

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6754701号
(P6754701)

(45) 発行日 令和2年9月16日(2020.9.16)

(24) 登録日 令和2年8月26日(2020.8.26)

(51) Int. Cl.			F I		
BO1J	19/00	(2006.01)	BO1J	19/00	321
B81B	1/00	(2006.01)	B81B	1/00	
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
C12M	1/34	(2006.01)	C12M	1/34	F
GO1N	35/00	(2006.01)	C12M	1/34	Z

請求項の数 34 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-572875 (P2016-572875)	(73) 特許権者	518365802
(86) (22) 出願日	平成27年3月6日(2015.3.6)		キャピタルバイオ・テクノロジー・コーポレーション
(65) 公表番号	特表2017-514686 (P2017-514686A)		レイション
(43) 公表日	平成29年6月8日(2017.6.8)		CAPITALBIO TECHNOLOGY CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/CN2015/000141		中華人民共和国、101111 베이ジン
(87) 国際公開番号	W02015/131662		、ビー・ディー・イー、イーチュアン・バイオメディカル・パーク、ケチュアン・シックス・ストリート、88、ビルディング・シー
(87) 国際公開日	平成27年9月11日(2015.9.11)		88 KECHUANG 6TH STREET, BUILDING C, YI ZHUANG BIOMEDICAL PARK, BDA, BEIJING 101111 PEOPLE'S REPU
審査請求日	平成29年2月1日(2017.2.1)		最終頁に続く
審判番号	不服2018-8050 (P2018-8050/J1)		
審判請求日	平成30年6月12日(2018.6.12)		
(31) 優先権主張番号	201410082166.2		
(32) 優先日	平成26年3月7日(2014.3.7)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		

(54) 【発明の名称】 マルチインデックス検出マイクロ流体チップおよび使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

水性試料のためのマイクロ流体チップであって、

(1) ボトムプレートを備え、前記ボトムプレートは、

少なくとも1つの谷および少なくとも1つのピークを備える少なくとも1つの波形の主要路と、

少なくとも1つの試料入口と、

少なくとも1つの排出口と、

少なくとも1つの反応チャンバとを備え、

前記少なくとも1つの波形の主要路の一端は前記少なくとも1つの試料入口に接続されており、他端は前記少なくとも1つの排出口に接続されており、

前記少なくとも1つの谷は前記ボトムプレートの中心から遠ざかって向いており、前記少なくとも1つのピークは前記ボトムプレートの中心の方を向いており、

前記主要路の前記少なくとも1つの谷は、前記少なくとも1つの反応チャンバに接続されており、

前記主要路のV字形部分における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は約0.3であり、

前記ボトムプレートは少なくとも1つの連結路をさらに備え、前記連結路は、前記主要路の前記少なくとも1つの谷を前記少なくとも1つの反応チャンバに接続しており、前記連結路は1つ以上の緩衝チャンバを備え、前記マイクロ流体チップはさらに、

10

20

(2) 前記ボトムプレートにフィットするように係合するカバープレートを備える、マイクロ流体チップ。

【請求項 2】

前記ボトムプレートは、中心の貫通孔をさらに備える、請求項 1 に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 3】

前記ボトムプレートは、イヤマークをさらに備える、請求項 1 または 2 に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 4】

前記イヤマークは、前記中心の貫通孔の内縁に位置するノッチである、請求項 3 に記載のマイクロ流体チップ。

10

【請求項 5】

前記カバープレートは、前記ボトムプレートの前記中心の貫通孔と一列に並ぶ中心の貫通孔を備える、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 6】

前記カバープレートは、前記ボトムプレートと一致して前記ボトムプレートを封止する、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 7】

前記ボトムプレートはマルチインデックス検出のための複数の前記反応チャンバを備え、前記波形の主要路は複数のピークおよび谷を備え、前記複数の谷の少なくとも約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、またはすべて、の各々が前記反応チャンバの 1 つ以上に接続されている、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

20

【請求項 8】

前記反応チャンバの各々は、試料中の標的を検出するための試薬を備える、請求項 7 に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 9】

前記反応チャンバは少なくとも 2 つの試薬を備え、その各々が異なる標的を検出する、請求項 7 または 8 に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 10】

前記緩衝チャンバの体積は、前記反応チャンバの体積の約 0.2 から約 0.8 倍である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

30

【請求項 11】

前記連結路と前記反応チャンバとの接合部は、前記ボトムプレートの中心と前記反応チャンバの中心との間の直線上に位置する、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 12】

前記主要路は少なくとも 1 つの円を形成する、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 13】

前記主要路は、前記ボトムプレート上に複数の同心円を形成する、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

40

【請求項 14】

前記ボトムプレートは、前記ボトムプレート上に 1 つ以上の円を形成する 1 つ以上の波形の主要路を備える、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 15】

前記反応チャンバの体積は、約 0.1 μL から約 5 μL である、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 16】

前記主要路の任意の V 字形部分の体積は、当該部分に接続されている前記反応チャンバ

50

の体積の約 1.2 から約 1.8 倍である、請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 17】

前記主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は約 1 未満であり、前記ピークの断面積は前記谷の断面積よりも小さい、請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 18】

前記ボトムプレートは、約 5 個から約 100 個の反応チャンバを備える、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 19】

前記ボトムプレートの厚みは、約 0.05 mm から約 5 mm である、請求項 1 から 18 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 20】

前記カバープレートの厚みは、約 0.05 mm から約 5 mm である、請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 21】

前記主要路の深さは、約 40 μm から約 4 mm である、請求項 1 から 20 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 22】

前記反応チャンバの深さは、約 40 μm から約 4 mm である、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 23】

前記連結路の深さは、約 40 μm から約 4 mm である、請求項 1 から 22 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 24】

前記緩衝チャンバの深さは、約 40 μm から約 4 mm である、請求項 1 から 23 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 25】

前記試料入口は丸形であり、前記試料入口のサイズは標準的な先端ヘッドのサイズと一致する、請求項 1 から 24 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップ。

【請求項 26】

分析物を分析する方法であって、

1) 請求項 1 から 25 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップの主要路内に試料をロードすることと、

2) 前記マイクロ流体チップに遠心力を加えることによって、前記主要路から前記反応チャンバに前記試料を搬送することと、

3) 前記反応チャンバの内部で前記試料の反応を実行することと、

4) 前記反応の指標を測定することとを備え、

前記指標は、前記試料中の分析物の存在、欠如、量、および/または性質を示す、方法。

【請求項 27】

前記試料は生体試料である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記試料は、たとえば、結合、上皮、筋もしくは神経組織；脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆のう、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、腺、および内部血管からなる群から選択される組織；または血液、尿、唾液、骨髄、精液、腹水、およびたとえば血清もしくは血漿などのそれらの亜分画からなる群から選択される体液などの、組織または体液に由来する、請求項 26 または 27 に記載の方法。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

複数の分析物の存在、欠如、量、および/または性質を分析する、請求項 26 から 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 1 から 25 のいずれか 1 項に記載のマイクロ流体チップと、前記マイクロ流体チップの内部で反応を実行するための 1 つ以上の試薬とを備える、キット。

【請求項 31】

前記反応の参照指標をさらに備える、請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

前記参照指標は、前記反応の正および/または負の参照指標を備える、請求項 31 に記載のキット。 10

【請求項 33】

前記反応の結果を解釈するための指示をさらに備える、請求項 30 から 32 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 34】

前記反応は、生体反応、化学反応、免疫反応、核酸増幅反応、またはポリヌクレオチド/ポリペプチドシークエンシング反応である、請求項 30 から 33 のいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願との相互参照

本願は、2014年3月7日に出願された中国特許出願番号第201410082166.2号を有する、2014年6月4日にCN 103831140 Aとして公開された中国特許出願の優先権利益を主張し、当該中国特許出願は、その全内容があらゆる目的のために参照により本明細書に援用される。

【0002】

技術分野

本開示は概して、マイクロ流体チップ、ならびに生体分子の検出および分析の分野に関する。ある局面において、本開示は、マルチインデックス検出マイクロ流体チップおよび使用方法に関する。 30

【背景技術】

【0003】

背景

マイクロ流体チップは、マイクロトータルアナリシスシステム (Micro Total Analysis System: μ -TAS) の開発におけるホットスポットである。マイクロ流体チップ技術は、生物学的技術、化学技術、および/または薬剤スクリーニング技術と組合せて、マイクロ流体チップをオペレーティングプラットフォームとして用いる。典型的に、プラットフォームは、試薬のローディング、分離、反応、および/または検出を含む、全分析プロセスにおける工程の大半を完了することができる。近年、バイオチップ技術の急速な発展に伴い、マイクロ流体チップがライフサイエンス、分析化学、および医学の分野で果たす役割はますます重要になりつつある。 40

【0004】

試料の高効率、高速、かつ高スループット検出のために、チップは典型的に、多数の反応チャンバと、試料または試薬を反応チャンバに運ぶことが可能な有効伝達モードとを有する必要がある。一般に、マイクロ流体チップは、電磁力、遠心力などの外力を用いて試料をチップの内部ウェル、経路、または孔に搬送する。

【0005】

CN 101609088 Aには、伝達流体デバイスが開示されている。電力が帯電液滴に印加され、電力はマイクロ粒子をマイクロ流路のそれぞれの分岐に移動するように 50

制御する。しかし、この方法は、チップに印加される電界を発生させる複雑な機器を必要とする。加えて、液体をまず電界において液滴に変換し、液滴として指定領域に運ばなければならないため、この方法では試料の処理速度が低下する。

【0006】

CN 103055973 Aには、異なる帯電分析物を分離可能な、電気浸透ポンプに基づく搬送装置が記載されている。一般に、この方法は帯電試料にしか適用されず、生体試料および非帯電試料には適用されない。

【0007】

したがって、高スループット、高感度、および高精度の試薬搬送のためのマイクロ流体チップならびに当該チップの使用が必要とされている。各反応体積中の試料または試薬の正確な投与を認識するだけでなく、隣接する反応体積同士の間での相互汚染も回避することが必要とされている。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

概要は、請求項に記載の主題の範囲を限定するために用いられることを意図していない。請求項に記載の主題の他の特徴、詳細、効用、および利点が、添付の図面および添付の請求項に開示されているそれらの局面を含む詳細な説明から明らかになるであろう。

【0009】

20

一局面において、マイクロ流体チップであって、(1) ボトムプレートを含み、ボトムプレートは、少なくとも1つの谷および少なくとも1つのピークを含む少なくとも1つの波形の主要路と、少なくとも1つの試料入口と、少なくとも1つの排出口と、少なくとも1つの反応チャンバとを含み、少なくとも1つの波形の主要路の一端は少なくとも1つの試料入口に接続されており、他端は少なくとも1つの排出口に接続されており、少なくとも1つの谷はボトムプレートの中心から遠ざかって向いており、少なくとも1つのピークはボトムプレートの中心の方を向いており、主要路の少なくとも1つの谷は、少なくとも1つの反応チャンバに接続されており、マイクロ流体チップはさらに、(2) ボトムプレートにフィットするように係合するカバープレートを含むマイクロ流体チップが本明細書において提供される。

30

【0010】

一実施形態において、ボトムプレートは少なくとも1つの連結路をさらに含み、連結路は、主要路の少なくとも1つの谷を少なくとも1つの反応チャンバに接続しており、連結路は1つ以上の緩衝チャンバを含む。

【0011】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ボトムプレートは、中心の貫通孔をさらに含み得る。一局面において、ボトムプレートは、イヤマーク(earmark)をさらに含み得る。一実施形態において、イヤマークは、中心の貫通孔の内縁に位置するノッチである。

【0012】

上記の実施形態のいずれかにおいて、カバープレートは、ボトムプレートの中心の貫通孔と一列に並び中心の貫通孔を含み得る。一局面において、カバープレートは、ボトムプレートと一致してボトムプレートを封止する。

40

【0013】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ボトムプレートはマルチインデックス検出のための複数の反応チャンバを含み得、波形の主要路は複数のピークおよび谷を含み、複数の谷の少なくとも約1%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはすべて、の各々が反応チャンバの1つ以上に接続されている。一実施形態において、反応チャンバの各々は、試料中の標的を検出するための試薬を含む。一局面において、反応チャンバは少なくとも2つの試薬を含み、その各々が異なる標的を検出する。

50

【 0 0 1 4 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、緩衝チャンバの体積は、反応チャンバの体積の約 0.2 から約 0.8 倍であり得る。

【 0 0 1 5 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、マイクロ流体チップが遠心力を受けると連結路が主要路から対応の反応チャンバに試料を移動させることが可能である限り、連結路と反応チャンバとの接合部は、ボトムプレートの中心と反応チャンバの中心との間の直線上に実質的に位置し得る。

【 0 0 1 6 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、主要路は少なくとも 1 つの円を形成し得る。一局面において、主要路は、ボトムプレート上に複数の同心円を形成する。

10

【 0 0 1 7 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ボトムプレートは、ボトムプレート上に 1 つ以上の円を形成する 1 つ以上の波形の主要路を含み得る。

【 0 0 1 8 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、反応チャンバの体積は、約 0.1 μL から約 5 μL であり得る。

【 0 0 1 9 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、主要路の任意の V 字形部分の体積は、当該部分に接続されている反応チャンバの体積の約 1.2 から約 1.8 倍であり得る。

20

【 0 0 2 0 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は約 0.2 から約 1 であり得る。

【 0 0 2 1 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は約 1 未満であり得、ピークの断面積は谷の断面積よりも小さくてもよい。

【 0 0 2 2 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ボトムプレートは、約 5 個から約 100 個の反応チャンバを含み得る。

【 0 0 2 3 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ボトムプレートの厚みは、約 0.05 mm から約 1 mm または約 1 mm から約 5 mm であり得、カバープレートの厚みは、約 0.05 mm から約 1 mm または約 1 mm から約 5 mm であり得る。

30

【 0 0 2 4 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、主要路の深さは、約 40 μm から約 800 μm または約 800 μm から 4 mm であり得、反応チャンバの深さは、約 40 μm から約 800 μm または約 800 μm から 4 mm であり得、連結路の深さは、約 40 μm から約 800 μm または約 800 μm から 4 mm であり得、緩衝チャンバの深さは、約 40 μm から約 800 μm または約 800 μm から 4 mm であり得る。

【 0 0 2 5 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、試料入口は丸形であり得、試料入口のサイズは標準的な先端ヘッドのサイズと一致し得る。

40

【 0 0 2 6 】

別の局面において、分析物を分析する方法であって、1) 上記の実施形態のいずれかのマイクロ流体チップの主要路内に試料をロードすることと、2) マイクロ流体チップに遠心力を加えることによって、主要路から反応チャンバに試料を搬送することと、3) 反応チャンバの内部で試料の反応を実行することと、4) 反応の指標を測定することとを含み、指標は、試料中の分析物の存在、欠如、量、および/または性質を示す方法が本明細書において提供される。

【 0 0 2 7 】

50

さらに別の局面において、上記の実施形態のいずれかのマイクロ流体チップと、マイクロ流体チップの内部で反応を実行するための1つ以上の試薬とを含むキットが本明細書において提供される。一局面において、キットは反応の参照指標をさらに含む。一実施形態において、参照指標は、反応の正および/または負の参照指標を含む。別の実施形態において、キットは反応の結果を解釈するための指示をさらに含む。上記の実施形態のいずれかにおいて、反応は、生体反応、化学反応、免疫反応、核酸増幅反応、またはポリヌクレオチド/ポリペプチドシークエンシング反応であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】本開示の一局面に係るマイクロ流体チップの鳥瞰図である。1 - ボトムプレート；2 - カバープレート；3 - 貫通孔；4 - 主要路；5 - 連結路；6 - 反応チャンバ；7 - 緩衝チャンバ；8 - イヤマークノッチ；9 - 試料入口；および10 - 排出口である。

