つの試料(1~8)のそれぞれのプロットを図中に示した。検出可能なシグナルを有する試料は、表13に示したCt値を有する。

【表13】

表13:実施例11の実験結果

#	1	2	3	4	5	6	7	8
試料希釈	1/10	1/100	1/1000	0	1/10	1/100	1/1000	0
Ct	18	21	27	-	11	17	24	-
第1のランのサイクル	10サイクル				15サイクル			

【0195】

(実施例12)

エボラ組換えプラスミドの増幅および検出

増幅および検出実験を、ザイールエボラウイルス(Zaire-EBOV)に対応する様々なコピー数の組換えプラスミドを含むヒト全血試料に対して実施した。8つの試料を検査した。試料のうち6つは、特定のコピー数(250000、25000、2500、250、25、および2.5コピー)で組換えプラスミドを含み、試料のうち2つ(1つは血液のみを有し、1つは水のみを有する)は、対照試料として機能を果たした。全血試料は、試料を精製することなく分析した。

【0196】

各試料を、核酸増幅に必要な試薬(例えば、DNAポリメラーゼ、dNTP、プライマー、補助因子、適当な緩衝液、プライマーなど)、およびレポーター剤(例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ)と組み合わせて反応混合物にした。組換えプラスミドのコピー数を含めた試料番号による様々な反応混合物の概要を表14に示す。増幅産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった:(i)第1のシリーズにおいて、95 で1秒と45 で1秒の15サイクル、その後95 で1分、および(ii)第2のシリーズにおいて、95 で5秒と55 で10秒の45サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成し、Ct値を得た。実験の増幅曲線を、それぞれを表14に示した試料番号に対応する試料番号によって標識して図18にグラフで表す。図18に表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位(RF

U)を示す。図18に示した曲線から得たCt値を、表15に要約する。

【0197】

図18に示したように、組換えプラスミドは、試料6を除いて組換えプラスミドを含んでいた試料のすべてについて増幅産物を介して検出された。さらに、組換えプラスミドは、対照試料(試料7および8)のいずれにおいても検出されなかった。したがって、図18に示した結果は、一部の 경우에는、25コピーのプラスミド/反応の検出感度を、多重のシリーズの変性化および伸長条件を使用して、試料を精製することなく得ることができることを示す。

【表14】

表14:実施例12の実験反応混合物

試料	プラスミド(コピー/反応)
1	250000
2	25000
3	2500
4	250
5	25
6	2.5
7	0(血液のみ)
8	0(水のみ)

10

20

30

【表15】

表15:実施例12における実験から判定したCt値

試料	コピー/反応	Ct
1	250000	26.12
2	25000	33.61
3	2500	37.61
4	250	40.61
5	25	42.97
6	2.5	---
7	0	---
8	0	---

40

【0198】

(実施例13)

エボラウイルスの増幅および検出

増幅および検出実験を、様々なコピー数のザイールエボラウイルス(Zaire-EBOV)シュドウイルスを含むヒト全血試料に対して実施した。8つの試料を、合計16の試料について2通りに(重複セット#1および重複セット#2)検査した。試料のうち

50

の6つは、特定のコピー数(2500000、250000、25000、2500、250、および25コピー)でシュードウイルスを含み、試料のうち2つ(1つは血液のみを有し、1つは水のみを有する)は、対照試料として機能を果たした。全血試料は、試料を精製することなく分析した。

【0199】

各試料を、逆転写および核酸増幅に必要な試薬(例えば、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、dNTP、補助因子、プライマー、適当な緩衝液など)、およびレポーター剤(例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ)と組み合わせて反応混合物30μLにした。シュードウイルスのコピー数を含めた試料番号による反応混合物の概要を表16に示す。シュードウイルスからの増幅産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった:(i)第1のシリーズにおいて、95℃で1秒と45℃で1秒の15サイクル、その後95℃で1分、および(ii)第2のシリーズにおいて、95℃で5秒と55℃で10秒の45サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成し、Ct値を得た。実験の増幅曲線を、それぞれを表16に示したものに対応する試料番号によって標識して図19A(重複セット#1)および図19B(重複セット#2)にグラフで表す。図19Aおよび図19Bに表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位(RFU)を示す。図19Aおよび図19Bに示した曲線から得たCt値を、「Ct1」が重複セット#1に対応し、「Ct2」が重複セット#2に対応する表17に要約する。

【0200】

図19Aおよび図19Bに示したように、シュードウイルスは、シュードウイルスを含んでいた試料のすべて(試料1~6)について増幅産物を介して両方の重複セットにおいて検出された。さらに、シュードウイルスは、対照試料(試料7および8)のいずれにおいても検出されなかった。したがって、図19Aおよび図19Bに示した結果は、一部の場では、25コピーのウイルス/反応の検出感度を、多重のシリーズの変性化および伸長条件を使用して、試料を精製することなく得ることができることを示す。

【表16】

表16:実施例13の実験反応混合物

試料	シュードウイルス(コピー/反応)
1	2500000
2	250000
3	25000
4	2500
5	250
6	25
7	0(血液のみ)
8	0(水のみ)

10

20

30

40

50

【表 17】

表17:実施例13における実験から判定したCt値

試料	コピー/反応	Ct 1	Ct 2
1	2500000	8.57	8.44
2	250000	12.09	11.27
3	25000	15.03	14.99
4	2500	18.90	18.87
5	250	21.71	21.71
6	25	27.86	39.42
7	0(血液のみ)	---	---
8	0(水のみ)	---	---

10

【0201】

(実施例14)

エボラウイルスの増幅および検出

増幅および検出実験を、様々なコピー数のザイールエボラウイルス (Zaire-EBOV) シュードウイルスを含むヒト全血試料に対して実施した。8つの試料を検査した。試料のうち6つは、特定のコピー数 (2500000、250000、25000、2500、250、および25) でシュードウイルスを含み、試料のうち2つ (1つは20000コピーのシュードウイルス陽性対照を有し、1つは水のみを有する) は、対照試料として機能を果たした。全血試料は、試料を精製することなく分析した。

20

【0202】

各試料を、逆転写および核酸増幅に必要な試薬 (例えば、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP、補助因子、適当な緩衝液など)、およびレポーター剤 (例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ) と組み合わせて反応混合物30 μ Lにした。シュードウイルスのコピー数を含めた試料番号による様々な反応混合物の概要を表18に示す。シュードウイルスからの増幅産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった: (i) 第1のシリーズにおいて、95 $^{\circ}$ Cで1秒と45 $^{\circ}$ Cで1秒の15サイクル、その後95 $^{\circ}$ Cで1分、および(ii) 第2のシリーズにおいて、95 $^{\circ}$ Cで5秒と55 $^{\circ}$ Cで10秒の35サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成し、Ct値を得た。実験の増幅曲線を、それぞれを表18に示したものに対応する試料番号によって標識して図20にグラフで表す。図20に表した結果は、サイクル数の関数としての記録した相対蛍光単位 (RFU) を示す。図20に示した曲線から得たCt値を、表19に要約する。

