

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6755533号
(P6755533)

(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28日(2020.8.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6837 Z N A Z
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z
C 1 2 Q 1/6816 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6816 Z
C 1 2 Q 1/6848 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6848 Z

請求項の数 14 (全 112 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-192342 (P2018-192342)	(73) 特許権者	508135149
(22) 出願日	平成30年10月11日(2018.10.11)		アボット・ラピッド・ダイアグノスティクス・イエーナ・ゲー・エム・ペー・ハー
(62) 分割の表示	特願2016-160381 (P2016-160381)の分割		ドイツ国、07743・イエーナ、オルラベーク・1
原出願日	平成20年7月23日(2008.7.23)	(74) 代理人	110001173
(65) 公開番号	特開2019-54794 (P2019-54794A)		特許業務法人川口国際特許事務所
(43) 公開日	平成31年4月11日(2019.4.11)	(72) 発明者	オイゲン・エルマントラウト
審査請求日	平成30年11月8日(2018.11.8)		ドイツ国、07745・イエーナ、フォルストベーク・23
(31) 優先権主張番号	60/951, 358	(72) 発明者	トーマス・カイザー
(32) 優先日	平成19年7月23日(2007.7.23)		ドイツ国、99441・ホールシュエット、カペンドルフアー・ベーク・3
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

流体状態の試料を收容するように適合され、第二の反応チャンパーを含む装置中に流体全血試料を導入する工程であって、前記第二の反応チャンパーが第一の表面及び第二の表面を含み、及び、前記第一の表面又は前記第二の表面上に配置されたマイクロアレイをさらに含み、前記マイクロアレイは捕捉核酸分子の規定された空間的配置を含み、マイクロアレイの所定の領域のそれぞれは捕捉核酸分子の1つの種のみを含む工程；

第二の反応チャンパー中において、ウイルス感染と関連する核酸を増幅する工程；並びに

第二の反応チャンパー中において、マイクロアレイに基づく分析を行うことによって、全血試料中のウイルス感染と関連する核酸の存在及び/又は量の指標となる値を測定する工程であって、前記マイクロアレイに基づく分析は、マイクロアレイ上の捕捉核酸と複合体を形成している核酸を検出することを含む工程
を含む方法。

【請求項2】

ウイルス感染と関連する核酸の存在及び/又は量の指標となる値に基づき、感染患者におけるウイルス負荷量の指標となる値を測定する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

試料の容積が1 µL から 45 µL である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

ウイルス感染が H I V 感染である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

流体状態の試料を収容するように適合された装置が微小流体装置である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

装置が第一の反応チャンバーをさらに含み、及び方法が、第一の反応チャンバー中において、試料から核酸を放出させる工程をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

当該放出工程が流体全血試料を溶解試薬と接触させる工程を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

装置が第一の反応チャンバーをさらに含み、及び方法が、第一の反応チャンバー中において、複合体を形成させる工程をさらに含み、各複合体はウイルス感染と関連する核酸と捕捉分子を含み、各捕捉分子は、ウイルス感染と関連する核酸のある領域に対して特異的な結合部分とアンカー基を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

方法が、第二の反応チャンバー中において、複合体を装置の第一の結合要素と接触させる工程をさらに含み、前記第一の結合要素は、複合体を第一の結合要素に結合するために、捕捉分子のアンカー基に結合するように構成されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ウイルス感染と関連する核酸が P C R によって増幅される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第二の反応チャンバーの第一の表面又は第二の表面が第二の結合要素であり、並びに方法が、ウイルス感染と関連する核酸と複合体を形成することができるレポーター化合物の一定量及び当該レポーター化合物を捕捉することができる第二の結合要素を準備する工程をさらに含み、レポーター化合物の核酸との複合体の形成が第二の結合要素によるレポーター化合物の捕捉を阻害する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

ウイルス感染と関連する核酸の量の少なくとも一部と、レポーター化合物の量の一部との複合体を形成させる工程；

第二の結合要素上の、ウイルス感染と関連する核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程；並びに

第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び / 又は量に対する指標となる値を測定する工程をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

レポーター化合物の量に対する指標となる値に基づいて、ウイルス感染と関連する核酸の量の指標となる 1 つ又はそれ以上の値を測定することをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

核酸の量の少なくとも一部とレポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程の前に、核酸の増幅が開始される、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本願は、2007年7月23日に出願された米国特許出願951,358号(参照により、その全体が組み込まれる。)の優先権を主張する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明は、アッセイ、例えば、ポリヌクレオチドのためのアッセイに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

生物学的試料中の病原体の存在は、病原体の存在に関連するポリヌクレオチドに関して試料をアッセイすることによって測定することができる。細菌、カビ及びウイルスは、関連するポリヌクレオチドに対するアッセイに基づいて測定することができる病原体の例である。

【 0 0 0 4 】

E P 0 6 3 7 9 9 9 は、ポリヌクレオチド重合反応を実施することによって、試料中の予め選択されたポリヌクレオチドを増幅するための装置を開示する。この装置は、試料注入ポート及び注入ポートから伸長する中規模流動システムを画するように微細加工された基材を含む。中規模流動システムは、予め選択されたポリヌクレオチドの重合及び増幅のために必要とされる試薬が与えられている注入ポートと流体連通しているポリヌクレオチド重合反応チャンバーを含む。この装置は、反応チャンバー（PCRチャンバー）中でポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施するために使用し得る。PCRチャンバーには、試料ポリヌクレオチド、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、プライマー及びポリメラーゼ連鎖反応に必要なとされる他の試薬が供給され、装置には、二本鎖ポリヌクレオチドのハイブリッド形成を解除し、プライマーを徐冷し、並びにポリヌクレオチドを重合及び増幅するように制御された温度に、反応チャンバーの内容物の温度を熱的に制御するための手段が提供されている。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、旧来の微小流体装置の様々な作業を適切に協調させることは困難であり得る。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 欧州特許出願公開第 0 6 3 7 9 9 9 号明細書

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

簡易な様式で試料の分析を可能とする装置及び方法に対する要求が存在し得る。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

要旨

典型的な実施形態によれば、堅固な基材と、該基材を少なくとも部分的に覆う柔軟なカバー要素と、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、及び 1 つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出するように適合された第一の構造と（内容物は、標的分子（例えば、構造又はチャンバー又はウェル中の乾燥された緩衝液）を含む。）、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、並びに標的分子を捕捉するように及び標的分子の存在及び / 又は量に対する指標となる値を測定するように適合された少なくとも 1 つの結合要素を含む第二の構造（第一の構造とは異なり得る。）と、少なくとも第一の構造と第二の構造を相互接続する微小流体ネットワークと、並びに微小流体ネットワークの一部を選択的に閉鎖するために基材に対して柔軟なカバー要素を押圧することによって第一の構造と第二の構造の間に液体流を生じさせるように適合されたアクチュエータ要素とを含む、装置が提供される。

【 0 0 0 9 】

別の典型的な実施形態によれば、液体を収容するように適合された構造と（該構造は、少なくとも 1 つの結合要素を含み、及び微小流体ネットワークと流体連通している。）並

10

20

30

40

50

びに少なくとも1つの結合要素に標的分子が捕捉される様式で微小流体ネットワークを通じた流体流を調節するように適合され、構造中での標的分子の増幅を調節するように適合され、及び少なくとも1つに結合要素に捕捉された標的分子の存在及び/又は量に対する指標となる化合物の検出を調節するように適合された調節ユニットを含む装置が提供される。

【0010】

さらに別の典型的な実施形態によれば、少なくとも1つの結合要素を含み及び微小流体ネットワークと流体連通している構造中に液体を収容すること、少なくとも1つの結合要素に標的分子が捕捉される様式で微小流体ネットワークを通じた流体流を調節すること、構造中の標的分子を増幅すること、並びに少なくとも1つに結合要素に捕捉された標的分子の存在及び/又は量に対する指標となる化合物を検出することを含む方法が提供される。

10

【0011】

さらに別の典型的な実施形態によれば、液体を収容するように適合された構造を含み、該構造は第一の化合物を捕捉するように適合された第一の結合要素を含み、並びに第一の化合物の存在及び/又は量に対する指標となる第二の化合物（第一の化合物と異なり得る。）を捕捉するように適合された第二の結合要素（第一の結合要素と異なり得る。）を含む装置が提供される。

【0012】

別の典型的な実施形態によれば、予め規定された分析作業を実施するように微小流体装置を通じて、調節ユニットの調節下で、その中において試料が誘導される装置が提供され得る。この装置は、分析の間に必要とされる幾つかの又は全ての固相連結手順を実施し得る中央ウェル/中央構造（第二のウェル又は第二の構造とも表記され得る。）を備えることができる。中央ウェルと表記され得るこの構造において、精製又は分離目的のために試料の標的分子を捕捉すること、（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応PCRによって）標的分子を増幅すること、並びに標的分子の存在/不存在又は標的分子の量に関する情報を誘導することができる（例えば、光学的）検出手順を実行することが可能であり得る。

20

【0013】

従って、迅速且つ正確な様式で、多くの人手を必要とせずに、生化学的又は医学的な結果を与え得る強力な、完全に自動的な生化学的分析システムが提供され得る。例えば、このような装置を用いて、定性的又は定量的な様式で、患者の全血試料中のHIV感染に伴う核酸を検出することが可能であり得る。

30

【0014】

次に、この装置のさらなる典型的な実施形態を説明する。しかしながら、これらの実施形態は、方法に対しても適用される。典型的な実施形態によれば、中央ウェル中で検出される化合物は、標的分子である。この目的のために、中央ウェルには、特異的な結合要素（例えば、標的分子を捕捉するために必要とされる他の結合要素とは異なる結合要素）が付与され得る。換言すれば、このような実施形態において、標的分子（例えば、標的分子は、例えば、遊離のウイルスに由来するRNA、細胞に随伴したウイルスに由来するRNA、プロウイルスDNA、逆転写されたウイルスDNA、すなわち、ウイルス複製の「中間体」及びプロウイルスDNA由来の転写物、すなわち、宿主DNAゲノムの転写によって得られるRNA分子など、遊離のウイルス及び細胞に随伴したウイルス（HIVなど）に由来する核酸）を結合要素であり得る。

40

【0015】

あるいは、例えば、PCR産物に、RNAに又はDNAに結合する能力を有し得るレポーター化合物などの特異的な化合物を付与することも可能である。このようなシナリオでは、レポーター化合物は、検出されることによって、試料中の標的分子の存在及び/又は量に関する情報を間接的に与えることを可能とする化合物であり得る。

【0016】

この少なくとも1つの結合要素は、標的分子を捕捉するように適合され得る。例えば、

50

少なくとも1つの結合要素は、全ウイルス核酸などの標的分子を含む複合体を捕捉することができる標識されたビーズを含み得る。

【0017】

この少なくとも1つの結合要素は、標的分子の存在及び/又は量に対する指標となる化合物を捕捉するように適合され得る。従って、分離した各標的分子を直接検出できるのみならず、例えば、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物を検出することによって、標的分子を間接的に検出することも可能である。

【0018】

この少なくとも1つの結合要素は標的分子を捕捉するように適合された第一の結合要素を含むことができ、並びに標的分子の存在及び/又は量に対する指標となるレポーター化合物を捕捉するように適合された第二の結合要素（第一の結合要素とは異なり得る。）を含み得る。従って、化合物の2つの異なる種類（1つは、特に、溶解後に標的分子を捕捉するための化合物（例えば、標的ポリヌクレオチドのある領域に対して特異的な結合部分とアンカー基とを含む捕捉分子）、もう1つは検出用の化合物（例えば、標的ポリヌクレオチドと複合体を形成することができるレポーター化合物（標的ポリヌクレオチドとの複合体の形成は、第二の結合要素によるレポーター化合物の捕捉を阻害する。））を提供することが可能である。換言すれば、捕捉は、検出から機能的に分離することができる。例えば、第一の結合要素は、例えば、捕捉分子のアンカー基に結合することによって、捕捉分子及び標的分子を含む複合体に結合するように構成されているビーズであり得るのに対して、第二の結合要素はレポーター化合物を捕捉することができる中央ウェルの表面であり得る。第二の結合要素である中央ウェルの表面は、表面上のレポーター化合物を捕捉することができる1つ又はそれ以上の異なるレポーター特異的捕捉分子を含み得る。

【0019】

この構造、すなわち、様々な固相カップリング手順が行われる中央チャンバーはウェルであり得る。「ウェル」は、基材中に形成され、その中で様々な分析手順を行い得る試料チャンバーを与える陥入又は陥凹であり得る。このようなウェルは、マイクロリットルとミリリットルの間の大きさの容積を有する円柱状の構造又はポットであり得る。

【0020】

中央ウェル又は第二の構造は、例えば、中央ウェルの注入口及び必要に応じて排出口を密封することによって、不可逆的に密封可能であり得る。

【0021】

この微小流体ネットワークは、1つのチャンネル又は相互接続されたチャンネルの複数を含み得る。「チャンネル」は、幅及び高さより著しく大きな長さを有することにより、これに沿って液体が輸送され得る経路を与える流体構造（例えば、実質的に一次元の構造）を表し得る。単一のチャンネルを与えることができ、又はチャンネルシステムを形成するために数個のチャンネルを相互接続し得る。このようなチャンネルシステムは、このようなシステムの分岐において、1つのチャンネルから別のチャンネルへの液体流を可能とし得る。1つ又はそれ以上のウェルを、このようなチャンネルシステムに一体化し得る。

【0022】

上記のような構造、例えば、「中央」構造に加えて、この微小流体ネットワークは少なくとも1つのさらなる構造を含み得る。換言すれば、チャンネル及び中央ウェルとは別に、さらなるチャンネル及び/又はさらなるウェルなど、さらなる微小流体要素を付与し得る。従って、ウェル及びチャンネルの複雑な系を与え得る。

【0023】

（溶解構造又は溶解ウェルなどの）少なくとも1つのさらなる構造は、1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスの、標的分子を含む内容物を放出するように適合され得る。従って、このようなさらなる構造は溶解チャンバーと表記することができ、溶解チャンパー内では、その後の分析のために、細胞などの生物学的化合物はその内容物を放出するように強制される。換言すれば、さらなる構造は、内容物を放出するためにこのような作業を実施する生化学的因子を含み、これにより、中央ウェルに輸送されるべき改変された試

10

20

30

40

50

料を与える構造を含み得る。この目的のために、溶解構造などのさらなる構造は、溶解試薬、例えば、細胞膜及び/又はウイルスのキャプシドを崩壊させる1つ又はそれ以上の界面活性剤を含むカオトロピック塩又は試薬を含み得る。これに代えて又はこれに加えて、(例えば、以下に記載されているような温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットを使用し、又は含めることによって)細胞膜及び/又はウイルスキャプシドを破壊するために、さらなる構造、例えば溶解ウェルは試料を加熱するように適合させ得る。

【0024】

この少なくとも1つのさらなる構造は、標的分子と複合体を形成することができる捕捉プローブも含み得る。従って、アンカー基を有する捕捉分子の存在下で試料を溶解することが可能であり得る。

10

【0025】

(PCR試薬を含むウェルなどの)少なくとも1つのさらなる構造は、標的分子の増幅を促進する少なくとも1つの物質を含み得る。換言すれば、すなわち、増幅を促進するために必要とされる生化学的因子を含むさらなるウェルが付与され得る。しかしながら、さらなる構造中にはPCR剤を含め得るが、実際のPCR増幅手順は、中央ウェル中など、別の位置で実施され得る。しかしながら、典型的な実施形態によれば、以下でさらに詳しく説明されているように、試料材料の喪失を避けるために、増幅物質ウェルを含むウェルを通じて、中央ウェルから再度中央ウェルへと試料を輸送して戻すことが有利であり得る。増幅を促進する物質は、PCRに必要なとされる物質(酵素、プライマー、緩衝液など)であり得、以下で詳しく記載されている。

20

【0026】

この少なくとも1つのさらなる構造はウェルでもあり得る。従って、微小流体ネットワークによって接続されたウェルの複数を付与することができる。しかしながら、ウェル以外の構造中で、例えばチャンネル中で、溶解を実施し、及び/又は増幅材料を提供することが可能であり得る。

【0027】

この装置は、その上に及び/又はその中に構造を形成し得る基材を含み得る。従って、装置のコンポーネントを収容する流体は、基材中へ一体的に統合され得る。あるいは、構造は、基材の上に形成され得、例えば、印刷し、又はスポット状に付与することができる。柔軟なカバー要素と適切に協調し得る堅固な基材の材料に対する例は、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリスチレン、PET、PMMA、ポリエチレン、アクリルガラス、PU、PEEK、PVC、ガラスなどである。

30

【0028】

特に、この基材は堅固であり得、極めて効率的な様式で基材を少なくとも部分的に覆う1つ又はそれ以上の柔軟なカバー要素と協調することが可能となる。特に、柔軟なカバー要素は堅固な基材を覆うことができ、アクチュエータは(バルブ機能などを実行するために)チャンネルを選択的に閉鎖するために、カバー要素を基材に対して押圧し得る。

【0029】

典型的な実施形態によれば、この基材は、第一の表面と該第一の表面とは対向する第二の表面とを有し得る。この構造は、この基材の第一の表面(特に、第一の主表面)上に及び/又は中に付与し得る。主表面は、その上に構造が構成される基材の主要な表面である。さらなる構造は、この基材の第二の表面(特に、第二の主表面)上に及び/又は中に付与し得る。流体の接続構造は、特に、この基材を貫通する穴及び/又は第一の表面を第二の表面と接続する基材の表面部分中の溝を通じて付与し得る。このような流体接続構造は、第一及び第二の表面の間に配置し得、構造をさらなる構造と流体連通させるように構成し得る。このような実施形態において、この基材は、2つの対向する主表面において加工され、これにより、微小流体構造を形成し得る。これらの構造は、この基材の表面に沿って形成されたチャンネル又は基材を直接通過するチャンネルを含み得る接続構造によって接続され得る。従って、このような基材の主表面は何れも液体輸送作業を与えるために加工され得るので、この基材の両主表面部分を極めて効率的に使用され得る装置が提供され得る

40

50

。必要に応じて、このような基材は、一方又は両方の側において、（特に柔軟な）カバー要素で被覆し得、これにより、例えば、一方又は両方の主表面上の柔軟な部分に対して作用するアクチュエータによって、両表面上の流体構造を通じた流体流を効率的に調節することが可能となる。従って、両側に流体構造を有する中央基材が提供され得る。特に、これは、3つの層、すなわち基材及び少なくとも部分的に柔軟な2つのカバー要素によって形成されるカートリッジを製造することを可能とし得る。このような3つの層構造は、微小流体構造を収容する中間層（例えば、堅固である。）を挟み込む（例えば柔軟な）基礎要素と（例えば柔軟な）カバー要素を有し得る。基礎要素及び/又はカバー要素は、中央基材を完全に覆うことができ、又は、例えばアクチュエータをベースとする調節のための基礎としてカバー機能が所望される位置において、部分的にのみ覆うことができる（例えば、図21参照）。

10

【0030】

この基材の他に、この装置は少なくとも1つのさらなる基材を含むことができ、さらなる構造はさらなる基材の上及び/又は中に付与し得る。この基材がさらなる基材とともに接続され、又は取り付けられ、又は組み立てられ、又は設置されている作動状態において、構造及びさらなる構造が流体連通され得るように、この基材及びさらなる基材は、可逆的に又は取り外し可能に互いに接続可能又は取り付け可能又は組み立て可能又は設置可能であるように適合され得る。このような実施形態によれば、互いに柔軟に接続され得る幾つかのモジュールを組み合わせることによって、その中で装置を形成し得るモジュラー構造が付与され得る。モジュラー構造の組によって、対応するカートリッジを形成し得、モジュールの各々が以下の特性を有することができ、協同的に形成された他のモジュールとともに使用し得る。

20

【0031】

- 各モジュールは、少なくとも2つの流体接続を有するチャンバーを含む。

【0032】

- チャンバーは堅固な要素及び弾性的な要素を含む。

【0033】

- 弾性的な要素の動きによって、少なくとも1つの流体接続を閉鎖することができ、チャンバーの内容物の混合を実施し得る。

【0034】

この少なくとも1つの結合要素は、標的分子の分析中の固相カップリング手順の複数が少なくとも1つの結合要素において行われるように適合させ得る。「固相カップリング手順」という用語は、具体的には、機能化/結合要素における固着及びハイブリッド形成などのあらゆる種類を含み得る。この文脈において、「結合要素又は支持要素」には、捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されているあらゆる物質、表面若しくは機能化及び/又はポリヌクレオチドを捕捉するように構成されている表面が含まれ得る。固相カップリング手順には、分析又は検出されるべき分子が固相表面に特異的に結合される、すなわち、溶液中ではなく固体表面上に結合される全ての手順が含まれ得る。

30

【0035】

標的分子の分析中における全ての固相カップリング手順が少なくとも1つの結合要素において行われるように、この少なくとも1つの結合要素を適合させ得る。換言すれば、このような実施形態では、中央ウェル/構造以外の別のウェルでは、固相カップリング手順が行われない。これによって、単一のウェル中で全ての固相カップリング手順を実施することが可能となり得、小型の高性能装置が可能となり得る。標的分子の分析中における正確に2つの固相カップリング手順が少なくとも1つの結合要素において行われるように、少なくとも1つの結合要素を適合させ得る。これらの2つの固相カップリング手順は複成分の試料由来の標的分子を捕捉すること、及び標的分子の存在若しくは不存在又は量に対する指標となる化合物を検出することに関し得る。記載されている実施形態において、このような両作業に対してウェルの設備を共同的に使用できるようにするために、これらの2つの手順は、単一のウェル中で行われる。1つのウェル中にこのような二つの作業を

40

50

組み合わせることによって、液体流の経路を短く保ち、装置を小さく保ち、分析時間を短く保ち得る。

【0036】

幾つかの実施形態において、標的分子の分析中における正確に3つの固相カップリング手順が少なくとも1つの結合要素において行われるように、この少なくとも1つの結合要素を適合させ得る。これらの3つの固相カップリング手順は複数成分の試料由来の標的分子を捕捉すること、標的核酸の逆転写から得られた核酸を捕捉すること、及び標的分子の存在若しくは不存在又は量に対する指標となる化合物を検出することに関し得る。記載されている実施形態において、このような全ての作業に対してウェルの設備を共同的に使用できるようにするために、これらの3つの手順は、単一のウェル中で行われる。1つのウェル中にこのような3つの作業を組み合わせることによって、液体流の経路を短く保ち、装置を小さく保ち、分析時間を短く保ち得る。

10

【0037】

あるいは、試料中の標的分子の分析中における正確に1つの固相カップリング手順が少なくとも1つの結合要素において行われるように、この少なくとも1つの結合要素を適合させ得る。生化学的分析又は実験の全体が、単一の固相カップリング手順のみを含み、例えば、試料の精製のみが予測され、検出が予測されていない場合に、このような実施形態は特に有利であり得る。

【0038】

この少なくとも1つの結合要素に隣接して配置された装置の少なくとも一部が実質的に1 nmと実質的に10 μmの間の波長の範囲にある電磁波照射に対して透過性であり得、これにより、標的分子の存在及び/又は量に対する指標となり、及びこの少なくとも1つの結合要素に捕捉された化合物の電磁波照射をベースとする検出が可能となる。このような実施形態において、特に、中央ウェルに近い基材の一部は、検出目的で使用される電磁波照射に対して、特に近赤外線、可視光及び/又は紫外線ドメインの電磁波照射に対して透過性であり得る。この措置を採ることにより、中央ウェル中の電磁波照射を基礎とする検出(例えば、蛍光をベースとする検出)も実施することが可能であり得る。少なくとも1つの結合要素に隣接して配置された装置の一部が実質的に400 μmと実質的に800 μmの間の波長の範囲にある電磁波照射に対して透過性である場合には、化合物の光学的検出が可能となる。

20

30

【0039】

この装置は、構造中に配置された液体の温度を操作するように適合された温度操作ユニットを含み得、又はこのような温度操作ユニットと接続可能であり得る。このような温度操作ユニットは、試料を特定の温度にすることができる又は特定の温度パターン若しくは系列を実行することができる加熱及び/又は冷却要素を含み得る。