10

【図2】本開示の一局面に係るマイクロ流体チップの断面図である。

【図3】緩衝チャンバを有さないマイクロ流体チップにおける遠心分離時の流体分布のパターンを示す図である。緩衝チャンバがない場合、反応チャンバのいくつかは図3(a)に示されるように試料で完全に充填されず、いくつかの反応チャンバは図3(b)に示されるように試料で完全に充填される(理想的な状況)が、他のチャンバは、図3(c)に示されるように試料で過充填され、試料が連結路内に溢れる。

【図4】緩衝チャンバを有するマイクロ流体チップにおける遠心分離時の流体分布のパターンを示す図である。図4のすべての反応チャンバは試料で完全に充填される(それによって反応チャンバ内の試料の均一な分布を保証する)が、試料は図4(a)~(c)に示されるように緩衝チャンバおよび/または連結路内で異なる高さに達し得る。

20

【図5】本開示の一局面に係る、マルチインデックス検出のためのマイクロ流体チップの鳥瞰図である。1 - ボトムプレート；2 - カバープレート；3 - 貫通孔；4 - 主要路；5 - 連結路；6 - 反応チャンバ；7 - 緩衝チャンバ；8 - イヤマークノッチ；9 - 試料入口；および10 - 排出口である。

【図6】本開示の一局面に係る、マルチインデックス検出のためのマイクロ流体チップの鳥瞰図である。1 - ボトムプレート；2 - カバープレート；3 - 貫通孔；4 - 主要路；5 - 連結路；6 - 反応チャンバ；7 - 緩衝チャンバ；8 - イヤマークノッチ；9 - 試料入口；および10 - 排出口である。

30

【図7】試料注入後(左パネル)および遠心分離後(右パネル)の染色試料の分布を示す図である。この図では、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は0.3:1である。

【図8】試料注入後(左パネル)および遠心分離後(右パネル)の染色試料の分布を示す図である。この図では、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は0.2:1である。

【図9】マイクロ流体チップの試料入口の内部への試料のローディングを示す概略図である。図9(a)は、ピペット先端を試料入口に挿入できないため、試料をロードする時に漏れが生じることを示す。図9(b)は、ピペット先端を試料入口に完全に挿入することによって、先端ヘッドがチップの底に触れて試料のローディングを阻止することを示す。図9(c)は、ピペット先端を試料入口に挿入した後、先端ヘッドとチップの底との間に隙間があるため、妨害はなく試料の正確なローディングが可能になることを示す。

40

【図10】本開示の一局面に係る、マイクロ流体チップを用いて病原体を検出するための実験手順の概略図である。

【図11(a)】本開示の一局面に係る、マイクロ流路のSEM画像の図である。

【図11(b)】本開示の一局面に係る、試料ローディング後のマイクロチップの写真の図である。

【図12】x軸が時間(分)を示し、y軸が蛍光強度(任意の単位)を示す、リアルタイム蛍光増幅曲線の図である。図12(a)は、1000コピー/ μ LのMt b(結核菌群)調製物を用いる12反復試験結果を示す。図12(b)は、試料中にSpn(肺炎レン

50

サ球菌)細菌が存在していたことを示す臨床試料の試験結果を示す。図12(c)は、各々が2000コピー/μLの最終濃度の7種類の細菌を含有する調製混合物の試験結果を示す。図12(d)は、PathoDiscを-20で11ヶ月間保管した後の、各々が100コピー/μLの最終濃度のSau/Eco/Kpnの調製混合物の試験結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

例示的な実施形態の詳細な説明

請求項に記載の1つ以上の実施形態の詳細な説明が、請求項に記載の主題の原理を示す添付の図面とともに以下に提供される。請求項に記載の主題はそのような実施形態に関連して説明されるが、いずれの特定の実施形態にも限定されない。請求項に記載の主題はさまざまな形態で具体化され得、多数の代替、修正および均等物を包含すると理解すべきである。したがって、本明細書に開示される具体的な詳細は限定的であると解釈すべきでなく、むしろ請求項の基礎として、かつ当業者が請求項に記載の主題を実質的に任意の適切に詳述されるシステム、構造、または態様で採用するための代表的な基礎として解釈すべきである。本開示の完全な理解を提供するために、以下の説明では多数の具体的な詳細が述べられる。これらの詳細は例示のために提供され、請求項に記載の主題はこれらの具体的な詳細のいくつかまたはすべてがなくても請求項に従って実践され得る。請求項に記載の主題の範囲から逸脱することなく、他の実施形態も用いられることができ、構造的な変更を行うことができると理解すべきである。個々の実施形態の1つ以上に記載されるさまざまな特徴および機能は、それらが記載されている特定の実施形態に適用性が限定されないと理解すべきである。それらは代わりに、単独でまたは何らかの組合せにおいて、そのような実施形態が記載されているかいないかにかかわらず、かつそのような特徴が記載されている実施形態の一部であると提示されているかいないかにかかわらず、開示の他の実施形態の1つ以上に適用可能である。明確にするために、請求項に記載の主題に関連する技術分野において公知の技工物は、請求項に記載の主題を不必要に不明瞭にしないように、詳細に記載されていない。

【0030】

特に定義されない限り、本明細書に用いられるすべての専門用語、表記ならびに他の技術および化学用語または術語は、請求項に記載の主題が関連する技術の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を持つことが意図されている。場合によっては、一般に理解される意味を有する用語は明確にするためにおよび/または容易に参照するために本明細書において定義され、本明細書におけるそのような定義の包含は、当該技術において一般的に理解されているものとの実質的な相違点を表わしていると必ずしも解釈すべきでない。本明細書に記載または参照される技術および手順の多くは、当業者によってよく理解されており、従来技法を用いて一般に採用されている。

【0031】

本願において参照される特許文献、科学論文およびデータベースを含むすべての出版物は、個々の各出版物が参照によって個別に援用されているのと同じ程度まで、その全内容があらゆる目的のために参照により援用される。本明細書に記載される定義が、参照により本明細書に援用される特許、特許出願、公開出願または他の出版物に記載される定義に反しているか、またはそうでなければ当該定義と矛盾している場合、本明細書に記載される定義が、参照により本明細書に援用される定義より優先する。出版物または文書の引用は、それらのいずれかが関連の先行技術であるという承認であることを意図しておらず、それらの出版物または文書の内容または日付についての如何なる承認を構成するものでもない。

【0032】

すべての表題は読者の利便性のためであり、そのように規定されない限り、表題に続く本文の意味を限定するために用いられるべきでない。

【0033】

本開示全体にわたって、請求項に記載の主題のさまざまな局面が範囲の形態で提示され

10

20

30

40

50

る。範囲の形態における記載は利便性および簡潔性のために過ぎず、請求項に記載の主題の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈されるべきでないとして理解すべきである。したがって、範囲の記載は、すべての可能なサブ範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると見なされるべきである。たとえば、値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間にある各値、およびその記載範囲内のその他の記載される、または間にある値が請求項に記載の主題に包含されると理解すべきである。これらのより小さい範囲の上限および下限は独立してより小さい範囲に含まれてもよく、さらに、記載範囲内の任意の具体的に排除された限定を受け、請求項に記載の主題に包含される。記載範囲が上下限の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界の一方または両方を排除する範囲も請求項に記載の主題に含まれる。これは、範囲の幅に係わらず適用される。

10

【 0 0 3 4 】

提供される実施形態の実践では、特に明記しない限り、当該技術において実践する当業者の範囲内にある、有機化学、高分子技術、分子生物学（組換え技術を含む）、細胞生物学、生化学、およびシーケンシング技術の従来技術ならびに説明を採用する。そのような従来技術として、ポリペプチドおよびタンパク質合成および修飾、ポリヌクレオチド合成および修飾、ポリマー配列合成、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよびライゲーション、ならびに標識を用いたハイブリダイゼーションの検出が挙げられる。本明細書中の例を参照することによって、好適な技術の具体的な例示を有することができる。しかし、他の同等の従来手順も、もちろん使用可能である。そのような従来技術および説明は、Green, et al., Eds., *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (20
Vols. I-IV) (1999); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds., *Genetic Variation: A Laboratory Manual* (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (2003); Bowtell and Sambrook, *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual* (2003); Mount, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2004); Sambrook and Russell, *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2006); および Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2002) (すべて Cold Spring Harbor Laboratory Press より); Ausubel et al. eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1987); T. Brown ed., *Essential Molecular Biology* (1991), IRL Press; Goeddel ed., *Gene Expression Technology* (1991), Academic Press; A. Botwell et al. eds., *Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes* (1990), 30
Bartlett Publ.; M. Kriegler, *Gene Transfer and Expression* (1990), Stockton Press; R. Wu et al. eds., *Recombinant DNA Methodology* (1989), Academic Press; M. McPherson et al., *PCR: A Practical Approach* (1991), IRL Press at Oxford University Press; Stryer, *Biochemistry* (4th Ed.) (1995), W. H. Freeman, New York N.Y.; Gait, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (2002), IRL Press, London; Nelson and Cox, *Lehninger, Principles of Biochemistry* (2000) 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; Berg, et al., *Biochemistry* (2002) 5th Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; D. Weir & C. Blackwell, eds., *Handbook of Experimental Immunology* (1996), Wiley-Blackwell; A. Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology* (1991, 1994), W.B. Saunders Co.; ならびに J. Coligan et al. eds., *Current Protocols in Immunology* (1991) などの標準的な実験室マニュアルを見つけることができ、上記マニュアルのすべてはその全内容があらゆる目的のために参照により本明細書に援用される。

20

30

40

【 0 0 3 5 】

A : 定義

本明細書および添付の請求項において使用する単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数対象物を含む。たとえば、「a」または「an」は「少なくとも1つの」または「1つ以上の」を意味する。ゆえに、「試薬 (a reagent)」の言及は1つ以上の試薬を指し、「当該方法 (the method)」の言及は本明細書に開示される、および/または当業者に公知の同等の工程および方法の言及を含

50

む、等である。

【0036】

本明細書において使用する「マイクロ流体デバイス」という用語は一般に、材料、特に、液体などの、流体で運ばれる材料が、ある実施形態ではマイクロスケールで、ある実施形態ではナノスケールでその中を通して輸送され得るデバイスを指す。ゆえに、本明細書に開示される主題によって記載されるマイクロ流体デバイスはマイクロスケール特徴、ナノスケール特徴、およびそれらの組合せを含み得る。

【0037】

したがって、例示的なマイクロ流体デバイスは典型的に、ミリメートルスケール以下のオーダで寸法決めされる構造的または機能的特徴を含み、これらは流体を μL /分以下のオーダの流量で操作可能である。典型的に、そのような特徴には、経路、流体リザーバ、反応チャンバ、混合チャンバ、および分離領域が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、経路は約 $0.1\ \mu\text{m}$ から約 $500\ \mu\text{m}$ の範囲内の少なくとも1つの断面寸法を含む。このオーダの寸法を用いることによって、小さい面積内に多くの経路を組込むことができ、利用される流体の量が減少する。

10

【0038】

マイクロ流体デバイスは単独で存在してもよいし、またはマイクロ流体システムの一部であってもよく、当該システムは、たとえば限定されずに、たとえば試料、試薬、緩衝液などの流体をシステム内におよび/またはシステム全体に導入するためのポンプ；検出機器またはシステム；データ記憶システム；ならびにデバイス内の流体輸送および/または方向を制御し、たとえば温度、電流などのデバイス内の流体が晒される環境条件を監視および制御するための制御システムを含み得る。

20

【0039】

本明細書において使用する「経路」、「マイクロ経路」、「流路」、および「マイクロ流路」という用語は同義で用いられ、パターンを有する基板から材料内にパターンを付与することによって、もしくは任意の好適な材料除去技術によって材料に形成される凹部もしくは空洞を意味し得るか、または、管、毛細管などの、凹部もしくは空洞内に装着された任意の好適な流体伝導構造と組合せた凹部もしくは空洞を意味し得る。本発明では、経路サイズはマイクロ流路の断面積を意味する。

【0040】

本明細書において使用する「流路」および「制御路」という用語は同義で用いられ、たとえば気体または液体など、流体などの材料が内部を流れることが可能なマイクロ流体デバイスの経路を意味し得る。より特定的には、「流路」という用語は、たとえば溶媒または化学試薬などの対象材料が内部を流れることが可能な経路を指す。さらに、「制御路」という用語は、たとえば気体または液体など、流体などの材料が弁またはポンプを作動させるように内部を流れることが可能な流路を指す。

30

【0041】

本明細書において使用する「チップ」は、物理的、化学的、生物学的、生物物理学的もしくは生化学的プロセス等の一定のプロセスをその上で実行可能な、複数の一、二もしくは三次元のマイクロ構造またはマイクロスケール構造を有する固体基板を指す。経路およびウェル、電極要素、電磁要素などのマイクロ構造またはマイクロスケール構造は、チップ上の物理的、生物物理学的、生物学的、生化学的、化学的反応またはプロセスを容易にするために基板に組込まれるか、基板上に製作されるか、またはそうでなければ基板に取付けられる。チップは一次元において薄くてもよく、たとえば矩形、円、楕円、または他の不規則形状など、他の次元におけるさまざまな形状を有してもよい。本発明のチップの主面のサイズは、たとえば約 $1\ \text{mm}^2$ から約 $0.25\ \text{m}^2$ のように、大きく異なり得る。好ましくは、チップのサイズは約 $4\ \text{mm}^2$ から約 $25\ \text{cm}^2$ であり、特性寸法は約 $1\ \text{mm}$ から約 $5\ \text{cm}$ である。チップ面は平坦であってもよいし、平坦でなくてもよい。非平坦面を有するチップは、表面上に製作された経路またはウェルを含んでもよい。

40

【0042】

50

一実施形態において、同一のマイクロ流体チップ上の反応チャンバの体積は実質的に同一である。本明細書において使用する「実質的に同一の」反応体積は、反応体積同士の差がアッセイ均一性に統計的に影響しないほど十分小さいことを意味する。通常、最大体積と最小体積との差は、最大反応体積の約50%未満である。好ましくは、最大体積と最小体積との差は、最大反応体積の約40%、約30%、約20%、約10%、約5%、約2%、約1%、約0.5%、約0.1%、約0.01%未満、または約0.001%未満である。

【0043】

本明細書において使用する「試料」は、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはそれらの任意の組合せであり得る。本開示の生体試料は、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性試料、または非水性試料の形態の試料を包含する。本明細書において使用する「生体試料」は、生体またはウイルス（もしくはプリオン）源または高分子および生体分子の他のソースから得られた任意の試料を含み、そこから核酸、タンパク質および/または他の高分子を得ることができる対象の任意の細胞種類または組織を含む。生体試料は、生物源から直接得られた試料、または処理される試料であり得る。たとえば、増幅される単離核酸は生体試料を構成する。生体試料には、動物および植物からの血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および臓器試料などの体液、ならびにそれに由来する処理済み試料が挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」という用語は本明細書において同義で用いられ、任意の長さのヌクレオチドの高分子形態を指し、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、およびそれらの類似体または混合物を含む。当該用語は、三本鎖、二本鎖および一本鎖のデオキシリボ核酸（「DNA」）ならびに三本鎖、二本鎖および一本鎖のリボ核酸（「RNA」）を含む。当該用語はさらに、たとえばアルキル化によって、および/またはキャッピングによって修飾された、ならびに修飾されていない形態のポリヌクレオチドを含む。より特定的には、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含有する）、スプライスされているかいないかにかかわらず、tRNA、rRNA、hRNA、およびmRNAを含むポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有する）、プリンまたはピリミジン塩基のN-またはC-グリコシドであるその他の種類のポリヌクレオチド、ならびに非ヌクレオチド骨格を含む他のポリマー、たとえば、ポリアミド（たとえばペプチド核酸（「PNA」））およびポリモルホリン（Neugeneとしてオレゴン州コーバリスのAnti-Virals, Inc.社から市販されている）ポリマー、ならびに、DNAおよびRNA中に見られるような塩基対合および塩基スタッキングを可能にする構成内の核酸塩基をポリマーが含有しているという条件で、他の合成配列特異的核酸ポリマーを含む。ゆえに、これらの用語は、たとえば、3'-デオキシ-2',5'-DNA、オリゴデオキシリボヌクレオチドN3'-P5'ホスホルアミデート、2'-O-アルキル置換RNA、DNAとRNAとの、またはPNAとDNAまたはRNAとのハイブリッドを含み、さらに、公知の種類の修飾、たとえば、標識、アルキル化、「キャップ」、ヌクレオチドの1つ以上を、類似体、ヌクレオチド間修飾で、たとえば、非荷電結合（たとえばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメート等）を有する、負荷電結合（たとえばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）、および正荷電結合（たとえばアミノアルキルホスホルアミデート、アミノアルキルホスホトリエステル）を有するもので、たとえばタンパク質（酵素（たとえばヌクレアーゼ）、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジン等を含む）などのペンダント部分を含有するもので、インターカレータ（たとえばアクリジン、ソラレン等）を有するもので、（たとえば金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属等の）キレートを含有するもので、アルキル化剤を含有するもので、修飾結合（たとえばアルファノマー核酸等）および非修飾形態のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを有するもので置換することを含む。核酸は一般にリン酸ジエステル結合を含有するが、場合