30

【0203】

図20に示したように、シュードウイルスは、陽性対照シュードウイルスを含む試料 (試料7) を含めて、シュードウイルスを含んでいた試料のすべて (試料1~6) について増幅産物を介して検出された。さらに、シュードウイルスは、水のみ対照試料 (試料8) において検出されなかった。したがって、図20に示した結果は、一部の 경우에는、25コピーのウイルス/反応の検出感度を、多重のシリーズの変性化および伸長条件を使用して、試料を精製することなく得ることができることを示す。

40

【表 1 8】

表18:実施例14の実験反応混合物

試料	シュードウイルス(コピー/反応)
1	2500000
2	250000
3	25000
4	2500
5	250
6	25
7	20000(陽性対照シュードウイルス)
8	0(水のみ)

10

20

【表 1 9】

表19:実施例14における実験から判定したCt値

試料	コピー/反応	Ct
1	2500000	10.44
2	250000	13.30
3	25000	16.14
4	2500	19.62
5	250	22.92
6	25	30.00
7	20000(陽性対照)	15.94
8	0(水のみ)	---

30

【 0 2 0 4】

(実施例 1 5)

40

エボラウイルスの増幅および検出

増幅および検出実験を、2つのコピー数(250コピー/反応または25コピー/反応)のザイルエボラウイルス(Zaire-EBOV)シュードウイルスのうちの1つを含むヒト全血試料に対して実施した。各全血試料を、合計8つの試料について4つの試薬システムの1つを使用して検査した。試薬システム(B-1、B-2、B-3、およびB-4)のそれぞれは、逆転写および核酸増幅に必要な試薬(例えば、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP、補助因子、適当な緩衝液など)、およびレポーター剤(例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ)を含んでいた。異なる試薬システムのそれぞれは、試薬システム中に異なる濃度の様々な成分を含有していた。各全血試料をその適切な試薬システムと組み合わせて反応混合物30μLにした。シュード

50

ウイルスのコピー数および試薬システムを含めた試料番号による様々な反応混合物の概要を表20で以下に示す。シュードウイルスからの増幅産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった：(i)第1のシリーズにおいて、95 で1秒と45 で1秒の15サイクル、その後95 で1分、および(ii)第2のシリーズにおいて、95 で5秒と55 で10秒の40サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成し、Ct値を得た。実験の増幅曲線を、それぞれを表20に示したものに対応する試料番号によって標識して図21にグラフで表す。図21に表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位(RFU)を示す。図21に示した曲線から得たCt値を、表21に要約する。

10

【0205】

図21に示したように、シュードウイルスは、25コピー/反応を有する試料を含めて、試料のすべてについて増幅産物を介して検出された。したがって、図21に示した結果は、一部の場合では、25コピーのウイルス/反応の検出感度を、多重のシリーズの変性化および伸長条件を使用して、異なる試薬システムを用いて、試料を精製することなく得ることができることを示す。

【表20】

表20:実施例15の実験反応混合物

試料	シュードウイルス(コピー/反応)	試薬システム
1	250	B-1
2	25	B-1
3	250	B-2
4	25	B-2
5	250	B-3
6	25	B-3
7	250	B-4
8	25	B-4

20

30

【表 2 1】

表21:実施例15における実験から判定したCt値

試料	コピー/反応	Ct
1	250	20.38
2	25	24.82
3	250	20.62
4	25	24.05
5	250	20.26
6	25	25.09
7	250	19.86
8	25	24.00

10

【 0 2 0 6】

(実施例 1 6)

ザイルエボラウイルスのリアルタイムPCR検出

本開示のワンステップqPCR法を使用して、ザイルエボラウイルスについて患者血清試料を分析した。試料は、精製しなかった。試料は、9つのザイルエボラウイルス陽性試料および7つのザイルエボラウイルス陰性試料を含んでいた。Roche LC96リアルタイムPCRシステムを使用した。

20

【 0 2 0 7】

試料を分析するのに本実施例で使用したプログラムを表 2 2 に示す。

【表 2 2】

表22:サーマルサイクリングプログラム

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	42°C	1分	1サイクル
2	95°C	5秒	10サイクル
	45°C	10秒	
3	95°C	1分	1サイクル
4	95°C	5秒	40サイクル
	55°C	10秒(読み)	

30

【 0 2 0 8】

ワンステップqPCR法の結果を表 2 3 に示す。ザイルエボラウイルスについて検査するワンステップqPCR法は、検証された試薬および方法と比較して100%の一致を示した。

40

【表 2 3】

表23:結果

試料番号	CoyoteワンステップqPCR法(Cq)	検証された試薬および方法(Cq)	一致
1	N/A	N/A	あり
2	26.53	29.73	あり
3	17.68	19.53	あり
4	N/A	N/A	あり
5	N/A	N/A	あり
6	N/A	N/A	あり
7	N/A	N/A	あり
8	21.52	20.98	あり
9	18.97	18.88	あり
10	24.97	24.44	あり
11	18.92	18.91	あり
12	26.32	25.22	あり
13	20.48	20.85	あり
14	18.5	20.45	あり
15	N/A	N/A	あり

10

20

【0209】

(実施例17)

マラリアの増幅および検出

増幅および検出実験を、未知の濃度のマラリア病原体を含むヒト全血試料に対して実施した。2つのセットの実験を完了した。第1のセットの実験では、重複実験を、ヒト全血試料の1:4希釈液(1×PBS中)について完了し、一実験を、全血およびマラリア病原体に対応するプラスミドを含む試料について完了し、一実験を水のみ対照について完了した。第2のセットの実験では、実験を、血液のみおよび水のみ対照試料とともに、1×PBS中のヒト全血試料の様々な希釈液(1:4、1:40、1:400、1:4000、1:40000、および1:400000)を含む試料について完了した。全血試料は、試料を精製することなく分析した。

30

【0210】

各試料を、核酸増幅に必要な試薬(例えば、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP、補助因子、適当な緩衝液など)、およびレポーター剤(例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ)と組み合わせて反応混合物30μLにした。第1のセットの実験について、希釈を含めた試料番号による反応混合物の概要を、表24に示す。第2のセットの実験について、希釈を含めた試料番号による反応混合物の概要を、表25に示す。マラリア病原体からの増幅産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった:(i)第1のシリーズにおいて、95℃で1秒と45℃で1秒の13サイクル、その後95℃で1分、および(ii)第2のシリーズにおいて、95℃で5秒と55℃で10秒の45サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成した。実験の第1のセットについての増幅曲線を図22Aにグラフで表し、第2のセットの実験についての増幅曲線を図22Bにグラフで表す。各曲線をそれぞれ表24および25中のその対応する試料番号によって標識する。図22Aおよび図22Bに表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位(RFU)を示す。

40

【0211】

図22Aに示したように、マラリア病原体は、全血試料を含む2つの反応混合物(試料

50

1 および 2)、ならびに組換えプラスミドを含む陽性対照 (試料 3) について増幅産物を介して検出された。さらに、マラリア病原体は、水のみでの対照試料 (試料 4) において検出されなかった。したがって、図 2 2 A に示した結果は、マラリア病原体を、一部の 경우에는、多重のシリーズの伸長および変性条件を使用して、試料を精製することなく検出することができることを示す。