【0040】

この温度操作ユニットはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施するための温度系列に従って構造中に配置された液体の温度を操作するように適合され得る。このようなポリメラーゼ連鎖反応は、例えば、約95、約55及び約72への温度サイクルを必要とし得る。温度のこのような系列は、通常、特定の予め定められた時間間隔で実施されなければならない、所定の複数回数を繰り返すことができる。

40

【0041】

この少なくとも1つの結合要素は、捕捉分子のアンカー基を結合するように構成され得る。特に、少なくとも1つの結合要素はポリヌクレオチドを捕捉するように構成され得る。

【0042】

この少なくとも1つの結合要素は、捕捉分子(例えば、構造の表面上に配置された(例えば、ウェル中に固定化された)レポーター特異的捕捉分子)、粒子上に(例えば、ビーズ上に)配置された捕捉分子(例えば、構造(例えば、多孔性ガラス構造)の多孔性表面上に配置された捕捉分子、並びに1つ又はそれ以上の異なる捕捉分子(例えば、構造の表

50

面に関して異なる位置に配置されたレポーター特異的捕捉分子（例えば、例えば競合的アッセイにおいて、ウェル中にアレイ様の様式で固定化されている捕捉分子の異なる種類）からなる群の少なくとも1つを含み得る。幾つかの実施形態において、この少なくとも1つの結合要素は、ビオチンなどのアンカー基を捕捉するための捕捉分子も含み得る。

【0043】

この構造は、実質的に1 μ lと実質的に1 mlの間の範囲、特に実質的に20 μ lと実質的に300 μ lの間の範囲の容積を有し得る。例えば、実質的に100 μ lの容積を有するウェルが提供され得る。

【0044】

この基材は、装置に液体を供給するための挿管を受容するように構成された溝を有し得る。試料供給用の挿管は、単に、微小流体チャネル系と適切な調和及び協調が為されるように溝の中に配置する必要があるに過ぎず、これにより、特別な技術を有しておらず、又は訓練を施されていない使用者でも実施し得る簡易な分析が可能となるので、このような実施形態において、使用者が装置を取り扱うのは極めて容易であり得る。

【0045】

この基材は構造に隣接するウィンドウ部分を有し得、及び実質的に1 nmと実質的に10 μ mの間の波長の範囲の電磁波照射（すなわち、近赤外線、可視光又は紫外線照射）、特に実質的に400 nmと実質的に800 nmの波長の範囲の電磁波照射（すなわち、特に可視光照射）に対して透過性であり、これにより、構造又は微小流体ネットワークを通じた（より正確には、構造又は微小流体ネットワークに達する）液体流のメニスカスの、電磁波照射をベースとする検出が可能となる。このような実施形態において、この基材の光学的に透過性のウィンドウ部分は放射線検出装置によって検出され得る。微小流体ネットワーク又は構造を通じて拍出された流体のメニスカスがウィンドウ部分を通過すると、ウィンドウ部分を通じた伝達特性は特徴的な様式で突発的に変化し得、これにより、放射線検出装置にシグナルを生成し、メニスカスがこの装置中の特定の領域に達したという事実が示唆される。アクチュエータの協調的な動き及び/又は温度操作ユニットの調節は、この装置を通じて拍出された試料の現在位置と適切に合致させることができるので、このシグナルは引き金を引く目的のために有用であり得、又はアクチュエータに対する制御シグナルとして有用であり得る。例えば、このような措置を取ることによって、過剰流が生じたときに、水又は緩衝液の所定の容量が装置内に拍出されたことを検出し得る。

【0046】

構造及びさらなる構造からなる群の少なくとも1つは、2つの流体開口部を含み得る。このような流体開口部は、流体注入口及び流体排出口であり得る。

【0047】

このカバー要素は、柔軟なカバー要素であり得る。特に、堅固な基材と協調して、カバー要素と基材は、カバー要素に対して作用するアクチュエータによって適切に制御され得る、三次元的に密封されたチャネルを形成し得る。外的な力の影響下で、特定の位置において、カバー要素が少なくとも部分的に変形可能である場合には、構造又は微小流体ネットワークを開放又は閉鎖することによって、液体の流れを選択的に可能とし、又は不能とすることが可能であり得る。この他に、このようなカバー要素を用いて、構造に沿った液体の輸送が可能である。

【0048】

特に、アクチュエータ要素が付与され、カバー要素を変形するように作動されるように適合される場合には、一体化された混合、ポンプ及び/又はバルブ機能を有する高性能のラブ-オン-チップ (lab-on-chip) が提供され得る。

【0049】

この構造の何れの一つも、生物学的に、生化学的に及び/又は化学的に活性を有する1つ又はそれ以上の物質を含み得る。従って、捕捉分子、レポーター特異的捕捉分子、検出可能なマーカー、溶解試薬及びPCR試薬を含み得るこのような物質が、乾燥された形態で、特に凍結乾燥された形態でウェル中に存在する場合には、完全に自動的な分析を実行

10

20

30

40

50

するために、使用者が単に（水、緩衝液及び試料などの）液体を充填するだけでよい装置を提供することが可能である。必要な生化学的成分が異なるウェル中に付与されている場合には、使用者は、調節ユニット中に保存された順序に基づいて、単に実験を開始し、異なる注入チャンバーに水又は緩衝液を提供し得る。残りは、完全に自動的な装置によって実施される。

【 0 0 5 0 】

このチャンネルは、実質的に 50 μm と実質的に 1 mm の間の範囲、特に実質的に 100 μm と実質的に 300 μm の間の範囲の幅（基材の表面平面中の次元であり、流体流の方向と垂直な次元である。）を有し得る。例えば、このチャンネルの幅は実質的に 200 μm であり得る。このチャンネルの高さ（基材の表面平面と垂直で、及び流体流の方向と垂直な方向の次元である。）は、実質的に 20 μm と実質的に 300 μm の間の範囲、特に実質的に 50 μm と実質的に 200 μm の間の範囲であり得る。例えば、このチャンネルの高さは実質的に 100 μm であり得る。これとは対照的に、このチャンネルの長さは幅及び高さよりずっと大きくすることができ、例えば、1 mm より大きく、特に 1 cm より大きくすることができ、又は数センチメートルでさえあり得る。

10

【 0 0 5 1 】

この構造は、液体用の輸送媒体として適合された材料を含み得る。例えば、この材料は固体材料、ゲル材料、液体材料及びこれらの組み合わせからなる群の少なくとも 1 つを含み得る。従って、この構造は、陥凹であり得、又は液体用担体としての役割を果たす材料によって形成され得る。

20

【 0 0 5 2 】

このカバー要素は、柔軟な膜又は柔軟な密封を含み得る。このような柔軟な膜又は柔軟な密封は、ラテックスなどの材料から構成され得、これにより、（例えば、アクチュエータ要素によって生成される）機械的な力の影響下で、このカバー要素を柔軟に変形させることが可能となる。

【 0 0 5 3 】

この装置は、このカバー要素を変形し、これにより、構造中及び/又は微小流体ネットワーク中の液体の流体流特性を調節するように作動されるように適合されたアクチュエータ要素を含み得る。このようなアクチュエータ要素は調節ユニットの調節下に置くことができ、柔軟なカバー要素に対して協同して作用するピン又はステンシルの複数を有し得、これにより、チャンネルを選択的に開放又は閉鎖し、拍出又は混合などの目的で、チャンネル又はウェルの容量を一時的に低下させることができる。

30

【 0 0 5 4 】

このアクチュエータ要素は、チャンネルの直線部分に沿って液体の流体流特性を調節するように特に適合され得る。流体が真っ直ぐなチャンネルに沿って流れる場合には、垂直に配置されたアクチュエータ要素は、このチャンネルが特定の部分で閉鎖されたときに、流体の流れを効率的に停止させ得る。

【 0 0 5 5 】

このアクチュエータ要素は、バルブとして、流体混合装置として、及び/又は流体ポンプとして機能するように適合させ得る。

40

【 0 0 5 6 】

より具体的には、このアクチュエータ要素は、カバー要素を変形して、これにより、調節ユニットによって規定される流体流スキームに従って液体の流体流特性を調節するために協調して作動されるように適合されたアクチュエータ要素の複数を含み得る。従って、様々なチャンネルを通じた流体及び試料の輸送を含む特定の試験又はアッセイを使用者が選択した場合には、この調節ユニットは、柔軟なカバー要素のこのような可逆的圧縮を与えることにより、完全に自動的にアッセイを実行するために、アクチュエータ要素の各ステンシルを単に調節する。

【 0 0 5 7 】

このアクチュエータユニットを調節して、標的分子が少なくとも 1 つの結合要素に捕捉

50

され、標的分子が構造中で増幅され、並びに標的分子の存在及び/又は量に対する指標となり、及び少なくとも1つの結合要素に捕捉された化合物が検出される様式でカバー要素を変形させるように、この調節ユニットを適合させ得る。従って、調節ユニットは、様々なコンポーネントの機能を調和させる装置の中央制御装置であり得る。

【0058】

このアクチュエータ要素は、往復されるように構成された1つ又はそれ以上のピンを含み得る。ピンを前方に移動させることによって、チャンネル中の基材の方向に柔軟なカバー要素を押圧することによって、このチャンネルを閉鎖し得る。ピンが後方に動かされると、流体が流れることができるように、このチャンネルを再度開放させ得る。幾つかの実施形態において、1つ又はそれ以上のピンは、少なくとも部分的に弾性的な先端を有し得る。

10

【0059】

さらに、基材の主表面に対して垂直な方向に移動できるように、このアクチュエータ要素を取り付け得る。平面状基材に対して垂直な方向に往復運動させることによって、効率的な開放及び閉鎖を可能とし得る。特に、構造を通じた液体の輸送を不能とするために、構造の少なくとも一部を選択的に閉鎖するように、このアクチュエータ要素を移動可能に取り付け得る。別の手順モードでは、構造を通じた液体の輸送を可能とするために、構造の少なくとも一部を選択的に開放するように、このアクチュエータ要素を移動させ得る。

【0060】

構造を通じた液体の流体流を選択的に可能又は不能とするために、基材の主表面に対して垂直に往復運動するように、このアクチュエータ要素を適合させ得る。往復運動するアクチュエータの使用は、流体流を可逆的及び選択的に可能又は不能とすることができ、装置の極めて柔軟な動作が可能となり、(一方向性バルブ機能を実行するためにチャンネルが不可逆的に閉鎖されるアプローチとは対照的に)装置を複数回使用することが可能となる。

20

【0061】

このアクチュエータ要素は、構造を通じて液体を拍出させるために、基材の主表面に対して垂直な方向に往復運動するように適合させ得る。従って、このアクチュエータ要素は構造の容積又は高さを調節することが可能である。このアクチュエータ要素は、構造を選択的に閉鎖することもできる。構造の閉鎖は、バルブ機能、混合機能又は拍出機能に関連して実施され得る。しかしながら、検出されるべき標的分子の局所濃度を増加させ、及び/又はバックグラウンドシグナルを除去するために、検出目的で、構造及び/又は結合要素を圧縮させることが可能なので、検出期の間このようなアクチュエータを使用することも可能である。これは、精度を増大させ得る。

30

【0062】

このアクチュエータ要素を機械的に駆動するために駆動ユニットを取り付けることが可能であり、この駆動ユニットは、調節ユニットによって調節可能であり得る。このような駆動ユニットは、空気圧式駆動機構、水力的駆動機構又は電磁的駆動機構を含み得る。

【0063】

この少なくとも1つの結合要素は、三次元媒体、例えば、ゲル、粒子、ビーズ又は多孔性マトリックスを含み得る。この三次元媒体は、アクチュエータ要素を移動させることによって可逆的に圧縮可能であるように配置され、及び構成され得る。標的分子の存在又は量に対する指標となる化合物又は複合体が付着された三次元媒体(ビーズなど)を圧縮することによって、検出されるべき分子の局所濃度が選択的に増大され得るので、この措置を取ることによって、極めて正確な検出を行うことが可能であり得る。

40

【0064】

この装置は、バイオセンサーアッセイ装置、微小流体カートリッジ又はラブ・オン・チップとして適合させ得る。従って、完全な生化学的実験を行うために、小規模で、様々な生化学的機能を組み合わせ得る。

【0065】

温度センサーを取り付け、装置を通じて輸送される液体の温度を感知するように適合さ

50

せ得る。基材中に温度センサーを組み込むことにより、微小流体ネットワークを通じた液体流の温度を感知し得る。あるいは、基材に対してカバー要素を押圧したときに、アクチュエータが流体の局所温度を同時に測定し得るように、アクチュエータ要素に、例えばステンシル様アクチュエータの先端に、温度センサーを配置し得る。

【0066】

この装置は、液体の温度を操作するように適合された、好ましくはアクチュエータ要素に配置された温度操作ユニットを含み得る。このような温度操作ユニットは、例えば基材中に一体化されたワイヤーを加熱し、ウェル中の試料を加熱する形態で、基材内に一体化させ得る。あるいは、このような温度操作ユニットは、外部電磁波照射源などの外部装置とすることができ、（例えば、レーザーからの）電磁波照射をウェル上に誘導して、エネルギー源として電磁波照射を用いて、ウェル中の流体を加熱し得る。さらにこれに代えて、この温度操作ユニットは、加熱要素のみならず、冷却要素を含み得る。このような実施形態に関して、ペルティエ冷却装置は少ない労力で実装し得る。

10

【0067】

温度操作ユニットを取り付け、液体の温度を操作するように適合させることが可能であり、この温度操作ユニットは、第一の加熱要素及び第二の加熱要素を含むことができ、構造は第一の加熱要素と第二の加熱要素の間に配置されている。環状プレート中の陥凹は電磁波照射を中央ウェル上に誘導させることができ、陥凹及び第二の加熱要素を通じて、蛍光放射が検出できるようになるので、2つのこのような加熱プレート（1つは連続したプレートであり、他の1つは環状プレートである。）を取り付けることによって、電磁波照射をベースとする検出装置を用いて装置を作動できなくすることなく、加熱を実施し得る。

20

【0068】

典型的な実施形態において、加熱/冷却要素の少なくとも1つは、柔軟に戴置される。加熱/冷却要素を柔軟に戴置することによって、第一の加熱/冷却要素と第二の加熱/冷却要素との間に構造（例えば、第二の構造又は中央ウェル）を容易に挿入することが可能となり得る。さらに、加熱/冷却要素の少なくとも1つを柔軟に戴置することによって、柔軟な加熱/冷却要素を構造の表面に接触させ、これにより、効率的な熱伝導を可能とするように、構造（例えば、第二の構造又は中央ウェル）の表面へ柔軟な加熱/冷却要素を柔軟に適合させることが可能となり得る。

30

【0069】

典型的な実施形態によれば、柔軟に戴置することは、加熱/冷却要素全体の柔軟な戴置である。

【0070】

さらなる典型的な実施形態によれば、柔軟に戴置することは、加熱/冷却要素そのものの柔軟性である。

【0071】

さらに、2つの加熱/冷却要素を柔軟に戴置することもできる。プローブ装置を挟み込むために、両加熱/冷却要素はバタフライ様式で配置し得る。同じ様式において、単一の加熱/冷却要素を押圧カウンタープレートとともに配置し得る。これにより、プローブ装置を挿入するときに、とりわけ、プローブ装置がその最終位置に到達した後に、プローブ装置の表面方向に加熱/冷却要素が移動したときに、一切の引っ掻き傷を回避し得る。

40

【0072】

幾つかの実施形態において、加熱要素又は冷却要素の各々又は両方は、ペルティエ素子である。

【0073】

温度制御ユニットを取り付け、構造中の液体の温度を制御するように適合させ得る。このような制御体は、実際の温度を測定すること、並びにこの測定に基づいて、加熱及び/又は冷却機能を実施し、これにより、温度を所望の値に調整することを含み得る。

【0074】

50

検出ユニットを取り付け、標的分子の存在及び/又は量に対する指標となり、並びに少なくとも1つの結合要素に捕捉された化合物を構造中で検出するように適合させ得る。このような検出ユニットは、光学的検出ユニット、特に蛍光検出ユニットを含み得る。

【0075】

この基材及びこのカバー要素は、互いに接続された分離した要素であり得る。あるいは、基材及びカバー要素は、異なる材料で作製され得る。

【0076】

輸送ユニットを取り付け、構造及び/又は微小流体ネットワークを通じて液体を輸送するように適合させ得る。このような輸送ユニットは、ポンプ、特に、圧縮空気ポンプ、水圧式ポンプ、蠕動式ポンプ及び真空ポンプからなる群の1つを含み得る。さらに、通常の使用の間に、所望の様式で、重力が装置を通じた液体の流れを促進するように、装置を適合させ得る。従って、輸送ユニットの活動の不存在下において、液体は、所望の方向へ直接流れ得る。しかしながら、この輸送ユニットのスイッチがオンになると、この輸送ユニットの影響は重力の影響より大きくなり得、これにより、重力に逆らった方向への流体の流れを選択的に開始することが可能となる。従って、重力及び特殊な輸送ユニットの組み合わせは極めて有利であり得、エネルギーを節約する作動を可能とし得る。

【0077】

この輸送ユニットは、構造中及び/又は微小流体ネットワーク中に気泡を発生させることによって、液体を輸送するように適合され得る。この装置を通じて気泡を移動させることによって、この装置を通じた液体の輸送を補助し、又は促進し得る。

【0078】

少なくとも1つのフィルター、特に少なくとも1つのフリットを構造に(すなわち、中央ウェルの注入口及び/又は排出口に)配置させることができ、この構造中に配置された少なくとも1つの結合要素(例えば、ビーズ)が構造外に洗い流されないように適合させ得る。流体流の影響下で、機械的な力が、この構造中のビーズ又は他の結合要素に対して作用し得る。しかしながら、フリット(すなわち、焼結材料で作製され得る多孔性フィルター要素)が構造の注入口及び/又は排出口に取り付けられると、ビーズが中央チャンバー外に洗い流されるのを確実に防止し得る。この装置内の対応する形状の環状溝の中に挿入され得るようにするために、環状形状を有するフリットを付与し得る。

【0079】

この少なくとも1つの結合要素は、表面機能化を含み得る。「表面機能化」という用語は、特異的な結合機能を実行することができるように表面が加工されている事実を表し得る。このような実施形態において、結合要素はウェルの表面の一部であり得、又はウェルの表面に結合され、又は付着され得る。

【0080】

この基材及びこのカバー要素は、互いに直接接触した状態であり得る。あるいは、基材は、カバー要素と直接接触しないことができる。様々な幾何学的現実化が可能である。

【0081】

この構造に隣接して配置されている基材の一部は実質的に400nmと実質的に800nmの間の波長の範囲にある電磁波照射に対して透過性としことができ、これにより、構造中での光学的検出が可能となる。従って、検出のために、可視光を使用し得る。このような検出は、光吸収、光反射又は例えば、検出されるべき分子又は複合体に付着された蛍光標識を用いた蛍光生成に基づいて行い得る。

【0082】

この少なくとも1つの結合要素は、標的分子の分析中における少なくとも2つの固相カップリング手順が少なくとも1つの結合要素の正確に1つにおいて行われるように適合させ得る。換言すれば、複数の固相カップリング手順のために1つの同じ結合要素が使用され得る。例えば、試料から標的分子を捕捉するために、付着された基を有するビーズを使用し得、その後の検出のための基礎として、増幅及び標識された標的分子などの化合物を捕捉するために、その後使用され得る。

【0083】

あるいは、この少なくとも1つの結合要素は、標的分子の分析中における少なくとも2つの固相カップリング手順が少なくとも1つの結合要素の異なる要素において行われるように適合させ得る。例えば、装置は複数の結合要素を含み、標的分子の分析の間の少なくとも2つの固相カップリング操作が少なくとも1つの結合要素の2つ又はそれ以上において起こるように、少なくとも1つの結合要素が適合される。このような構成では、例えば、一方で試料由来の捕捉分子及び他方で標的分子の指標となる検出成分は、結合要素の異なる2つの種類を用いて捕捉される。例えば、試料から標的分子を捕捉するために、ビーズが提供され得る。他方で、試料中の標的分子の存在又は量に対する指標となる成分、例えばレポーター化合物を捕捉するための競合アッセイにおいて、捕捉分子、例えば、ウエル中に固定化されたレポーター特異的捕捉分子を使用し得る。

10

【0084】

本発明の別の典型的な実施形態によれば、方法は、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を形成させること（各捕捉分子は標的核酸のある領域に対して特異的な結合部分とアンカー基を含む。）；複合体を結合要素と接触させること（結合要素は、複合体を結合要素に結合させるために捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている。）；1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供すること；結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉すること；並びに捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することを含む。

【0085】

この1つ又はそれ以上の標的核酸は、一本鎖又は二本鎖核酸であり得る。

20

【0086】

この方法は、1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供する前に、標的核酸を逆転写に供することをさらに含み得る。

【0087】

この方法は、捕捉された、増幅された標的核酸を結合要素から放出させること、並びに1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供する工程及び結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉する工程を反復することをさらに含み得る。このような実施形態において、捕捉された、増幅された標的核酸を結合要素から放出させること、並びに1つ又はそれ以上の核酸を増幅に供する工程及び結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉する工程を反復するサイクルは、少なくとも10回、又は少なくとも20回実施され得る。

30

【0088】

捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値は、捕捉された、増幅された標的核酸を結合要素から放出させ、並びに1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供する工程及び結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉する工程を反復する少なくとも1つのサイクル後に、例えば、各サイクル後に測定され得る。

【0089】

この結合要素は、標的核酸を捕捉することができる1つ又はそれ以上の捕捉分子を含み得る。このような実施形態において、1つ又はそれ以上の捕捉分子により、標的核酸は、結合要素に関して捕捉される。

40

【0090】

この結合要素は、粒子をさらに含み得る。

【0091】

それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を形成させる工程は、複合体を結合要素と接触させる工程とは空間的に隔てて実施し得る。

【0092】

この方法は、標的核酸を標識することをさらに含み得る。この標的核酸は、例えば、1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供する前若しくは間に、及び/又は増幅された標的核酸を、結合要素に関して捕捉する前に、1つ又はそれ以上の検出可能なマーカーを添加することによって標識され得る。この1つ又はそれ以上の検出可能なマーカーは、蛍光マ-

50

カーであり得る。

【0093】

捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる1つ又はそれ以上の値の測定は、得られた1つ又はそれ以上の指標値の時間依存的モニタリングを含み得る。

【0094】

この方法は、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を形成させる前に、1つ又はそれ以上の標的核酸を提供することをさらに含み得る。この1つ又はそれ以上の標的核酸を提供する工程は、生物学的材料から標的核酸を放出させることを含み得る。このような実施形態において、生物学的材料は1つ又はそれ以上の原核細胞、1つ又はそれ以上の真核細胞、1つ又はそれ以上の赤血球及び1つ又はそれ以上のウイルス粒子並びにこれらの混合物からなる群から選択され得る。さらに、生物学的材料からの標的核酸を放出させることは、生物学的材料を溶解試薬と接触させることを含み得る。

10

【0095】

この1つ又はそれ以上の標的核酸を提供することは、1つ又はそれ以上の標的核酸を含む試料を提供することを含み得、試料は、全血、血漿、血清、尿、痰及び脳脊髄液からなる群から選択され得る。

【0096】

この1つ又はそれ以上の標的核酸を提供することは、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を接触させること、1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供すること、結合要素に関して、増幅された核酸を捕捉すること、並びに捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することから空間的に分離して実施し得る。