10

20

30

40

50

によっては、ホスホルアミダイト、ホスホロジチオエート、もしくはメチルホスホロアミダイト結合；またはペプチド核酸骨格および結合などの代替骨格を有する核酸類似体が含まれてもよい。他の類似の核酸は、ロックド核酸、正骨格、非イオン性骨格および非リボース骨格を含む二環構造を有するものを含む。リボースリン酸骨格の修飾が、分子の安定性を増加させるために行なわれてもよく、たとえば、PNA：DNAハイブリッドは環境によってはより高い安定性を示すことができる。「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」という用語は、少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個、300個、400個、500個、1000個以上のヌクレオチドなどの、任意の好適な長さを含み得る。

10

【0045】

本明細書において使用する「ヌクレオシド」および「ヌクレオチド」という用語は、公知のプリンおよびピリミジン塩基だけでなく、修飾された他の複素環塩基も含有するそれらの部分を含むことが認識されるであろう。そのような修正は、メチル化プリンもしくはピリミジン、アシル化プリンもしくはピリミジン、または他の複素環を含む。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、たとえば、ヒドロキシル基の1つ以上がハロゲン、脂肪族基で交換されるか、またはエーテル、アミンなどとして官能化される、糖部分に対する修飾も含み得る。「ヌクレオチド単位」という用語は、ヌクレオシドおよびヌクレオチドを包含することが意図されている。

【0046】

「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は本明細書において同義で用いられ、たとえば、少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、100個、200個、300個、400個、500個、1000個以上のアミノ酸などの、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは直鎖状でも分岐状でもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されてもよい。当該用語はさらに、自然にまたは介入によって、たとえば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分を用いた共役などのその他の操作もしくは修飾によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。この定義には、たとえば、アミノ酸の1つ以上の類似体（たとえば、非天然アミノ酸等を含む）を含有するポリペプチド、および当該技術において公知の他の修飾も含まれる。

20

30

【0047】

本明細書において使用する「バインダ」、「結合剤」、「結合部分」、および「結合基」という用語は、たとえば他の分子を有する生体分子またはその一部もしくは複合体などの、対象の分析分子に特異的に結合する任意の薬剤またはその任意の部分もしくは基を指す。一実施形態において、本明細書に開示されるマイクロ流体チップの反応チャンバは、反応チャンバに搬送される試料中の1つ以上の標的分子のためのバインダを含む。バインダは、反応チャンバの内面に、直接的にまたは間接的に、共有結合的にまたは非共有結合的に固定化され得る。バインダは、ポリヌクレオチド（たとえば、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブもしくはアダプタ、または親和性および特異性が高いタンパク質およびペプチドを含む予め選択された標的に結合し得るアダプタ）またはタンパク質（たとえば、標的タンパク質上のエピトープを特異的に認識する抗体）であり得る。

40

【0048】

本明細書に開示されるチップを用いて検出および/または分析可能な分析物は、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物、イオン、または上記のいずれかを含有する多成分複合体を含むがこれらに限定されない任意の生体分子であり得る。対象の細胞内分析物の例には、細胞小器官、たとえば、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、葉緑体、エンドサイトーシス小胞、エキソサイトーシス小胞、液胞、リソソーム、等が挙げられる。例示的な核酸分析物には、さまざまなコンフォメーションのゲノムDNA（たとえば、A-DNA、B-DNA、Z-DNA）、ミトコンドリアDNA（mtDNA）、mRNA、tRNA、r

50

RNA、hRNA、miRNA、およびpiRNAが挙げられ得る。

【0049】

本明細書において使用する「結合」という用語は、2つの分子が互いに近接している安定した会合をもたらす当該分子同士の間での誘因性相互作用を指す。分子結合は以下の種類、すなわち、非共有結合、可逆性共有結合、および不可逆性共有結合に分類され得る。分子結合に関与し得る分子は、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、および医薬化合物などの小有機分子を含む。たとえば、他の分子との安定した複合体を形成するタンパク質はレセプタと称されることが多く、それらの結合パートナーはリガンドと称される。核酸はさらに、核酸と安定した複合体を、または、他の物と、たとえばDNA-タンパク質複合体、DNA-DNA複合体、DNA-RNA複合体などの安定した複合体を形成し得る。

10

【0050】

本明細書において使用する「特異的結合」という用語は、たとえば抗体などのバインダがポリペプチド抗原などの標的に優先的に結合するような、バインダの特異性を指す。たとえばタンパク質、核酸、抗体または他の親和性捕捉剤などの結合パートナーに言及する場合、「特異的結合」は、指定のアッセイ条件下で選択的なハイブリダイゼーションを保証するように高い親和性および/または相補性を有する2つ以上の結合パートナーの結合反応を含み得る。典型的に、特異的結合は、バックグラウンド信号の標準偏差の少なくとも3倍となる。ゆえに、指定条件下で、結合パートナーはその特定の標的分子に結合し、試料中に存在する他の分子には大量に結合しない。他の潜在的な妨害物質の存在下の特定の標的のバインダまたは抗体による認識は、そのような結合の1つの特徴である。好ましくは、標的に特異的な、または標的に特異的に結合するバインダ、抗体または抗体フラグメントは、他の非標的物質への結合よりも高い親和性で標的に結合する。さらに好ましくは、標的に特異的な、または標的に特異的に結合するバインダ、抗体または抗体フラグメントは、たとえば試験試料中に存在する非標的物質など、非標的物質のかなりの割合と結合することを回避する。いくつかの実施形態において、本開示のバインダ、抗体または抗体フラグメントは、非標的物質の約90%よりも大きい割合との結合を回避するが、より高い割合が明らかに考えられ、かつ好ましい。たとえば、本開示のバインダ、抗体または抗体フラグメントは、非標的物質の約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、および約99%以上との結合を回避する。他の実施形態では、本開示のバインダ、抗体または抗体フラグメントは、非標的物質の約

20

30

【0051】

本明細書において使用する「捕捉剤」および「捕捉基」という用語は、分析物上の親和性基またはドメインとの結合または連鎖を介して当該分析物の捕捉を可能にする任意の部分に指す。捕捉剤とその親和性タグとの結合は、共有結合および/または非共有結合であり得る。捕捉剤は、たとえば、融合ペプチド上の親和性タグに選択的に結合する結合対のメンバー、組換え技術または他のメカニズムによって付加される化学結合、酵素のための共同因子などを含む。捕捉剤は、ハイブリダイゼーション、架橋（たとえばソラレンなどのフロクマリンを用いる共有結合固定）、化学反応基を介した付着などを含む従来の技術を用いて本開示のチップと会合され得る（たとえば、捕捉剤は反応チャンバの1つ以上の内部に位置し得る）。

40

【0052】

本明細書において使用する「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド、または小分子等の、抗原との特異的結合が可能な全免疫グロブリンまたは抗体または免疫グロブリン分子の機能性フラグメントを含み、たとえば、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなどの任意のクラスの免疫グロブリンであり得る。ニワトリなどの鳥類における主要な抗体種類であるIgYも含まれる。分泌抗体は、IgAと同

50

様に2個のIg単位を有する二量体、硬骨魚類IgMのように4個のIg単位を有する四量体、または哺乳類IgMのように5個のIg単位を有する五量体であり得る。

【0053】

抗体は、全抗体、および、たとえば対象のエピトープなどの抗原または抗原性フラグメントと結合可能な任意の抗体フラグメントを含む。例には、完全な抗体分子、抗体フラグメントまたは連鎖抗体フラグメント、たとえばFab、F(ab')₂、化学結合したF(ab')₂、Fab'、scFv(単鎖可変フラグメント)、di-scFv、sdAb(シングルドメイン抗体)、三機能抗体、BiTE(bi-specific T-cell engager)、CDR、V_L、V_H、および抗原との特異的結合が可能な抗体のその他の部分が挙げられる。本明細書において使用する抗体は免疫反応性または免疫特異性であり、したがって、たとえば、検出されたタンパク質(すなわち生体試料中の分析物)または本明細書に開示されるアッセイにおいて検出のために用いられるタンパク質(すなわちバインダもしくはプローブ)に特異的にかつ選択的に結合する。本明細書において使用する抗体は、本明細書に開示される分析物、バインダ、もしくはエピトープのいずれか、またはそれらの任意の組合せに対して特異的であり得る。ある実施形態において、本開示の分析物自体が抗体またはそのフラグメントであり得る。

10

【0054】

本明細書において使用する「抗原」という用語は、その抗原認識部位を介して抗体によって特異的に結合される標的分子を指し得る。抗原は一価でも多価でもよく、すなわち、抗原は1つ以上の抗体によって認識される1つ以上のエピトープを有してもよい。抗体によって認識され得る種類の抗原の例には、ポリペプチド、オリゴ糖、糖タンパク質、ポリヌクレオチド、脂質、または小分子等が挙げられる。

20

【0055】

本明細書において使用する「エピトープ」という用語は、単独でまたはより大きい配列の一部として、そのような配列に反応して生成される抗体に結合する配列を規定する、少なくとも約3個から5個、好ましくは約5個から10個または15個、かつ約1,000個以下(またはそれらの間の任意の整数)のアミノ酸のペプチド配列を指し得る。フラグメントの長さには臨上限はなく、これは、たとえば、抗原配列のほぼ全長、またはさらには標的抗原からの2つ以上のエピトープを含む融合タンパク質を含み得る。本開示で用いるエピトープは、それが由来する親タンパク質の部分の正確な配列を有するペプチドに限定されず、天然配列と同一の配列、ならびに欠失、付加および置換(保存的な性質)などの天然配列に対する修飾も包含する。

30

【0056】

「相補的な」および「実質的に相補的な」という用語は、ヌクレオチド同士または核酸同士の、たとえば、二本鎖DNA分子の2本の鎖同士の、または一本鎖核酸上のオリゴヌクレオチドプライマとプライマ結合部位との、ハイブリダイゼーションまたは塩基対合または二重鎖の形成を含む。相補的ヌクレオチドは、一般に、AおよびT(もしくはAおよびU)、またはCおよびGである。2つの一本鎖RNAまたはDNA分子は、最適に整理しており、比較され、かつ適切なヌクレオチド挿入または欠失によって、一方の鎖のヌクレオチドが、他方の鎖の少なくとも約80%、通常は少なくとも約90%から約95%、さらには約98%から約100%と対になる場合に実質的に相補的であると言われている。一局面において、ヌクレオチドの2つの相補的配列は、対向するヌクレオチド同士のミスマッチが25%未満、より好ましくは15%未満、さらに好ましくは5%未満で、もっとも好ましくはミスマッチがゼロで、ハイブリダイズ可能である。好ましくは、2つの分子は高ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする。

40

【0057】

本明細書において使用する「ハイブリダイゼーション」は、2つの一本鎖ポリヌクレオチドが非共有結合的に結合して安定した二本鎖ポリヌクレオチドを形成するプロセスを指し得る。一局面において、結果として得られる二本鎖ポリヌクレオチドは「ハイブリッド」または「二重鎖」であり得る。「ハイブリダイゼーション条件」は、典型的に、約1M

50

未満の、しばしば約500mM未満の、かつ約200mM未満であり得る塩濃度を含む。「ハイブリダイゼーション緩衝液」は、5%SSPEなどの緩衝塩溶液、または当該技術において公知の他のそのような緩衝液を含む。ハイブリダイゼーション温度は5℃まで低くてもよいが、典型的に22℃よりも高く、より典型的に約30℃よりも高く、典型的に37℃を超える。ハイブリダイゼーションはしばしばストリンジェントな条件下で、すなわち、配列がその標的配列にハイブリダイズするが、他の非相補的配列にはハイブリダイズしない条件下で行われる。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、異なる状況において異なる。たとえば、長いフラグメントは短いフラグメントよりも特異的ハイブリダイゼーションのためにより高いハイブリダイゼーション温度を必要とし得る。相補鎖の塩基組成および長さ、有機溶媒の存在、ならびに塩基ミスマッチの程度を含む他の要因がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響し得るため、パラメータの組合せはいずれか1つのパラメータのみの絶対測定値よりも重要である。一般に、ストリンジェントな条件は、規定イオン強度およびpHにおいて特異配列について T_m よりも約5℃低いように選択される。溶融温度 T_m は、二本鎖核酸分子の集団が一本鎖に半解離する温度であり得る。核酸の T_m を計算するためのいくつかの数式が当該技術において周知である。標準的な参照によって示されるように、 T_m 値の単純な推定値は、核酸が1MのNaClで水溶液中にある時に、数式 $T_m = 81.5 + 0.41(\% G + C)$ によって計算され得る(たとえば、Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, Nucleic Acid Hybridization (1985)を参照)。他の参照(たとえば、Allawi and SantaLucia, Jr., Biochemistry, 36:10581-94 (1997))は、 T_m の計算のために構造特性および環境特性、

【0058】

一般に、ハイブリッドの安定性はイオン濃度および温度の関数である。典型的に、ハイブリダイゼーション反応は低ストリンジェンシーの条件下で行われ、続いて、異なる、しかしより高いストリンジェンシーの洗浄が行われる。例示的なストリンジェントな条件は、約7.0から約8.3のpHにおける少なくとも0.01Mから1M以下のナトリウムイオン濃度(または他の塩)の塩濃度および少なくとも25℃の温度を含む。たとえば、5×SSPE(pH7.4における750mMのNaCl、50mMのリン酸ナトリウム、5mMのEDTA)および約30℃の温度の条件がアレル特異的なハイブリダイゼーションに好適であるが、好適な温度はハイブリダイズされる領域の長さおよび/またはGC含有量に依存する。一局面において、パーセンテージミスマッチを求める際の「ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー」は以下の通りであり得る：1)高ストリンジェンシー：0.1×SSPE、0.1%SDS、65℃；2)中ストリンジェンシー：0.2×SSPE、0.1%SDS、50℃(中程度のストリンジェンシーとも称される)；および3)低ストリンジェンシー：1.0×SSPE、0.1%SDS、50℃。同等のストリンジェンシーは代替の緩衝液、塩および温度を用いて達成され得ると理解すべきである。たとえば、中程度のストリンジェントなハイブリダイゼーションは、プローブなどの核酸分子が相補的核酸分子に結合することを可能にする条件を指し得る。ハイブリダイズされる核酸分子は一般に、たとえば70%、75%、80%、85%、90%、または95%同一性の少なくともいずれかを含む、少なくとも60%同一性を有する。中程度のストリンジェントな条件は、42℃での50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2%SDSにおけるハイブリダイゼーションと、その後の、42℃での0.2×SSPE、0.2%SDSにおける洗浄と同等の条件であり得る。高ストリンジェンシー条件は、たとえば、42℃での50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2%SDSにおけるハイブリダイゼーションと、その後の、65℃での0.1×SSPE、および0.1%SDSにおける洗浄によって提供され得る。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、22℃での10%ホルムアミド、5×デンハート液、6×SSPE、0.2%SDSにおけるハイブリダイゼーションと、その後の、37℃での1×SSPE、0.2%SDSにおける洗浄と同等の条件を指し得る。デンハート液は1%フィコール、1%ポリビニルピロリドン、および1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含