【 0 2 1 2 】

図 2 2 B に示したように、マラリア病原体は、全血試料 (試料 1 ~ 6) を含有するすべての反応混合物について増幅産物を介して検出された。さらに、マラリア病原体は、水のみおよび血液のみでの対照試料 (試料 7 および 8) において検出されなかった。したがって、図 2 2 B に示した結果は、マラリア病原体を含めて病原体 (複数可) を、一部の 경우에는、多重のシリーズの変性化および伸長条件を使用して、試料を精製することなく、最大で 1 : 4 0 0 0 0 0 の希釈で検出することができることを示す。

10

【 表 2 4 】

表24:実施例17における第1のセットの実験についての実験反応混合物

試料	希釈
1	1:4
2	1:4
3	1:2(全血対照中のプラスミド)
4	なし(水のみ)

20

【表 2 5】

表25:実施例17における第2のセットの実験についての実験反応混合物

試料	希釈
1	1:4
2	1:40
3	1:400
4	1:4000
5	1:40000
6	1:400000
7	0(血液のみ)
8	0(水のみ)

10

20

【 0 2 1 3】

(実施例 1 8)

デングウイルスの増幅および検出

増幅および検出実験を、未知の濃度のデングウイルスを含む培養液から得た試料に対して実施した。3つのセットの実験を完了した。第1のセットの実験では、重複実験を不希釈培養液について完了し、一実験を培養液の1:10希釈液について完了し、一実験を水のみの対照について完了した。第2のセットの実験では、実験を、水のみの対照試料とともに、培養液の様々な希釈液(希釈なし、1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000、および1:1000000)について完了した。第3のセットの実験では、実験を、水のみの対照試料とともに、培養液の様々な希釈液(希釈なし、1:10、1:100、1:1000、および1:10000)について完了した。培養試料は、試料を精製することなく分析した。

30

【 0 2 1 4】

各試料2μLを、逆転写および核酸増幅に必要な試薬(例えば、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP、補助因子、適当な緩衝液など)、およびレポーター剤(例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ)と組み合わせて反応混合物30μLにした。第1のセットの実験について、希釈を含めた反応混合物の概要を、表26に示し、第2のセットの実験について、表27に示し、第3のセットの実験について表28に示す。ウイルスからの増幅産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった:(i)第1のシリーズにおいて、42°Cで1分、95°Cで5秒と45°Cで10秒の10サイクル、その後95°Cで1分、および(ii)第2のシリーズにおいて、95°Cで5秒と55°Cで10秒の45サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成した。第1のセットの実験についての増幅曲線を図23Aにグラフで表し、第2のセットの実験についての増幅曲線を図23Bにグラフで表し、第3のセットの実験についての増幅曲線を図23Cにグラフで表す。各曲線を、それぞれ表26、27、および2

40

50

8 中のその対応する試料番号によって標識する。図 2 3 A、図 2 3 B、および図 2 3 C に表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位 (R F U) を示す。図 2 3 A、図 2 3 B、および図 2 3 C に示した曲線から得た C t 値を、それぞれ表 2 6、2 7、および 2 8 に示す。

【 0 2 1 5 】

図 2 3 A に示したように、ウイルスは、ウイルスを含む 3 つの反応混合物 (試料 1 ~ 3) について増幅産物を介して検出された。さらに、ウイルスは、水のみ对照試料 (試料 4) において検出されなかった。したがって、図 2 3 A に示した結果は、デングウイルスを、一部の 경우에는、多重のシリーズの伸長および変性条件を使用して検出することができることを示す。

10

【 0 2 1 6 】

図 2 3 B に示したように、ウイルスは、デングウイルスを含有し、希釈していない (試料 1) または最大で 1 : 1 0 0 0 に希釈した (試料 2、3、および 4) 反応混合物について増幅産物を介して検出された。しかし、C t 値は、1 : 1 0 0 0 の反応混合物 (試料 4) について判定されなかった。ウイルスは、より高い希釈液 (試料 5、6、および 7)、または水のみ对照試料 (試料 8) において検出されなかった。したがって、図 2 3 B に示した結果は、ウイルスを、一部の 경우에는、多重のシリーズの変性化および伸長条件を使用して、試料を精製することなく、最大で 1 : 1 0 0 0 の希釈で検出することができ、この場合 C t 値は、最大で 1 : 1 0 0 の希釈で生成することができることを示す。

20

【 0 2 1 7 】

図 2 3 C に示したように、ウイルスは、デングウイルスを含有し、希釈していない (試料 1) または最大で 1 : 1 0 0 0 に希釈した (試料 2、3、および 4) 反応混合物について増幅産物を介して検出された。しかし、C t 値は、1 : 1 0 0 0 の反応混合物について判定されなかった。ウイルスは、より高い希釈液 (試料 5)、または水のみ对照試料 (試料 6) において検出されなかった。したがって、図 2 3 C に示した結果は、ウイルスを、一部の 경우에는、多重のシリーズの変性化および伸長条件を使用して、試料を精製することなく、最大で 1 : 1 0 0 0 の希釈で検出することができ、この場合 C t 値は、最大で 1 : 1 0 0 の希釈で生成することができることを示す。

【 表 2 6 】

30

表 26: 実施例 18 における第 1 のセットの実験についての実験反応混合物および判定した C t 値

試料	希釈	Ct 値
1	なし	19.32
2	なし	20.40
3	1:10	23.23
4	ウイルスなし(水のみ)	---

40

【表 27】

表27:実施例18における第2のセットの実験についての実験反応混合物および判定したCt値

試料	希釈	Ct値
1	なし	20.85
2	1:10	25.14
3	1:100	31.57
4	1:1000	---
5	1:10000	---
6	1:100000	---
7	1:1000000	---
8	ウイルスなし(水のみ)	---

10

20

【表 28】

表28:実施例18における第3のセットの実験についての実験反応混合物および判定したCt値

試料	希釈	Ct値
1	なし	19.22
2	1:10	22.43
2	1:100	26.55
4	1:1000	---
5	1:10000	---
6	ウイルスなし(水のみ)	---

30

40

【0218】

(実施例19)

一塩基多型(SNP)の検出

増幅および検出実験を、チトクロムP450 2C19の特定の遺伝子型、CYP2C19*2(「GA」遺伝子型を有する)またはCYP2C19*3(「GG」遺伝子型を有する)を含むヒト口咽頭スワブまたは血液試料に対して実施した。2つのセットの実験

50

、ヒト口咽頭スワブから得た試料についての1セットおよび血液から得た試料についての1セットを行った。第1のセットの実験では、ヒト口咽頭スワブから得た7つの異なる試料を、試料を精製することなく分析した。第2のセットの実験では、5つの異なる血液試料を、試料を精製することなく分析した。