20

【0097】

この方法は、1つ又はそれ以上の標的核酸をきょう雑物質から分離することをさらに含み得る。

【0098】

さらなる実施形態において、この典型的な実施形態に係る方法は、上記のような装置中で実施される。例えば、方法は、堅固な基材と、該基材を少なくとも部分的に覆う柔軟なカバー要素と、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、及び1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出するように適合された第一の構造と(内容物は、標的核酸などの標的分子を含む。)、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、並びに標的分子を捕捉するように及び標的分子の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定するように適合された少なくとも1つの結合要素を含む第二の構造と、少なくとも第一の構造と第二の構造を相互接続する微小流体ネットワークと、並びに微小流体ネットワークの一部を選択的に閉鎖するために基材に対して柔軟なカバー要素を押圧することによって第一の構造と第二の構造の間に流体流を生じさせるように適合されたアクチュエータユニットとを含む装置において実施され得る。さらに、方法は、液体を収容するように適合された構造と(該構造は、少なくとも1つの結合要素を含み、微小流体ネットワークと流体連通している。)並びに少なくとも1つの結合要素に標的核酸などの標的分子が捕捉される様式で微小流体ネットワークを通じた流体流を調節するように適合され、構造中での標的分子の増幅を調節するように適合され、及び少なくとも1つに結合要素に捕捉された化合物の検出を調節するように適合された調節ユニットとを含む装置において実施し得る。

30

40

【0099】

この装置は、液体を収容するように適合された第一の構造を含み得る。このような実施形態において、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体は、第一の構造中で形成される。

【0100】

さらに、この装置は、1つ又はそれ以上の標的核酸を検出するように構成され、並びに第二のウェルを覆うカバー要素及び該カバー要素を変形させるために作動されるように適合されたアクチュエータユニットを含む第二の構造を含み得る。このような実施形態にお

50

いて、捕捉された標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定することは、第二の構造中で実施され得る。

【0101】

さらに、1つ若しくはそれ以上の標的核酸を増幅に供すること、及び／又は結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉することも、第二の構造中でも実施され得る。

【0102】

捕捉された標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値の測定は、カバー要素を変形させるように作動されるアクチュエータを用いて実施し得る。このカバー要素は、第二の構造又は中央ウェル又は検出ウェルの容積が減少するように変形させ得る。このような実施形態において、捕捉された標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定した後に、第二のウェルの容積は再度増加させ得る。

10

【0103】

本発明の別の典型的な実施形態によれば、以下を含む方法が提供される。レポーター化合物のある量；捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている第一の結合要素；レポーター化合物を捕捉することができる第二の結合要素；レポーター化合物と複合体を形成することができる標的核酸のある量（レポーター化合物との複合体の形成は第二の結合要素によるレポーター化合物の捕捉を阻害する。）；及び捕捉分子のある量（各捕捉分子は標的核酸のある領域に対して特異的な結合部分及びアンカー基を含む。）を提供すること；それぞれ標的核酸及び捕捉分子を含む複合体を形成させること；複合体を第一の結合要素に結合させるために、複合体を第一の結合要素と接触させること；第一の結合要素から標的核酸の量の少なくとも一部を放出させること；標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させること；

20

第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること；並びに第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる1つ又はそれ以上の値を測定すること。

【0104】

このレポーター化合物は、1つ又はそれ以上の検出可能な標識、例えば、2つの検出可能な標識を含み得る。1つ又はそれ以上の検出可能な標識は、蛍光標識であり得る。

【0105】

さらに、このレポーター化合物はオリゴヌクレオチドであり得る。

30

【0106】

この方法は、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる値に基づいて、標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定することをさらに含み得る。

【0107】

この方法は、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定する工程の後に、レポーター化合物の量の残りの一部を第二の結合要素から放出させること；標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させること；第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること；並びに第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標と値を測定することをさらに含み得る。このような実施形態において、放出させる、複合体を形成させる、捕捉する及び測定する工程は、N回のさらなる回数（Nは、1より大きい又は1に等しい整数、例えば、 $N \geq 5$ 、 $N \geq 10$ 又は $N \geq 20$ である。）実施され得る。

40

【0108】

さらに、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程は同時に実施し得る。

【0109】

この方法は、標的核酸を増幅に供することをさらに含み得る。このような実施形態にお

50

いて、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程の前に、標的核酸の増幅が開始され得る。

【0110】

標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程が化学的平衡状態になる前に、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が測定され得る。特に、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成する工程及び第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程を開始してから1秒ないし120秒後に、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が測定され得る。

10

【0111】

この方法は、標的核酸を増幅に供する前に、標的核酸を逆転写に供することをさらに含み得る。

【0112】

第二の結合要素は、第二の結合要素上のレポーター化合物を捕捉することができる1つ又はそれ以上の異なるレポーター特異的捕捉分子を含み得る。このような実施系チアにおいて、捕捉分子はオリゴヌクレオチドであり得る。異なるレポーター特異的捕捉分子が第二の結合要素に関して異なる位置の上に配置され得る。さらに、このレポーター化合物は、レポーター特異的捕捉分子と複合体を形成させることによって、第二の結合要素上に捕捉させ得る。標的核酸と複合体を形成することが可能なレポーター化合物の相互作用部位の少なくとも一部はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成することも可能であり得る。レポーター特異的捕捉分子及び標的核酸は、レポーター化合物との複合体の形成に関して競合し得る。

20

【0113】

この増幅は、二本鎖核酸を変性させる工程を含み得る。二本鎖核酸は、標的核酸とのレポーター化合物の複合体、レポーター特異的捕捉分子とのレポーター化合物の複合体、レポーター化合物の二本鎖及び標的核酸の二本鎖を含み得る。

【0114】

この増幅は、プライマー分子を標的核酸に徐冷させる工程をさらに含み得る。この実施形態において、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び/又は第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成しないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程と同時に徐冷工程が実施され得る。

30

【0115】

この増幅は、循環増幅、例えばPCRであり得る。PCRを実施することは、エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼを使用することを含み得る。この循環増幅は、少なくとも10サイクル又は少なくとも20サイクルを含み得る。

【0116】

第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値は、循環増幅の少なくとも1つのサイクル後に、例えば各サイクル後に測定され得る。さらに、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値が、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定した後に毎回測定され得る。

40

【0117】

第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することは、指標値の時間依存的モニタリングを含み得る。

【0118】

さらに、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値は、レポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値と相関させる校正曲線に基づいて測定され得る。

50

【0119】

この典型的な実施形態の方法は、上に記載されているような装置中で実施することもできる。例えば、方法は、堅固な基材と、該基材を少なくとも部分的に覆う柔軟なカバー要素と、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、及び1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出するように適合された第一の構造と（内容物は、標的核酸を含む。）、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、並びに標的核酸を捕捉するように及び標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定するように適合された少なくとも1つの結合要素を含む第二の構造と、少なくとも第一の構造と第二の構造を相互接続する微小流体ネットワークと、並びに微小流体ネットワークの一部を選択的に閉鎖するために基材に対して柔軟なカバー要素を押圧することによって第一の構造と第二の構造の間に流体流を生じさせるように適合されたアクチュエータユニットとを含む装置において実施され得る。方法は、液体を収容するように適合された構造と（該構造は、少なくとも1つの結合要素を含み、及び微小流体ネットワークと流体連通している。）並びに少なくとも1つの結合要素に標的核酸が捕捉される様式で微小流体ネットワークを通じた流体流を調節するように適合され、構造中での標的核酸の増幅を調節するように適合され、及び少なくとも1つの結合要素に捕捉された化合物の検出を調節するように適合された調節ユニットとを含む装置において実施することもできる。

10

【0120】

この装置は、液体を収容するように適合された第一の構造をさらに含み得る。このような実施形態において、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を形成させる工程は、第一の構造中で実施される。

20

【0121】

この装置は液体を収容するように適合された第二の構造をさらに含むことができ、第一の結合要素、及び必要に応じて第二の結合要素は第二の構造中に付与され得る。このような実施形態において、それぞれ標的核酸及び捕捉分子を含む複合体を形成させること；複合体を第一の結合要素に結合させるために、複合体を第一の結合要素と接触させること；第一の結合要素から標的核酸の量の少なくとも一部を放出させること；標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させること；第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること；並びに第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することは、第二の構造、例えば、中央ウェル中で行われる。

30

【0122】

捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量の指標となる値の測定は、カバー要素を変形させるように作動されるアクチュエータを用いて実施し得る。カバー要素は、中央ウェル又は第二の構造又は検出ウェルの容積が低下するように変形され得る。このような実施形態において、中央ウェルの容積は、同じく、捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定した後に増加させ得る。

【0123】

1つ又はそれ以上の標的核酸を提供することは、1つ又はそれ以上の標的核酸を有する試料を提供することを含み得る。試料は、1 μ Lから50 μ Lの容量を有する液体試料であり得る。さらに、試料は、液体全血試料であり得る。

40

【0124】

方法は、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成していないレポーター化合物と複合体を形成することができる消光化合物の一定量を添加することをさらに含み得る。消光化合物は、標識による検出可能なシグナルの生成を妨害する1つ又はそれ以上の部分（例えば、蛍光色素の励起から生じた発光を「乗っ取る」消光基）を含み得る。例えば、消光基は、レポーター化合物の検出可能な標識によって発せられたシグナル（例えば、蛍光シグナル）を抑制又は阻害することが可能であり得る。このような実施形態において、消光化合物は、1つ又はそれ以上の消光基が複体内のレポーター化合物の検出可能な標識と近接するように、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成して

50

いないレポーター化合物と複合体を形成することが可能であり得る。

【0125】

消光化合物は、オリゴヌクレオチドであり得る。この実施形態において、消光オリゴヌクレオチドは、レポーターオリゴヌクレオチドの配列領域と相補的であり、従って、消光化合物とレポーター化合物間の塩基対形成を可能とする少なくとも1つの特異的な配列領域を含み得る。

【0126】

消光基には、例えば、Black Hole Quenchers (Biosearch Technologies)、Qx1消光物質 (AnaSpec) 及びIowa black quencherなどの一般的な消光物質が含まれ得る。

10

【0127】

消光化合物は、上記装置の第二の構造中に付与され得る。このような実施形態において、消光化合物は、第二の結合要素上に捕捉されていないレポーター化合物と複合体を形成し得る。

【0128】

上記装置の第二の構造は、標的核酸の増幅を開始させる前に、不可逆的に密封され得る。第二の構造の不可逆的な密封は、例えば、第二の構造と接続された熱密封性チャネル及び/又はバルブによって、第二の構造の注入口及び必要に応じて排出口を密封する(例えば、溶接する)ことによって達成され得る。

【0129】

別の典型的な実施形態によれば、二本鎖アンプリコンを形成させるために、少なくとも1つの標的ポリヌクレオチドを増幅すること、アンプリコンを選択的に結合するように構成された表面と(例えば、アンカー基と)、及びアンカー基によって表面に結合されたアンプリコンとアンプリコンを接触させること、アンプリコンの存在を光学的に測定すること、を含む方法が提供される。方法は、光学的に検出する工程後に、アンプリコンを表面から放出させること、放出されたアンプリコンを少なくとも1つ以上の増幅サイクルに供すること、得られたアンプリコンを表面と、及びアンカー基によって表面に結合されたアンプリコンと接触させること、アンプリコンの存在を光学的に測定すること、をさらに含み得る。方法は、N回のさらなる回数(Nは、1より大きい又は1に等しい整数である。)、放出、増幅に供すること、接触及び光学的測定の実施することをさらに含み得る。特に、 $N \geq 5$ 、より具体的には $N \geq 10$ 、さらに具体的には、 $N \geq 20$ である。

20

30

【0130】

この方法は、増幅の工程の前に、標的ポリヌクレオチドを提供すること、それぞれ病原体から放出された標的ポリヌクレオチド及び少なくとも1つの捕捉分子を含む複合体を形成させること(各捕捉分子は標的ポリヌクレオチドのある領域に対して特異的な結合部分とアンカー基を含む。)、並びに複合体を表面と接触させること(表面は、複合体及び表面を非選択的に結合するために、捕捉分子のアンカー基を非選択的に結合するように構成されている。)をさらに含み得る。このような方法において、ポリヌクレオチドを提供することは、標的ポリヌクレオチドを含む、1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出させることを含み得る。放出の工程は、1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスを含む試料を、溶解試薬及び捕捉分子と接触させることを含み得る。試料を溶解試薬及び捕捉分子と接触させる工程は、試料を、凍結乾燥された形態の溶解試薬及び捕捉分子と接触させることを含み得る。

40

【0131】

このような方法において、標的ポリヌクレオチドを提供する工程は付属物質を提供することを含み得、この方法は、表面に結合された複合体と付属物質を分離することをさらに含み得る。このような方法において、付属物質は、ポリヌクレオチドがそこから放出される少なくとも1つの細胞、芽胞又はウイルスの内容物を含むことができる。表面は、粒子の表面であり得る。

【0132】

50

別の典型的な実施形態によれば、1つ又はそれ以上の標的ポリヌクレオチドを提供すること、それぞれ標的ポリヌクレオチド及び少なくとも1つの捕捉分子を含む複合体を形成させること（各捕捉分子は標的ポリヌクレオチドのある領域に対して特異的な結合部分とアンカー基を含む。）、並びに複合体を表面と接触させること（表面は、複合体及び表面を非選択的に結合させるために、捕捉分子のアンカー基を非選択的に結合するように構成されている。）を含む方法が提供される。このような方法において、提供する工程は、1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出させることを含むことができ、内容物はポリヌクレオチドを含む。この方法は、表面に結合された複合体と1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスから放出された他の内容物と分離することをさらに含む得る。

10

【0133】

別の典型的な実施形態によれば、レポーター化合物の量、レポーター化合物を捕捉することができる結合要素及びレポーター化合物と複合体を形成することができる標的核酸の量を含む組成物を形成させること（レポーター化合物との複合体の形成は結合要素によるレポーター化合物の捕捉を阻害する。）；標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させること；結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること；並びに結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することを含む方法が提供される。

【0134】

換言すれば、この方法は、レポーター化合物の量の一部の複合体を標的核酸の量の少なくとも一部と複合体を形成させること及び標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を結合要素上に捕捉させることを含む得る。

20

【0135】

この方法は、バイオセンサーアッセイ装置、微小流体カートリッジ及びラブ・オン・チップ (lab on chip) からなる群から選択される装置中で実施され得る。

【0136】

幾つかの実施形態において、方法は、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値に基づいて、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することをさらに含む。結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値の測定は、指標値の時間依存的モニタリングを含み得る。特定の実施形態において、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値は、レポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値と相関させる校正曲線に基づいて測定される。

30

【0137】

他の実施形態において、方法は、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程の後に、結合要素からレポーター化合物の量の残りの一部を放出させること、結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること、並びに結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することをさらに含む。

40

【0138】

放出、複合体の形成、捕捉並びにレポーター及び/又は標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定する工程は、N回のさらなる回数（Nは、1より大きい又は1に等しい整数である。）実施され得る。特定の実施形態において、Nは、 ≥ 5 、 ≥ 10 又は ≥ 20 である。

【0139】

この方法は、複合体を形成させる工程の前に、結合要素上に、レポーター化合物の量の少なくとも一部を捕捉させること；結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定すること；並びに、捕捉されたレポーター化合物を結合要素から放出させること、をさらに含む得る。

50

【0140】

幾つかの実施形態において、さらに、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程は同時に実施される。

【0141】

さらなる実施形態において、方法は、標的核酸を増幅に供することを含む。標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程の前に、標的核酸を増幅が開始され得る。

【0142】

標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体の形成、及び結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部の捕捉が化学的平衡状態になる前に、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が測定され得る。幾つかの実施形態において、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程から1秒ないし120秒後に、指標値が測定される。

10

【0143】

このレポーター化合物は、1つ又はそれ以上の検出可能な標識、例えば2つの検出可能な標識を含み得る。特定の実施形態において、この1つ又はそれ以上の検出可能な標識は、蛍光標識である。他の特定の実施形態において、このレポーター化合物はオリゴヌクレオチドである。

20

【0144】

他の実施形態において、方法は、標的核酸を増幅に供する前に、標的核酸を逆転写に供することをさらに含む。

【0145】

他の実施形態において、組成物を形成する工程は、第一のレポーター化合物のある量と、第一のレポーター化合物と複合体を形成することができる第一の標的核酸ある量と（第一のレポーター化合物との複合体の形成は結合要素による第一のレポーター化合物の捕捉を阻害する。）、第二のレポーター化合物のある量と、及び第二のレポーター化合物と複合体を形成することができる第二の標的核酸のある量（第二のレポーター化合物との複合体の形成は結合要素による第二のレポーター化合物の捕捉を阻害する。）とを含む組成物を形成することを含む。

30

【0146】

方法において使用される結合要素は、結合要素上にレポーター化合物を捕捉することができる1つ又はそれ以上の異なる捕捉分子を含み得る。この捕捉分子は、レポーター特異的捕捉分子とも表記され得る。特定の実施形態において、この捕捉分子はオリゴヌクレオチドである。異なる捕捉分子は、結合要素に関して、異なる位置の上にも配置され得る。

【0147】

レポーター化合物は、捕捉分子との複合体を形成することによって、結合要素上に捕捉され得る。特定の実施形態において、標的核酸と複合体を形成することが可能なレポーター化合物の相互作用部位の少なくとも一部は捕捉分子と複合体を形成することもできる。他の特定の実施形態において、捕捉分子及び標的核酸は、レポーター化合物との複合体の形成に関して競合する。

40

【0148】

他の実施形態において、増幅は、二本鎖核酸を変性させる工程を含む。二本鎖核酸は、標的核酸とのレポーター化合物の複合体、捕捉分子とのレポーター化合物の複合体、レポーター化合物の二本鎖及び標的核酸の二本鎖を含み得る。

【0149】

この増幅は、プライマー分子を標的核酸に徐冷させる工程も含み得る。標的核酸の量の少なくとも一部とのレポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び/又は結

50

合要素上の標的核酸と複合体を形成しないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程と同時に徐冷工程が実施され得る。

【0150】

この増幅は、循環増幅であり得る。特定の実施形態において、循環増幅はPCRである。循環増幅は、少なくとも10サイクル又は少なくとも20サイクルを含み得る。他の実施形態において、PCRを実施することは、エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼを使用することを含む。

【0151】

結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値は、循環増幅の少なくとも1つのサイクル後に測定され得る。特定の実施形態において、この値は、循環増幅の各サイクル後に測定される。他の実施形態において、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値が、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定した後に毎回測定される。

10

【0152】

方法は、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成していないレポーター化合物と複合体を形成することができる消光化合物の一定量を添加することをさらに含み得る。消光化合物は、標識による検出可能なシグナルの生成を妨害する1つ又はそれ以上の部分(例えば、蛍光色素の励起から生じた発光を「乗っ取る」消光基)を含み得る。例えば、消光基は、レポーター化合物の検出可能な標識によって発せられたシグナル(例えば、蛍光シグナル)を抑制又は阻害することが可能であり得る。このような実施形態において、消光化合物は、1つ又はそれ以上の消光基が複体内のレポーター化合物の検出可能な標識と近接するように、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成していないレポーター化合物と複合体を形成することが可能であり得る。

20

【0153】

消光化合物は、オリゴヌクレオチドであり得る。この実施形態において、消光オリゴヌクレオチドは、レポーターオリゴヌクレオチドの配列領域と相補的であり、従って、消光化合物とレポーター化合物間の塩基対形成を可能とする少なくとも1つの特異的な配列領域を含み得る。

【0154】

消光基には、例えば、Black Hole Quenchers (Biosearch Technologies)、Qx1消光物質(AnaSpec)及びIowa Black消光物質などの一般的な消光物質が含まれ得る。

30

【0155】

別の典型的な実施形態によれば、流体状態の試料を収容するように適合された装置中に、液体全血試料を導入すること;並びに装置中で行われた分析に基づいて、全血試料中のウイルス感染と関連する核酸の存在及び/又は量の指標となる値を測定することを含む、方法が提供される。特に、測定された値は、ウイルス感染と関連する全核酸の存在及び/又は量の指標であり得る。装置中に導入された全血試料の容量は、1µLから50µLであり得る。

【0156】

幾つかの実施形態において、方法は、ウイルス感染と関連する全核酸の存在及び/又は量の指標となる値に基づいて、感染された患者中のウイルス負荷量の指標となる値を測定することをさらに含む。

40

【0157】

他の実施形態において、流体全血試料は、患者から直接装置中に導入される。特に、流体全血試料は、患者の指先の穿刺から取得され得る。方法は、キャピラリーが指先と接触した状態を保ちながら、指先での穿刺から得られた血液をキャピラリーと接触させることをさらに含み得る。一実施形態において、方法は、キャピラリー及び血液を接触させた後に、キャピラリーを装置に接続させることをさらに含む。

【0158】

50

別の典型的な実施形態によれば、1 μ L から 50 μ L の容量を有する流体試料を準備すること；並びに流体試料中のウイルス感染と関連する核酸の存在及び／又は量の指標となる値を測定することを含む方法が提供される。幾つかの実施形態によれば、方法は、流体状態の試料を収容するように適合された装置中に、流体試料を導入すること；並びに装置中で行われた分析に基づいて、流体試料中のウイルス感染と関連する核酸の存在及び／又は量の指標となる値を測定することをさらに含む。測定された値は、ウイルス感染と関連する全核酸の存在及び／又は量の指標であり得る。

【0159】

幾つかの実施形態において、方法は、ウイルス感染と関連する全核酸の存在及び／又は量の指標となる値に基づいて、感染された患者中のウイルス負荷量の指標となる値を測定することをさらに含む。

10

【0160】

さらなる実施形態において、流体試料は、処理されていない全血試料であり得る全血試料である。さらに、流体試料の容量は、1 μ L から 10 μ L であり得る。

【0161】

特定の実施形態において、ウイルス感染は、HIVによる感染である。

【0162】

方法の実施形態中で使用されている装置は、流体試料中のウイルス感染と関連する核酸を検出するために適合され得る。さらなる実施形態において、装置は、バイオセンサーアッセイ装置、微小流体カートリッジ及びラブオンチップからなる群から選択される。

20

【0163】

幾つかの実施形態において、装置中において行われた分析は、試料から核酸を放出させることをさらに含み、放出は流体試料を可溶化試薬と接触させることを含み得る。

【0164】

分析は、複合体を形成することも含み得、各複合体はウイルス感染と関連する核酸及び捕捉分子を含み、各捕捉分子はアンカー基及びウイルス感染と関連する核酸の領域に対して特異的な結合部分を含む。

【0165】

他の実施形態において、装置中で行われた分析は装置の第一の結合要素と複合体を接触させることをさらに含み、第一の結合要素は捕捉分子のアンカー基を結合するように、従って、第一の結合要素へ複合体を結合するように構成されている。複合体を形成する工程は、複合体を第一の結合要素と接触させる工程から空間的に分離して実施され得る。

30

【0166】

幾つかの実施形態において、分析は、典型的にはPCRによる、検出されるべき核酸の増幅をさらに含む装置中で行われる。増幅された核酸は、第一の結合要素に関して捕捉され得る。

【0167】

分析は、ウイルス感染と関連する核酸との複合体を形成することができるレポーター化合物の一定量及びレポーター化合物を捕捉することができる第二の結合要素を準備することをさらに含むことができ、核酸との複合体の形成は、第二の結合要素によるレポーター化合物の捕捉を阻害する。

40

【0168】

幾つかの実施形態において、方法は、ウイルス感染と関連する核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させること；第二の結合要素上のウイルス感染と関連する核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること；並びに第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量の指標となる値を測定すること；並びに、レポーター化合物の量の指標となる値に基づいて、ウイルス感染と関連する核酸の量の指標となる1つ又はそれ以上の値を必要に応じて測定することを含む。

【0169】

50

さらに、方法は、レポーター分子を第二の結合要素から放出させながら、ウイルス感染と関連する核酸を増幅に供することを含み得る。

【0170】

別の典型的な実施形態において、本発明は、HIVを検出するために及び/又は患者中のHIV負荷量を測定するための、本明細書中に定義されている方法の使用に向けられる。

【0171】

別の典型的な実施形態において、本発明は、診断マーカーとしての、全ウイルス核酸の量の使用に関する。特定の実施形態において、全ウイルス核酸の量は、本明細書中に記載されている方法によって測定される。