有する。20 × S S P E (塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、E D T A) は3 Mの塩化ナトリウム、0.2 Mのリン酸ナトリウム、および0.025 MのE D T Aを含有する。他の好適な中程度のストリンジェンシーおよび高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション緩衝液および条件は当業者に周知であり、たとえば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); およびAusubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons (1999)に記載されている。

【0059】

代替的に、実質的な相補性は、RNAまたはDNA鎖が選択的なハイブリダイゼーション条件下でその補体にハイブリダイズする時に存在する。典型的に、選択的なハイブリダイゼーションは、少なくとも14個から25個のヌクレオチドのストレッチにわたって少なくとも約65%相補性、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約90%相補性がある時に起こる。M. Kanehisa, *Nucleic Acids Res.* 12:203 (1984)を参照。

10

【0060】

本明細書において使用する「プライマ」は、ポリヌクレオチドテンプレートと二重鎖を形成すると、核酸合成の開始点となることができ、伸長二重鎖が形成されるようにテンプレートに沿ってその3'端から伸長することができる、天然または合成のオリゴヌクレオチドであり得る。伸長プロセス時に付加されるヌクレオチドの配列は、テンプレートポリヌクレオチドの配列によって決定される。プライマは通常、たとえばDNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって伸長する。

20

【0061】

シーケンシング反応などは、核酸のヌクレオチド塩基配列に関連する情報の判定を含む。そのような情報は、核酸の部分的なおよび完全な配列情報の同定または判定を含み得る。配列情報は、異なる程度の統計的信頼性または信頼度で判定され得る。一局面において、当該用語は、核酸内の複数の近接するヌクレオチドの同一性および順序付けの判定を含む。「高スループットシーケンシング」または「次世代シーケンシング」は、多くの(典型的に数千から数十億の)核酸配列を本質的に並列な態様で判定する、すなわちDNAテンプレートが一度に1つずつではなくバルク処理におけるシーケンシングのために調製され、多くの配列が好ましくは並列に読出される方法を用いる、または代替的に、それ自体が並列化され得る超高スループット直列処理を用いる、配列判定を含む。そのような方法として、パイロシーケンス法(たとえば、コネチカット州ブランフォードの44 Life Sciences, Inc.社によって商品化されている); ライゲーションによるシーケンシング(たとえば、カリフォルニア州カールスバッドのLife Technologies, Inc.社のSOLiD(商標)技術において商品化されている); 修飾ヌクレオチドを用いる合成によるシーケンシング(カリフォルニア州サンディエゴのIllumina, Inc.社によるTruSeq(商標)およびHiSeq(商標)技術; マサチューセッツ州ケンブリッジのHelicos Biosciences Corporation社によるHeliscope(商標); およびカリフォルニア州メンローパークのPacific Biosciences of California, Inc.社によるPacBio RSにおいて商品化されている)、イオン検出技術によるシーケンシング(カリフォルニア州カールスバッドのLife Technologies社のIon Torrent(商標)技術など); DNAナノボールのシーケンシング(カリフォルニア州マウンテンビューのComplete Genomics, Inc.社); ナノポアを用いたシーケンシング技術(たとえば、イギリスのオックスフォードのOxford Nanopore Technologies, LTD社によって開発されている)、ならびに同様の高度に並列化されたシーケンシング法が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0062】

本明細書における「マルチプレクシング」、「マルチプレックスアッセイ」、または「マルチインデックスアッセイ」は、たとえば複数の核酸配列などの複数の標的の存在および/または量が、たとえば1つよりも多い捕捉プローブ抱合体を用いて同時にアッセイされ得るアッセイまたは他の分析方法を指し得、抱合体の各々は少なくとも1つの異なる検

50

出特性、たとえば蛍光特性（たとえば励起波長、発光波長、発光強度、FWHM（半値全幅ピーク高さ）、もしくは蛍光寿命）または固有の核酸もしくはタンパク質配列特性を有する。

【0063】

本明細書に記載される発明の局面および実施形態は、「からなる」および/または「から本質的になる」の局面および実施形態を含むと理解される。

【0064】

B. マイクロ流体チップおよびマイクロ流体システム

一局面において、本開示はマルチインデックス検出マイクロ流体チップを提供する。一実施形態において、マイクロ流体チップは、1つ以上の標的が検出および/またはアクセスされる、試料を反応チャンバ内に均一に分布させるための遠心分離を採用する。一局面において、本開示は、主要路の断面積同士の好適な比を用いることによって試料の均一な分布を達成する。一局面において、主要路の断面積同士の比は、反応チャンバ内への試料の最適な均一の分布を達成するように調整され得る。別の局面において、本開示は、緩衝チャンバの設計によって、反応チャンバが遠心分離の後に試料で完全に充填されることを保証する。一局面において、本開示は、反応チャンバが反応期間全体にわたって完全に充填された状態を維持することを保証し、特定の実施形態において、各反応チャンバの反応生成物が主要路および隣接した反応チャンバに広がることを減少させるか防止する。

【0065】

ある実施形態において、本開示は、ボトムプレートと、ボトムプレートと一致してボトムプレートを封止するカバープレートとを含む、マルチインデックス検出マイクロ流体チップを提供する。一局面において、マイクロ流体チップの中心は貫通孔を有する。

【0066】

いくつかの局面において、ボトムプレートは、外部または外面と、マイクロ流体デバイス全体のさまざまなマイクロスケール経路および/またはチャンバを規定する内部とを含む。たとえば、例示的なマイクロ流体デバイスの本体構造は、典型的に、平面構造であり得る、たとえば実質的に平坦であるか少なくとも1つの平坦面を有する、固体または半固体構造を採用する。好適な基板は、さまざまな材料のいずれか1つから、または材料の組合せから製作され得る。しばしば、平面基板は、微細加工の分野で一般的な固体基板、たとえば、ガラス、石英、シリコンまたはポリシリコンなどのシリカベースの基板、およびたとえばガリウムヒ素などの他の公知の基板を用いて製造される。これらの基板の場合、フォトリソグラフィ技術、湿式化学エッチング、たとえばドリル加工、ミリング加工などのマイクロマシニングなどの一般的な微細加工技術が、マイクロ流体デバイスおよび基板の製作に容易に適用され得る。代替的に、たとえば、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリウレタン、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリカーボネートなどを含むポリマー基質材料を用いて、本発明のデバイスを製作してもよい。そのようなポリマー材料の場合、射出成形またはエンボス加工法を用いて、本明細書に記載されるような経路およびリザーバ形状を有する基板を形成してもよい。そのような場合、原型は上述の材料および方法のいずれかを用いて製作されてもよい。

【0067】

例示的なデバイスの経路およびチャンバは典型的に、平面基板の一方の表面に、その表面の溝、ウェルまたは窪みとして製作される。典型的に同一のまたは同様の材料から準備される第2の平面基板が第1の平面基板に被せられて接合されることによって、デバイスの経路および/またはチャンバを規定して封止する。第1の基板の上面、および上面の下側の嵌合面は、ともにデバイスの内部を規定し、すなわちデバイスの経路およびチャンバを規定する。いくつかの実施形態において、上層が下層にリバーシブルに結合されてもよい。

【0068】

例示的なシステムはさらに、デバイス自体の本体の外部にあるが、依然として試料ロー

ディング経路と流体連結している試料源を含み得る。いくつかの実施形態において、システムはさらに、マイクロ経路への入口および/または出口を含み得る。いくつかの実施形態において、システムはさらに、試料をマイクロ経路に導入するための搬送手段を含み得る。いくつかの実施形態において、システムはさらに、液体をマイクロ経路に導入するための注入手段を含み得る。ピペット、ポンプ等の任意の液体操作機器が、液体をマイクロ経路に導入するための注入手段として用いられ得る。

【0069】

ある実施形態において、マイクロ流体チップのボトムプレートは1つ以上の波形の主要路を有する。特定の局面において、主要路の各々の一端が試料入口（たとえば試料ローディングまたは注入用の孔）に接続し、他端が排出口（たとえば排出孔）に接続する。いくつかの局面において、試料入口または排出口または両方がボトムプレート上にある。

10

【0070】

一局面において、波形の主要路の谷は貫通孔の遠位にあり、主要路のピークは貫通孔の近位にある。別の局面において、主要路の谷はボトムプレートの中心（たとえばボトムプレートの中心の貫通孔）から遠ざかって向いており、主要路のピークはボトムプレートの中心（たとえば中心の貫通孔）の方を向いている。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の谷を含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、少なくとも約10個、約20個、約40個、約60個、約80個、約100個、約120個、約140個、約160個、約180個、または約200個の谷を含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、約200個から約400個、約400個から約600個、約600個から約800個、約800個から約1000個、または約1000個よりも多い谷を含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のピークを含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、少なくとも約10個、約20個、約40個、約60個、約80個、約100個、約120個、約140個、約160個、約180個、または約200個のピークを含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、約200個から約400個、約400個から約600個、約600個から約800個、約800個から約1000個、または約1000個よりも多いピークを含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の谷/ピーク対（互いに隣接および接続している1つのピークおよび1つの谷）を含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、少なくとも約10個、約20個、約40個、約60個、約80個、約100個、約120個、約140個、約160個、約180個、または約200個の谷/ピーク対を含む。いくつかの実施形態において、波形の主要路は、約200個から約400個、約400個から約600個、約600個から約800個、約800個から約1000個、または約1000個よりも多い谷/ピーク対を含む。上記の実施形態のいずれかにおいて、主要路の谷の各々は、ボトムプレート上の連結路を介して少なくとも1つの反応チャンバに接続され得る。

20

30

【0071】

一局面において、連結路は少なくとも1つの緩衝チャンバを含み、緩衝チャンバは、反応チャンバと主要路との間の連結路上に位置している。一局面において、緩衝チャンバの体積は、緩衝チャンバが接続されている反応チャンバの体積の約0.2から約0.8倍である。いくつかの局面において、緩衝チャンバの体積と反応チャンバの体積との比は、約0.2未満、約0.2から約0.3、約0.3から約0.4、約0.4から約0.5、約0.5から約0.6、約0.6から約0.7、約0.7から約0.8、または約0.8よりも大きい。

40

【0072】

別の局面において、連結路と反応チャンバとの接合部は、マイクロ流体チップの中心と反応チャンバとを接続する直線内に位置している。

【0073】

50

一実施形態において、ボトムプレートにおいて、主要路は1つ以上の円に分布されている。別の局面において、1つ以上の主要路が1つ以上の円によって形成される。

【0074】

いくつかの実施形態において、反応チャンバの体積は、約0.1 μ Lから約5.0 μ Lである。いくつかの実施形態において、反応チャンバの体積は、約0.01 μ L未満、約0.01 μ Lから約0.05 μ L、約0.05 μ Lから約0.1 μ L、約0.1 μ Lから約0.2 μ L、約0.1 μ Lから約0.2 μ L、約0.2 μ Lから約0.3 μ L、約0.3 μ Lから約0.4 μ L、約0.4 μ Lから約0.5 μ L、約0.5 μ Lから約0.6 μ L、約0.6 μ Lから約0.7 μ L、約0.7 μ Lから約0.8 μ L、約0.8 μ Lから約0.9 μ L、約0.9 μ Lから約1.0 μ L、約1.0 μ Lから約1.1 μ L、約1.1 μ Lから約1.2 μ L、約1.2 μ Lから約1.3 μ L、約1.3 μ Lから約1.4 μ L、約1.4 μ Lから約1.5 μ L、約1.5 μ Lから約1.6 μ L、約1.6 μ Lから約1.7 μ L、約1.7 μ Lから約1.8 μ L、約1.8 μ Lから約1.9 μ L、約1.9 μ Lから約2.0 μ L、約2.0 μ Lから約2.1 μ L、約2.1 μ Lから約2.2 μ L、約2.2 μ Lから約2.3 μ L、約2.3 μ Lから約2.4 μ L、約2.4 μ Lから約2.5 μ L、約2.5 μ Lから約2.6 μ L、約2.6 μ Lから約2.7 μ L、約2.7 μ Lから約2.8 μ L、約2.8 μ Lから約2.9 μ L、約2.9 μ Lから約3.0 μ L、約3.0 μ Lから約3.1 μ L、約3.1 μ Lから約3.2 μ L、約3.2 μ Lから約3.3 μ L、約3.3 μ Lから約3.4 μ L、約3.4 μ Lから約3.5 μ L、約3.5 μ Lから約3.6 μ L、約3.6 μ Lから約3.7 μ L、約3.7 μ Lから約3.8 μ L、約3.8 μ Lから約3.9 μ L、約3.9 μ Lから約4.0 μ L、約4.0 μ Lから約4.1 μ L、約4.1 μ Lから約4.2 μ L、約4.2 μ Lから約4.3 μ L、約4.3 μ Lから約4.4 μ L、約4.4 μ Lから約4.5 μ L、約4.5 μ Lから約4.6 μ L、約4.6 μ Lから約4.7 μ L、約4.7 μ Lから約4.8 μ L、約4.8 μ Lから約4.9 μ L、約4.9 μ Lから約5.0 μ L、または約5.0 μ Lよりも大きい。

10

20

【0075】

特定の実施形態において、マイクロ流体チップの反応チャンバの少なくとも1つまたはすべては、試料の1つ以上の成分との特異的な相互作用および/または反応が可能な試薬が予めロードされている。一局面において、試薬は、たとえば、試料中の1つ以上の標的核酸との特異的ハイブリダイゼーションが可能なポリヌクレオチドなどの核酸を含む。

30

【0076】

いくつかの実施形態において、主要路の任意のV字形部分(谷を含むV字形部分)の体積と、当該谷に接続された反応チャンバの体積との比は約1.2から約1.8であり、特定の実施形態において、当該比は約1.2未満、約1.2から約1.3、約1.3から約1.4、約1.4から約1.5、約1.5から約1.6、約1.6から約1.7、約1.7から約1.8、または約1.8よりも大きい。

【0077】

いくつかの実施形態において、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は約0.2から約1であり、特定の実施形態において、当該比は約0.2未満、約0.2から約0.3、約0.3から約0.4、約0.4から約0.5、約0.5から約0.6、約0.6から約0.7、約0.7から約0.8、約0.8から約0.9、または約0.9から約1.0である。一局面において、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比が約1.0未満である場合、ピークの断面積は谷の断面積よりも小さい。

40

【0078】

上記の実施形態のいずれかにおいて、マイクロ流体チップは約5個から約100個の反応チャンバを含み得る。いくつかの実施形態において、マイクロ流体チップは、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の反応チャンバを含む。いくつかの実施形態において、マイクロ流体チップは、少なくとも約10個、約20個、約40個、約60個、約80個、約100個、約120個、約140個、約160個、約180個、または約200個の反応チャンバを含む。いくつかの実施形態にお

50

いて、マイクロ流体チップは約200個から約400個、約400個から約600個、約600個から約800個、約800個から約1000個、または約1000個よりも多い反応チャンバを含む。マイクロ流体チップ上の反応チャンバは1つ以上のグループに分割され得る。たとえば、同一の主要路接続される反応チャンバはともにグループ分けされ得、マイクロ流体チップは1つよりも多い主要路を含み得、各主要路は別個のグループの反応チャンバに接続される。一局面において、異なるグループの反応チャンバは接続されない。