【0219】

各試料を、核酸増幅に必要な試薬（例えば、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP、補助因子、適当な緩衝液など）、および2種のレポーター剤（例えば、核酸の増幅を検出するためのFAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ、「GA」遺伝子型を検出するためのテキサスレッド色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ）と組み合わせて反応混合物にした。増幅産物を生成するために、各反応混合物を、95℃で5分、その後95℃で5秒と49℃で10秒の50サイクルを含んでいたサーモサイクリングプロトコールに付した。サーモサイクリング中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成した。第1のセットの実験（ヒト口咽頭スワブ）についての増幅曲線を、図24A（FAMオリゴヌクレオチドプローブに対応するシグナル）および図24B（テキサスレッドオリゴヌクレオチドプローブに対応するシグナル）にグラフで表す。第2のセットの実験（血液試料）についての増幅曲線を、図25A（FAMオリゴヌクレオチドプローブに対応するシグナル）および図25B（テキサスレッドオリゴヌクレオチドプローブに対応するシグナル）にグラフで表す。図24A、図24B、図25A、および図25Bに表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位（RFU）を示す。各曲線を、表29（口咽頭スワブ実験）または表30（血液実験）中のその対応する反応混合物番号によって標識する。増幅曲線について判定したCt値も、判定した遺伝子型とともに表29または表30に示す。テキサスレッドからのシグナルが図24Bまたは図25Bで観察された増幅曲線では、対応する反応混合物は、「GA」遺伝子型を有すると判定した。さらに、テキサスレッドからのシグナルが図24Bまたは図25Bで観察されなかった増幅曲線では、対応する反応混合物は、「GG」遺伝子型を有すると判定した。

【0220】

図24Aに示したように、増幅産物が口咽頭スワブから得た試料を有する反応混合物のそれぞれについて観察され、核酸の増幅が起こることを示唆した。しかし、図24Bに示したように、増幅産物は、口咽頭スワブから得た試料を有する反応混合物の一部のみ（反応混合物1、4、6、および7）について観察され、これらの反応混合物は、「GA」遺伝子型に対応した。他の反応混合物（反応混合物2、3、および5）では、増幅産物は、観察されず、これらの反応混合物は、「GG」遺伝子型に対応した。図24Aおよび図24Bに示した結果は、口腔スワブ試料から抽出したDNAを使用する増幅および検出実験を介してバリデートした（データを示さず）。したがって、図24Aおよび図24Bに示した結果は、一部の場合では、SNPは、試料を精製することなく口咽頭スワブから得られる試料中でリアルタイム増幅を介して検出することができることを示唆する。

【0221】

図25Aに示したように、増幅産物が血液から得た試料を有する反応混合物のそれぞれについて観察され、核酸の増幅が起こることを示唆した。しかし、図25Bに示したように、増幅産物は、血液から得た試料を有する反応混合物の一部のみ（反応混合物1、2、および5）について観察され、これらの反応混合物は、「GA」遺伝子型に対応した。他の反応混合物（反応混合物3および4）では、増幅産物は、観察されず、これらの反応混合物は、「GG」遺伝子型に対応した。図25Aおよび図25Bに示した結果は、核酸配列決定を使用してバリデートした。したがって、図25Aおよび図25Bに示した結果は、一部の場合では、SNPは、試料を精製することなく血液から得られる試料中でリアルタイム増幅を介して検出することができることを示唆する。

【表 29】

表29:実施例19における口咽頭スワブ実験についての判定したCt値および遺伝子型

反応混合物	Ct-FAMレポーター	Ct-テキサスレッドレポーター	遺伝子型
1	38.70	40.25	GA
2	38.28	---	GG
3	34.16	---	GG
4	33.18	33.75	GA
5	35.20	---	GG
6	33.08	33.59	GA
7	36.45	37.01	GA

10

【表 30】

表30:実施例19における血液実験についての判定したCt値および遺伝子型

反応混合物	Ct-FAMレポーター	Ct-テキサスレッドレポーター	遺伝子型
1	38.36	36.24	GA
2	39.97	39.67	GA
3	41.25	---	GG
4	33.96	---	GG
5	35.68	34.12	GA

20

【0222】

(実施例20)

アデノウイルス55型(ADV55)およびアデノウイルス7型(ADV7)の増幅および検出

増幅および検出実験を、様々なコピー数のアデノウイルス55型(ADV55)または未知の濃度のアデノウイルス7型(ADV7)を含む口咽頭スワブから得た試料に対して実施した。2つのセットの実験、ADV55を有する試料について1セットおよびADV7を有する実験について1セットを完了した。第1のセットの実験では、異なるコピー数(1、10、100、1000、10000、および100000コピー)のADV55を含む試料を有する6つの異なる実験を、陰性対照についての実験とともに、試料を精製することなく完了した。第2のセットの実験では、未知のコピー数のADV7を含む試料を有する8つの異なる実験を、試料を精製することなく完了した。

40

【0223】

各試料を、核酸増幅に必要な試薬(例えば、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP、補助因子、適当な緩衝液など)、およびレポーター剤(例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ)と組み合わせて反応混合物にした。第1のセットの実験について、ADV55のコピー数を含めた反応混合物の概要を表31に示す。ウイルスからの増幅産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった:(i)第1のシリーズにおいて、95で1秒と45で1秒の20サイクル、その後95で1分、および(ii)第2のシリ

50

ーズにおいて、95 で5秒と60 で34秒の35サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成し、Ct値を得た。第1のセットの実験についての増幅曲線を、それぞれ表31に示したものに対応する反応混合物番号によって標識して図26Aにグラフで表す。第2のセットの実験についての増幅曲線を図26Bにグラフで表し、対応するCt値を表32に示す。図26B中の増幅曲線を、これらが表32に示した反応混合物番号に対応するように標識する。図26Aおよび図26Bに表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位(RFU)を示す。

【0224】

図26Aに示したように、ADV55は、ウイルスを含有する試料を含む反応混合物のすべてについて(反応混合物1~6)、増幅産物を介して検出された。さらに、ウイルスは、陰性対照反応混合物(反応混合物7)において検出されなかった。したがって、図26Aに示した結果は、ADV55ウイルスを、一部の場合では、多重のシリーズの伸長および変性条件を使用して、試料を精製することなく、様々なレベルの希釈で検出することができることを示す。

【0225】

図26Bに示したように、ADV7は、反応混合物のすべてについて増幅産物を介して検出された。したがって、図26Bに示した結果は、ADV7ウイルスを、一部の場合では、多重のシリーズの伸長および変性条件を使用して、試料を精製することなく検出することができることを示す。

【表31】

表31:実施例20におけるADV55実験についての実験反応混合物

反応混合物	ADV55コピー数/反応
1	1
2	10
3	100
4	1000
5	10000
6	100000
7	0(陰性対照)

【表32】

表32:実施例20におけるADV7実験についての判定したCt値

反応混合物	Ct値
1	5.12
2	7.16
3	10.97
4	14.15
5	17.58
6	20.29
7	22.13
8	17.66

【0226】

(実施例21)

アーマードRNA C型肝炎ウイルス(RNA-HCV)の増幅および検出

増幅および検出実験を、様々なコピー数のアーマードRNA C型肝炎ウイルス(RNA-HCV)を含む血漿試料に対して実施した。異なるコピー数(10、100、および500コピー)のRNA-HCVを含む試料を有する3つの異なる実験を、陰性対照について完了した実験とともに、試料を精製することなく完了した。