10

【0172】

他の特定の実施形態において、診断マーカーとして使用される全ウイルス核酸は、HIV核酸である。マーカーとして使用される全HIV核酸の量は、HIVを検出し、患者中のHIV負荷量を測定し、HIVに感染した患者中での疾病の進行をモニタリングし、及び/又はHIVに感染した患者の抗ウイルス治療の効率性をモニタリングするための指標であり得る。全HIV核酸の量は、遊離のウイルス及び細胞に随伴したウイルスに由来する核酸を含むことができ、この核酸は、次いで、遊離のウイルスに由来するRNA、細胞に随伴したウイルスに由来するRNA、プロウイルスDNA、逆転写されたウイルスDNA及び転写されたプロウイルスRNAを含み得る。

【0173】

上記方法の何れか1つを実施するように構成された装置が提供され得る。

20

【0174】

上記態様及びさらなる態様は、本明細書中の以下に記載されるべき実施形態の実施例から明らかとなり、実施形態のこれらの実施例を参照しながら説明される。

【0175】

以下でさらに詳しく典型的な実施形態が記載されているが、本発明を以下の実施形態に限定するものではない。図面中の図解は、模式的なものである。異なる図面中で、類似又は同一の要素が同じ参照記号を用いて提供されている。

【図面の簡単な説明】

【0176】

30

【図1a】図1aは、典型的な実施形態に従うポリヌクレオチドアッセイ法のフローチャートである。

【図1b】図1bは、典型的な実施形態に従って図1aの方法を実施する上で有用な検出システムの図である。

【図1c】図1dは、粒子に結合されたアンプリコンを示している。

【図1d】図1eは、粒子に結合されたアンプリコンを示している。

【図2】図2は、図1b及び1cの検出システムにおける使用に適した、典型的な実施形態に係るアッセイ装置を図解する。

【図3】図3は、装置を作動させるためのステンシルアクチュエータとともに示されている図2のアッセイ装置である。

40

【図4】図4は、新鮮な緩衝液又は凍結乾燥された溶解緩衝液（溶解緩衝液は、機能の喪失なしに、溶解乾燥されたペレットとして保存することができる。）の何れかを用いて実施されたアッセイの結果（RT-PCR産物曲線及びゲル電気泳動）を示している。

【図5】図5は、血液-溶解混合物から得られたオリゴヌクレオチド（すなわち、HIV RNA）を捕捉するために使用されるストレプトアビジンセファローススラリーの量の効果を示しており、ストレプトアビジンセファローススラリーの200 μ l、100 μ l又は50 μ lを用いて実施されたアッセイの結果から、スラリー50 μ lの結合能が実質的に全てのRNA分子を捕捉するのに十分であることが明らかとなる。

【図6】図6は、血液-溶解混合物から得られたオリゴヌクレオチド（すなわち、HIV RNA）を捕捉するために使用されるストレプトアビジンセファローススラリーの量の効

50

果を示しており、ストレプトアビジンセファローススラリーの10 μ L及び7 μ Lを用いて実施されたアッセイの結果から、スラリー10 μ Lの結合能が実質的に全てのRNA分子を捕捉するのに十分であることが明らかとなる。

【図7】図7は、分析されるべきポリヌクレオチドと捕捉プローブの間での複合体形成（すなわち、ハイブリッド形成）に対する温置時間の効果を示しており、温置時間の2分後には、ポリヌクレオチドの大幅な量が回収されないのに対して、温置の10分後には、上清中にRNAを全く検出することができない。

【図8】図8は、分析されるべきポリヌクレオチドと捕捉プローブの間での複合体形成（すなわち、ハイブリッド形成）に対する、温置時間の効果を示している。

【図9】図9は、捕捉工程（すなわち、ストレプトアビジンセファロース粒子への、複合体のビオチンアンカー基の結合）に対する温置時間の効果を示しており、温置時間の5分が、全てのポリヌクレオチド分子を捕捉する（すなわち、RNA分子が上清中に検出されない。）のに十分であることを示している。

【図10】図10は、新鮮なストレプトアビジンセファロース粒子又は数時間又は7日間の保存後の凍結乾燥されたストレプトアビジンセファロース粒子（ストレプトアビジンセファロース粒子は、機能の喪失なしに、溶解乾燥し、再構成することができる。）の何れかを用いて実施されたアッセイ（RT-PCR産物曲線）の結果を示している。

【図11】図11は、新鮮な洗浄緩衝液又は凍結乾燥された洗浄緩衝液（洗浄緩衝液は、機能の喪失なしに、溶解乾燥し、再構成することができる。）の何れかを用いて実施されたアッセイの結果（RT-PCR産物曲線）を示している。

【図12】図12は、ストレプトアビジンセファロース粒子のRT-PCRとの適合性を示すために実施された試験（RT-PCR産物曲線及びアガロースゲル電気泳動）の結果を示しており、ストレプトアビジンセファロース粒子スラリー10 μ Lは、増幅効率の喪失なしに、RT-PCR増幅へ適用され得る。

【図13】図13は、典型的な実施形態に従うアッセイの特異性を示しており、結果（RT-PCR産物曲線及びアガロースゲル電気泳動）は、HIV-RNAがストレプトアビジンセファロース粒子に非特異的に（すなわち、捕捉プローブの不存在下で）結合せず、且つ溶解工程の間にも放出されるヒト血液細胞のRNAが一切捕捉/増幅されないことを示している。

【図14】図14は、ストレプトアビジンセファロース粒子上でのアンプリコン検出の蛍光画像を示しており、ビオチン標識されたアンプリコンは、ストレプトアビジンセファロース粒子上に捕捉され、捕捉されたアンプリコンへの蛍光標識プローブのハイブリッド形成後に可視化された。

【図15】図15は、アガロースゲル電気泳動が、さらなる処理工程（すなわち、溶出、希釈又は濃縮）なしに、増幅のためのテンプレートとして、ストレプトアビジンセファロース粒子上に捕捉されたポリヌクレオチド（すなわち、HIV-RNA）を直接使用できることを示していることを図解する。

【図16】図16は、ストレプトアビジンセファロース粒子の各蛍光画像を示しており、陰性プローブと比べて、より多くの蛍光性ストレプトアビジンセファロース粒子が陽性プローブ中に検出される。

【図17a】図17は、典型的な実施形態に係る装置を模式的に図解している。

【図17b】図17は、典型的な実施形態に係る装置を模式的に図解している。

【図17c】図17は、典型的な実施形態に係る装置を模式的に図解している。

【図17d】図17は、典型的な実施形態に係る装置を模式的に図解している。

【図18】図18は、別の典型的な実施形態に係る装置の前面を図解している。

【図19】図19は、図18の装置の背面を図解している。

【図20】図20は、典型的な実施形態に係る装置の平面図を表している。

【図21】図21は、典型的な実施形態に係る装置の断面図を表している。

【図22】図22は、本発明に従ってポリヌクレオチドを検出するための競合的方法の典型的な実施形態を模式的に図解している。

10

20

30

40

50

【図23】図23は、試料中のヒトポリオウイルス1 DNAの量を測定するための本発明に係る競合的アッセイの典型的な実施形態の結果を示している。

【図24】図24は、試料中のHIV gag/env PCR産物の量を測定するためのアレイをベースとする本発明の競合的アッセイの典型的な実施形態の原理及び結果を示している。

【図25】図25は、図24に示されているアッセイの間の様々な工程を図解している。

【図26A】図26は、本発明のポリヌクレオチドを検出するための競合的方法の典型的な実施形態を模式的に図解している。

【図26B】図26は、本発明のポリヌクレオチドを検出するための競合的方法の典型的な実施形態を模式的に図解している。

【図26C】図26は、本発明のポリヌクレオチドを検出するための競合的方法の典型的な実施形態を模式的に図解している。

【図26D】図26は、本発明のポリヌクレオチドを検出するための競合的方法の典型的な実施形態を模式的に図解している。

【図27A】図27は、試料中のHIVサブタイプB及びHIVサブタイプO₂の量を測定するための本発明の競合的アッセイの典型的な実施形態の結果を示している。

【図27B】図27は、試料中のHIVサブタイプB及びHIVサブタイプO₂の量を測定するための本発明の競合的アッセイの典型的な実施形態の結果を示している。

【図28A】図28は、試料中のHIVサブタイプBの様々な量を測定するための本発明の競合的アッセイの典型的な実施形態の結果を示している。

【図28B】図28は、試料中のHIVサブタイプBの様々な量を測定するための本発明の競合的アッセイの典型的な実施形態の結果を示している。

【図29】図29は、HIV陽性患者から得た血漿及び全血試料中のHIV-1 RNAのそれぞれのコピー数を測定するPCRを基礎とするアッセイの結果を示している。HIV-1 RNAの少なくとも40コピーが検出された試料のみが、分析中に含まれている。

【図30】図30は、HIV-1 RNAの40コピー又はそれ以下が検出された血漿試料に対する、図29に示されているPCRを基礎とするアッセイの結果を示している。

【図31】図31は、図29に従う別のPCRを基礎とするアッセイの結果を示している。

【図32】図32から34は、抗ウイルス療法を受けている異なるHIV陽性患者のそれぞれの血漿及び全血ウイルス負荷量を図示している。

【図33】図32から34は、抗ウイルス療法を受けている異なるHIV陽性患者のそれぞれの血漿及び全血ウイルス負荷量を図示している。

【図34】図32から34は、抗ウイルス療法を受けている異なるHIV陽性患者のそれぞれの血漿及び全血ウイルス負荷量を図示している。

【図35】図35は、全血及び血漿試料中のウイルスのコピー数の典型的な経時変化を図示している。

【図36】図36は、別の典型的な実施形態に従う装置を模式的に示している。

【発明を実施するための形態】

【0177】

詳細な説明

生物学的試料の分析は、1つ又はそれ以上のポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNA、mRNA又はrRNA）が試料中に存在するかどうかを測定することを含み得る。例えば、特定の病原体の存在の指標となるポリヌクレオチドが存在するかどうかを測定するために、試料を分析し得る。

【0178】

本発明の典型的な実施形態によれば、分析のための方法は、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を形成させること（各捕捉分子は標的核酸のある領域に対して特異的な結合部分とアンカー基を含む。）；複合体を結合要素と接触させること（結合要素は、複合体を結合要素に結合させるために捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている

10

20

30

40

50

。) ; 1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供すること ; 結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉すること ; 並びに捕捉された標的核酸の存在及び / 又は量に対する指標となる値を測定することを含む。

【 0 1 7 9 】

本明細書において使用される「標的核酸」という用語は、この方法を使用することによって検出され得る核酸分子(すなわち、捕捉分子と複合体を形成することができる標的核酸、以下参照)を表し得る。このような核酸分子の例には、デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)などの天然に存在する核酸及び人工的に設計された核酸、例えば核酸類縁体、とりわけ、化学的に合成され又は組換え遺伝子技術(例えば、Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照。)を用いて作製されるペプチド核酸(PNA)又はロックされた核酸(LNA; locked nucleic acid)などが含まれる。天然に存在する核酸の具体例には、ゲノムDNA又はcDNA分子などのDNA配列及びhnRNA、mRNA若しくはrRNA分子などのRNA配列又はこれらの逆相補核酸配列が含まれる。このような核酸はあらゆる長さであり得、一本鎖又は二本鎖分子の何れかであり得る。典型的には、標的核酸は、10から10000ヌクレオチドの長さ、例えば、20から2000ヌクレオチド、30から1000ヌクレオチド又は50から500ヌクレオチドの長さである。本明細書において使用される「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド(すなわち、RNA及びDNA分子)の両方を表すものと理解すべきである。

【 0 1 8 0 】

この標的核酸は、ウイルス感染に関連する核酸であり得る。ウイルス感染に関連する核酸は、1つ又はそれ以上のウイルス種によって感染された分析すべき液体試料中に存在するウイルス起源のあらゆる核酸分子(すなわち、そのヌクレオチド配列は、ウイルスゲノム内の対応する配列と同一であり、又は相補的である。)を表す。そこから液体試料が得られた宿主に感染しているウイルスは、あらゆるDNAウイルス(すなわち、DNAゲノムを有するウイルス)又はRNAウイルス(すなわち、RNAゲノムを有するウイルス)であり得る(例えば、Buchanan-Osmond, C. (2003) *Taxonomy and Classification of Viruses*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., vol. 2, p. 1217-1226, ASM Press, Washington DCに概説されている。)。DNAウイルスの例には、とりわけ、パポバウイルス科(例えば、パピローマウイルス)、アデノウイルス科(例えば、アデノウイルス)及びヘルペスウイルス科(例えば、エプシュタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス)の科が含まれる。RNAウイルスの例には、とりわけ、ピコルナウイルス科(例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス)、フラビウイルス科(例えば、C型肝炎ウイルス)、フィロウイルス科(例えば、マールブルグウイルス、エボラウイルス)及びレトロウイルス科(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV))の科が含まれる。幾つかの実施形態において、検出すべき核酸は、レトロウイルス科の一員によって引き起こされる感染症と関連しており、特に、HIV感染症と関連している。本明細書において使用される「HIV」という用語は、HIV-1及びHIV-2種の両方並びにこれらに由来する全てのサブタイプを表す。

【 0 1 8 1 】

多くのDNAウイルス及びレトロウイルス科(注目すべきことに、レトロウイルス科の複製は、RNAウイルスゲノムのDNAへの逆転写を一般に必要とする。)は潜伏性のプロウイルスの形態で、宿主細胞ゲノム中へ遺伝情報を組み込むことができるので、「ウイルス感染症と関連する核酸」という用語は、遊離のウイルス及び細胞に随伴したウイルスに由来する核酸を表すのみならず、宿主のゲノム中に組み込まれているプロウイルスDN

10

20

30

40

50

A分子、逆転写されたウイルスDNA分子（すなわち、ウイルス複製の「中間体」）及びプロウイルスDNA由来の転写物（すなわち、宿主DNAゲノムの転写によって得られたRNA分子）も表す。

【0182】

典型的には、この標的核酸は、単離された形態で本発明の方法に供せられるのではなく、標的核酸の1つ又はそれ以上の種を含むと推測される試料の形態で方法に供せられる。本明細書において使用される「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する分子及び/又は異なる起源から伝達された分子（例えば、宿主細胞に感染している異なる病原体に由来する核酸）など、核酸の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。

10

【0183】

本明細書において使用される「試料」という用語は、本発明を使用することによる分析が予定され、検出すべき標的核酸の1つ又はそれ以上の種を含むと推測されるあらゆる液体を表す。従って、試料は、水又は適切な緩衝液（例えば、T r i s / E D T A）及び様々な生物学的試料中に溶解された、精製された核酸調製物を含み得る。本発明を用いて分析することができる液体試料の例には、とりわけ、有機及び無機の化学溶液、飲料水、下水、全血、血漿、血清、尿、痰、唾液又は脳脊髄液などのヒト及びヒト以外の体液、動物、植物又は組織培養物からの細胞抽出物、原核細胞及び真核細胞懸濁物、ファージ調製物などが含まれる。

【0184】

本明細書において使用される「全血」という用語は、その構成成分を全て有する血液を表す。換言すれば、全血は、赤血球、白血球及び血小板などの血液細胞、並びにその中に血液細胞が懸濁されている血漿の両方を含む。

20

【0185】

この試料は、この試料を本発明の方法に供する前に、必要に応じて行われる試料の精製及び/又は加工に由来し得る希釈剤、溶媒又は緩衝液などの1つ又はそれ以上のさらなる因子をさらに含み得る。しかしながら、本発明の幾つかの実施形態において、分析される試料は、処理されていない全血試料などの処理されていない試料である。本明細書において使用される「処理されていない」という用語は、（例えば、患者からの血液採取によって）試料を収集した後に、及び試料を本発明の方法に供する前に、試料のさらなる処理（例えば、分画法、乾燥/再構成など）が行われないことと理解すべきである。

30

【0186】

このような処理されていない試料を含む典型的な核酸検出法は、以下に記載されている。

【0187】

分析すべき流体試料の容量は、1 μ l から 50 μ l の範囲、典型的には、1 μ l から 45 μ l 又は 1 μ l から 40 μ l 又は 1 μ l から 30 μ l 又は 1 μ l から 25 μ l 又は 1 μ l から 20 μ l 又は 1 μ l から 15 μ l の範囲であり得る。特定の実施形態において、流体試料の容量は 1 μ l から 10 μ l の範囲である。しかしながら、全血試料が分析される場合には、50 μ l を超える試料容量も本発明の範囲に属する。

40

【0188】

本明細書において使用される「捕捉分子」という用語は、特異的な結合動作及び/又は特徴的な反応性を示し、このため、標的核酸との複合体の形成に適したあらゆる分子を表す。核酸は、典型的には、捕捉分子として使用される。捕捉分子として使用することができる核酸の例には、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）などの天然に存在する核酸及びとりわけ、ペプチド核酸（PNA）又はロックされた核酸（LNA）などの核酸類縁体が含まれる。天然に存在する核酸の具体例には、ゲノムDNA又はcDNA分子などのDNA配列及びhnRNA、mRNA若しくはrRNA分子などのRNA配列又はこれらの逆相補核酸配列が含まれる。このような核酸はあらゆる長さであり得、一本鎖又は二本鎖分子の何れかであり得る。典型的には、核酸捕捉分子は、10 から 150 又

50

クレオチドの、例えば、20から100ヌクレオチド又は30から70ヌクレオチドの長さを有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。特定の実施形態において、この捕捉分子は、所定の流体試料中に存在する目的のあらゆる標的核酸を増幅するために、PCR中でのプライマーとして使用される。

【0189】

幾つかの実施形態において、本発明において使用される捕捉分子は、標的核酸（例えば、ウイルス感染と関連する核酸）の配列領域に対して相補的であり、従って、捕捉分子と検出すべき核酸の間での塩基対形成を可能とする少なくとも1つの特異的配列領域（すなわち、上に引用されている結合部分）を含み得る。典型的には、この特異的結合領域は、少なくとも20ヌクレオチド長、例えば、少なくとも30ヌクレオチド又は少なくとも40ヌクレオチドである。特に、捕捉分子の結合領域のヌクレオチド配列は、標的核酸の対応するヌクレオチド配列に対して相補的である。本明細書において使用される「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの両方（すなわち、RNA及びDNA分子）を表すものとして理解すべきである。

10

【0190】

捕捉分子は、分析すべき流体試料を導入する前に、液体を収容するように適合された上記装置の少なくとも1つの構造のうち1つ又はそれ以上に（例えば、凍結乾燥された形態又は乾燥された形態で）提供され得る。あるいは、捕捉分子は、試料とともに（すなわち、同時に）装置内に導入することができ、又は試料が既に導入された後に導入することができる。

20

【0191】

本発明の範囲内において、捕捉分子の1つ又はそれ以上の種を使用し得る。「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する1つ又はそれ以上の核酸分子などの捕捉分子の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。同時に使用される捕捉分子の2以上の種は、「ライブラリー」とも称される。このようなライブラリーには、少なくとも2つの異なる分子が含まれるのみならず、より多くの異なる分子、例えば、少なくとも5つの異なる種、少なくとも10の異なる種、少なくとも30の異なる種などが含まれ得る。これらライブラリーは、アレイ要素の形態で又は他のあらゆる空間的配置でも存在し得る。

【0192】

本発明の幾つかの実施形態において、この装置中で実施される分析は、検出すべき標的核酸と捕捉分子を含む複合体を装置の結合要素と接触させることをさらに含み、結合要素は、結合要素へ複合体を結合させるために、捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている。

30

【0193】

本明細書において使用される「結合要素」又は「支持要素」という用語は、共有的相互作用又は非共有的相互作用により、捕捉分子のアンカー基を介して、捕捉分子（及び、このような捕捉分子を含むあらゆる複合体も）を結合することができるあらゆるマトリックスを表す。このようなマトリックスの例は、とりわけ、アレイ要素の基材又は磁気ビーズ（例えば、Dynabeads[®]）としても知られる、常磁性ポリスチロールビーズ及びラテックスビーズなどの合成粒子並びにCPGなどの多孔性表面を含む。捕捉分子の種類、アンカー基の種類及び予定される用途に応じて、各事例において、極めて多様な結合が可能である。例えば、捕捉分子のアンカー基がピオチン部分であり得る場合には、これは、結合要素に付着されているアビジン又はストレプトアビジン基に結合され得る。あるいは、捕捉分子は、結合要素に結合されたチミジン残基の対応する伸長と相互作用するアデノシン残基の伸長（例えば、10アデノシン残基）を含み得る。アンカー基を含む特異的な結合試薬は、様々な業者から市販されており、本分野において十分に確立されている（例えば、上記、Sambrook, J. et al., 上記; Ausubel, F. M. et al., 上記及びLottspeich, F., and Zorbach H., 上記参照）。

40

50

【0194】

結合要素は、分析されるべき流体試料を導入する前に、上記装置の少なくとも1つの構造の1つ又はそれ以上の中に付与され得る。これにより、結合要素は、捕捉分子と同じ1つ若しくはそれ以上の構造中に付与することができ、又は少なくとも1つの異なる構造中に付与することができる。典型的には、標的核酸との捕捉分子の複合体を形成させる工程は、複合体を結合要素と接触させる工程とは空間的に分離して、すなわち、この装置の異なる構造又はウェル又は反応チャンパー中で行われる。例えば、標的核酸との捕捉分子の複合体を形成させる工程は「溶解ウェル」中で実施することができ、複合体を結合要素と接触させる工程は、図17中に引用されている「中央ウェル」中で実施される。このような実施形態において、捕捉分子及び結合要素は、液体を収容するように適合された異なる構造中に通常付与される。試料を添加する前に、結合要素を装置中に付与する代わりに、試料とともに（すなわち、同時に）又は試料が既に導入された後に、結合要素を装置中に導入され得る。

10

【0195】

特定の実施形態において、方法は、増幅（すなわち、さらなる検出を容易にするために、試料をさらなる分析に供する前に、試料中に存在する標的核酸の量を増加させること）に、標的核酸を供することをさらに含む。典型的には、標的核酸の増幅は、循環増幅を用いて達成される。循環増幅は、2に等しい又は2より多い増幅サイクルのあらゆる数を含み得る。通常、循環増幅反応は、少なくとも10サイクル又は少なくとも20サイクルを含む。

20

【0196】

典型的な循環増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。PCRは、例えば、Sambrook他、上記及びAusubel, F.M.他、上記に詳しく記載されている、分子生物学における確立された標準的方法である。典型的には、PCRは、熱安定性DNAポリメラーゼを使用することによって、二本鎖DNA分子を増幅するために使用される。幾つかの実施形態において、循環増幅において使用されるDNAポリメラーゼは、エキソヌクレアーゼ活性、特に5' → 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する。このようなDNAポリメラーゼの例には、とりわけ、TaqDNAポリメラーゼ又はTthDNAポリメラーゼ（これらは、複数の業者から市販されている。）が含まれる。

30

【0197】

標的核酸がRNA分子である場合には、本発明の方法は、標的核酸を増幅に供する前に、逆転写（すなわち、対応するRNA分子からDNA分子を生成すること）に供することをさらに含み得る。逆転写は、分子生物学における別の標準的方法であり、同じく、例えば、Sambrook他、上記及びAusubel, F.M.他、上記に記載されている。

【0198】

この目的（すなわち、核酸増幅）のために、上記装置は、反応チャンパー内の温度を調節及び/又は制御するための1つ又はそれ以上の温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットを含み得る。このような温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットは、1つ又はそれ以上の別々の加熱及び/又は冷却要素を含むことができ、これは装置の1つ又はそれ以上の反応チャンパーに直接接触させ得る。典型的には、1つ又はそれ以上の加熱及び/又は冷却要素は、熱伝導性材料から作製される。このような熱伝導性材料の例には、とりわけ、ケイ素、酸化アルミニウムセラミックのようなセラミック材料及び/又は高い等級の鋼、アルミニウム、銅又は真鍮のような金属が含まれる。本発明を実施するのに適した適切な温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットの典型的な詳細な記述は、国際特許出願WO 01/02094号（その関連する内容は、明示的に、本明細書に引用される。）にも見出すことができる。