【0079】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ボトムプレートの厚みは、約0.05mm未満、約0.05mmから約1mm、約1mmから約5mm、または約5mmよりも大きくてもよい。10
 特定の実施形態において、ボトムプレートの厚みは、約0.05mmから約0.1mm、約0.1mmから約0.2mm、約0.2mmから約0.3mm、約0.3mmから約0.4mm、約0.4mmから約0.5mm、約0.5mmから約0.6mm、約0.6mmから約0.7mm、約0.7mmから約0.8mm、約0.8mmから約0.9mm、約0.9mmから約1.0mm、約1.0mmから約1.5mm、約1.5mmから約2.0mm、約2.0mmから約2.5mm、約2.5mmから約3.0mm、約3.0mmから約3.5mm、約3.5mmから約4.0mm、約4.0mmから約4.5mm、約4.5mmから約5.0mm、または約5.0mmよりも大きい。上記の実施形態のいずれかにおいて、カバープレートの厚みは、約0.05mm未満、約0.05mm
 から約1mm、または約1mmよりも大きくてもよい。特定の実施形態において、カバー
 プレートの厚みは、約0.05mmから約0.1mm、約0.1mmから約0.2mm、
 約0.2mmから約0.3mm、約0.3mmから約0.4mm、約0.4mmから約0.5mm、約0.5mmから約0.6mm、約0.6mmから約0.7mm、約0.7mmから約0.8mm、約0.8mmから約0.9mm、約0.9mmから約1.0mm、約1.0mmから約1.5mm、約1.5mmから約2.0mm、約2.0mmから約2.5mm、約2.5mmから約3.0mm、約3.0mmから約3.5mm、約3.5mmから約4.0mm、約4.0mmから約4.5mm、約4.5mmから約5.0mm、または約5.0mmよりも大きい。20

【0080】

上記の実施形態のいずれかにおいて、カバープレートまたはボトムプレートまたは両方の厚みは最適化され得る。一局面において、厚みが薄すぎる場合、カバープレートおよびボトムプレートを容易に変形させることができる。別の局面において、経路の深さはこれらのプレートの厚みに影響され得、シートが厚過ぎる場合、チップ内にロード可能な試薬の量が減少する。さらに別の局面において、厚みが厚過ぎる場合、チップ材料の熱的特性が影響され、これはチップの不均一な加熱の原因となり、ゆえに試験結果に影響し得る。30

【0081】

上記の実施形態のいずれかにおいて、主要路、反応チャンバ、連結路、および/または緩衝チャンバの深さは、約40μm未満、約40μmから約800μm、約800μmから約1mm、約1mmから約1.5mm、約1.5mmから約2mm、約2mmから約2.5mm、約2.5mmから約3mm、約3mmから約3.5mm、約3.5mmから約4mm、または約4mmよりも大きくてもよい。特定の実施形態において、主要路、反応
 チャンバ、連結路、および/または緩衝チャンバの深さは、約40μmから約50μm、
 約50μmから約60μm、約60μmから約70μm、約70μmから約80μm、約
 80μmから約90μm、約90μmから約100μm、約100μmから約150μm
 、約150μmから約200μm、約200μmから約250μm、約250μmから約
 300μm、約300μmから約350μm、約350μmから約400μm、約400
 μmから約450μm、約450μmから約500μm、約500μmから約550μm
 、約550μmから約600μm、約600μmから約650μm、約650μmから約
 700μm、約700μmから約750μm、または約750μmから約800μmである。特定の実施形態において、主要路、反応チャンバ、連結路、および/または緩衝チャ 40
 50

ンバの深さは、約800 μ mから約900 μ m、約900 μ mから約1.0mm、約1.0mmから約1.1mm、約1.1mmから約1.2mm、約1.2mmから約1.3mm、約1.3mmから約1.4mm、約1.4mmから約1.5mm、約1.5mmから約1.6mm、約1.6mmから約1.7mm、約1.7mmから約1.8mm、約1.8mmから約1.9mm、約1.9mmから約2.0mm、約2.1mmから約2.2mm、約2.2mmから約2.3mm、約2.3mmから約2.4mm、約2.4mmから約2.5mm、約2.5mmから約2.6mm、約2.6mmから約2.7mm、約2.7mmから約2.8mm、約2.8mmから約2.9mm、約2.9mmから約3.0mm、約3.1mmから約3.2mm、約3.2mmから約3.3mm、約3.3mmから約3.4mm、約3.4mmから約3.5mm、約3.5mmから約3.6mm、約3.6mmから約3.7mm、約3.7mmから約3.8mm、約3.8mmから約3.9mm、約3.9mmから約4.0mmである。

【0082】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ボトムプレートの試料入口（たとえば試料注入孔）は、たとえば、円形または丸形のオリフィスなどの、豆オリフィス（bean orifice）であってもよい。他の実施形態において、オリフィスは正方形、矩形、円形、楕円形、長円形、または他の不規則形状であってもよい。一局面において、オリフィスのサイズは、オペレータが標準的な先端を用いて試料を試料注入孔に直接注入することができるように、生物学的アッセイにおける標準的な先端ヘッドの寸法と一致する。一局面において、試料注入孔の設計によって、マイクロ流体チップの製造および/または使用が容易になる。

【0083】

上記の実施形態のいずれかにおいて、貫通孔の内縁に位置決めノッチが設けられてもよく、これは一局面において、試料が遠心力によって反応チャンバ内に分布される時にチップを固定する役割を果たす。別の局面において、チップが器具内で分析のために用いられる場合、位置決めノッチは反応チャンバの各々を位置決めし、したがって識別する際に役割を果たす。

【0084】

上記の実施形態のいずれかにおいて、両面接着テープを用いてボトムプレートとカバープレートとを堅固に接合してもよい。一局面において、両面接着テープは所望の接着強度および従来の加熱温度に対する耐性を有し、チップ内の反応の特異性に大きな悪影響を及ぼさない。

【0085】

一般に、ポリマーマイクロ流体チップは、熱プレスおよび/またはレーザー溶接を用いて、ボトムプレートおよびカバープレートの表面を加熱および溶融することによって両プレートを接合することによって製造され得る。しかし、熱プレスおよびレーザー溶接は比較的高価である。チップの底に予めロードされた試料の場合、レーザー溶接および熱プレスの処理は、予めロードされた試料の生物活性および/または化学的性質に悪影響を及ぼし得る。加えて、これら2つの処理方法はマイクロ流路の形状に影響を及ぼし得、さらには経路閉塞またはチップ漏れの原因ともなり得る。

【0086】

本開示では、一局面において、両面接着テープは、生物学的アッセイにおけるさまざまな加熱条件に耐えるのに十分な接着強度および能力を有する。一局面において、両面接着テープはさまざまな加熱条件におけるチップ漏れを防止し、したがってチップ漏れによる試験の失敗または環境汚染を防止する。

【0087】

本開示では、一局面において、両面接着テープは適切な生体適合性を有し、包埋試料を含む試験試料の生物活性および化学的性質を維持し得る。別の局面において、両面接着テープは、チップ内の反応の特異性を含むチップ内の反応に大きなまたは悪い影響を及ぼさない。

【0088】

本開示では、一局面において、両面接着テープは、本開示における検出手段と適合性のある光学的性質を有する。たとえば、通過する蛍光を検出するために蛍光検出を用いる場合、両面接着テープは、反応チャンバから発せられた蛍光に対して十分な光透過率を有する。別の局面において、蛍光を反射によって検出する場合、両面接着テープの蛍光バックグラウンドは、反応チャンバから発せられた蛍光の高感度検出を可能にするように検出波長において十分低い。

【0089】

一局面において、開示のチップは、封止するために粘性封止膜を用いる。他の局面において、チップは、チップ内に最初にロードされた試料を封止するために、二次的なローディングによって鉱油またはシリコン油を用いて封止されてもよい。鉱油またはシリコン油を用いる場合と比較して、チップを封止するために粘性封止膜を用いると二次的なローディングが回避され、オペレータに対する負担が軽減される。

10

【0090】

一局面において、本開示のマイクロ流体チップを用いて、オペレータは、たとえばチップ生産時に、異なる反応チャンバ内に異なる物質を予めロードすることができる。ゆえに、本開示は、核酸増幅反応、生化学反応（たとえば酵素触媒反応）、および免疫反応を含む、同一のチップ上の（または同じ設計のチップ上の）さまざまな形態の検出を可能にする。別の局面において、本開示は、同一のチッププラットフォーム上の複数のアプリケーションが実行され得るように、同一の反応において異なる物質の検出を可能にする。たとえば、（突然変異遺伝子または病原微生物の遺伝子などの）チップ上の核酸増幅反応によって試料中の特定の核酸フラグメントを検出するために、試験試料中の異なる核酸フラグメントとの特異的な生化学反応に必要なプライマおよび補助成分が、異なる反応チャンバ内に予めロードされてもよい。別の例では、（グルコースまたはトリグリセリドなどの）チップ上の生化学反応によって試料中の特異物質または成分を検出するために、試験試料中の標的物質または成分との特異的な生化学反応に必要な試薬が、異なる反応チャンバ内に予めロードされてもよい。さらに別の例では、（特異的抗原または抗体などの）チップ上の免疫反応によって試料中の特異成分を検出するために、標的物質または成分との特異的な免疫反応に必要な試薬が、異なる反応チャンバ内の試験試料に予めロードされてもよい。

20

【0091】

上記の実施形態のいずれかにおいて、マイクロ流体チップは、反応時にリアルタイム検出のために用いられてもよいし、または、たとえば、蛍光、濁度、色、検出機器、もしくは裸眼による直接観察によって、反応後に検出されてもよい。

30

【0092】

本開示全体にわたって、同様の参照番号は同様の部分を示すために用いられる。本開示は図面に関連してさらに説明される。しかし、本開示は以下の例に限定されない。

【0093】

図1は、本開示の一局面に係るマルチインデックス検出マイクロ流体チップ（96個の孔）の鳥瞰図である。図2は本開示の一局面に係るマイクロ流体チップの断面図である。本開示のマイクロ流体チップは、ボトムプレート1と、ボトムプレート1と一致してボトムプレートを1封止するカバープレート2とを含む。ボトムプレートおよび/またはカバープレートの構成要素は、所望の接着強度および従来の加熱温度に対する耐性を有し、かつチップ内の反応の特異性に大きな悪影響を及ぼさない両面接着テープを用いて堅固に接合され得る。マイクロ流体チップの中心に貫通孔3が設けられており、貫通孔3の内縁に位置決めノッチ8が設けられている。貫通孔3および位置決めノッチ8は、遠心分離時にチップを固定する役割を果たす。一局面において、貫通孔3および位置決めノッチ8はチップを固定し、同時にチップ上の反応チャンバをイヤマークする基準位置として用いられるため、試料を反応チャンバ内に均一に分布させるプロセスを完了させるのに1つの遠心分離機のみで済む。ボトムプレート1上に波形の主要路4が設けられており、主要路4の一端は試料注入孔9に接続し、主要路4の他端は排出孔10に接続する。試料注入孔の形

40

50

状は、生物学的アッセイに用いられる標準的な従来のプラスチック先端ヘッドと一致するように設計され得る。たとえば、必要な試料体積が約20から約200マイクロリットルである場合、試料注入孔9の直径は約0.75mmから約0.9mmであってもよい。いくつかの実施形態において、試料注入孔9の直径は約0.75mmから約0.80mm、約0.80mmから約0.85mm、または約0.85mmから約0.90mmである。

【0094】

図1に示されるように、波形の主要路4は、連結路5によって反応チャンバ6に接続する。一局面において、反応チャンバ6は貫通孔3の遠位に位置決めされ、連結路5と反応チャンバ6との接合部は、マイクロ流体チップの中心と反応チャンバ6とを接続する直線内に位置する。したがって、主要路4内にロードされる試料（たとえば液体試料）は、チップが回転すると遠心力によって連結路5を介して反応チャンバ6内に分布され得る。

10

【0095】

一実施形態において、図1に示されるように、波形の主要路4はボトムプレート1上に2つの円を形成する。この例では、連結路5の各々の内部に緩衝チャンバ7がある。したがって、緩衝チャンバは、主要路の谷の各々をその対応の反応チャンバに接続し、チップが遠心分離を受けて試料が主要路から反応チャンバ内に分布されると、試料用の緩衝液リザーバとして働く。緩衝チャンバを有さないチップと比較すると、図1に示されるような連結路5内の緩衝チャンバ7は、とりわけ3つの主要な機能を果たす。

【0096】

第1に、緩衝チャンバは、試料が主要路内にロードされて遠心分離を受けると、マイクロ流体チップの反応チャンバが試料で充填されることを保証する。

20

【0097】

図3に示される例として、緩衝チャンバ7がなく、各反応チャンバ6の体積が主要路のV字形部分の体積と同一である場合、反応チャンバのいくつかは遠心分離後に試料で完全に充填されない場合がある。この理由は、試料が主要路内にロードされて経路のV字形部分内に分布されると、V字形部分の各々は同じ量の試料を有さない場合があるためである。ゆえに、遠心分離後、反応チャンバ内に集められる試料の量は、すべての反応チャンバについて均一でない場合がある。反応チャンバのいくつかは図3(a)に示されるように試料で完全に充填されず、他のチャンバは図3(b)に示されるように試料で完全に充填され、さらに他のチャンバは、図3(c)に示されるように試料で過充填され、試料が連結路内に、および/または主要路のV字形部分内に溢れ出る。したがって、反応チャンバ内の試料量の一貫性のない分布は反応チャンバ内の反応結果に影響し、試験結果の精度に直接影響を及ぼす。別の局面において、(たとえば図3(c)に示されるように)主要路のV字形部分内の残留試料によって、反応チャンバ内の反応生成物が隣接する反応チャンバに拡散し、相互汚染を引起し得る。

30

【0098】

一局面において、主要路のV字形部分内の試料は反応チャンバに分布され、遠心分離後に緩衝チャンバの体積の約2/3を充填する。この場合、遠心分離後の試料の不均一な分布は緩衝チャンバ内の試料の量にしか反映されず、これによって反応チャンバは、図4(a)~図4(c)に示されるように、同じ量の試料で均一に完全に充填されることが保証される。

40

【0099】

第2に、緩衝チャンバは、反応チャンバが反応時に加熱されたとしても、反応チャンバが試料(または反応混合物)で完全に充填されることを保証する。

【0100】

例として、緩衝チャンバ7がない場合、試料または反応混合物が遠心分離後に反応チャンバ内に均一に分布されないとしても、試料または反応混合物は、反応を起こすために一定温度まで加熱される必要があり得る。加熱時の液体の蒸発は、反応チャンバ内の液体体積の減少、および試薬濃度の変化をもたらす得る。試薬濃度のそれらの変化は典型的に、すべての反応チャンバについて均一でない。試薬濃度の変化、および反応チャンバ内の液

50

液体量の減少は、試験結果の精度に影響する。

【0101】

したがって、一局面における緩衝チャンバは連結路に直接接続され、緩衝チャンバ内の液体が反応チャンバ内の液体量の損失を補償することによって、反応チャンバが反応全体にわたって完全に充填されることが維持される。

【0102】

第3に、一局面における緩衝チャンバは、各反応チャンバ内の反応生成物が、隣接する反応チャンバに拡散して相互汚染を引き起こすことを防止する。

【0103】

典型的に、試料が遠心分離を介して反応チャンバに分布されると、試料の液膜は連結路の内面上に残る。2つの隣接する反応チャンバが連結路によって接続され、連結路のみによって分離される場合は、各反応チャンバの反応生成物は液膜を介して隣接するチャンバ内に拡散し、相互汚染につながる可能性がある。

【0104】

一局面において、本開示は、連結路内の緩衝チャンバを、相互汚染を回避するように設計する。典型的に、試薬、標的分子、および反応生成物は高濃度から低濃度に拡散する。たとえば、反応生成物（たとえば核酸増幅反応からの増幅生成物）が反応チャンバから拡散すると、それらはまず緩衝チャンバ内に拡散し、拡散した生成物の濃度が劇的に低下する。そのため、緩衝チャンバ内の反応生成物は、連結路内に、主要路内に、および/または隣接する反応チャンバ内にさらに拡散する可能性が低くなる。したがって、本開示は拡散した生成物が連結路に広がる機会を減少させ、したがって試験結果の精度を向上させる。