【0227】

各試料を、逆転写および核酸増幅に必要な試薬(例えば、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP、補助因子、適当な緩衝液など)、およびレポーター剤(例えば、FAM色素を含むオリゴヌクレオチドプローブ)と組み合わせて反応混合物にした。RNA-HCVコピー数を含めた反応混合物の概要を表33に示す。ウイルスから増幅DNA産物を生成するために、各反応混合物を2つのシリーズの変性化および伸長条件に付した。2つのシリーズは、以下の通りであった:(i)第1のシリーズにおいて、95で1秒と45で1秒の20サイクル、その後95で1分、および(ii)第2のシリーズにおいて、95で5秒と60で34秒の55サイクル。第2のシリーズ中、レポーター剤からのシグナルを記録して増幅曲線を作成した。第1のセットの実験についての増幅曲線を、それぞれ表33に示した反応混合物番号に対応する数によって標識して図27にグラフで表す。図27に表した結果は、サイクル数の関数としての記録された相対蛍光単位(RFU)を示す。

10

【0228】

図27に示したように、RNA-HCVは、ウイルスを含有する試料を含む反応混合物のすべて(反応混合物1~3)について増幅産物を介して検出された。さらに、RNA-HCVは、陰性対照反応混合物(反応混合物4)において検出されなかった。したがって、図27に示した結果は、RNA-HCVを、一部の 경우에는、多重のシリーズの伸長および変性条件を使用して、試料を精製することなく検出することができることを示す。10コピー/反応の検出感度も実現することができる。

20

【表33】

表33:実施例21におけるRNA-HCV実験についての実験反応混合物

反応混合物	RNA-HCVコピー数/反応
1	10
2	100
3	500
4	0(陰性対照)

30

【0229】

本発明の好適な実施形態を本明細書に示し、記載してきたが、このような実施形態は、単なる例として提供されていることが当業者に明白となる。数多くのバリエーション、変更、および置換が、本発明から逸脱することなく当業者に今では想起されるであろう。本明細書に記載の本発明の実施形態の様々な代替案が、本発明を実行することにおいて使用され得ることが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲は、本発明の射程を規定し、これらの特許請求の範囲の射程内の方法および構造、ならびにこれらの同等物は、それによって保護されることが意図されている。