40

【0199】

例えば、液体を収容するように適合された構造内の温度を調節/制御することは、電気伝導性材料製のチャンパー体を使用することによっても達成することができる。本明細書

50

において使用される「チャンパー体」は、装置の少なくとも1つの構造又は反応チャンパーを少なくとも部分的に取り囲む固形体を表すものと理解すべきである。少なくとも1つの構造は、少なくとも部分的に、チャンパー体の一体的コンポーネントであり得る（すなわち、チャンパー体と同じ材料で作製されている。）。電気伝導性材料の例には、5から30%の炭素繊維を有するポリアミド、5から30%の炭素繊維を有するポリカーボネート、2から20%のステンレス鋼繊維を有するポリアミド及び5から40%の炭素繊維を有するポリフェニレンスルフィドなどの電気伝導性合成材料が含まれる。さらに、チャンパー体は、膨張及び先細りを含むように設計され得、これにより、反応チャンパー又は対応する表面の特異的な加熱が可能となる。

【0200】

液体を収容するための構造は、構造中の圧力が増加するように、増幅されるべき標的核酸を含む溶液で満たされ得る。構造中の圧力の増加は、加熱要素及び/又は冷却要素に対して、構造の柔軟なカバー要素に力を加え得る。

【0201】

構造中の温度の測定は、本分野において十分に確立された様々な方法によって、例えば、一体化された抵抗センサー、半導体センサー、光導波管センサー、多色性色素又は液晶を使用することによって実施することができる。さらに、反応チャンパー中の温度は、チャンパー体中の一体化された温度センサー、高温計若しくは赤外線センサーを使用することによって、又はその上で検出が行われる表面における屈折率若しくは試料のpH値などのパラメータの温度依存性変化を測定することによって、例えば、pH感受性の指標の色変化を測定することによって測定することができる。

【0202】

通常、PCRなどの増幅は、循環様式で繰り返し実行される変性、プライマーの徐冷及びプライマーの伸長という3つの基礎的な工程を含む。しかしながら、増幅は、それぞれ、第一の「真の」増幅サイクルの前に最初の変性工程を、及び/又は最終増幅サイクルの完了後に最終伸長工程をさらに含み得る。幾つかの実施形態において、標的核酸増幅は、（少なくとも）二本鎖核酸を変性させる工程及び/又は標的核酸においてプライマー分子を徐冷及び伸長させる組み合わせられた工程を含む（すなわち、「二段階PCR」）。

【0203】

典型的には、変性工程は、分析すべき試料を、典型的には0.5秒から5分間、94から95の温度まで加熱して、二本鎖核酸テンプレートの鎖を解離させることを含む。分析すべき試料をこのような変性工程に供することは、二本鎖標的核酸及び（結合要素に付着された）標的核酸との捕捉分子の複合体を含む試料中で二本鎖核酸の同時変性をもたらす（すなわち、可能とし）、後者は、結合要素からの標的核酸の放出をもたらす。

【0204】

典型的には、徐冷工程は、変性された核酸テンプレート鎖へのプライマー分子の会合（すなわち、ハイブリッド形成/塩基対形成）を可能とするために、分析すべき試料を、典型的には1秒から5分間、40から65の温度まで冷却することを含む。使用される反応温度は、徐冷されるべきプライマー分子のヌクレオチド配列組成、融解温度、分子内折り畳みを形成する傾向（例えば、二本鎖ヘアピン又はターン構造の形成）など、徐冷されるべきプライマー分子の化学的及び/又は物理的特性に依存する。本発明の幾つかの実施形態内で、分析すべき試料をこのような徐冷工程に供することは、二本鎖標的分子の再会合及び捕捉分子との標的核酸の複合体の形成をもたらす（すなわち、可能とし）、後者は、結合要素上への標的核酸の捕捉又は再捕捉をもたらす。従って、本発明の幾つかの実施形態において、徐冷工程は、捕捉分子との複合体を形成することによって、標的核酸を結合要素上に捕捉する工程と同時に行われる。

【0205】

最後に、典型的な伸長工程は、DNAポリメラーゼによってDNAテンプレート鎖の完全長コピーを作製するために、ハイブリッド形成されたプライマー分子を伸長させることを含む。増幅されるDNA断片の長さは、使用されるプライマーの対の5'末端によって

10

20

30

40

50

決定される。典型的には、伸長工程は、1秒から10分間、70から72の温度で行われる。本発明の幾つかの実施形態において、分析されるべき試料をこのような伸長工程に供することは、徐冷工程の間に形成された、標的核酸とのプライマーの複合体を伸長させて、その後を検出できる検出可能なマーカを必要に応じて取り込んだ、二本鎖の増幅された核酸断片を生成させることによって、分析されるべき標的核酸の複製をもたらす得る。

【0206】

幾つかの実施形態において、例えば、安全上の理由のために、中央ウェル又は第二の構造は、標的核酸の増幅を開始する前に、不可逆的に密封され得る。中央ウェルの不可逆的な密封は、中央ウェルの注入口及び必要に応じて、排出口を密封することによって達成され得る。例えば、中央ウェルと接続されたチャンネル及びノ又はバルブは、加熱密封され又は溶接され得る。プラスチックが融解され及びチャンネル又はバルブがロックされるように、熱いピンをチャンネル又はバルブと接触させることによって、プラスチックチャンネル又はバルブを、例えば、加熱密封させ得る。

10

【0207】

特定の実施形態において、方法は、典型的には、結合要素に関して（すなわち、標的核酸をその上に固定化する）、分析されるべき試料をPCRに供することによって増幅された標的核酸を捕捉することをさらに含む。既に上述されているように、アンカー基を介して結合要素になお結合されている捕捉分子との複合体を形成させることによって、結合要素に関して、標的核酸を捕捉し得る。

20

【0208】

方法は、捕捉された、増幅された標的核酸を結合要素から放出させること、並びに1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供する工程及び結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉する工程を反復することをさらに含む得る。本明細書において使用される「放出」は、結合要素からの標的核酸の脱離又は結合解除を含み得る。これは、例えば、何れかの共有結合の切断を介して酵素的に達成することができ、又は相補的塩基対形成を介して、核酸捕捉分子によって標的核酸が結合要素に結合されている場合には、その中でアッセイが行われている構造中の温度を増加させ、これにより、核酸鎖分離（すなわち、変性）をもたらすことによって達成することができる。

【0209】

このような実施形態において、捕捉された、増幅された標的核酸を結合要素から放出させること、並びに1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供する工程及び結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉する工程を反復するサイクルは、少なくとも5回、少なくとも10回、少なくとも20回、少なくとも30回、少なくとも50回又は少なくとも100回実施し得る。捕捉された標的核酸の存在及びノ又は量に対する指標となる値を測定する工程は、捕捉された、増幅された標的核酸を結合要素から放出させ、並びに1つ又はそれ以上の標的核酸を増幅に供する工程及び結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉する工程を反復する少なくとも1つのサイクル後に、例えば、各サイクル後に実施し得る。

30

【0210】

それぞれ標的核酸と捕捉分子（各捕捉分子は標的核酸のある領域に対して特異的な結合部分とアンカー基を含む）を含む複合体を形成する工程は、複合体を結合要素（結合要素は、複合体を結合要素に結合するために、捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている。）と複合体を接触させる工程とは、空間的に分離して実施し得る。このような実施形態において、方法は、液体を収容するように適合された少なくとも2つの構造を含む装置中で実施される。少なくとも2つの構造は、例えば、微小流体ネットワークと流体連通され得る。例えば、方法は、図18及び図19に図解されているように、装置500中で実施され得る。それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体は、第一の構造502の中で形成され得る。次いで、複合体は、第二の構造512へ移すことができ、第二の構造512中において、複合体は、捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている上記

40

50

結合要素と接触される。

【0211】

本明細書において使用される「捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定する」という用語は、結合要素上に捕捉された(又は再捕捉された)標的核酸の定性的及び/又は定量的測定を可能とする電気伝導度、酸化還元電位、光学的吸収、蛍光強度又は生物発光などのパラメータの検出/測定を表す。これらのパラメータの1つのみを測定し得るが、2以上のパラメータ(例えば、電気伝導度及び適切な標識によって引き起こされた蛍光シグナルの強度)を同時に又は連続して測定することも可能である。

【0212】

検出反応を実施するために、標的核酸は1つ又はそれ以上の検出可能な標識で標識され得る。本明細書において使用される「1つ又はそれ以上の検出可能な標識」という用語は、化学的、物理的又は酵素的反応中に検出可能な化合物又は標識を直接的に又は間接的に生成する1つ又はそれ以上の適切な化学物質又は酵素を含むあらゆる化合物又は部分であり得る。従って、このような標識は、レポーター化合物との相互作用を形成することが可能であることにより、目的のレポーター化合物の検出のために必要であり得、又は検出を促進する。本明細書において使用される場合、この用語は、検出可能な標識そのもの(「マーカーとも称される。’)及び1つ又はそれ以上のこのような検出可能なマーカーに結合されたあらゆる化合物の両方を含むものと理解すべきである。さらに、標識による検出可能なシグナルの生成を妨害する部分(例えば、消光物質及び蛍光色素が互いに近接している限り、蛍光色素の励起から生じた発光を「乗っ取る」消光物質)も検出可能な標識に属し得る。検出可能な標識は、例えば、修飾された及び/又は標識されたりボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの形態で、標的核酸に取り込まれ又は付着され得る。

【0213】

使用され得る検出可能なマーカー又は標識には、化学的、物理的又は酵素的な反応において、検出可能な化合物又はシグナルを直接的に又は間接的に生成するあらゆる化合物が含まれる。

【0214】

標識は、本分野において周知の方法によって達成することができる(例えば、Sambrook, J. et al., 上記; 及び Lottspeich, F., and Zorbach, H., 上記参照)。標識は、とりわけ、蛍光標識、酵素標識、着色された標識、発色性標識、発光標識、放射性標識、ハプテン、ピオチン、金属錯体、金属及びコロイド状の金から選択することができる。標識のこれらの種類の全てが、本分野において十分に確立されている。このような標識によって媒介される物理的反応の例は、放射性標識を使用するときには、X線の照射又は励起又は発光時の蛍光又はリン光の発光である。アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ及び β -ラクタマーゼは、発色性反応産物の形成を触媒する酵素標識の例である。特定の実施形態において、検出可能な標識は、蛍光標識である。多数の蛍光標識が本分野において十分に確立されており、様々な業者から市販されている(例えば、The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed. (2006), Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USAを参照)。

【0215】

このような標識を検出するために、支持要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定するのに適した検出システムを使用し得る。検出システムは、装置500に接続され得る。典型的には、検出システムは、第二の構造512の1つに対向して、必要に応じて、検出が行われる特定の表面領域に対向して配置される。適切な検出システムの選択は、検出のために使用される標識の種類又は実施される分析の種類などの幾つかのパラメータに依存する。様々な光学的及び非光学的検出システム

10

20

30

40

50

が本分野において十分に確立されている。方法とともに使用することができる検出システムの一般的な記述は、例えば、「L o t t s p e i c h , F . , 及び Z o r b a s H . 、上記」に見出すことができる。

【0216】

典型的には、検出システムは光学的検出システムである。幾つかの実施形態において、方法の実施は、蛍光、光学的吸収、共鳴転移などのパラメータの測定に基づき得る単純な検出システムを含む。

【0217】

さらなる実施形態において、検出システムは、蛍光色素で標識された、スペクトル的に励起された核酸の蛍光強度の比較に基づく。蛍光とは、特定の波長の光によって励起されたときに、それ自身の光を放射し、特徴的な吸収及び発光挙動をもたらす特定の分子の能力である。特に、蛍光シグナルの定量的検出は、蛍光顕微鏡の改変された方法を用いて行われる（概説に関して、例えば、L i c h t m a n , J . W . , a n d C o n c h e l l o , J . A . (2 0 0 5) N a t u r e M e t h o d s 2 , 9 1 0 - 9 1 9 ; Z i m m e r m a n n , T . (2 0 0 5) A d v . B i o c h e m . E n g . B i o t e c h n o l . 9 5 , 2 4 5 - 2 6 5 を参照されたい。)。これにより、それぞれ光吸収及び光放射から生じたシグナルは、1つ又はそれ以上のフィルター及び/又は重晶石によって分離され、適切な検出装置上に画像化される。データ解析は、デジタル画像処理を用いて実施される。画像処理は、本分野において周知の幾つかのソフトウェアパッケージ（M a t h e m a t i c a D i g i t a l I m a g e P r o c e s s i n g 、 E I K O N A 又は I m a g e - P R O など）を用いて実現することができる。このような目的に適した別のソフトウェアは、I c o n o c l u s t ソフトウェア（C l o n d i a g C h i p T e c h n o l o g i e s G m b H , J e n a , G e r m a n y ）である。

【0218】

適切な検出システムは、落射蛍光又は暗視野蛍光顕微鏡などの蛍光シグナルを測定するための古典的方法を基礎とし得る（例えば、L a k o w i c z , J . R . (1 9 9 9) P r i n c i p l e s o f F l u o r e s c e n c e S p e c t r o s c o p y , 2nd e d . , P l e n u m P u b l i s h i n g C o r p . , N Y (参照により、その全体が組み込まれる。) 中に概説されている。) 。

【0219】

使用し得る別の光学検出システムは、点光源を介して、レンズの焦平面中で対象物が照射される共焦点蛍光顕微鏡である。重要なことは、点光源、対象物及び点光検出装置は、光学的に共役（c o n j u g a t e d ）平面上に位置していることである。このような共焦点系の例は、例えば、「D i a s p r o , A . (2 0 0 2) C o n f o c a l a n d 2 - p h o t o n - m i c r o s c o p y : F o u n d a t i o n s , A p p l i c a t i o n s a n d A d v a n c e s , W i l e y - L i s s , H o b r o k e n , N J 」に詳しく記載されている。通常、蛍光 - 光学系は、自動焦点を持たない蛍光顕微鏡、例えば固定された焦点を有する蛍光顕微鏡である。

【0220】

同じく使用し得るさらなる蛍光検出法には、とりわけ、全内部蛍光顕微鏡（t o t a l i n t e r n a l f l u o r e s c e n c e m i c r o s c o p y ）（例えば、A x e l r o d , D . (1 9 9 9) S u r f a c e f l u o r e s c e n c e m i c r o s c o p y w i t h e v a n e s c e n t i l l u m i n a t i o n , i n : L a c e y , A . (e d .) L i g h t M i c r o s c o p y i n B i o l o g y , O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , N e w Y o r k , 3 9 9 - 4 2 3 ） 、 蛍光寿命画像化顕微鏡（f l u o r e s c e n c e l i f e t i m e i m a g i n g m i c r o s c o p y ）（例えば、D o w l i n g , K . e t a l . (1 9 9 9) J . M o d . O p t i c s 4 6 , 1 9 9 - 2 0 9 参照）、蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T ; 例 ば、P e r i a s a m y , A . (2 0 0 1) J . B i o m e d . O p t i

10

20

30

40

50

cs6, 287-291参照)、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET;例えば、Wilson, T., and Hastings, J.W. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 197-230参照)及び蛍光相関分光法(例えば、Hess, S.T. et al. (2002) *Biochemistry* 41, 697-705参照);が含まれる。

【0221】

特定の実施形態において、検出は、蛍光又は生物発光消光物質対のそれぞれの形成を基礎とするFRET又はBRETを用いて行われる。FRETの使用は、例えば、「Liu, B. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 589-593」及び「Szollosi, J. et al. (2002) *J. Biotechnol.* 82 251-266」にも記載されている。BRETの使用は、例えば、「Prinz, A. et al. (2006) *Chembiochem.* 7, 1007-1012」及び「Xu, Y. et al (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 151-156」中にも記載されている。

10

【0222】

捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる1つ又はそれ以上の値を測定することは、得られた1つ又はそれ以上の指標値の時間依存的モニタリング(すなわち、測定/検出工程の反復実施及び経時的な指標値の過程のモニタリング)を含み得る。

【0223】

標的核酸を提供する工程は、試料中に含まれる生物学的材料から標的核酸を放出させることを含み得る。この目的のために、試料は、(例えば、以下に記載されているような温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットを使用することによって)細胞膜及び/又はウイルスキャプシドを破壊するために加熱され得る。幾つかの実施形態において、この放出工程は、溶解試薬、例えば、細胞膜及び/又はウイルスのキャプシドを崩壊させる1つ又はそれ以上の界面活性剤を含む試薬と流体試料を接触させることを含む。このような溶解試薬は本分野において周知であり(例えば、「Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)」、多くの業者によって市販されている。

20

30

【0224】

この方法は、1つ又はそれ以上の標的核酸をきょう雑物質から分離することをさらに含み得る。

【0225】

標的核酸を提供することは、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を結合要素と接触させる工程、標的核酸を増幅に供する工程、結合要素に関して、増幅された標的核酸を捕捉する工程、並びに捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定する工程から空間的に分離して実施し得る。例えば、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体がその中で形成される同じ構造502中に、標的核酸を提供し得る。

【0226】

さらなる実施形態において、方法は、上記のような装置中で実施される。例えば、装置は第一のウェル502を含むことができ、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体は、第一のウェル502中で形成される。さらに、装置は第二のウェル512を含むことができ、捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することは、1つ又はそれ以上の標的核酸を検出するように構成された第二のウェル512中で実施され得る。第二のウェル512は、第二のウェルを覆うカバー要素及び該カバー要素を變形するように作動されるように適合されたアクチュエータユニットを含み得る。さらに、1つ若しくはそれ以上の標的核酸を増幅に供すること、及び/又は結合要素に関して、増幅された標的核酸を(再)捕捉することも、第二のウェル512中でも実施され得る。

40

【0227】

50

捕捉された標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる１つ又はそれ以上の値の測定は、カバー要素を変形させるように作動されるアクチュエータを用いて実施し得る。このような実施形態において、カバー要素は、検出ウェル５１２の容積が減少するように変形させ得る。さらに、捕捉された標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定した後に、第二のウェルの容積は再度増加させ得る。

【 0 2 2 8 】

本発明の別の典型的な実施形態によれば、以下を含む方法が提供される。

【 0 2 2 9 】

a) レポーター化合物のある量；捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている第一の結合要素；レポーター化合物を捕捉することができる第二の結合要素；レポーター化合物と複合体を形成することができる標的核酸のある量（レポーター化合物との複合体の形成は第二の結合要素によるレポーター化合物の補足を阻害する。）；捕捉分子のある量（各捕捉分子は標的核酸のある領域に対して特異的な結合部分及びアンカー基を含む。）を提供すること；

b) それぞれ標的核酸及び捕捉分子を含む複合体を形成すること；

c) 複合体を第一の結合要素に結合させるために、複合体を第一の結合要素と接触させること；

d) 第一の結合要素から標的核酸の量の少なくとも一部を放出させること；

e) 標的核酸の量の少なくとも一部とのレポーター化合物の量の一部の複合体を形成させること；

f) 第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること；並びに

g) 第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定すること。

【 0 2 3 0 】

本明細書において使用される「レポーター分子」又は「レポーター化合物」という用語は、１つ又はそれ以上の標的核酸と複合体を形成することができ、及び支持要素（例えば、第二の結合要素）上に捕捉されることができるあらゆる分子を表し、標的核酸との複合体の形成は、支持要素（例えば、第二の結合要素）上へのレポーター化合物の捕捉を阻害する。これにより、本明細書において使用される「複合体を形成することができる」という用語は、レポーター分子と標的核酸との間のあらゆる相互作用を表し得る。換言すれば、この用語は、標的との相互作用を媒介する、レポーター分子中に含まれる共通の又は異なる結合領域を介して（相補的ヌクレオチド配列間のワトソン・クリック塩基対形成を介するなど）達成され得る互いへの分子の結合を表す。典型的には、相互作用は可逆的である。同様に、「支持要素上に捕捉されていること」又は「第二の結合要素上に捕捉されていること」という用語は、所定の支持要素とのレポーター分子のあらゆる直接又は間接的（例えば、捕捉分子を介した；以下参照）相互作用も表す。この相互作用も、一般に可逆的である。

【 0 2 3 1 】

一般に、レポーター分子は、１０から１００ヌクレオチド、例えば、１５から５０ヌクレオチド、１５から４０ヌクレオチド又は２０から３０ヌクレオチドの長さを有する核酸分子（すなわち、上述のようなRNA又はDNA分子）であり得る。通常、レポーター分子は、一本鎖核酸分子（すなわち、オリゴヌクレチド）である。レポーター化合物は、検出されるべき標的核酸へのこのようなレポーター分子の結合が第二の結合要素上のレポーター分子の捕捉を阻害するように構成されている。核酸レポーター分子は、（例えば、標的核酸の少なくとも部分的に相補的な領域へ結合して、例えば、レポーター分子と検出されるべき標的核酸との間のワトソン・クリック塩基対形成を可能とすることによって）標的核酸と相互作用することができるのみならず、第二の結合要素上にも捕捉され得る少なくとも一つの特異的な結合領域（本明細書では、「相互作用部位」とも称される。）を含み得る。典型的には、レポーター分子中に含まれた特異的な結合領域は、少なくとも１２ヌク

10

20

30

40

50

レオチド長、例えば、少なくとも15ヌクレオチド又は少なくとも18ヌクレオチド又は少なくとも22ヌクレオチドである。特定の実施形態において、レポーター分子の結合部分のヌクレオチド配列は、標的核酸の対応するヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0232】

レポーター分子の1つ又はそれ以上の種を使用し得る。「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する1つ又はそれ以上の核酸分子などのレポーター分子の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。

【0233】

本明細書において使用される「第一の結合要素」は、上述のような結合要素であり得る。例えば、第一の結合要素は、共有的相互作用又は非共有的相互作用により、捕捉分子のアンカー基を介して、捕捉分子（及び、このような捕捉分子を含むあらゆる複合体も）を結合することができるあらゆる固体マトリックスを表し得る。このようなマトリックスの例には、とりわけ、磁気ビーズ（例えば、Dynabeads^(R)）としても知られる、常磁性ポリスチロールビーズ）及びラテックスビーズなどの合成粒子が含まれる。

【0234】

本明細書において使用される「第二の結合要素」は、上述のような結合要素であり得る。例えば、第二の結合要素は、直接的に（例えば、レポーター分子中に含まれるアンカー基を介して）又は共有若しくは非共有的相互作用によって、レポーター分子を第二の結合要素に捕捉することができるレポーター特異的捕捉分子の1つ又はそれ以上の種を介した間接的な様式で、その上にレポーター分子を捕捉することができるあらゆる固体マトリックスを表す。使用可能な第二の結合要素の例には、とりわけ、アレイ要素の基材（例えば、顕微鏡スライド、ウェハー又はセラミック材料）が含まれる。

【0235】

本明細書において使用される「レポーター特異的捕捉分子」という用語は、これをレポーター分子との複合体の形成（すなわち、レポーター分子への結合）に適するものとする特異的な結合挙動及び/又は特徴的な反応性を示す第二の結合要素上に、例えば、付着され、又は固定化されるあらゆる分子を表す。核酸は、典型的には、捕捉分子として使用される。レポーター特異的捕捉分子として使用することができる核酸の例には、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）などの天然に存在する核酸及びとりわけ、ペプチド核酸（PNA）又はロックされた核酸（LNA）などの核酸類縁体が含まれる。天然に存在する核酸の具体例には、ゲノムDNA又はcDNA分子などのDNA配列及びhnRNA、mRNA若しくはrRNA分子などのRNA配列又はこれらの逆相補核酸配列が含まれる。このような核酸はあらゆる長さであり得、一本鎖又は二本鎖分子の何れかであり得る。典型的には、レポーター特異的捕捉分子は、10から100ヌクレオチドの、例えば、15から50ヌクレオチド又は20から30ヌクレオチドの長さを有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0236】

レポーター特異的捕捉分子は、レポーター分子を結合するように、例えば、レポーター特異的捕捉分子と検出されるべき核酸との間の塩基対形成を介したレポーター分子の相補的配列領域と相互作用するように構成された少なくとも1つの特異的配列領域（すなわち、結合領域）を含み得る。典型的には、特異的結合領域は、少なくとも12ヌクレオチド長、例えば、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド又は少なくとも22ヌクレオチドである。特定の実施形態において、レポーター特異的捕捉分子の結合領域のヌクレオチド配列は、レポーター分子の対応するヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0237】