【0105】

図5は、本開示の一局面に係る、マルチインデックス検出のためのマイクロ流体チップの鳥瞰図である。この例では、ボトムプレート内に4つの波形の主要路4があり、これら4つの主要路が円を形成する。さらに、各主要路4の端は試料注入孔9に接続し、他端は排出孔10に接続する。したがって、このチップ上の反応チャンバは4つのグループにグループ分けされ得、各グループのメンバーは同一の主要路に接続される。この例では、各主要路4に接続する反応チャンバ6の各々に、異なる物質が予めロードされてもよい。一局面において、異なる物質は、たとえば核酸増幅反応などの同じ形態のアッセイを用いて検出され得る。別の局面において、異なる物質は、たとえば核酸増幅反応などの同じ形態のアッセイを用いて1つ以上の標的を検出するための反応に関与し得る。ある実施形態において、反応チャンバに、試験試料の異なる核酸フラグメントと特異的な生化学反応を生成するプライマおよび補助成分が予めロードされてもよい。試料を遠心分離すること、および複数の試料の核酸増幅反応によって、同一のチップ上の同一の反応フォーマット（たとえば同一のPCR周期）を用いて、当該チップを用いて複数の試験試料中の1つ以上の核酸フラグメントを検出することができる。一局面において、本開示は、同一の試料中の複数の標的の同時検出を可能にする。たとえば、同一の試料が4つのアリコートに分割され得、各アリコートは図5の4つの主要路のうちの1つの内部にロードされ、各グループの反応チャンバは、試料中の異なる標的分子を検出するための試薬を含有する。一局面において、本開示は、異なる試料中の同一の標的の同時検出を可能にする。たとえば、4つの異なる試料の各々が図5の4つの主要路のうちの1つの内部にロードされ得、4つのグループの反応チャンバは、同一の標的を検出するための同一の試薬を含有する。一局面において、本開示は、試料中の同一の標的の異なるパラメータの同時検出を可能にする。たとえば、同一の試料が4つのアリコートに分割され得、各アリコートは図5の4つの主要路のうちの1つの内部にロードされ、各グループの反応チャンバは、試料中の同一の標的の異なるパラメータを検出するための試薬を含有する。

【0106】

図6は、本開示の別の局面に係る、マルチインデックス検出のためのマイクロ流体チップの鳥瞰図である。この例では、波形の主要路4は円を形成する。一局面において、主要

10

20

30

40

50

路4において、ピークにおける断面積は谷における断面積よりも小さい。谷における断面積に対するピークにおける断面積の比は異なり得、当該比は試料の均一な分布を容易にするように、かつ相互汚染を回避するように選択され得る。いくつかの実施形態において、主要路のV字形部分における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との好ましい比は約0.2から約1である。特定の実施形態において、図7および図8に実験的に証明されているように、当該比が約0.2未満である場合、主要路の一連のV字形部分における抵抗が大きいため、主要路内に試料を追加し、その後、試料を反応チャンバ内に分布させることが困難である。別の局面において、谷の断面積はピークの断面積よりも幅広であるため、気泡が容易に生成されて試料の不均一な分布に繋がる。加えて、谷における断面積に対するピークにおける断面積の比が1よりも大きい場合、遠心分離によって試料が各反応チャンバに不均一に分布される可能性が高くなる。実験検証の結果を以下に説明する。

10

【0107】

図7は、試料注入後（左パネル）および遠心分離後（右パネル）の染色試料の分布を示す。この図では、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は0.3:1である。

【0108】

図8は、試料注入後（左パネル）および遠心分離後（右パネル）の染色試料の分布を示す。この図では、主要路における最も幅狭の断面積と最も幅広の断面積との比は0.2:1である。

20

【0109】

図7では、注入プロセス時に気泡がなく、試料は遠心分離後にすべての反応チャンバ内に均一に分布される。対照的に、図8では、主要路のいくつかのV字形部分に気泡が発生しており、試料は遠心分離後に反応チャンバに均一に分布されないことが明らかに観察され得る。

【0110】

CN 102369443 Aは遠心注入チップを開示しており、すなわち、チップの中心保管部上の液体は、試料を追加するための中心保管部の周りの孔に偏心して輸送される。CN 102369443 Aの主要路の設計は、ピークおよび谷が同一幅を有することであり、この設計は液体の均一性問題を解決することができない。つまり、各試料孔に追加される試料の量は等しくない。加えて、ピークが谷よりも幅広の設計では、試料を追加するプロセス時に主要路内に気泡が発生する。さらに、CN 102369443 Aは、過剰な溶液をロードするために無駄なチャンバを追加する。この設計は、試料孔の各々の内部に分布される試料の量の一貫性を達成し得るが、反応時に試料が試料孔を一貫して充填することを保証し得ない。加えて、この設計はマイクロ流路の内面上の表面改質、すなわち、試料追加孔に接続される分岐流路の内面の親水性処理、および、残りの溶液を集める無駄なチャンバに接続される分岐流路の内面における疎水性処理を必要とする。これらの工程はすべて、製造プロセスの複雑度および処理の困難度を増加させ、処理コストを増大させる。

30

【0111】

ある実施形態において、試料入口は、約0.05mmから約1mmの厚み範囲を有するボトムプレート1において設定される。いくつかの実施形態において、試料入口の直径は約0.75mmから約0.9mmであり、生物学的実験における標準的な200マイクロリットル先端ヘッドを用いて、ローディング時に経路から試料が漏れ出ることなく、試料を試料入口に追加することができる。図9に示されるように、マイクロピペッタ先端の直径は0.75mmであり、先端から1mmの断面の直径は0.9mmである。したがって、この例では、試料入口孔の直径が0.75mmよりも小さい場合、マイクロピペッタ先端を試料入口孔に挿入することができない。別の局面において、試料入口孔の直径が0.9mmよりも大きい場合、先端と試料入口孔の側壁との間に隙間があり、試料注入のプロセス時に試料漏れを引起こすことになる。したがって、いくつかの実施形態において、試料入口のサイズの最適範囲は約0.75mmから約0.9mmである。試料入口孔の直径

40

50

が0.75mmである場合、図9(a)に示されるように、マイクロピペット先端を試料入口孔に挿入することができず、試料漏れが生じる。試料入口孔の直径が0.9mmである場合、先端ヘッドを試料入口に完全に挿入しなければならないため、先端がチップの底に触れて試料のローディングを阻止してしまう。これによって、図9(b)に示されるように、経路が容易に閉塞されて試料の追加が困難になり得る。一局面において、試料入口の直径は約0.8mmである。この場合、図9(c)に示されるように、先端ヘッドを挿入した後に先端の端とチップの底との間に隙間があるため、妨害はなく試料の正確なローディングが可能になる。これらの状況下で、試料を便利に、正確に、かつ漏れなしで、ピペットからチップの主要路4に追加することができる。

【0112】

マイクロ流体チップは任意の好適な材料を含み得る。一例では、マイクロ流体チップは、シリコン、プラスチック、ガラス、セラミック、ゴム、金属、ポリマー、紙、およびそれらの組合せからなる群から選択される材料を含む。一局面において、マイクロ流体チップは射出成形される。別の局面において、プラスチックは、ポリカーボネート、メチルメタクリレート、ポリスチレン、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン(ABS)、ポリエチレンおよびポリプロピレンからなる群から選択される。さらに別の例では、マイクロ流体チップはガラスを含む。一局面において、マイクロ流体チップは、糊付け、ダイシング/カッティング、スライシング、陽極接合、超音波溶接、およびそれらの組合せからなる群から選択される方法によって製作される。

【0113】

一局面において、本開示は製造品に向けられ、当該製造品は、a)パッケージング材料；b)本明細書に開示されるマイクロ流体チップ；随意に、c)たとえば分析物をアッセイするための、当該物品がアッセイ用であることを示す標識；および随意に、d)たとえば製造品をアッセイのために用いるための指示を含む。

【0114】

本開示は、本明細書に開示されるマイクロ流体チップまたはアッセイデバイスを含むキットを含む。たとえば、病状もしくは病気(たとえば癌)を診断するための、もしくは当該診断を助けるための、または病状もしくは病気をモニタするためのキットが含まれる。一実施形態において、キットは、たとえば病状または病気と関連付けられるバイオマーカなどの1つ以上の分析物を検出するための1つ以上の試薬を含む。試薬は、生体試料中のバイオマーカに対応するポリペプチドもしくはポリペプチドをコード化するmRNAを検出可能な標識付けられた成分または薬剤と、試料中のポリペプチドまたはmRNA(たとえば、ポリペプチドまたはポリペプチドをコード化するDNAまたはmRNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブに結合する抗体)の欠如、存在、および/または量を判定するための手段とを含む。バイオマーカに対応するポリペプチドと結合するための好適な試薬には、抗体、抗体誘導体、抗体フラグメントなどが挙げられる。核酸と結合するための好適な試薬(たとえばゲノムDNA、mRNA、スプライスされたmRNA、cDNAなど)は相補的核酸を含む。一実施形態において、キットは参照試料を含む。一局面において、参照試料を用いて、試験中の試料から得られた結果が比較される。キットはさらに、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定化剤などの他の成分を含み得る。キットはさらに、検出可能な標識を検出するのに必要な成分(たとえば酵素または基質)を含み得る。

【0115】

キットの各成分は個別の容器内に封入されてもよく、さまざまな容器のすべてが、キットを用いて行なわれるアッセイの結果を解釈するための指示とともに、単一のパッケージ内であってもよい。

【0116】

一局面において、本明細書に開示される製造品またはキットは、被験者の病状または病気を診断するために、病状もしくは病気を発症している被験者のリスクを査定するために、および/または、たとえば、療法による被験者の治療に続いて、被験者の病状または病気の進行を評価するために用いられる。一局面において、製造品は、病状または病気を発

10

20

30

40

50

症している、またはを発症している疑いのある被験者から得られた試料をアッセイするために用いられる。

【 0 1 1 7 】

C . マイクロ流体チップの使用

本マイクロ流体チップは、特に少量の反応体積を伴うアッセイについて、アッセイ精度、再現性、および/または感度を向上させるために任意の好適なアッセイにおいて用いられ得る。たとえば、マイクロ流体チップは、たとえば核酸などのさまざまな部分同士の間
の相互作用、タンパク質を伴う免疫反応、タンパク質と核酸との相互作用、リガンド-レセプタ相互作用、ならびに小分子およびタンパク質または核酸相互作用等をアッセイする
際に用いられ得る。

10

【 0 1 1 8 】

本マイクロ流体チップは、たとえば、細胞、細胞小器官、ウイルス、分子、およびそれらの凝集体または複合体などの、任意の分析物をアッセイするために用いられ得る。例示的な細胞として、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、細菌細胞、組換え細胞、および培養細胞が挙げられる。動物、植物、真菌、細菌細胞は、動物界、植物界、菌界または細菌界の任意の属または亜属に由来し得る。繊毛虫類、細胞性粘菌類、鞭毛虫類および微孢子虫類の任意の属または亜属に由来する細胞も、本方法によってアッセイ可能である。ニワトリなどの鳥類、魚などの脊椎動物、ならびにマウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、雌ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サルおよび他の非ヒト霊長類、ならびにヒトなどの哺乳動物に由来する細胞も、本方法によってアッセイ可能である。

20

【 0 1 1 9 】

動物細胞について、特定の組織または器官に由来する細胞がアッセイ可能である。たとえば、結合、上皮、筋または神経組織細胞がアッセイ可能である。同様に、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆のう、胃、腸、精巢、卵巢、子宮、直腸、神経系、腺、内部血管等の内部動物器官に由来する細胞もアッセイ可能である。さらに、任意の植物、酵母などの真菌、真性細菌または古細菌などの細菌に由来する細胞もアッセイ可能である。動物、植物、真菌もしくは細菌細胞などの任意の真核または原核源に由来する組換え細胞もアッセイ可能である。血液、尿、唾液、骨髄、精液または他の腹水、およびたとえば血清または血漿などのそれらの亜分画などの体液もアッセイ可能である。

30

【 0 1 2 0 】

例示的な細胞小器官には、核、ミトコンドリア、葉緑体、リボソーム、ER、ゴルジ体、リソソーム、プロテアソーム、分泌小胞、空胞およびマイクロソームが挙げられる。例示的な分子には、無機分子、有機分子およびそれらの複合体が挙げられる。例示的な有機分子には、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ビタミン、単糖、オリゴ糖、炭水化物、脂質、およびそれらの複合体が挙げられる。

【 0 1 2 1 】

任意のアミノ酸が本マイクロ流体チップによってアッセイ可能である。たとえば、D-およびL-アミノ酸がアッセイ可能である。任意のタンパク質またはペプチドが本マイクロ流体チップによってアッセイ可能である。たとえば、酵素、イオンチャネルおよびポンプなどの輸送タンパク質、栄養素または保管タンパク質、アクチンおよびミオシンなどの収縮または運動タンパク質、構造タンパク質、抗体、ホルモンおよび増殖因子などの防御タンパク質または調節タンパク質がアッセイ可能である。タンパク質性またはペプチド性抗原もアッセイ可能である。

40

【 0 1 2 2 】

任意のヌクレオシドが本マイクロ流体チップによってアッセイ可能である。そのようなヌクレオシドの例には、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン、およびウリジンが挙げられる。任意のヌクレオチドが本開示に従ってアッセイ可能である。そのようなヌクレオチドの例には、AMP、GMP、CMP、UMP、ADP、GDP、CDP、UD

50

P、ATP、GTP、CTP、UTP、dAMP、dGMP、dCMP、dTMP、dADP、dGDP、dCDP、dTDP、dATP、dGTP、dCTPおよびdTTPが挙げられる。一本鎖、二本鎖および三本鎖の核酸を含む任意の核酸が本マイクロ流体チップによってアッセイ可能である。そのような核酸の例には、A -、B - または Z - 型 DNA などの DNA、ならびに mRNA、miRNA、piRNA、tRNA および rRNA などの RNA が挙げられる。

【0123】

任意のビタミンが本マイクロ流体チップによってアッセイ可能である。たとえば、チアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、ピリドキシン、ビオチン、葉酸、ビタミン B 1 2 およびアスコルビン酸などの水溶性ビタミンがアッセイ可能である。同様に、

10

【0124】

D - 単糖であるか L - 単糖であるかにかかわらず、かつアルドースであるかケトースであるかにかかわらず、任意の単糖が本マイクロ流体チップによってアッセイ可能である。単糖の例には、グリセルアルデヒドなどの三炭糖、エリトロースおよびトレオースなどの四炭糖、リボース、アラビノース、キシロース、リキソースおよびリブロースなどの五炭糖、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロースおよびフルクトースなどの六炭糖、ならびにセドヘブツロースなどの七炭糖が挙げられる。

20

【0125】

任意の脂質が本マイクロ流体チップによってアッセイ可能である。脂質の例には、トリステアリン、トリパルミチンおよびトリオレインなどのトリアシルグリセロール、ワックス、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールおよびカルジオリピンなどのホスホグリセド、スフィンゴミエリン、セレブロシドおよびガングリオシドなどのスフィンゴ脂質、コレステロールおよびスチグマステロールおよびステロール脂肪酸エステルなどのステロールが挙げられる。脂肪酸は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸およびリグノセリン酸などの飽和脂肪酸であってもよいし、または、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸およびアラキドン酸などの不飽和脂肪酸であってもよい。