40

【 図 1 】

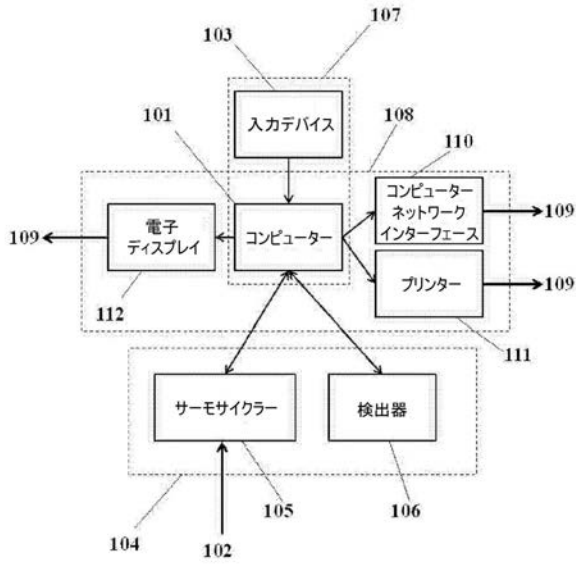


Fig. 1

【 図 2 】

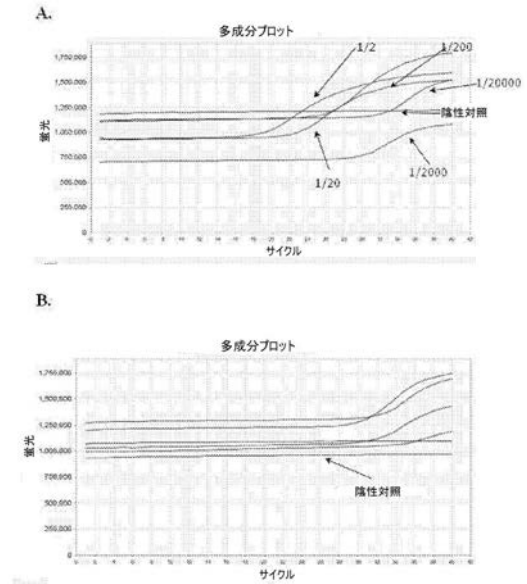


Fig. 2

【 図 3 】

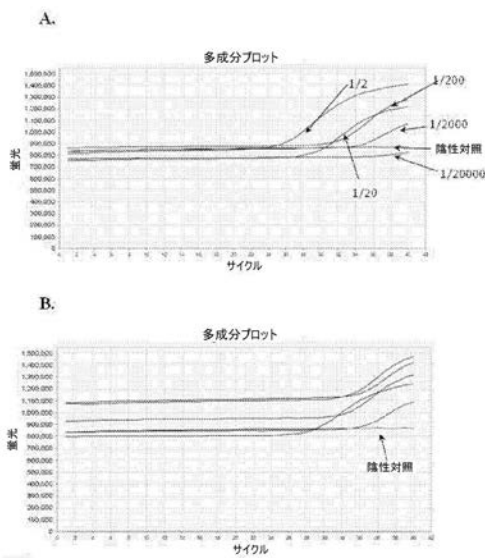


Fig. 3

【 図 4 】

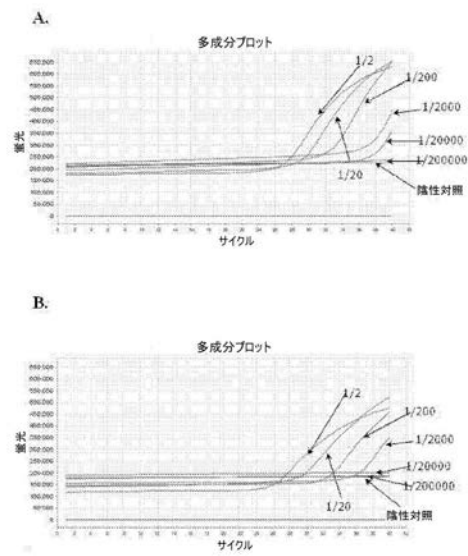


Fig. 4

【 図 5 】

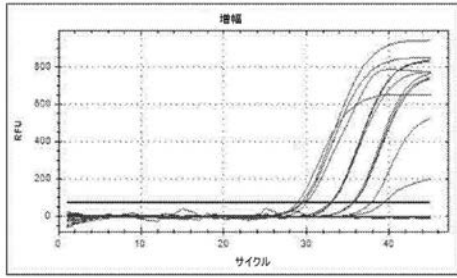


Fig. 5

【 図 6 】

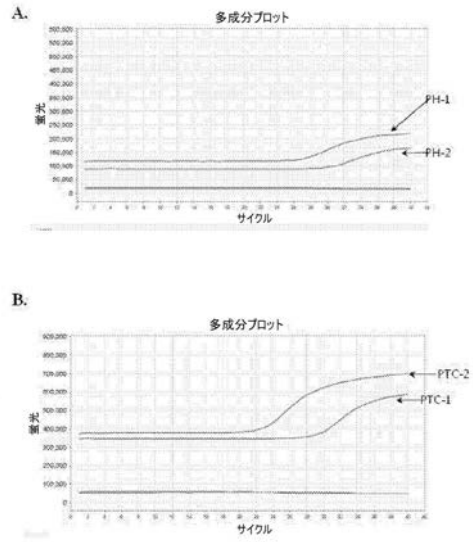


Fig. 6

【 図 7 】

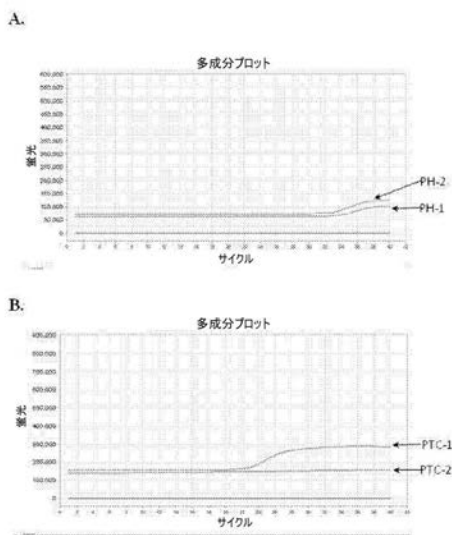


Fig. 7

【 図 8 】

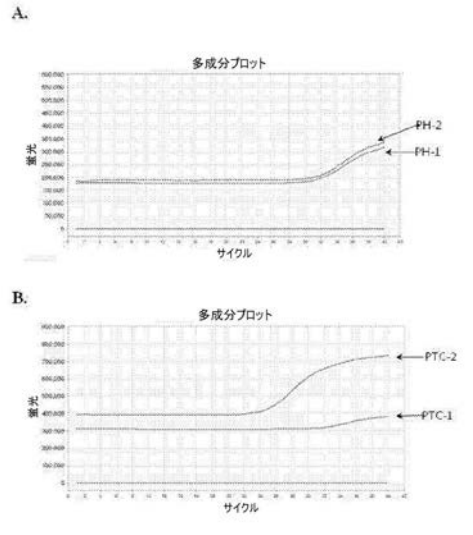


Fig. 8

【 図 9 】

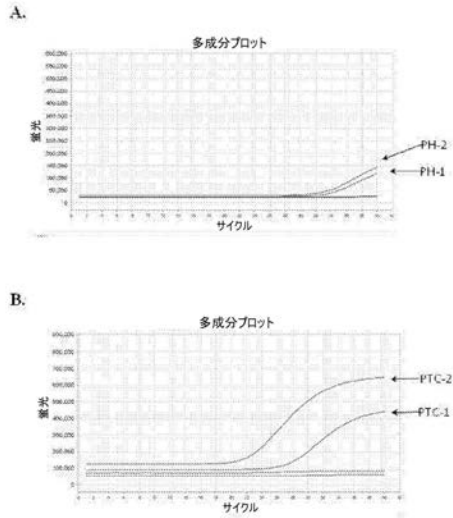


Fig. 9

【 図 1 0 】

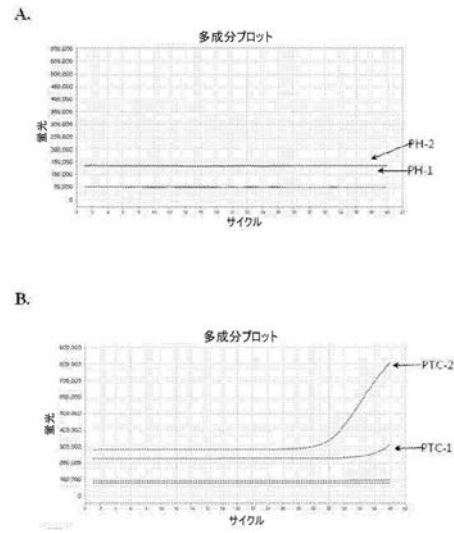


Fig. 10

【 図 1 1 】

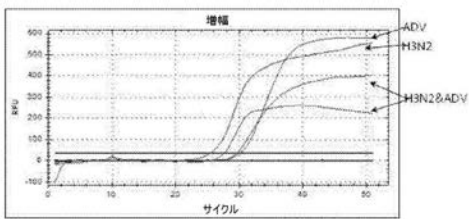


Fig. 11

【 図 1 2 】

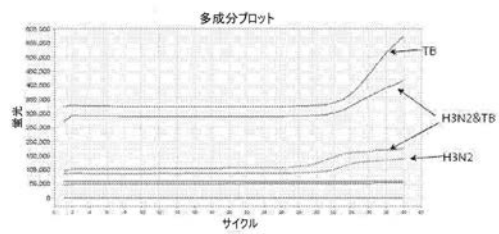


Fig. 12

【 図 1 3 】

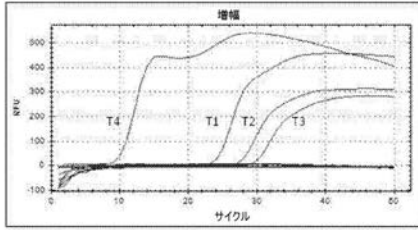


Fig. 13

【 図 1 4 】

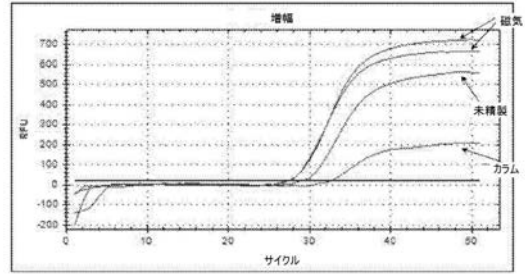


Fig. 14

【 図 1 5 】

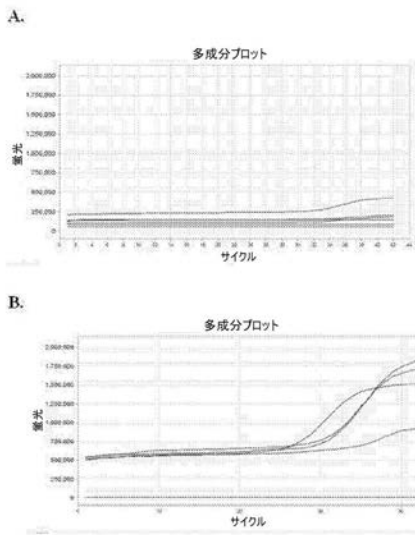


Fig. 15

【 図 1 6 】

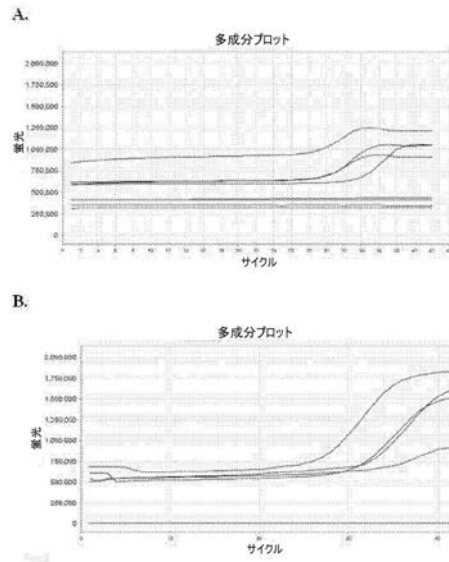


Fig. 16

【 図 17 】

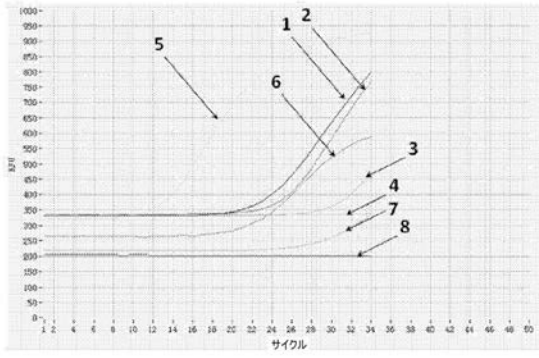


Fig. 17

【 図 18 】

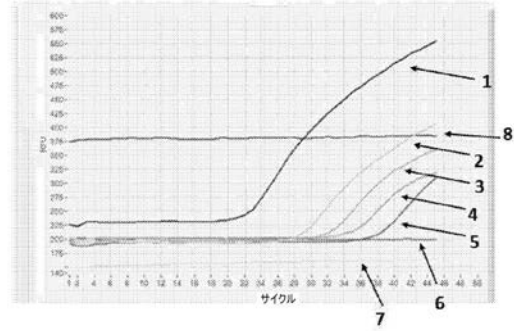


Fig. 18

【 図 19 A 】

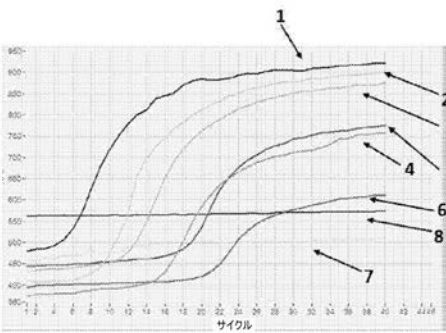


Fig. 19A

【 図 19 B 】

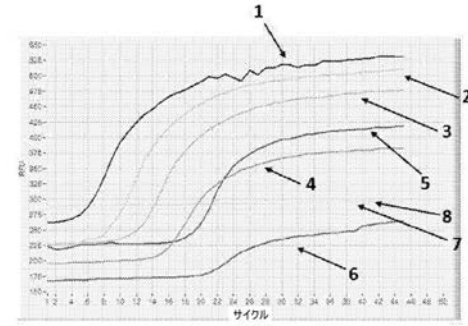


Fig. 19B

【図 20】

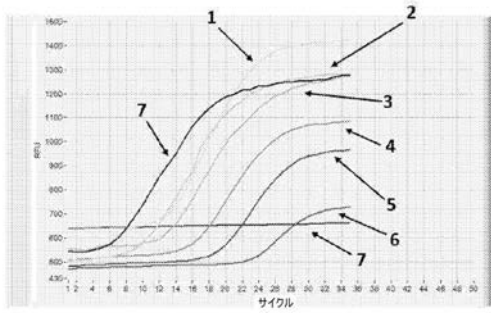


Fig. 20

【図 21】

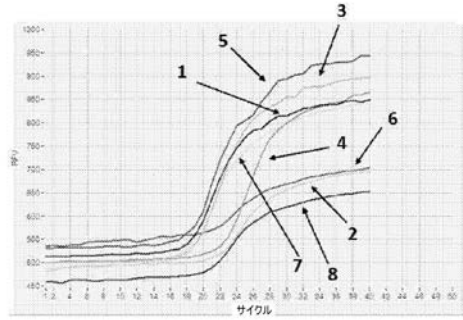


Fig. 21

【図 22 A】

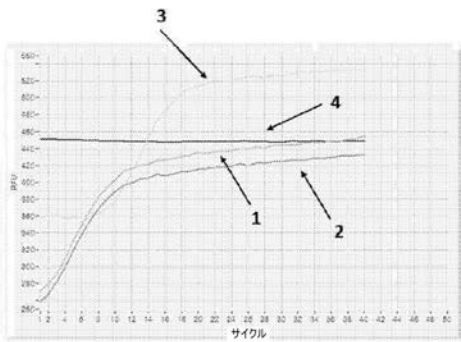


Fig. 22A

【図 22 B】

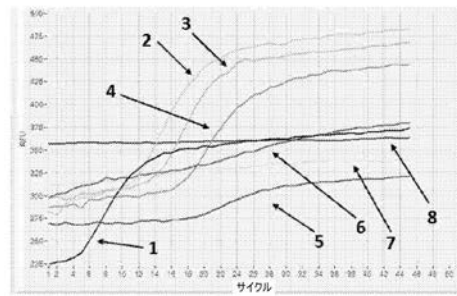