幾つかの実施形態において、標的核酸と複合体を形成することが可能なレポーター化合物の相互作用部位の少なくとも一部はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成することもできる。換言すれば、レポーター特異的捕捉分子と標的核酸は、レポーター化合物と複合体を形成することに関して競合する。すなわち、レポーター特異的捕捉分子中に含まれ

10

20

30

40

50

る各結合領域と標的核酸は、レポーター分子の同一の又は少なくとも類似の対応する配列を認識する。本明細書において使用される「類似の配列」という用語は、1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドのミスマッチ（すなわち、ヌクレオチドの非相補的な対）のみが異なり、又は1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドの付加、挿入若しくは欠失（すなわち、付加された又は欠如しているヌクレオチド残基）が異なる配列を表す。従って、レポーター特異的捕捉分子及び標的核酸中に含まれる各結合領域は少なくとも部分的に同一である。本明細書において使用される「部分的に同一」という用語は、上述のように1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドのみが異なる配列、又は重複する結合部位を有する配列、すなわち、共通のヌクレオチド配列を共有するが、配列領域の少なくとも1つの他の部分が異なる配列を表す。しかしながら、レポーター特異的捕捉分子及び標的核酸中に含まれる各結合領域と標的核酸は、レポーター分子の異なる、重複していない（例えば、隣接する）配列を認識することも可能であるが、レポーター特異的捕捉分子又は標的核酸の、レポーター分子への結合は、他の分子の結合を立体的に妨害する。

10

【0238】

幾つかの実施形態において、一方で、レポーター化合物と標的核酸の複合体を形成する工程と、他方で、（例えば、レポーター特異的捕捉分子との複合体を形成することによって）第二の結合要素上へレポーター化合物を捕捉する工程との間の化学的平衡は、上述されているように、それぞれ、（レポーター化合物配列に関して）レポーター特異的捕捉分子及び（標的核酸に関して）レポーター化合物の配列の類似性及び/又は部分的同一性の程度を変動させることによって影響を受け得る。

20

【0239】

例えば、標的核酸配列に関するレポーター化合物配列の結合領域より、レポーター化合物配列に関する結合領域が短くなるように、又は長くなるように、レポーター特異的捕捉分子配列を選択し得る。このようにして、レポーター特異的捕捉分子に関するレポーター化合物の結合親和性と比べた標的核酸に関するレポーター化合物の結合親和性を増加又は減少させ得る。

【0240】

レポーター特異的捕捉分子の1つ又はそれ以上の種を使用し得る。「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する1つ又はそれ以上の核酸分子などのレポーター特異的捕捉分子の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。同時に使用されるレポーター特異的捕捉分子の2以上の種は、ライブラリーとも称され得る。このようなライブラリーには、少なくとも2つの異なる分子が含まれるのみならず、より多くの異なる分子、例えば、少なくとも10つの異なる種、少なくとも20の異なる種、少なくとも50の異なる種なども含まれ得る。ライブラリーは、第二の結合要素に関して、異なる位置の上にも配置され得る。例えば、ライブラリーは、アレイ又は他のあらゆる空間配置の形態で存在し得る。

30

【0241】

本明細書において使用される「アレイ（「マイクロアレイ」とも称される。）用語は、結合要素（例えば、第二の結合要素）（基材とも称される。）上への、レポーター特異的捕捉分子などの捕捉分子の確定された空間的配置（レイアウト）を表し、アレイ中の各分子の位置は別々に決定される。典型的には、マイクロアレイは、特定のパターンで配置され得る確定された部位又は所定の領域（いわゆる、アレイ要素又はスポット）を含み、各アレイ要素は、捕捉分子の唯一の種を典型的に含む。支持体、例えば、第二の結合要素上のレポーター特異的捕捉分子などの捕捉分子の配置は、共有又は非共有の相互作用を用いて作製され得る。しかしながら、捕捉分子は、方法を実施するために使用される装置の反応チャンバー内に直接固定化され得る（以下参照）。

40

【0242】

「標的核酸」は、上述のような標的核酸であり得る。例えば、標的核酸は、HIVなどのウイルス感染と関連する核酸であり得る。

【0243】

50

典型的には、標的核酸は、単離された形態で本発明の方法に供されず、標的核酸の1つ又はそれ以上の種を含むと推測される上記試料の形態で供される。本明細書において使用される「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する分子及び/又は異なる起源に由来する分子(例えば、宿主細胞に感染している異なる病原体に由来する核酸)などの核酸の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。

【0244】

本明細書において使用される「試料」という用語は、上に記載されているように、あらゆる液体試料を表す。分析可能な液体試料の例には、とりわけ、全血などのヒト及びヒト以外の体液が含まれ得る。本発明の幾つかの実施形態において、分析される試料は、上記のように、処理されていない全血試料などの処理されていない試料である。分析されるべき流体試料の容積は、1 μ lから50 μ lの範囲、典型的には、1 μ lから45 μ l又は1 μ lから40 μ l又は1 μ lから30 μ l又は1 μ lから25 μ l又は1 μ lから20 μ l又は1 μ lから15 μ lの範囲であり得る。特定の実施形態において、流体試料の容積は、1 μ lから10 μ lの範囲である。しかしながら、全血試料が分析される場合には、50 μ lを超える試料容量も、本発明の範囲に属する。

10

【0245】

本明細書において使用される「第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定する」という用語は、第二の結合要素上に捕捉された(又は再捕捉された)レポーター分子の定性的及び/又は定量的測定を可能とする、電気伝導度、酸化還元電位、光学的吸収、蛍光強度又は生物発光などのパラメータの検出/測定を表す。これらのパラメータの1つのみを測定することができるが、2以上のパラメータ(例えば、電気伝導度及び適切な標識によって引き起こされた蛍光シグナルの強度)を同時に又は連続して測定することも可能である。

20

【0246】

幾つかの実施形態において、方法は、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値に基づいて、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することをさらに含む。すなわち、ある試料中に存在する1つ又はそれ以上の標的核酸の存在及び/又は量は、標的核酸/レポーター分子複合体の形成の前に存在するレポーター化合物の存在及び/又は量と複合体形成後に第二の結合要素上に捕捉されているレポーター化合物の量との差に基づいて計算され得る。

30

【0247】

検出反応を実施するために、レポーター化合物は、上述のように、1つ又はそれ以上の検出可能な標識を含み得る。例えば、レポーター化合物は、2つの検出可能な標識を含み得る。特定の実施形態において、検出可能な標識は、蛍光標識である。多数の蛍光標識が本分野において十分に確立されており、様々な業者から市販されている(例えば、The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed. (2006), Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USAを参照)。

40

【0248】

このような標識を検出するために、方法を実施するために使用される装置は、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定するのに適した検出システムをさらに含み得る。例えば、上述のように結合要素上に捕捉された標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定するのに適した検出システムを使用し得る。

【0249】

幾つかの実施形態において、方法は、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程の後に、第二の結合要素からレポーター化合物の量の残りの一部を放出させること、結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること、並びに第二の結合要素上に捕捉さ

50

れたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することをさらに含む。本明細書において使用される「放出」という用語は、第二の結合要素からのレポーター分子の剥離又は結合解除を表す。これは、例えば、何れかの共有結合の切断を介して酵素的に、又は相補的な塩基対形成を介して、レポーター特異的核酸捕捉分子によって、核酸レポーター分子が第二の結合要素に結合されている場合には、その中でアッセイが行われている構造中の温度を増加させて、核酸鎖の分離（すなわち、変性）をもたらすことによって達成され得る。

【0250】

さらなる実施形態において、放出、複合体の形成、捕捉及び測定の工程は、N回のさらなる回数（Nは、1より大きい又は1に等しい整数である。）反復される。換言すれば、方法は、環状様式で実施される。特定の実施形態において、整数Nは、 ≥ 5 、 ≥ 10 又は ≥ 20 である。

10

【0251】

さらに、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程は同時に実施し得る。

【0252】

特定の実施形態において、方法は、増幅（すなわち、さらなる検出を容易にするために、試料をさらなる分析に供する前に、試料中に存在する標的核酸の量を増加させること）に、標的核酸を供することをさらに含む。典型的には、標的核酸の増幅は、循環増幅を用いて達成される。循環増幅は、2に等しい又は2より多い増幅サイクルのあらゆる数を含み得る。通常、循環増幅反応は、少なくとも10サイクル又は少なくとも20サイクルを含む。

20

【0253】

典型的な循環増幅は、上述のようなポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。典型的には、PCRは、熱安定性DNAポリメラーゼを使用することによって、二本鎖DNA分子を増幅するために使用される。幾つかの実施形態において、循環増幅において使用されるDNAポリメラーゼは、エキソヌクレアーゼ活性、特に5' -> 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する。このようなDNAポリメラーゼの例には、とりわけ、Taq DNAポリメラーゼ又はTth DNAポリメラーゼ（これらは、複数の業者から市販されている。）が含まれる。この5' -> 3'エキソヌクレアーゼ活性を用いることによって、DNAポリメラーゼは、標的核酸に結合されているレポーター分子の標識された5'末端を核酸分解的に攻撃して、このようなレポーター分子の進行性分解をもたらす。その結果、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の量は、増幅反応の各サイクルの間に、さらに減少する。場合により、使用されるDNAポリメラーゼは、特定の配列位置において新生DNA鎖に付加された誤ったヌクレオチドを除去するために3' -> 5'エキソヌクレアーゼ活性（「校正活性」）を示し得る。両エキソヌクレアーゼ活性を有するこのようなDNAポリメラーゼの例には、とりわけ、Pwo DNAポリメラーゼ及びPfu DNAポリメラーゼ（何れの酵素も、様々な業者から市販されている。）が含まれる。

30

【0254】

標的核酸がRNA分子である場合には、方法は、増幅に供する前に、上述のように、標的核酸を逆転写に供することをさらに含み得る。

40

【0255】

標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程の前に、標的核酸の増幅が開始され得る。すなわち、レポーター化合物が標的核酸との複合体を形成し、及び標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物が第二の結合要素上に捕捉され得るようにしながら、標的核酸が増幅に供される。

【0256】

この目的（すなわち、核酸増幅）のために、構造又は反応チャンバー、例えば中央ウェル502内の温度を調節及び/又は制御するための、上述のような1つ又はそれ以上の温

50

度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットをさらに含み得る図18及び図19に図解されている装置500を、方法を実施するために使用し得る。反応チャンパー中の温度の測定は、上述のように行うことができる。

【0257】

液体を収容するための構造には、構造中の圧力が増加されるように、増幅されるべき標的核酸を含む溶液を満たすことができ、構造中の圧力増加は、加熱要素及び/又は冷却要素に対して構造の1つ又はそれ以上の柔軟なカバー要素に力を加える。例えば、核酸標的の増幅を行うために、1つ又はそれ以上の柔軟なカバー要素は、凸状の屈曲を行い、これにより、加熱要素及び/又は冷却要素に対して1つ又はそれ以上のカバー要素を押し、効率的な熱的伝導を可能とするように、構造を満たし得る。

10

【0258】

反応チャンパー中の温度の測定は、上述のように実施することができる。

【0259】

通常、PCRなどの増幅は、環状様式で繰り返し行われる3つの基本的工程(変性、プライマーの徐冷及びプライマーの伸長)を含む。しかしながら、増幅は、それぞれ、第一の「真の」増幅サイクルの前の最初の変性工程及び/又は最終増幅サイクルの完了後の最終伸長工程をさらに含み得る。方法の幾つかの実施形態において、標的核酸増幅は、二本鎖核酸を変性させる工程及び/又は標的核酸においてプライマー分子を徐冷し、及び伸長する統合された工程を(少なくとも)含む(すなわち、「二段階PCR」)。

【0260】

20

変性工程は、94から95の温度まで、典型的には、0.5秒から5分間、分析されるべき試料を加熱することを含み、これにより、二本鎖核酸テンプレートの鎖解離をもたらす。分析されるべき試料をこのような変性工程に供することによって、二本鎖標的分子、二本鎖レポーター分子、標的核酸とのレポーター化合物の複合体及び(第二の結合要素に付着された)レポーター特異的捕捉分子とのレポーター化合物の複合体など、試料中の二本鎖核酸の同時変性をもたらし得(すなわち、可能とし得)、後者は、第二の結合要素からのレポーター化合物の放出をもたらす。

【0261】

徐冷工程は、変性された核酸テンプレート鎖へのプライマー分子の会合(すなわち、ハイブリッド形成/塩基対)を可能とするために、40から65の温度まで、典型的には1秒から5分間、分析されるべき試料を冷却することを含む。使用された反応温度は、プライマー分子のヌクレオチド配列組成、融点、分子内折り畳み(例えば、二本鎖ヘアピン又は折り返し構造の形成)の傾向など、徐冷されるべきプライマー分子の化学的及び/又は物理的特異性に依存する。このような徐冷工程へ分析されるべき試料を供することによって、二本鎖標的分子の再会合、二本鎖レポーター分子の再会合、核酸標的とのレポーター化合物の複合体の形成及び標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の、レポーター特異的捕捉分子との複合体の形成(後者は、第二の結合要素上のレポーター化合物の捕捉又は再捕捉をもたらす。)をもたらし得る(すなわち、可能とし得る。)。従って、幾つかの実施形態において、徐冷工程は、レポーター化合物の量の一部の、標的核酸の量の少なくとも一部との複合体を形成させる工程と同時に、及び/又は第二の結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程と同時に行われる。

30

40

【0262】

最後に、伸長工程は、DNAポリメラーゼによって、DNAテンプレート鎖の完全長コピーを作製するために、ハイブリッド形成されたプライマー分子を伸長させることを含む。増幅されたDNA断片の長さは、使用されるプライマーの対の5'末端によって決定される。典型的には、伸長工程は、70から72の温度で、1秒から10分間行われる。分析されるべき試料をこのような伸長工程に供することは、その後を検出され得る必要に応じて標識されたレポーター化合物を取り込んだ二本鎖の増幅された核酸断片を生じさせるために、徐冷工程中に形成された、標的核酸の量の少なくとも一部とのレポーター化合

50

物の量の一部の複合体を伸長させることにより、分析されるべき標的核酸の複製をさらにもたらし得る。

【0263】

幾つかの実施形態において、例えば、安全上の理由のために、中央ウェル又は第二の構造は、標的核酸の増幅を開始する前に、不可逆的に密封され得る。中央ウェルの不可逆的な密封は、中央ウェルの注入口及び必要に応じて、排出口を密封することによって達成され得る。例えば、中央ウェルと接続されたチャンネル及び/又はバルブは、加熱密封され、又は溶接され得る。プラスチックが融解され及びチャンネル又はバルブがロックされるように、熱いピンをチャンネル又はバルブと接触させることによって、プラスチックチャンネル又はバルブは、加熱密封され得る。

10

【0264】

検出反応を実施するために、レポーター化合物は、上述のような1つ又はそれ以上の検出可能な標識(例えば、蛍光標識)で標識され得る。検出可能な標識は、例えば、修飾された及び/又は標識されたりボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの形態で、レポーター分子へ取り込ませ、又は付着させ得る。このような標識を検出させるために、上記検出システム(例えば、光学的検出システム)を使用し得る。

【0265】

標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値の検出/測定は、アッセイが行われている間に、1回だけ又は2回以上実施し得る。単一のアッセイの間に2以上の検出工程が実施される場合、幾つかの実施形態では、得られた結果の平均値を計算し得る。とりわけ、1つ若しくはそれ以上の標的核酸の存在、長さ若しくは配列を決定するために及び/又はその/それらの量を計算するために、検出の1つ又はそれ以上のサイクルにおいて得られたデータを分析し、当業者に公知の適切なコンピュータソフトウェアを用いて、数学的に処理し得る。

20

【0266】

幾つかの実施形態において、特にレポーター化合物が標的核酸より過剰であれば、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させ、及び第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉することが化学的平衡状態になる前に、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が測定される。例えば、測定/検出工程は、増幅反応の徐冷工程の間に実施される。しかしながら、徐冷工程の完了後に(すなわち、伸長工程の間に又は伸長工程の完了後に)測定/検出反応を実施することも可能である。

30

【0267】

さらなる実施形態において、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成する工程及び第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程を開始してから1秒ないし120秒(例えば、1、5、10、15、20、30、60又は120秒)後に、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が測定される。

40

【0268】

他の実施形態において、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が、変性、徐冷及び伸長工程を含む循環増幅の少なくとも1つのサイクル後に、例えば、徐冷工程の間に又は徐冷工程の完了後に測定される。特定の実施形態において、値は、循環増幅の各サイクル後に測定される。他の特定の実施形態において、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値が、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定した後に毎回測定される。

【0269】

幾つかの実施形態において、第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及

50

び／又は量に対する指標となる値の測定は、指標値の時間依存的モニタリング（すなわち、測定／検出工程の反復実施及び経時的な指標値の過程のモニタリング）を含む。

【0270】

さらなる実施形態において、標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値は、レポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる値を標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値と関連させる較正曲線に基づいて測定される。

【0271】

方法は、液体を収容するように適合された構造と（該構造は、少なくとも1つの結合要素を含み、及び微小流体ネットワークと流体連通している。）並びに少なくとも1つの結合要素に標的分子が捕捉される様式で微小流体ネットワークを通じた流体流を調節するように適合され、構造中での標的核酸の増幅を調節するように適合され、及び少なくとも1つに結合要素に捕捉された化合物の検出を調節するように適合された調節ユニットとを含む上述のような装置において実施され得る。例えば、方法は、堅固な基材と、該基材を少なくとも部分的に覆う柔軟なカバー要素と、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、及び1つ又はそれ以上の細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出するように適合された第一の構造と（内容物は、標的分子を含む。）、基材中に形成され、液体を収容するように適合され、並びに標的分子を捕捉するように及び標的分子の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定するように適合された少なくとも1つの結合要素を含む第二の構造と、少なくとも第一の構造と第二の構造を相互接続する微小流体ネットワークと、並びに微小流体ネットワークの一部を選択的に閉鎖するために基材に対して柔軟なカバー要素を押圧することによって第一の構造と第二の構造の間に流体流を生じさせるように適合されたアクチュエータユニットとを含む装置において実施され得る。

【0272】

例えば、第一のウェル502を含む装置500を使用することができる。このような実施形態において、それぞれ標的核酸と捕捉分子を含む複合体を形成させる工程は、第一のウェル中で実施される。

【0273】

装置500は、第二のウェル512を含み得る。このような実施形態において、第一の結合要素及び第二の結合要素は、第二のウェル中に付与され、及び複合体を第一の結合要素に結合させるために、複合体を第一の結合要素と接触させる工程；第一の結合要素から標的核酸の量の少なくとも一部を放出させる工程；標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程；第二の結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程；並びに第二の結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる1つ又はそれ以上の値を測定する工程は、第二のウェル中で行われる。

【0274】

捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる値の測定は、カバー要素を変形させるように作動されるアクチュエータを用いて実施し得る。カバー要素は、中央ウェル又は第二の構造又は検出ウェルの容積が低下するように変形され得る。このような実施形態において、中央ウェルの容積は、同じく、捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量に対する指標となる値を測定した後に増加させ得る。

【0275】

方法は、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成していないレポーター化合物と複合体を形成することができる消光化合物の一定量を添加することをさらに含み得る。消光化合物は、標識による検出可能なシグナルの生成を妨害する1つ又はそれ以上の部分（例えば、蛍光色素の励起から生じた発光を「乗っ取る」消光基）を含み得る。例えば、消光基は、レポーター化合物の検出可能な標識によって発せられたシグナル（例えば、蛍光シグナル）を抑制又は阻害することが可能であり得る。このような実施形態において、消光化合物は、1つ又はそれ以上の消光基が複体内のレポーター化合物の検出可能な標識と近接するように、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成して

10

20

30

40

50

いないレポーター化合物と複合体を形成することが可能であり得る。

【0276】

消光化合物は、オリゴヌクレオチドであり得る。この実施形態において、消光オリゴヌクレオチドは、レポーターオリゴヌクレオチドの配列領域と相補的であり、従って、消光化合物とレポーター化合物間の塩基対形成を可能とする少なくとも1つの特異的な配列領域を含み得る。

【0277】

消光基には、例えば、Black Hole Quenchers (Biosearch Technologies)、QxI消光物質 (AnaSpec) 及びIowa Black消光物質などの一般的な消光物質が含まれ得る。

10

【0278】

消光化合物は、上記装置の第二の構造中に付与され得る。このような実施形態において、消光化合物は、第二の結合要素上に捕捉されていないレポーター化合物と複合体を形成し得る。

【0279】

上記装置の第二の構造は、標的核酸の増幅を開始させる前に、不可逆的に密封され得る。第二の構造の不可逆的な密封は、例えば、第二の構造と接続された熱密封性チャネル及び/又はバルブによって、第二の構造の注入口及び必要に応じて排出口を密封する(例えば、溶接する)ことによって達成され得る。

【0280】

20

本発明の別の典型的な実施形態によれば、方法は、

- レポーター化合物のある量、レポーター化合物を結合することができる結合要素及びレポーター化合物を結合することができる標的核酸の量のある量を含む組成物を形成させること(レポーター化合物への標的核酸の結合は結合要素へのレポーター化合物の結合を阻害する。);

- 標的核酸の量の少なくとも一部と、レポーター化合物の量の一部とを結合させること

;

- 結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部とを結合させること; 並びに

- 結合要素に結合されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定すること

30

を含む。

【0281】

本明細書中において使用される「標的核酸」という用語は、方法を使用することによって検出することができるあらゆる核酸分子(すなわち、レポーター化合物との複合体を形成することができる標的核酸; 下記参照)を表す。このような核酸分子の例には、デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)などの天然に存在する核酸及び組換え遺伝子技術を用いて化学的に合成され又は作製された人工的に設計された核酸(例えば、とりわけ、ペプチド核酸(PNA)又は鍵型核酸(LNA)などの核酸類縁体)(例えば、Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。)が含まれる。天然に存在する核酸の具体例には、ゲノムDNA若しくはcDNA分子などのDNA配列並びにhnRNA、mRNA若しくはrRNA分子などのRNA分子又はこれらの逆相補核酸配列が含まれる。このような核酸は、あらゆる長さであり得、一本鎖又は二本鎖分子であり得る。典型的には、標的核酸は、10から10,000ヌクレオチドの長さ、例えば、20から2,000ヌクレオチド、30から1,000ヌクレオチド又は50から500ヌクレオチドである。本明細書において使用される「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチド(すなわち、RNA及びDNA分子)の両方を表すものと理解す

40

50

べきである。

【0282】

典型的には、標的核酸は単離された形態で方法に提供されるのではなく、標的核酸の1つ又はそれ以上の種を含むことが推測される試料の形態で提供される。本明細書において使用される「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する分子及び/又は異なる起源から生じた分子(例えば、宿主細胞に感染している異なる病原体に由来する核酸)などの核酸の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。

【0283】

本明細書において使用される「試料」という用語は、方法を使用することによって分析されるべき、及び検出されるべき標的核酸の1つ又はそれ以上の種を含むと推測されるあらゆる液体を表す。従って、試料という用語は、水又は適切な緩衝液(例えば、Tris/EDTA)中に溶解された精製された核酸調製物及び様々な生物学的試料を含む。方法を用いて分析することができる液体試料の例には、とりわけ、有機及び無機の化学的溶液、飲料水、下水道、全血、血漿、血清、尿、痰、唾液又は脳脊髄液、動物、植物又は組織培養物から得た細胞抽出物、原核及び真核細胞懸濁液、ファージ調製物などのヒト及びヒト以外の体液が含まれる。

10

【0284】

試料は、試料を本発明の方法に供する前に、必要に応じて行われる試料の精製及び/又は加工から生じ得る希釈液、溶媒又は緩衝液などの1つ又はそれ以上のさらなる薬剤をさらに含み得る。しかしながら、幾つかの実施形態において、分析される試料は、処理されていない全血試料などの処理されていない試料である。本明細書において使用される「処理されていない」という用語は、(例えば、患者からの採血によって)試料を集めた後に、及び試料を本発明の方法に供する前に、さらなる試料の処理(例えば、分画法、乾燥/再構成など)は行われなことを理解すべきである。