30

【0126】

本マイクロ流体チップは任意の試料をアッセイするために用いられ得る。たとえば、本方法は哺乳動物試料をアッセイするために用いられ得る。例示的な哺乳動物には、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウサギ、モルモット、マウス、ヒト、ネコ、サル、イヌおよびブタが挙げられる。本マイクロ流体チップは、臨床試料をアッセイするためにも用いられ得る。例示的な臨床試料には、血清、血漿、全血、喀痰、脳脊髄液、羊水、尿、胃腸内容物、毛、唾液、汗、歯肉擦過物および生検からの組織が挙げられる。好ましくは、本マイクロ流体チップはヒト臨床試料をアッセイするために用いられる。

【0127】

任意の好適な試薬が本開示に従ってアッセイにおいて用いられ得る。一局面において、本開示において用いられる試薬は、試料中の分析物と特異的に結合するか相互作用する。例示的な試薬には、細胞、細胞小器官、ウイルス、分子、およびそれらの凝集体または複合体が挙げられる。一局面において、試薬は抗体または核酸である。

40

【0128】

本マイクロ流体チップは、たとえば、直接アッセイフォーマット、サンドイッチアッセイフォーマット、または競合アッセイフォーマットなどの、任意の好適なアッセイフォーマットで用いられ得る。一実施形態において、異なる複数の試薬が、単一の分析物をアッセイするために用いられる。別の実施形態では、異なる複数の試薬が、異なる複数の分析物をアッセイするために用いられる。さらに別の実施形態では、複数の試薬が反応チャン

50

バの内面に付着させられ、たとえば、1つ以上の試料中の1つ以上の分析物をアッセイするために用いられる。

【0129】

本マイクロ流体チップは、細胞、細胞小器官、ウイルス、分子、およびそれらの凝集体または複合体からなる群から選択される部分同士の間でのいずれかの相互作用を検出するために用いられ得る。たとえば、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA、DNA-タンパク質、RNA-タンパク質およびタンパク質-タンパク質等の相互作用などの、高分子間の相互作用が分析され得る。他の実施形態では、高分子-小分子または小分子-小分子の相互作用が本マイクロ流体チップを用いて検出または分析される。2つよりも多い部分同士の間での相互作用を含むより複雑な相互作用も、本開示に従って検出および/または分析可能である。DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA相互作用を検出する場合、接触させる、すなわちハイブリダイズさせる工程が、試料または試薬が本開示に従って反応体積に搬送された後、たとえば低、中または高ストリンジェンシー下などの好適な条件下で行なわれ得る。

10

【0130】

試験部分と複数の標的部分との相互作用は任意の好適な方法によって検出され得、本マイクロ流体チップは特定の検出方法に適するように作られ得る。たとえば、試験部分および/または標的部分は検出を容易にするように標識付けられ得る。任意の好適な標識が用いられ得る。例示的な標識には、放射性、蛍光、化学、酵素、発光およびFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）標識が挙げられる。発光標識は、化学発光標識または生物発光標識であり得る。標識は、試験部分のみに、標的部分のみに、または両方に、直接的にまたは間接的に付着させられるか共役させられ得る。読出は、正または負の信号であり得る。サンドイッチまたは競合フォーマットを含む任意の好適なアッセイフォーマットが用いられ得る。標識、PCR反応のプライマもしくはdNTP、または酵素を含む試料または試薬のいずれかが、本マイクロ流体チップを用いて搬送され得る。

20

【0131】

一実施形態において、本マイクロ流体チップは、試験部分と複数の遺伝子、遺伝子フラグメントまたはそれらのコード化製品同士の間での相互作用を検出するために用いられる。たとえば、複数の標的遺伝子、遺伝子フラグメントまたはそれらのコード化製品が生物学的経路に含まれ、同一または同様の生物学的機能を有するタンパク質の塩基に属し、細胞周期のある段階で発現し、細胞種類で発現し、組織種類で発現し、器官種類で発現し、発達段階で発現し、その発現および/または活性が病気もしくは疾患の種類もしくは段階で変わるタンパク質、またはその発現および/または活性が薬もしくは他の治療によって変わるタンパク質。

30

【0132】

本マイクロ流体チップは、単一の試験部分または物質と複数の標的部分との間の相互作用を検出する際に用いられ得る。好ましくは、本方法は高スループットモードにおいて、たとえば、複数の標的部分、および/または複数の試験部分もしくは物質同士の間での相互作用を検出する際に用いられる。複数の試験部分または物質と複数の標的部分との相互作用は、同時にまたは連続的に検出され得る。

40

【0133】

本開示のマイクロ流体チップは、核酸増幅反応、生化学反応、免疫反応などを含むがこれらに限定されないさまざまな用途および反応に用いられ得る。このプロセスの使用は、以下に説明されるように等温増幅反応の例によって例示される。

【0134】

細菌遺伝子および細菌検出のための等温増幅反応は、本開示のチッププラットフォーム、等温増幅キット、および等温増幅マイクロ流体チップ核酸分析器であるRTisochip（商標）と組合せることによって行なわれ得る。検出原理は等温増幅技術を利用することであり、反応は、鎖置換機能を有するポリメラーゼを用いることによって一定温度（たとえば65）で実行され得る。正の増幅の試料は、SYBR緑色を用いてリアルタイムで蛍光

50

を検出することによって、同様のリアルタイム蛍光一定S字状の増幅曲線を生成するため、それは一工程で標的遺伝子の増幅および検出を完了する。一局面において、本開示の特徴は等温増幅の方法をマイクロ流体チップ技術と組合せることであり、これによってさまざまな核酸標的配列の高スループット並列検出を同時に実行することができる。

【0135】

一実施形態において、各チップに24個の反応チャンバがあり、各反応チャンバは、特定の種類の核酸標的配列の増幅および検出のために用いられる1組のプライマを包埋および/または包含している。24個の反応チャンバのうちの2つに、正および負の対照試料として参照物質が包埋されており、24個の反応チャンバの残りには、22個の異なる標的核酸配列のための試薬が包埋されている。したがって、チップは、たとえば、各々が特定の細菌の株からの、22個の標的核酸配列を検出するために用いられ得る。

10

【0136】

まず、試験試料DNAを増幅試薬と混合してからチップに注入する。試料は、細菌感染などの病気または病状を発症している疑いのある患者または個人の喀痰、口腔スワブ、または血液からであってもよい。他の例では、試料は、血液、浸出液、尿、骨髓試料、腹水、骨盤洗浄液、胸水、髄液、リンパ液、血清、粘液、喀痰、唾液、精液、眼液、鼻腔の抽出物、喉頭もしくは性器スワブ、消化組織からの細胞懸濁液、糞便物質の抽出物、ならびに/または混合種類および/もしくは混合サイズの培養細胞を含み得る。DNAまたはRNAなどの核酸は、キャピタルバイオ コーポレーション社の汎用細菌DNA高速抽出キットであるCrystal Core(登録商標)を用いて、試料から抽出され得る。

20

【0137】

試料入口および/または排出口に残留溶液がある場合、残留溶液は吸取り紙で拭き取ってもよい。その後、封止膜を用いて試料入口および/または排出口を覆ってもよい。

【0138】

そして、試料をロードした後に、等温増幅マイクロ流体チップ核酸分析器であるRTisochip(商標)の内部にチップを配置し、増幅反応を完了させる。チップ内の各反応チャンバは同時に独立した等温増幅反応を受け、リアルタイム蛍光検出が等温増幅器具によって達成される。S字状の増幅曲線が反応チャンバ内に検出された場合は、反応チャンバに対応する検出インデックスは正である。

【0139】

ゆえに、本マイクロ流体チップおよび方法を用いて、被験者の多数の感染症または感染状態を検出することができる。病原性ウイルスとして、レトロウイルス科(たとえばHIV-1(HTLV-II, LAVまたはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIIとも称される)などのヒト免疫不全ウイルス);およびHIV-LPなどの他の分離菌;ピコルナウイルス科(たとえばポリオウイルス、A型肝炎ウイルス;エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス);カリシウイルス科(たとえば胃腸炎を引き起こす株);トガウイルス科(たとえばウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス);フラウイルス科(たとえばデング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス);コロナウイルス科(たとえばコロナウイルス);ラブドウイルス科(たとえば水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス);フィロウイルス科(たとえばエボラウイルス);パラミクソウイルス科(たとえばパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス);オルトミクソウイルス科(たとえばインフルエンザウイルス);ブンガウイルス科(たとえばハンタンウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス);アレナウイルス科(出血熱ウイルス);レオウイルス科(たとえばレオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス);ピマウイルス科;ヘパドナウイルス科(B型肝炎ウイルス);パルボウイルス科(パルボウイルス);パポバウイルス科(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス);アデノウイルス科(ほとんどのアデノウイルス);ヘルペスウイルス科(ヘルペス単純ウイルス(HSV)1および2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘルペスウイルス);ポックスウイルス科(痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス);およびイリドウイ

30

40

50

ルス科（たとえばアフリカブタ熱ウイルス）；C型肝炎ウイルス；ならびに分類不能ウイルス（たとえばデルタ肝炎の病原体（B型肝炎ウイルスの欠損サテライトと考えられる）；ノーウォークおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0140】

病原性細菌として、ヘリコバクターピロリ、ボレリア・ブルグドルフェリ、レジオネラ・ニューモフィリア、マイコバクテリア種（たとえば結核菌、M・アビウム、M・イントラセルラーレ、M・カンサイイ、M・ゴールドナエ）、黄色ブドウ球菌、淋菌、髄膜炎菌、リステリア・モノサイトゲネス、化膿レンサ球菌（A群レンサ球菌）、ストレプトコッカス・アガラクチア（B群レンサ球菌）、ストレプトコッカス（ビリダンス群）、大便レンサ球菌、ストレプトコッカス・ボビス、ストレプトコッカス（嫌気性種）、肺炎レンサ球菌、病原性カンピロバクター種、エンテロコッカス種、インフルエンザ菌、炭疽菌、ジフテリア菌、コリネバクテリウム種、ブタ丹毒菌、ウェルシュ菌、破傷風菌、エンテロバクター・アエロゲネス、肺炎桿菌、パストツレラ・ムルトシダ、バクテロイデス種、フゾバクテリウム・ヌクレアタム、大腸菌の病原株、ストレプトバシルス・モニリフォルミス、トレポネーマ・パリジウム、トレポネーマ・ベルテヌエ、レプトスピラ、およびアクチノミセス・イスラエリイが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0141】

感染性真菌として、クリプトコックス・ネオフォルマンس、ヒストプラズマ・カプスラタム、コッキディオイデス・イムミティス、プラストミケス・デルマティティディス、クラミディア・トラコマティス、カンディダ・アルビカンスが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0142】

感染性原虫として、たとえば熱帯熱マラリア原虫などのマラリア原虫種；たとえばクルーズトリパノソーマなどのトリパノソーマ類；およびトキソプラズマ・ゴンディが挙げられるが、これらに限定されない。

【0143】

本マイクロ流体チップは、たとえば、感染体を示す特異的な核酸配列のPCRによってそれらの遺伝物質を検出することによって、感染体を示すタンパク質、脂質、もしくは多糖を検出することによって、および/または感染体への宿主応答（たとえば感染体への宿主抗体）を検出することによって、上記の感染体の検出に好適である。

30

【0144】

アレルゲンとして、花粉、昆虫毒液、動物の鱗屑粉塵、真菌孢子および薬（たとえばペニシリン）が挙げられるが、これらに限定されない。天然の動物および植物アレルゲンの例として、以下の属：イヌ属（カニス・ファミリアリス）；デルマトファゴイデス属（たとえばコナヒョウダニ）；ネコ属（フェリス・ドメスティクス）；ブタクサ属（ブタクサ）；ドクムギ属（たとえばホソムギまたはネズミムギ）；スギ属（スギ）；アルテルナリア属（アルテルナリア・アルテルナータ）；ハンノキ；ハンノキ属（アルヌス・グルティノサ）；カバノキ属（ベツ標識コサ）；カシ属（クウエルクス・アルバ）；オリーブ属（オレア・エウロパ）；ヨモギ属（アルテミシア・ブルガリス）；オオバコ属（たとえばヘラオオバコ）；パリエタリア属（たとえばパリエタリア・オフィチナリスまたはパリエタリア・ユダイカ）；チャバネゴキブリ属（たとえばチャバネゴキブリ）；ミツバチ属（たとえばアピス・ムルティフロルム）；イトスギ属（たとえばクプレスス・セムベルピレンス、クプレスス・アリゾニカおよびクプレスス・マクロカルパ）；ビャクシン属（たとえばユニベルス・サピノイデス、ユニベルス・ビルギニアナ、ユニベルス・コムニスおよびユニベルス・アシエイ）；クロベ属（たとえばコノテガシワ）；ヒノキ属（たとえばヒノキ）；ゴキブリ属（たとえばワモンゴキブリ）；カモジグサ属（たとえばアグロピロン・レペンス）；ライムギ属（たとえばライムギ）；コムギ属（たとえばコムギ）；カモガヤ属（たとえばカモガヤ）；ウシノケグサ属（たとえばヒロハウシノケグサ）；イチゴツナギ属（たとえばナガハグサまたはボア・コンプレッサ）；カラスムギ属（たとえばマカラス

40

50

ムギ) ; シラゲガヤ属 (たとえばシラゲガヤ) ; ハルガヤ属 (たとえばハルガヤ) ; オオカニツリ属 (たとえばオオカニツリ) ; ヌカボ属 (たとえばコヌカグサ) ; アワガエリ属 (たとえばオオアワガエリ) ; クサヨシ属 (たとえばクサヨシ) ; スズメノヒエ属 (たとえばパスパルム・ノタツム) ; モロコシ属 (たとえばソルグム・ハレペンシス) ; ならびにスズメノチャヒキ属 (たとえばコスズメノチャヒキ) に特異的なタンパク質が挙げられる。抗体検出および分析のために、本方法における上述のアレルゲンからのエピトープを使用することも考えられる。この方法を用いて、宿主の体液内に生成された抗体などのアレルゲンに対する宿主応答がアッセイ可能である。本明細書に開示されるマイクロ流体チップは、宿主抗体の高感度なマルチプレックス検出に特に好適である。

【0145】

10

以下の実施形態は、本開示のさまざまな局面をさらに説明および例示することが意図されており、本開示の範囲をいずれの態様、形状、または形態においても、明示的にまたは非明示的に限定することを意図していない。

【0146】

実施形態1：マルチインデックス検出マイクロ流体チップであって、マイクロ流体チップは、ボトムプレートと、ボトムプレートと一致してボトムプレートを封止するカバープレートとを含み、このマイクロ流体チップの中心は貫通孔を有し、ボトムプレートは1つ以上の波形の主要路を有し、主要路の各々の一端はボトムプレート上の試料注入孔に接続し、他端はボトムプレート上の排出孔に接続し、主要路上の谷は貫通孔の方向から遠く、ピークは貫通孔の方向から近く、主要路上の任意の谷が連結路によって反応チャンバに接続し、連結路は緩衝チャンバを有することを特徴とする、マイクロ流体チップ。

20

【0147】

実施形態2：緩衝チャンバの体積は、反応チャンバの体積の約0.2～約0.8倍であることを特徴とする、実施形態1に記載のマイクロ流体チップ。

【0148】

実施形態3：連結路と反応チャンバとの接合部は、マイクロ流体チップの中心と反応チャンバとの接続線内に位置することを特徴とする、実施形態1または2に記載のマイクロ流体チップ。

【0149】

実施形態4：ボトムプレートにおいて、主要路は円の形に分布されていることを特徴とする、実施形態1～3のいずれか1つに記載のマイクロ流体チップ。

30

【0150】

実施形態5：ボトムプレートにおいて、1つ以上の主要路が1つ以上の円を形成することを特徴とする、実施形態1～4のいずれか1つに記載のマイクロ流体チップ。

【0151】

実施形態6：反応チャンバの体積は約0.1～約5 μ Lであり、主要路の任意のV字形部分の体積は、V字形部分に接続される反応チャンバの約1.2～約1.8倍であることを特徴とする、実施形態1～5のいずれか1つに記載のマイクロ流体チップ。