Fig. 22B

【図 23 A】

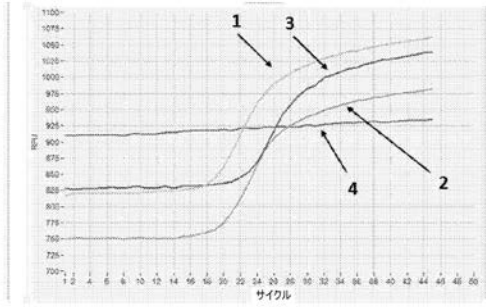


Fig. 23A

【図 23 B】

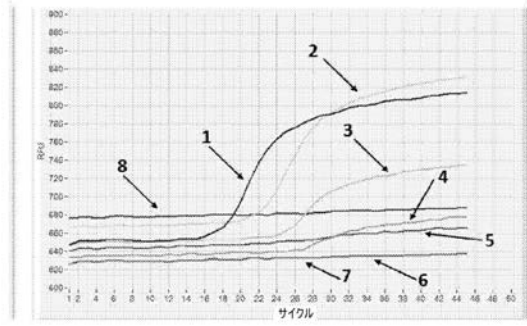


Fig. 23B

【図 23 C】

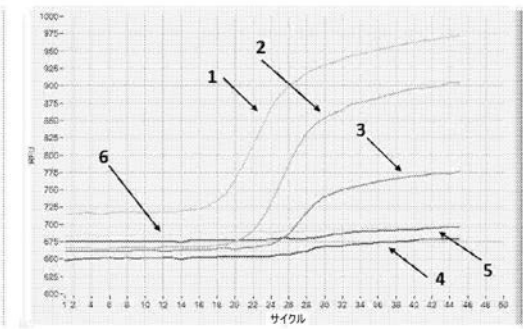


Fig. 23C

【図 24 A】

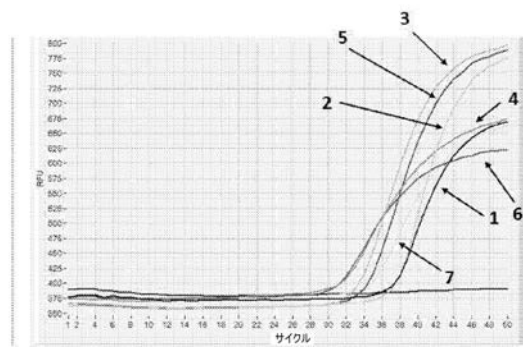


Fig. 24A

【 図 2 4 B 】

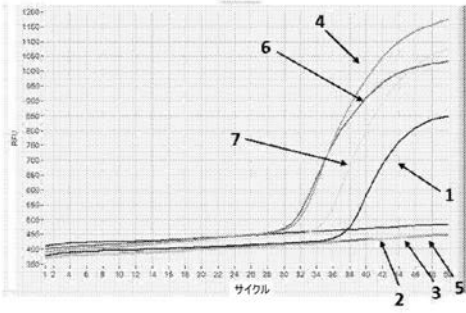


Fig. 24B

【 図 2 5 A 】

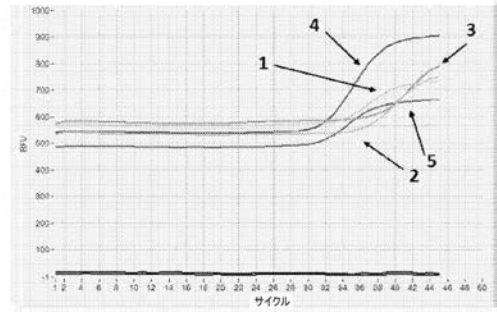


Fig. 25A

【 図 2 5 B 】

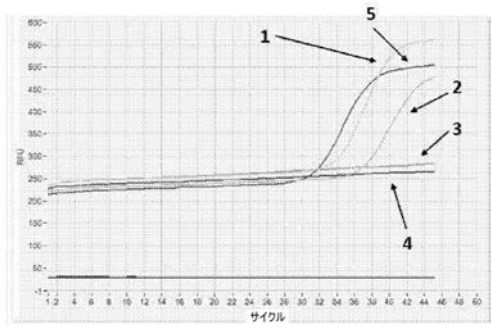


Fig. 25B

【 図 2 6 A 】

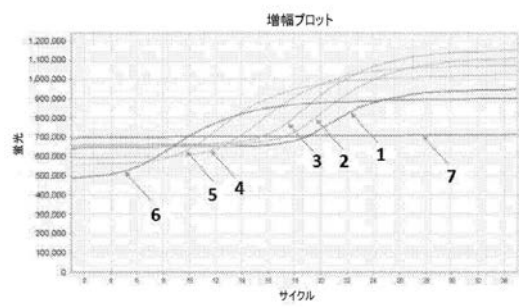


Fig. 26A

【 図 2 6 B 】

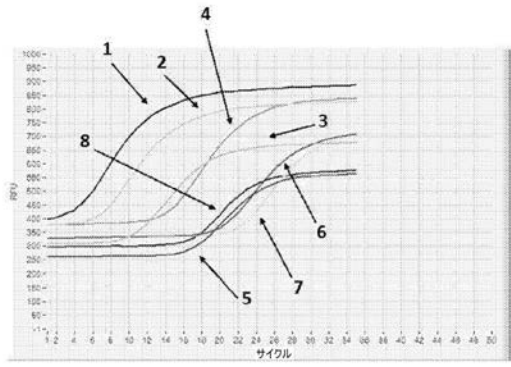


Fig. 26B

【 図 2 7 】

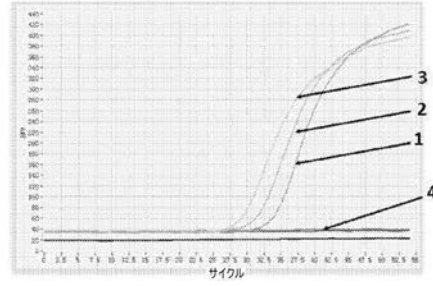


Fig. 27

【 図 2 8 A 】

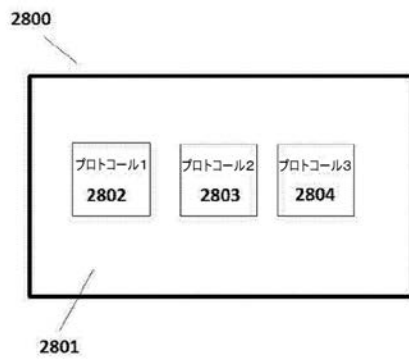


Fig. 28A

【 図 2 8 B 】

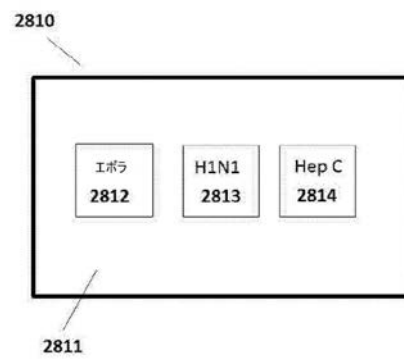


Fig. 28B

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2014/094914
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/68(2006.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i; G06F 19/22(2011.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q; G06F Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNPAT;WPI;EPODOC;CNKI;PubMed;DNA polymerase, reverse transcriptase, primer, PCR, nest-PCR, elongation, denature		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101597652 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY DA AN GENE CO., LTD.) 09 December 2009 (2009-12-09) description, page 2, line 28 to page 3, line 15, examples 1 and 2	1-35, 52-56