20

【0285】

このような処理されていない試料を含む典型的な核酸検出法は、以下に記載されている。

【0286】

本明細書において使用される「レポーター分子」又は「レポーター化合物」という用語は、1つ又はそれ以上の標的核酸と複合体を形成することができ及び結合要素上で捕捉され得るあらゆる分子を表し、標的核酸との複合体の形成は結合要素上でのレポーター化合物の捕捉を阻害する。これにより、本明細書において使用される「複合体を形成することができる」という用語は、レポーター分子と標的核酸との間のあらゆる相互作用を表す。換言すれば、この用語は、(相補的ヌクレオチド配列間のワトソン・クリック塩基対形成などの)標的との相互作用を媒介するレポーター分子中に含まれる共通の又は異なる結合領域を介して達成され得る、分子の相互結合を表す。典型的には、相互作用は可逆的である。同様に、「結合要素上に捕捉されている」という用語は、ある結合要素とのレポーター分子のあらゆる直接的又は間接的(例えば、捕捉分子を介した、以下参照)な相互作用も表す。この相互作用も、一般に、可逆的である。

30

【0287】

一般に、レポーター分子は、10から100のヌクレオチド、例えば、15から50のヌクレオチド、15から40のヌクレオチド又は20から30のヌクレオチドの長さを有する核酸分子(すなわち、上記のようなRNA又はDNA分子)であり得る。通常、レポーター分子は、一本鎖核酸分子(すなわち、オリゴヌクレオチド)である。検出されるべき標的核酸へのこのようなレポーター分子の結合が結合要素上のレポーター分子の捕捉を阻害するように、レポーター化合物が構成されている。核酸レポーター分子は、(例えば、標的核酸の少なくとも部分的に相補的な配列領域へ結合し、これにより、例えば、レポーター分子と検出されるべき標的核酸との間のワトソン・クリック塩基対形成を可能にすることによって)標的核酸との相互作用を可能するのみならず、結合要素上に捕捉することもできる少なくとも1つの特異的な結合領域(本明細書において、「相互作用部位」とも

40

50

称される。)を含み得る。典型的には、レポーター分子中に含まれる特異的結合領域は、少なくとも12ヌクレオチド長、例えば、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド又は少なくとも22ヌクレオチドである。特定の実施形態において、レポーター分子の結合部分のヌクレオチド配列は、標的核酸の対応するヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0288】

レポーター分子の1つ又はそれ以上の種を使用し得る。「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する1つ又はそれ以上の核酸分子など、レポーター分子の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。

【0289】

本明細書において使用される「結合要素」又は「支持部材」という用語は、(例えば、レポーター分子中に含まれるアンカー基を介して)直接的に又は共有若しくは非共有相互作用によって結合要素へレポーター分子を捕捉することができる捕捉分子の1つ若しくはそれ以上の種を介した間接的様式で、その上でレポーター分子を捕捉することができるあらゆる固体マトリックスを表す。使用することができる結合要素の例は、とりわけ、アレイ要素の基材(例えば、顕微鏡スライド、ウェハー又はセラミック材料)又は磁気ビーズ(例えば、Dynabeads^(R))としても知られる常磁性ポリスチロールビーズ)及びラテックスビーズなどの合成粒子を含む。

【0290】

この実施形態において使用される「捕捉分子」という用語は、捕捉分子をレポーター分子との複合体の形成(すなわち、レポーター分子への結合)に適したものとする、特異的な結合挙動及び/又は特徴的な反応性を示す結合要素上に含まれる(例えば、結合要素に付着され又は結合要素上に固定化された)あらゆる分子を表す。この実施形態において使用される捕捉分子は、レポーター特異的捕捉分子とも表記され得る。典型的には、核酸が捕捉分子として使用される。捕捉分子として使用することができる核酸の例は、それぞれ、標的及びレポーター分子に関連して上述されている。このような核酸は、あらゆる長さであり得、一本鎖又は二本鎖分子であり得る。典型的には、核酸捕捉分子は、10から200ヌクレオチドの、例えば、15から100ヌクレオチド又は20から70ヌクレオチドの長さを有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0291】

捕捉分子は、レポーター分子を結合するように、例えば、捕捉分子と検出されるべき核酸との間の塩基対形成を介したレポーター分子の相補的配列領域と相互作用するように構成された、少なくとも1つの特異的配列領域(すなわち、結合領域)を含み得る。典型的には、特異的結合領域は、少なくとも15ヌクレオチド長、例えば、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド又は少なくとも50ヌクレオチドである。特定の実施形態において、捕捉分子の結合領域のヌクレオチド配列は、レポーター分子の対応するヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0292】

幾つかの実施形態において、標的核酸と複合体を形成することができるレポーター化合物の相互作用部位の少なくとも一部は、捕捉分子とも複合体を形成することもできる。換言すれば、捕捉分子と標的核酸は、レポーター化合物との複合体の形成に関して競合する。すなわち、捕捉分子及び標的核酸中に含まれるそれぞれの結合領域は、レポーター分子の同じ又は少なくとも類似の対応する配列を認識する。本明細書において使用される「類似の配列」という用語は、1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドの不一致(すなわち、ヌクレオチドの非相補的な対)のみが異なる配列又は1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドの付加、挿入若しくは欠失(すなわち、ヌクレオチド残基の付加又は欠如)が異なる配列を表す。従って、捕捉分子及び標的核酸中に含まれるそれぞれの結合領域は、少なくとも部分的に同一である。本明細書において使用される「部分的に同一」という用語は、上述されているように、1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドにおいてのみ異なる配列、又は重複する結合部位を有する配列、すなわち、共通のヌクレオチド配列を共有

10

20

30

40

50

するが、配列領域の少なくとも1つの他の部分が異なる配列を表す。しかしながら、捕捉分子及び標的核酸中に含まれているそれぞれの結合領域は、レポーター分子の異なる重複していない（例えば、隣接する）配列を認識するが、レポーター分子への捕捉分子又は標的核酸の結合は、他の分子の結合を立体的に妨害することも可能である。

【0293】

幾つかの実施形態において、一方で、レポーター化合物と標的核酸の複合体を形成する工程と、他方で、（例えば、レポーター特異的捕捉分子との複合体を形成することによって）第二の結合要素上にレポーター化合物を捕捉する工程との間の化学的平衡は、上述されているように、それぞれ、（レポーター化合物配列に関して）レポーター特異的捕捉分子及び（標的核酸に関して）レポーター化合物の配列の類似性及び/又は部分的同一性の程度を変動させることによって影響を受け得る。

10

【0294】

例えば、標的核酸配列に関して、レポーター化合物配列の結合領域より、レポーター化合物配列に関して結合領域がより短くなるように、又はより長くなるように、レポーター特異的捕捉分子配列を選択し得る。このようにして、レポーター特異的捕捉分子に関するレポーター化合物の結合親和性と比した標的核酸に関するレポーター化合物の結合親和性を増加又は減少させ得る。

【0295】

捕捉分子の1つ又はそれ以上の種を使用し得る。「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する1つ又はそれ以上の核酸分子など、捕捉分子の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。同時に使用される捕捉分子の2以上の種は、「ライブラリー」とも称される。このようなライブラリーは、少なくとも2つの種を含むが、多くのさらなる異なる分子、例えば、少なくとも5つの異なる種、少なくとも10の異なる種、少なくとも30の異なる種なども含み得る。ライブラリーは、結合要素に関して異なる位置上にも配置され得る。例えば、ライブラリーは、アレイの形態で又は他のあらゆる空間的配置で存在し得る。

20

【0296】

本明細書において使用される「アレイ」（「マイクロアレイ」とも称される。）という用語は、結合要素（「基材」とも称される。）上への捕捉分子の規定された空間的配置（レイアウト）を表し、アレイ中の各分子の位置は個別に決定される。典型的には、マイクロアレイは、特定のパターンで配置され得る規定の部位又は所定の領域（すなわち、いわゆる、「アレイ要素」又は「スポット」）を含み、各アレイ要素は、典型的には、捕捉分子の1つの種のみを含む。支持体上の捕捉分子の配置は、共有又は非共有相互作用を用いて作製することができる。しかしながら、捕捉分子は、方法を実施するために使用される装置の反応チャンパー内に直接固定化することもできる（下記参照）。

30

【0297】

第一の工程において、方法は、レポーター化合物のある量、結合要素及び標的ヌクレオチドのある量を含む組成物を形成することを含み得る。本明細書において使用される「組成物を形成する」という用語は、上記成分のあらゆる混和又は混合を表す。これは、方法を実施するのに適した分析装置の1つ又はそれ以上の反応チャンパー中に、同時に、連続的に又は別々に成分を導入することによって達成され得る。あるいは、混合物を装置中に導入する前に、各成分を混合することも可能である。

40

【0298】

既に上述されているように、方法は、2以上のレポーター化合物及び2以上の標的ヌクレオチドを用いて実施することも可能である。従って、幾つかの実施形態において、組成物を形成する工程は、

- 第一のレポーター化合物のある量と、
- 第一のレポーター化合物と複合体を形成することができる第一の標的核酸の量と（第一のレポーター化合物との複合体の形成は結合要素による第一のレポーター化合物の捕捉を阻害する。）

50

- 第二のレポーター化合物のある量、並びに
- 第二のレポーター化合物と複合体を形成することができる第二の標的核酸のある量（第二のレポーター化合物との複合体の形成は結合要素による第二のレポーター化合物の捕捉を阻害する。）
を含む組成物を形成することを含む。

【0299】

本明細書中において使用される「装置」は、方法を用いて試料のアッセイを行うのに適したあらゆる機器類を表す。方法において使用するための適切な装置は、本明細書に記載されている。このような装置の典型的な実施形態は、図17から19に図解されている。方法を実施するのに適したさらなる装置は、欧州特許出願E P 0 6 1 2 2 6 9 5及び国際特許出願W O 2 0 0 7 / 0 5 1 8 6 1号に記載されており、両文献の関連する内容は同じく明示的に本明細書に引用される。

10

【0300】

典型的には、装置は、液体試料を収容するための少なくとも1つの構造（本明細書において、「反応チャンバー」又は「反応空間」とも称される。）を含み得る。本明細書において使用される「反応チャンバー」という用語は、下部表面と上部表面（第一及び第二の表面とも称される。）間の装置内に形成され、実際の分析の少なくとも1つの工程（例えば、標的核酸の検出）がその中で行われる空間を表す。下部及び上部表面は、互いに対向して又は実質的に対向して配置され得る。例えば、下部及び上部表面は、互いに平行に又は実質的に平行に配置され得る。

20

【0301】

幾つかの実施形態において、反応チャンバーは2つ又はそれ以上のサブチャンバーを含み得る。これは、第一の表面及び/又は第二の表面に、2つ又はそれ以上のサブチャンバー間の側壁としての役割を果たす1つ又はそれ以上の仕切り又は空洞を付与することによって達成することができる。

【0302】

さらなる実施形態において、平行して1つの試料の複数アッセイを実施するために又は異なる反応チャンバー中で連続してアッセイの異なる工程を実施するために、方法において使用される装置は2以上の反応チャンバーを含む。この目的のために、反応チャンバーは、互いに流体連通され得る。本明細書において使用される「互いに流体連通する」という用語は、一般的な試料導入路、充填ユニット、処理ユニットなどの追加手段を介した、直接的又は間接的な各反応チャンバー間のあらゆる相互接続を表す。しかしながら、本明細書において使用されるこの用語は、試料を導入した後に、反応チャンバーが永続的に互いに流体連通されていることを必ずしも意味しない。反応チャンバーは、例えば、反応チャンバー間の接続部における一方向性又は二方向性バルブによって達成される一過性の流体連通である。

30

【0303】

分析されるべき試料（標的核酸を含む。）を導入する前に、検出アッセイがその中で行われる装置の少なくとも1つの反応チャンバーの1つ又はそれ以上の中に（又は1つ若しくはそれ以上のサブチャンバー中に）、レポーター分子及び/又は捕捉分子を（例えば、凍結乾燥された又は乾燥された形態で）付与し得る。レポーター分子及び/又は捕捉分子は、同じ反応チャンバー（又はサブチャンバー）中に又は異なる反応チャンバー（又はサブチャンバー）中に付与し得る。あるいは、レポーター分子及び/又は捕捉分子は、試料とともに（すなわち同時に）又は試料が既に導入された後に、装置中に導入され得る。

40

【0304】

同様に、分析されるべき試料（標的核酸を含む。）を導入する前に、検出アッセイがその中で行われる装置の少なくとも1つの反応チャンバーの1つ又はそれ以上の中に（又は1つ若しくはそれ以上のサブチャンバー中に）、結合要素を付与し得る。結合要素は、レポーター分子及び/又は捕捉分子と同じ反応チャンバー（又はサブチャンバー）中に又は異なる反応チャンバー（又はサブチャンバー）中に付与し得る。例えば、レポーター分子

50

を結合要素へ捕捉する工程と空間的に隔てて（すなわち、装置の異なる反応チャンバー（又はサブチャンバー）中で）、レポーター分子の標的分子との複合体を形成する工程を実施することも可能であり得る。このような実施形態において、各成分は、通常、同じ反応チャンバー中に付与されない。試料を添加する前に、装置中に結合要素を付与する代わりに、試料と一緒に（すなわち、同時に）又は試料が既に導入された後に、結合要素を装置中に導入し得る。

【0305】

特定の実施形態において、方法において使用される装置は、バイオセンサーアッセイ装置、微小流体カートリッジ及びラブ・オン・チップからなる群から選択される装置である。

10

【0306】

組成物を形成した後に、方法は、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程を含み得る。換言すれば、例えば、それぞれ、レポーター化合物及び標的核酸の相補的ヌクレオチド配列の塩基対形成を介して、二本鎖核酸分子を形成することによって、レポーター分子を標的核酸に結合させることが可能である。レポーター化合物の量の一部が存在する標的核酸の量の少なくとも一部と複合体を形成するという事実は、アッセイの最初に存在するレポーター分子の総濃度が存在する標的核酸の総濃度を超え得ることを表す。

【0307】

続いて、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の残りの量は、（直接、又は結合要素に付着されている捕捉分子への結合によって）上記レポーター分子中に含まれる1つ又はそれ以上の結合領域を介して、結合要素上に捕捉（すなわち、結合）され得る。レポーター分子との標的核酸の複合体の形成は結合要素上のレポーター分子の捕捉を阻害するので、標的核酸/レポーター分子複合体の形成は、標的核酸/レポーター分子複合体を形成させる工程を実施する前に存在する量と比べて、結合要素上に捕捉され得るレポーター分子の量を減少させる。

20

【0308】

本発明の方法の特定の実施形態において、レポーター化合物の量の一部の、標的核酸の量の少なくとも一部との複合体を形成させる工程及び結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程は、同時に行われる。

30

【0309】

最後に、方法は、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することを含み得る。本明細書において使用される「結合上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定する」という用語は、結合要素上に捕捉された（又は再捕捉された）レポーター分子の定性的及び/又は定量的測定を可能とする電気伝導度、酸化還元電位、光学的吸収、蛍光強度又は生物発光などのパラメータの検出/測定を含む。これらのパラメータの1つのみを測定することが可能であるが、2以上のパラメータ（例えば、電気伝導度及び適切な標識によって引き起こされた蛍光シグナルの強度）を同時に又は連続して測定し得る。

【0310】

40

幾つかの実施形態において、方法は、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値に基づいて標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することをさらに含む。すなわち、ある試料中に存在する1つ又はそれ以上の標的核酸の存在及び/又は量は、標的核酸/レポーター分子複合体の形成前に存在するレポーター化合物の存在及び/又は量と複合体形成後の結合要素上に捕捉されているレポーター化合物の量との間の差に基づいて計算され得る。

【0311】

検出反応を実施するために、レポーター化合物は、上述のように、1つ又はそれ以上の検出可能な標識、例えば蛍光標識を含み得る。例えば、レポーター化合物は、2つの検出可能な標識を含み得る。検出可能な標識は、例えば、修飾された及び/又は標識されたり

50

ボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの形態で、レポーター分子に取り込まれ又は付着され得る。

【0312】

このような標識を検出するために、方法を実施するために使用される装置は、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定するのに適した上述のような検出システム、例えば、光学的検出システムをさらに含み得る。検出システムは、反応チャンパーに接続され得る。典型的には、検出システムは、少なくとも1つの反応チャンパーの1つに対向して、必要に応じて、検出が行われる特定の表面領域に対向して配置される。

【0313】

幾つかの実施形態において、方法は、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程の後に、結合要素からレポーター化合物の量の残りの一部を放出させること、結合要素上の、標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉すること、並びに結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定することをさらに含む。本明細書において使用される「放出する」という用語は、結合要素からのレポーター分子の剥離又は結合解除を表す。これは、例えば、何れかの共有結合の切断を介して酵素的に達成することができ、又は相補的塩基対形成を介して、核酸捕捉分子によって、核酸レポーター分子が結合要素に結合されている場合には、その中でアッセイが行われている反応チャンパー中の温度を増加させ、これにより、核酸鎖分離（すなわち、変性）をもたらすことによって達成することができる。

【0314】

さらなる実施形態において、放出する、複合体を形成する、捕捉する及び測定する工程は、N回のさらなる回数（Nは、1より大きい又は1に等しい整数である。）反復される。換言すれば、方法は、環状様式で実施される。特定の実施形態において、整数Nは、 ≥ 5 、 ≥ 10 又は ≥ 20 である。

【0315】

幾つかの実施形態において、複合体を形成させる工程の前に、方法は、結合要素上にレポーター化合物の量の少なくとも一部を捕捉すること；結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を測定すること；並びに捕捉されたレポーター化合物を結合要素から放出させることをさらに含む。従って、これらの追加の工程を実施することによって、受容体化合物と標的核酸との間で複合体の形成が可能になる前に、最初に存在するレポーター化合物の量を測定することが可能になる。得られた値を、結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の一部を捕捉した後測定された値と比較することによって、試料中に存在する標的核酸の存在及び/又は量に対する指標が得られる。

【0316】

特定の実施形態において、方法は、増幅（すなわち、さらなる検出を容易にするために、試料をさらなる分析に供する前に、試料中に存在する標的核酸の量を増加させること）に、標的核酸を供することをさらに含む。典型的には、標的核酸の増幅は、循環増幅を用いて達成される。循環増幅は、2に等しい又は2より多い増幅サイクルのあらゆる数を含み得る。通常、循環増幅反応は、少なくとも10サイクル又は少なくとも20サイクルを含む。典型的な循環増幅は、上述のようなポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。典型的には、熱安定的なDNAポリメラーゼを使用することによって二本鎖DNA分子を増幅するために、PCRが使用される。幾つかの実施形態において、環状増幅において使用されるDNAポリメラーゼは、エキソヌクレアーゼ活性、特に、5' -> 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する。このようなDNAポリメラーゼの例には、とりわけ、（複数の業者から市販されている）Taq DNAポリメラーゼ又はTth DNAポリメラーゼが含まれる。この5' -> 3'エキソヌクレアーゼ活性を用いて、DNAポリメラーゼは、標的核酸に結合されたレポーター分子の標識された5'末端を核酸分解的に攻撃することができ

10

20

30

40

50

、このようなレポーター分子の進行性の分解をもたらす。その結果、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の量は、増幅反応の各サイクルの間にさらに減少する。必要に応じて、使用されるDNAポリメラーゼは、ある配列位置の新生DNA鎖に付加された誤ったヌクレオチドを除去するために、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性（「校正活性」）も示し得る。両エキソヌクレアーゼ活性を有するこのようなDNAポリメラーゼの例には、とりわけ、Pwo DNAポリメラーゼ及びPfu DNAポリメラーゼ（両酵素は、様々な業者からも市販されている。）が含まれる。

【0317】

標的核酸がRNA分子であれば、方法は、増幅に供される前に、標的核酸を上述のように逆転写へ供することをさらに含み得る。

10

【0318】

標的核酸の増幅は、レポーター化合物の量の一部の、標的核酸の量の少なくとも一部との複合体を形成させる工程の前に開始され得る。すなわち、レポーター化合物に標的核酸と複合体を形成させながら、及び標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物を結合要素上に再捕捉させながら、標的核酸を増幅に供する。

【0319】

この目的（すなわち、核酸増幅）のために、方法において使用される装置は、反応チャンパー内の温度を調節及び/又は制御するために、上述されているような1つ又はそれ以上の温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットをさらに含み得る。

【0320】

反応チャンパー中の温度の測定は、上述のように実施することができる。通常、PCRなどの増幅は、環状様式で繰り返し行われる3つの基本的工程（変性、プライマーの徐冷及びプライマーの伸長）を含む。しかしながら、増幅は、それぞれ、第一の「真の」増幅サイクルの前の最初の変性工程及び/又は最終増幅サイクルの完了後の最終伸長工程をさらに含み得る。本発明の方法の幾つかの実施形態において、標的核酸増幅は、二本鎖核酸を変性させる工程及び/又は標的核酸においてプライマー分子を徐冷し、及び伸長する統合された工程を（少なくとも）含む（すなわち、「二段階PCR」）。

20

【0321】

変性工程は、94から95の温度まで、典型的には、0.5秒から5分間、分析されるべき試料を加熱することを含み、これにより、二本鎖核酸テンプレートの鎖解離をもたらす。分析されるべき試料をこのような変性工程に供することによって、二本鎖標的分子、二本鎖レポーター分子、標的核酸とのレポーター化合物の複合体及び（結合要素に付着された）捕捉分子とのレポーター化合物の複合体など、試料中の二本鎖核酸の同時変性をもたらし得（すなわち、可能とし得）、後者は、結合要素からのレポーター化合物の放出をもたらす。

30

徐冷工程は、変性された核酸テンプレート鎖へのプライマー分子の会合（すなわち、ハイブリッド形成/塩基対）を可能とするために、40から65の温度まで、典型的には1秒から5分間、分析されるべき試料を冷却することを含む。使用される反応温度は、プライマー分子のヌクレオチド配列組成、融点、分子内折り畳み（例えば、二本鎖ヘアピン又は折り返し構造の形成）の傾向など、徐冷されるべきプライマー分子の化学的及び/又は物理的特性に依存する。このような徐冷工程へ分析されるべき試料を供することによって、二本鎖標的分子の再会合、二本鎖レポーター分子の再会合、核酸標的とのレポーター化合物の複合体の形成及び標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の、捕捉分子との複合体の形成（後者は、結合要素上のレポーター化合物の捕捉又は再捕捉をもたらす。）をさらにもたらし得る（すなわち、可能とし得る。）。従って、幾つかの実施形態において、徐冷工程は、レポーター化合物の量の一部の、標的核酸の量の少なくとも一部との複合体を形成させる工程と同時に、及び/又は結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程と同時に行われる。

40

【0322】

最後に、伸長工程は、DNAポリメラーゼによって、DNAテンプレート鎖の完全長コ

50

ピーを作製するために、ハイブリッド形成されたプライマー分子を伸長させることを含む。増幅されたDNA断片の長さは、使用されるプライマーの対の5'末端によって決定される。典型的には、伸長工程は、70から72の温度で、1秒から10分間行われる。分析されるべき試料をこのような伸長工程に供することは、その後を検出され得る必要に応じて標識されたレポーター化合物を取り込んだ二本鎖の増幅された核酸断片を生じさせるために、徐冷工程中に形成された、標的核酸の量の少なくとも一部とのレポーター化合物の量の一部の複合体を伸長させることにより、分析されるべき標的核酸の複製をさらにもたらし得る。

【0323】

標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値の検出/測定は、アッセイが行われている間に、1回だけ、又は2回以上実施し得る。単一のアッセイの間に2以上の検出工程が実施される場合には、得られた結果の平均値を計算することができる。とりわけ、1つ若しくはそれ以上の標的核酸の存在、長さ若しくは配列を決定するために、及び/又はその/それらの量を計算するために、検出の1つ又はそれ以上のサイクルにおいて得られたデータを分析し、当業者に公知の適切なコンピュータソフトウェアを用いて、数学的に処理し得る。