【0152】

実施形態7：主要路における最も幅狭の面積と最も幅広の面積との断面比は約0.2～約1であり、この比が約1未満である場合、ピークの断面は谷の断面よりも小さいことを特徴とする、実施形態1～6のいずれか1つに記載のマイクロ流体チップ。

40

【0153】

実施形態8：マイクロ流体チップは約5個～約100個の反応チャンバを含むことを特徴とする、実施形態1～7のいずれか1つに記載のマイクロ流体チップ。

【0154】

実施形態9：ボトムプレートの厚みおよびカバープレートの厚みは約0.05～約5mmであり、主要路の深さ、反応チャンバの深さ、連結路の深さ、および緩衝チャンバの深さは約40 μ m～約4mmであることを特徴とする、実施形態1～8のいずれか1つに記載のマイクロ流体チップ。

50

【 0 1 5 5 】

実施形態 10：ボトムプレートの試料注入孔は丸形であり、試料注入孔のサイズは標準的な先端ヘッドと一致しており、貫通孔の内縁に位置決めノッチが設けられていることを特徴とする、実施形態 1～9 のいずれか 1 つに記載のマイクロ流体チップ。

【 0 1 5 6 】

実施例 1

マルチプレックス遺伝子増幅のためのマイクロ流体チップおよび病原体の高速検出。

【 0 1 5 7 】

この例では、ミニディスク状のマイクロ流体チップ (PathoDisc) を開発し、1 つの試料中のマルチプレックス対象標的遺伝子の並列等温増幅を行なった。スマート温度制御モジュールおよび蛍光信号検出システムを備えたディスク動作器具を、結果を測定するように構成した。一局面において、高速核酸抽出キットと適切な等温増幅試薬とを組合せることによって、チップは、喀痰または気管支肺胞洗浄液などの臨床試料中の 13 種類の病原体を 2 時間未満で並列して検出することができた。マイクロ流体チップは、1 回のアッセイ実行において複数の標的の並列検出を実行可能であり、感染症 (たとえば重症肺炎) の診断におけるその適用が実証された。

10

【 0 1 5 8 】

チップ設計および製作。チップは、試料ローディングのための 1 つの主要な流路と、核酸増幅のための 24 個の反応ウェルとを有する。主要路は、各々が 1 つの反応ウェルに対応する 24 個の「V 字形」を有する。チップは抽出成形を用いて製作した。そして、特定のプローブを反応ウェル上にロードした。その後、チップをカバーで封入した。

20

【 0 1 5 9 】

実験セットアップ。一局面において、喀痰または気管支肺胞洗浄液試料を得てから検出結果を報告するまでの全実験時間は 2 時間以下であった。実験手順を図 10 に示す。

【 0 1 6 0 】

チップ設計および製作の確認。チップ製作を SEM および顕微鏡によって確認した。反応ウェルと経路との間に相互汚染は観察されなかった (図 11 (a) : マイクロ流路の SEM 画像)。図 11 (B) は、試料をロードした後の、24 個の反応ウェルを有するマイクロ流体チップ構造の写真である。高品質の写真を達成するために、試料をインクで色付けした。

30

【 0 1 6 1 】

チップの性能の評価。リアルタイム蛍光増幅曲線を用いて、PathoDisc の性能を参照調製物で試験した。特定のプローブが、検出された核酸と一致した場合、主要な曲線形状は「S」字状となり、そうでなければ直線となる。図 12 (a) は、1000 コピー/μL の Mt b (結核菌群) 調製物を用いる 12 反復試験結果を示し、試験結果が高度に再現可能であることを実証している。図 12 (b) は、試料中に Sp n 細菌が存在していたことを示す臨床試料の試験結果を示す。試料中に同時に存在している複数の細菌種から高濃度の核酸がある場合でも、分析物の性能は影響を受けなかった (図 12 (c))。この結果はさらに、試料を -20 で 11 ヶ月間保管した後、PathoDisc の分析感度が影響を受けなかったことを示す (図 12 (d))。

40

【 0 1 6 2 】

遺伝子シーケンシングによって検証された臨床試料検出。PathoDisc を用いて 140 個の臨床試料を試験し、遺伝子シーケンシングを用いて結果を確認した。結果を表 1 に示す。ゆえに、一局面において、ディスク状のマイクロ流体チップ (PathoDisc) は 1 つの試料中の高速マルチプレックス遺伝子検出に好適である。他の局面において、対応の器具および適切な等温増幅試薬と共に、チップは、1 mL の臨床試料 (喀痰または気管支肺胞洗浄液など) 中の 500 個の細菌を検出する能力と平行して、13 種類の細菌を 2 時間未満で検出可能である。

【 0 1 6 3 】

表 1 : 臨床試料の結果

50

【 0 1 6 4 】

【表 1】

	細菌種	略語	臨床感度	臨床特異性
1	肺炎レンサ球菌	Spn	5/6	99%
2	黄色ブドウ球菌	Sau	9/9	100%
3	大腸菌	Eco	1/1	100%
4	肺炎桿菌	Kpn	4/4	100%
5	緑膿菌	Pae	11/11	98%
6	アシネトバクター・パウマニ	Aba	17/19	100%
7	ステプトトロフォモナス・マルトフィリア	Sma	9/9	100%
8	インフルエンザ菌	Hin	2/3	100%
9	レジオラ・ニューモフィラ	Lpn	2/2	100%
10	肺炎マイコプラズマ	Mpn	16/16	97%
11	肺炎クラミジア	Cpn	0/0	100%
12	メチリン耐性ブドウ球菌	MRS	26/26	96%
13	結核菌群	Mtb	4/6	100%

10

【 図 1 】

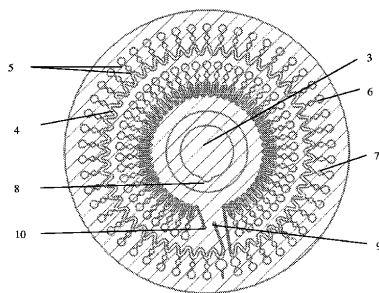


Figure 1

【 図 2 】

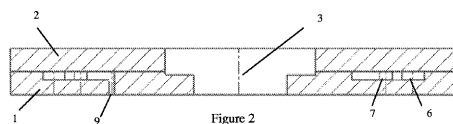
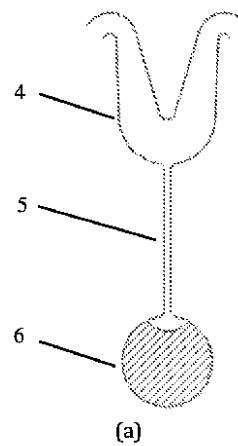


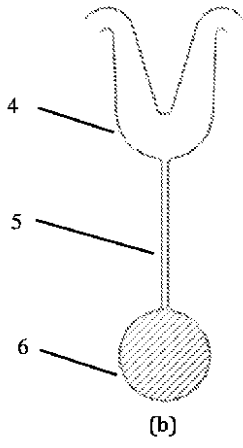
Figure 2

【 図 3 (a) 】

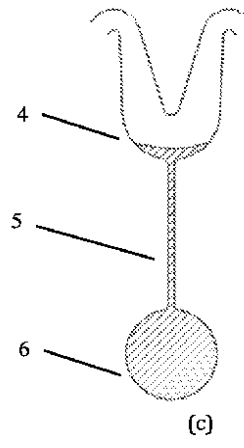


(a)

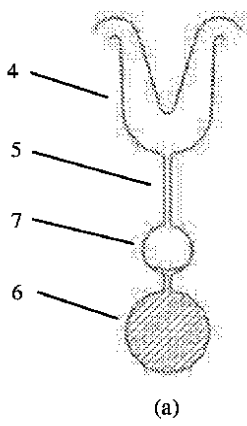
【図 3 (b)】



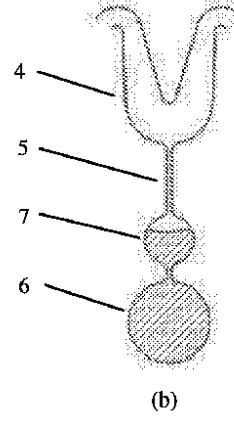
【図 3 (c)】



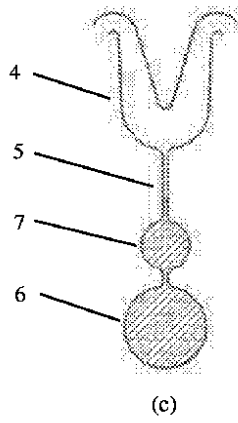
【図 4 (a)】



【図 4 (b)】



【 図 4 (c) 】



(c)

【 図 5 】

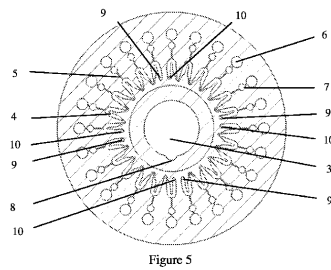


Figure 5

【 図 6 】

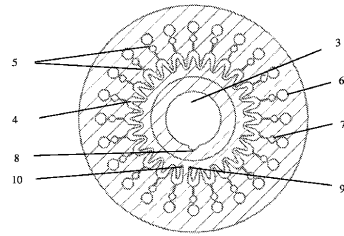


Figure 6

【 図 7 】

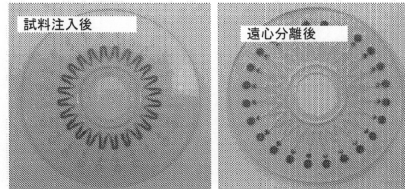


Figure 7

【 図 8 】

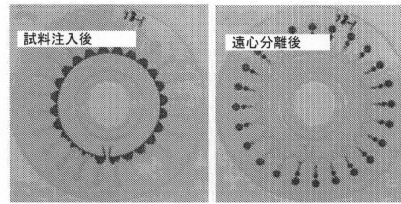
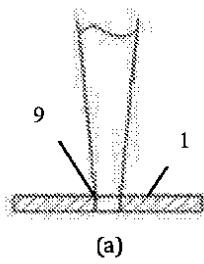


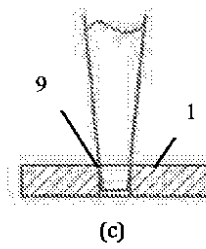
Figure 8

【 図 9 (a) 】



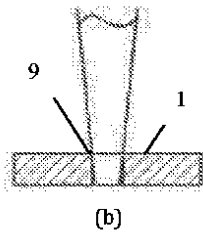
(a)

【 図 9 (c) 】



(c)

【 図 9 (b) 】



(b)

【 図 10 】

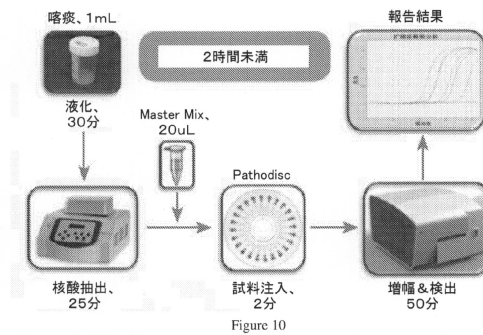
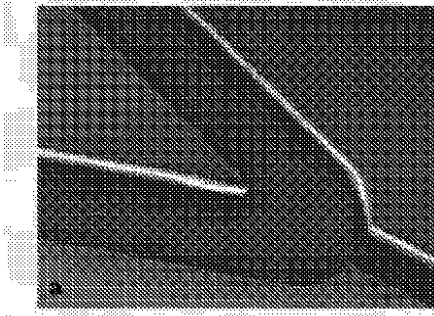


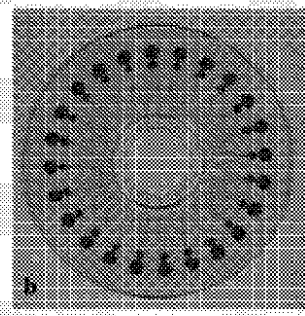
Figure 10

【図 1 1 (a)】



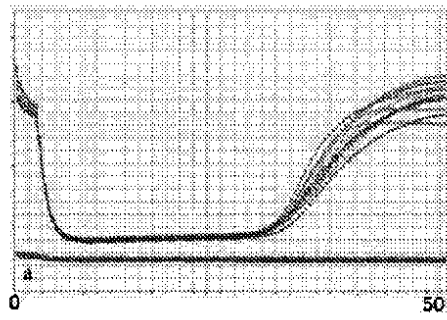
(a)

【図 1 1 (b)】

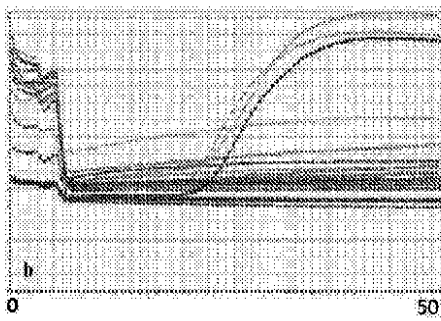


(b)

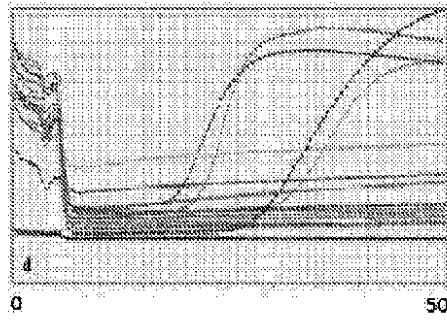
【図 1 2 a】



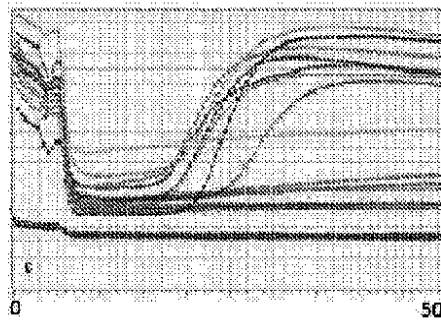
【図 1 2 b】



【図 1 2 d】



【図 1 2 c】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 37/00	(2006.01)	G 0 1 N 35/00		D
C 1 2 Q 1/06	(2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 1	
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	C 1 2 Q 1/06		
		C 1 2 Q 1/68		

(73)特許権者 518365802

キャピタルバイオ・テクノロジー・コーポレーション
 CAPITALBIO TECHNOLOGY CORPORATION
 中華人民共和国、101111 ベイジン、ピー・ディー・イー、イーチュアン・バイオメディカル・パーク、ケチュアン・シックス・ストリート、88、ビルディング・シー
 88 KECHUANG 6TH STREET, BUILDING C, YIZHUANG
 BIOMEDICAL PARK, BDA, BEIJING 101111 PEOPLE
 'S REPUBLIC OF CHINA

(73)特許権者 506162688

清華大學
 TSINGHUA UNIVERSITY
 中華人民共和国北京市海澱區清華園1號
 NO.1, TSINGHUA YUAN, HAIDIAN DISTRICT, BEIJING
 , PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

(74)代理人 110001195

特許業務法人深見特許事務所

(72)発明者 ワン, レイ

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 チャン, グオハオ

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 チョウ, シンイン

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 シン, ジュエン

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 チャン, ヤオ

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 リン, ミンシアン

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 フアン, グオリアン

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 ワン, ツァン

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 シン, ワンリー

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

(72)発明者 チョン, ジン

中華人民共和国 102206 北京市昌平区 ライフ サイエンス パークウェイ 18

合議体

審判長 日比野 隆治

審判官 川端 修

審判官 蔵野 雅昭

- (56)参考文献 特開2012-132935(JP,A)
特表2004-529333(JP,A)
米国特許出願公開第2009/0053108(US,A1)
特表2010-519892(JP,A)
中国特許出願公開第102886280(CN,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B01J 19/00-19/32
C12M 1/00- 1/42
G01N 35/00-35/10
B81B 1/00