X	CN 103074349 A (HANGZHOU HONGYUN HUANG BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD.) 01 May 2013 (2013-05-01) description, paragraphs [0006]-[0008] and [0028]-[0033]	36-51, 57-84
A	US 2008085541 A1 (ADVANCED MOLECULAR SYSTEMS LLC.) 10 April 2008 (2008-04-10) the whole document	1-84
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 January 2015		Date of mailing of the international search report 26 February 2015
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA(ISA/CN) 6,Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer YANG,Jiaqian Telephone No. (86-10)82245626

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/094914

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101597652	A	09 December 2009	CN	101597652	B	04 January 2012
CN	103074349	A	01 May 2013	CN	103074349	B	15 October 2014
US	2008085541	A1	10 April 2008	WO	2008045431	A3	16 October 2008
				WO	2008045431	A2	17 April 2008

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01) C 1 2 M 1/34 B
 C 1 2 Q 1/06

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . F L A S H

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 リ, シアン

中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 ベイジン, チャオヤン, 6 - 3 0 4, アンシアンリ ナン
 バー 4 9

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB13 BB20 CC01 FA03 FA12
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ10 QQ28 QQ42 QQ52
 QR32 QR35 QR56 QR62 QR72 QR77 QR79 QS25 QS34 QS36
 QS39 QX02
 4B064 AF27 CA12 CA21 CB30 CC24 DA13