10

【0324】

幾つかの実施形態において、特に、レポーター化合物が標的核酸より過剰である場合には、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体の形成と結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部の捕捉とが化学的に平衡状態になる前に、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が測定される。例えば、測定/検出工程は、増幅反応の徐冷工程の間に行われる。しかしながら、徐冷工程の完了後に(すなわち、伸長工程の間又は完了後に)測定/検出反応を実施することも可能である。

20

【0325】

さらなる実施形態において、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成させる工程及び結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を捕捉する工程を開始してから1秒から120秒(例えば、1、5、10、15、20、30、60又は120秒)後に、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値が測定される。

30

【0326】

他の実施形態において、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値は、変性、徐冷及び伸長工程を含む環状増幅の少なくとも1つのサイクルの後に、例えば、徐冷工程の間又は完了後に、測定される。特定の実施形態において、値は、環状増幅の各サイクル後に測定される。他の特定の実施形態において、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値は、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を決定した後に、毎回測定される。

【0327】

幾つかの実施形態において、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量の指標となる値の測定は、指標となる値の時間依存的モニタリング(すなわち、測定/検出工程の実施及び指標となる値の経時的なモニタリングの反復)を含む。

40

【0328】

さらなる実施形態において、標的核酸の存在及び/又は量の指標となる値は、レポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値を標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値と相関付ける較正曲線に基づいて測定される。

【0329】

方法は、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成していないレポーター化合物と複合体を形成することができる消光化合物の一定量を添加することをさらに含み得る。消光化合物は、標識による検出可能なシグナルの生成を妨害する1つ又はそれ以上の部分(例えば、蛍光色素の励起から生じた発光を「乗っ取る」消光基)を含み得る。例

50

例えば、消光基は、レポーター化合物の検出可能な標識によって発せられたシグナル（例えば、蛍光シグナル）を抑制又は阻害することが可能であり得る。このような実施形態において、消光化合物は、1つ又はそれ以上の消光基が複合体内のレポーター化合物の検出可能な標識と近接するように、標的分子又はレポーター特異的捕捉分子と複合体を形成していないレポーター化合物と複合体を形成することが可能であり得る。

【0330】

消光化合物は、オリゴヌクレオチドであり得る。この実施形態において、消光オリゴヌクレオチドは、レポーターオリゴヌクレオチドの配列領域と相補的であり、従って、消光化合物とレポーター化合物間の塩基対形成を可能とする少なくとも1つの特異的な配列領域を含み得る。

10

【0331】

消光基には、例えば、Black Hole Quenchers (Biosearch Technologies)、Qx1消光物質 (AnaSpec) 及びIowa Black消光物質などの一般的な消光基が含まれ得る。

【0332】

消光化合物は、上記装置の第二の構造中に付与され得る。このような実施形態において、消光化合物は、第二の結合要素上に捕捉されていないレポーター化合物と複合体を形成し得る。

【0333】

上記装置の第二の構造は、標的核酸の増幅を開始させる前に、不可逆的に密封され得る。第二の構造の不可逆的な密封は、例えば、第二の構造と接続された熱密封性チャネル及び/又はバルブによって、第二の構造の注入口及び必要に応じて排出口を密封する（例えば、溶接する）ことによって達成され得る。

20

【0334】

別の典型的な実施形態によれば、

- 流体状態の試料を収容するように適合された装置中に、流体全血試料を導入すること；並びに
- 装置中で行われた分析に基づいて、全血試料中のウイルス感染と関連する核酸の存在及び/又は量の指標となる値を測定することを含む、方法が提供される。

【0335】

特に、測定された値は、ウイルス感染と関連する全核酸の存在及び/又は量の指標である。

30

【0336】

別の典型的な実施形態によれば、

- 1 μ L から 50 μ L の容量を有する流体試料を準備すること；並びに
- 装置中で行われた分析に基づいて、試料中のウイルス感染と関連する核酸の存在及び/又は量の指標となる値を測定することを含む方法が提供される。

【0337】

必要に応じて、方法は、流体状態の試料を収容するように適合された装置中に、流体試料を導入すること；並びに装置中で行われた分析に基づいて、全血試料中のウイルス感染と関連する核酸の存在及び/又は量の指標となる値を測定することをさらに含み得る。

40

【0338】

特に、測定された値は、ウイルス感染と関連する全核酸の存在及び/又は量の指標である。

【0339】

本明細書において使用される「流体試料」又は「液体試料」という用語は、方法によって分析され、及び検出されるべき1つ又はそれ以上の核酸（すなわち、ウイルス感染と関連する核酸）を含むと推測される液体を表す。典型的には、分析されるべき流体試料は、生物学的試料である。分析され得る流体試料の例には、とりわけ、全血、血漿、血清、尿、痰、唾液又は脳脊髄液、細胞抽出物、組織培養物などの、ヒト及びヒト以外の体液が含

50

まれる。幾つかの実施形態において、分析されるべき流体試料は、血液試料（すなわち、例えば、全血、血漿及び血清）、特に、全血試料である。

【0340】

分析されるべき流体試料の容積は、 $1\mu\text{l}$ から $50\mu\text{l}$ の範囲、典型的には、 $1\mu\text{l}$ から $45\mu\text{l}$ 又は $1\mu\text{l}$ から $40\mu\text{l}$ 又は $1\mu\text{l}$ から $30\mu\text{l}$ 又は $1\mu\text{l}$ から $25\mu\text{l}$ 又は $1\mu\text{l}$ から $20\mu\text{l}$ 又は $1\mu\text{l}$ から $15\mu\text{l}$ の範囲であり得る。特定の実施形態において、流体試料の容積は、 $1\mu\text{l}$ から $10\mu\text{l}$ の範囲である。しかしながら、全血試料が分析される場合には、 $50\mu\text{l}$ を超える試料容量も、本発明の範囲に属する。

【0341】

本明細書において使用される「全血」という用語は、その全ての構成成分を有する血液を表す。換言すれば、全血は、赤血球、白血球及び血小板などの血液細胞並びに血液細胞がその中に懸濁されている血漿をともに含む。

10

【0342】

本明細書において使用される「血漿」という用語は、血液の液体溶媒を表し、水、血漿タンパク質並びに血清アルブミン、血液凝固因子、免疫グロブリン（抗体）、ホルモン、二酸化炭素、様々な他のタンパク質及び様々な電解質（主に、ナトリウム及び塩化物）などの他の物質の微量を含有する実質的に水性の溶液である。

【0343】

本明細書において使用される「血清」という用語は、凝固タンパク質が除去された血漿を表す。

20

【0344】

さらなる実施形態において、装置中に導入された流体試料は、処理されていない全血試料である。本明細書において使用される「処理されていない」という用語は、（例えば、患者からの採血によって）試料を集めた後に、及び試料を本発明の方法に供する前に、さらなる試料の処理（例えば、分画法、試料保存のために、例えば、ろ紙上で全血を乾燥させ、水に再溶解することによる乾燥された血液試料の再構成など）は行われなことを理解すべきである。

【0345】

しかしながら、例えば、冷蔵庫又は冷凍機中での試料の保存そのものは、上に定義されている処理工程と考えるべきではない。従って、収集後直ちに、試料を装置中に導入してもよく、又は1時間若しくはそれ以上から1日若しくはそれ以上若しくは1週若しくはそれ以上、試料を保存した後に、試料を装置中に導入してもよい。

30

【0346】

さらに、全血試料は、試料の長期保存時に血餅の形成を引き起こし、従って、その存在がその後の分析を妨害し得る血液凝固因子を含むので、抗凝固物質（すなわち、血液凝固の阻害剤）の添加も、本発明の意義における試料の処置ではない。抗凝固物質として作用する複数の化合物が、本分野において周知である。抗凝固物質の例には、とりわけ、天然又は合成の（すなわち、化学的合成及び/又は組換えDNA技術によって得られる）ビタミンKアンタゴニスト、天然又は合成の直接的トロンビン阻害剤、シトラート、オキサラート、ヘパリン及びエチレンジアミン四酢酸（EDTA）が含まれる。

40

【0347】

他の実施形態において、流体全血試料は、患者から直接（すなわち、上に定義されているように、処理されていない形態で）装置中に導入される。特に、流体全血試料は、患者の指先の穿刺から取得され得る。例えば、指先の穿刺後に、外的操作なしに、毛細管力によって血液が導入されるように、血液を毛細管と接触させることによって、漏出する血液を収集し得る。次いで、血液が装置中に通過できるように、又は装置中へ能動的に輸送され得るように、使用されているアッセイ装置に対して毛細管を配置させ得る。あるいは、穿刺からの血液の漏出が装置中に導入され得るように、（例えば、開口部上に指先を直接押し付けることにより）以下に詳述されている装置の開口部の1つへ直接隣接して穿刺された指先を配置させることができる。

50

【0348】

本明細書において使用される「ウイルス感染と関連する核酸」という用語は、1つ又はそれ以上のウイルス種によって感染された、分析されるべき流体試料中に存在するウイルス起源のあらゆる核酸分子（すなわち、そのヌクレオチド配列が、ウイルスゲノム内の対応する配列と同一であり、又は相補的である。）を表す。流体試料が得られた宿主に感染するウイルスは、あらゆるDNAウイルス（すなわち、DNAゲノムを有するウイルス）又はRNAウイルス（すなわち、RNAゲノムを有するウイルス）であり得る（例えば、Buchan-Osmond, C. (2003). Taxonomy and Classification of Viruses. In: Manual of Clinical Microbiology, 8th ed., vol. 2, p. 1217-1226, ASM Press, Washington DC中に概説されている。）。DNAウイルスの例には、とりわけ、パポウイルス科（例えば、パピローマウイルス）、アデノウイルス科（例えば、アデノウイルス）及びヘルペスウイルス科（例えば、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス）の科が含まれる。RNAウイルスの例には、とりわけ、ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス）、フラビウイルス科（例えば、C型肝炎ウイルス）、フィロウイルス科（例えば、マールブルグウイルス、エボラウイルス）及びレトロウイルス科（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV））が含まれる。幾つかの実施形態において、検出されるべき核酸は、レトロウイルス科の一員によって引き起こされる感染症と関連しており、特に、HIV感染症と関連している。本明細書において使用される「HIV」という用語は、HIV-1及びHIV-2の両種を表し、並びにこれらに由来するあらゆるサブタイプを表す。

10

20

【0349】

多くのDNAウイルス及びレトロウイルス科（特に、レトロウイルス科の複製には、RNAウイルスゲノムのDNAへの逆転写を一般に必要とする。）は、潜伏性プロウイルスの形態で、宿主細胞のゲノム中へ遺伝情報を組み込むことができるので、「ウイルス感染と関連する核酸」という用語は、遊離のウイルス及び細胞に随伴したウイルスに由来する核酸を表すのみならず、宿主ゲノム中に組み込まれているプロウイルスDNA分子、逆転写されたウイルスDNA分子（すなわち、ウイルス複製の「中間体」）及びプロウイルスDNAに由来する転写物（すなわち、宿主DNAゲノムの転写によって得られるRNA分子）も表す。

30

【0350】

特定の実施形態において、方法は、分析されるべき流体試料中の全ウイルス核酸の量を測定することが意図される。換言すれば、方法は、患者のウイルス感染と関連する核酸の全ての異なる種（すなわち、RNA及びDNA分子の両方）及び細胞のサブセット（すなわち、空間的に隔てられた核酸プール）の検出を目的とし得る。典型的には、検出されるべき核酸は、HIV感染などのウイルス感染の単一種と関連する。しかしながら、患者がウイルスの異なる種類での同時感染に罹患することも可能であり得る。方法は、単一の分析で同時に又は複数の別個の分析で（但し、同じ流体試料を用いて、実施し得る。）、ウイルスの異なる各種類と関連する核酸の存在及び/又は（全）量を測定することをさらに含み得る。

40

【0351】

従って、患者がHIVに感染している場合には、その患者から得られた全血試料中に存在し得るHIV感染と関連する核酸は、遊離のHIVに由来するRNA分子（すなわち、血漿中を自由に循環しているウイルス粒子）、細胞に随伴しているHIVに由来するRNA分子（すなわち、血液細胞の何れかの種類に付着されたウイルス粒子）、宿主のゲノム中に組み込まれているプロウイルスHIVDNA分子、逆転写されたHIVDNA分子及びプロウイルスDNAに由来するHIV転写物を含む。しかしながら、他の全てのHIV核酸種は患者の除去された血液細胞に随伴しているので、同じ患者から得られた血漿試料は、遊離のHIVに由来するRNA分子のみを含む。

【0352】

50

本明細書において使用される「装置」という用語は、上記方法を用いて試料をアッセイするのに適したあらゆる機器類を表すが、但し、装置は、「流体状態の試料を収容するように適合されている」ものとする（これは、試料を装置中に収容しながら、試料の流体（すなわち、液体）状態が維持されるように、装置が構成されていることを意味する。）。すなわち、ろ紙上に試料を適用し、過剰な液体を蒸発させるなど、核酸分析が行われる前に、試料は決して装置中で乾燥されない。本明細書において、このような装置は、「微小流体装置」とも称される。

【0353】

方法において使用するための典型的な装置は、本明細書中に記載されている。このような装置の典型的な実施形態は、図17から19に示されている。方法を実施するのに適したさらなる装置は、欧州特許出願EP06122695号及び国際特許出願WO2007/051861号（両者の関連する内容も、本明細書に明示的に引用される。）中に記載されている。

10

【0354】

方法を実施するために使用される装置は、液体試料を収容するための少なくとも1つの構造（本明細書において、「反応チャンバー」又は「反応空間」とも称される。）を含む。本明細書において使用される「反応チャンバー」という用語は、下部表面と上部表面（第一及び第二の表面とも称される。）間の装置内に形成され、実際の分析の少なくとも1つの工程（例えば、標的核酸の検出）がその中で行われる空間を表す。下部及び上部表面は、互いに対向して又は実質的に対向して配置され得る。例えば、下部及び上部表面は、互いに平行に又は実質的に平行に配置され得る。

20

【0355】

幾つかの実施形態において、少なくとも1つの反応チャンバーの少なくとも一部は、核酸検出を容易にするために、透明な材料、すなわち、光透過性材料で作製されている。適切な透過性材料の例には、とりわけ、ガラス又はガラス様材料（例えば、アクリルガラス）及び合成ポリマー（例えば、ポリメチルメタクリレート、アクリル又はポリエチレン）が含まれる。

【0356】

他の実施形態において、少なくとも1つの反応チャンバーの少なくとも一部は、柔軟であり、又は弾性的に変形可能である。すなわち、反応チャンバーの少なくとも1つ又はそれ以上の一部が、弾性的に変形可能な材料、例えば、弾性的な膜（例えば、シリコーンゴム）から作製される。

30

【0357】

使用される幾つかの装置において、少なくとも1つの反応チャンバーは、2つ又はそれ以上のサブチャンバーを含み得る。これは、2つ又はそれ以上のサブチャンバー間の側方側壁としての役割を果たす1つ又はそれ以上の仕切り又は空洞を第一の表面及び/又は第二の表面に付与することによって達成することができる。

【0358】

幾つかの実施形態において、装置は、1つの試料の複数のアッセイを平行して実施するために、又は異なる反応チャンバー中で、連続的にアッセイの異なる工程を実施するために、2以上の反応チャンバーを含む（図17も参照。）。この目的のために、反応チャンバーは、互いに、流体連通させ得る。本明細書において使用される、「流体連通する」という用語は、直接的に又は共通の試料導入路、充填ユニット、処理ユニットなどのさらなる手段（「微小流体ネットワーク」とも称される。）を介して間接的に、各反応チャンバー間でのあらゆる相互接続を表す。しかしながら、本明細書において使用される場合、この用語は、試料を導入した後に、反応チャンバーが、恒常的に互いに流体連通していることを必ずしも意味するものではない。反応チャンバーは、例えば、反応チャンバー間の接続部における一方向又は二方向バルブによって達成される、一過性の流体連通であり得る。

40

【0359】

50

方法において使用されるアッセイ装置において、少なくとも1つの反応チャンバーの少なくとも1つの下部表面と上部表面間の距離は、1つ又はそれ以上のアクチュエータ（変位装置とも称される。）を介して変動させ得る。アクチュエータは、下部表面及び/若しくは上部表面又はこれらの少なくとも1つ若しくはそれ以上の一部を互いに関して垂直に移動させるための手段を表す。従って、表面間の距離の変動は、表面領域全体にわたって必ずしも起こらなくてもよく、表面の一方又は両方の表面領域の少なくとも1つの部分へ局所的に限定され得る。典型的には、下部表面及び/又は上部表面間の距離は、例えば、表面の一方又は両方の少なくとも一部へ、アクチュエータを介して圧力をかけることによって短縮される。アクチュエータは、下部表面又は上部表面の一体化された一部を構成することができ（例えば、隆起又はバックルとして構成される。）、又は反応チャンバーの外側に配置された独立の、すなわち、内蔵型の構成要素（他ペット又はステンシルなど）に相当し得る。

10

【0360】

1つ又はそれ以上のアクチュエータを介した上部表面と下部表面間の距離の変動は、特定の反応チャンバー内の試料の少なくとも一部を除去し、及び/又は異なる方法の工程がその中で行われ得る異なる反応チャンバー（又はサブチャンバー）間の試料の少なくとも一部を移動（輸送）させ得る。すなわち、アクチュエータを作動させることによって、装置の少なくとも1つの反応チャンバー内に又は装置の少なくとも1つの反応チャンバー間に、試料が移動される。従って、表面間の距離の反復的な交互の短縮及び再増加は、反応チャンバー内での、試料の対応する前方及び後方への移動（すなわち、試料の混合）ももたらす。

20

【0361】

1つ又はそれ以上のアクチュエータを介して、反応チャンバーの下部表面及び上部表面間の距離を変動させることに代えて、装置中での流体試料の輸送又は移動は、とりわけ、ポンプを用いて、特に、真空ポンプ又は蠕動ポンプを使用することによって達成され得る。

【0362】

本明細書において使用される装置の反応チャンバーは、少なくとも1つの反応チャンバーの下部表面及び/又は上部表面上に配置された1つ又はそれ以上のマイクロアレイ（本明細書において、「アレイ」又は「アレイ要素」とも称される。）をさらに含み得る。本明細書において使用される「マイクロアレイ」は、支持部材（「基材」又は「結合要素」とも称される。）上への捕捉分子（例えば、プローブ分子の1つ若しくはそれ以上の種又は物質ライブラリー；以下も参照）。の規定の空間的配置（レイアウト）を表し、マイクロアレイ内の各分子の位置は別個に決定されている。典型的には、マイクロアレイは、特定のパターンで配置され得る規定の部位又は所定の領域（すなわち、いわゆる、アレイ要素又はスポット）を含み、各アレイ要素は、典型的には、捕捉分子の1つの種のみを含む。支持体上の捕捉分子の配置は、共有又は非共有相互作用を用いて作製することができる。マイクロアレイ用の適切な基材には、とりわけ、顕微鏡スライド、ウェハー又はセラミック材料が含まれる。しかしながら、下部表面及び/又は上部表面上に、捕捉分子を直接固定化することもできる。

30

40

【0363】

方法において使用される装置の反応チャンバーは、ロック可能及び/又は密封可能であり得る、並びに分析されるべき試料及び方法を実施するためにも場合により必要とされるあらゆる追加の試薬、検出試薬などの直接的導入のために使用され得る1つ又はそれ以上の開口部をさらに含み得る。あるいは、このような開口部は、とりわけ、充填ユニット、処理ユニット、温度調節ユニット、特異的検出ユニット及び廃棄容器など、装置の一体的な部分として設計されていない装置のあらゆる追加的（補足的）モジュールを取り付けるためにも使用され得る。

【0364】

特定の実施形態において、装置は、バイオセンサーアッセイ装置、微小流体カートリッ

50

ジ及びラブオンチップからなる群から選択される装置である。

【0365】

幾つかの実施形態において、装置は、流体（すなわち、液体）試料中の核酸を検出するように適合される。換言すれば、装置は、反応チャンバーに接続され得る、上記のような検出システム、例えば、光学的検出システムをさらに含む。典型的には、検出システムは、少なくとも1つの反応チャンバーの1つに対向して配置されており、場合により、検出が行われる特定の表面領域に対向して配置されている。適切な検出システムの選択は、検出のために使用される標識の種類又は実施される分析の種類など、幾つかのパラメータに依存する。幾つかの実施形態において、方法の実施は、蛍光、光吸収、共鳴転移などのパラメータの測定に基づき得る単純な検出システムを含む。

10

【0366】

典型的には、装置及びシステムは、自己含有されている。すなわち、アッセイを実施する間に、装置及びシステムは、反応チャンバー中の試料及び/又は他の何れかの試薬の除去及び/又は置換を必ずしも必要としない。従って、このような装置は、試料注入ポートのみを含み得るが、排出ポートは含まない。

【0367】

分析されるべき流体試料は、ロック可能及び/又は密封可能であり得る少なくとも1つの反応チャンバーの1つ又はそれ以上の開口部を介して、装置中に直接導入され得る。適切な圧力生成手段、例えば、ピペット、注射器又は自動化されたユニット（例えば、加工処理装置の機能的ユニットであり得る。）を使用することによって、必要に応じてさらなる試薬（緩衝液又は他の希釈剤、検出分析を実施するための染料、標識、アッセイ試薬又は酵素など）とともに、試料を反応チャンバー中に転移させ得る。あるいは、例えば、反応チャンバーを区切る表面の何れかの中に存在する開口部の1つに直接隣接して試料を配置することによって、一切の外的な操作なしに、毛細管力によって、試料を反応チャンバー中に導入することもできる。

20

【0368】

方法は、方法を実施しながら、反応チャンバー中の試料及び/又は他の何れかの試薬を除去及び/又は置換する必要なしに実施し得る。しかしながら、幾つかの用途は、目的の核酸のさらなる検出を可能とするために何らかの標識を含む1つ又はそれ以上の薬剤などの、さらなる試薬を反応チャンバー中に導入することを必要とする場合があり得る。このようなさらなる溶液は、試料を導入する前に又は試料と同時に又は試料が反応チャンバー中に導入された後に、上述のように反応チャンバー中に直接導入することもできる。幾つかの実施形態において、試料を添加する前に、特に、粉末、顆粒又はペレットなどの凍結乾燥された形態又は乾燥形態で、さらなる試薬が装置内に付与される。

30

【0369】

あるいは、分析すべき試料の導入及び必要に応じてさらなる試薬の導入は、装置の一体的な部分であり得る1つ若しくはそれ以上の充填ユニットを用いて間接的な様式で行うことが可能であり得、又は反応チャンバーを充填するために反応チャンバーに取り付け、使用後には取り外すことができる別個の部分として設計され得る。分析されるべき液体試料を保持することができ、及び反応チャンバーへ（可逆的に）接続され得るあらゆる容器を充填ユニットとして使用し得る。例えば、充填ユニットは、血液試料の採取に適した毛細管であり得る。

40

【0370】

装置は、反応チャンバーから余剰溶媒を取り込む役割を果たす一体型の又は取り外し可能な別個の廃棄容器を含み得る。必要に応じて、廃棄容器は、余剰物質を可逆的に又は不可逆的に結合するさらなる気体、液体又は固体充填媒体（とりわけ、セルロース、フィルター材料及びシリカゲルなどの）を含む。さらに、廃棄容器は、余剰材料の廃棄容器への転移を向上させるために、1つ若しくはそれ以上の換気装置を含み得、又はその内部に真空を付与され得る。

【0371】

50

試料及び必要に応じて何れかの追加試薬が反応チャンバー中に導入された後、又は1つ若しくはそれ以上の充填ユニットから反応チャンバー中に転移された後、反応空間全体に適切な拡散を可能とするために、所定の期間、反応チャンバー中で、試料を必要に応じて温置し得る。典型的には、温置期間は、1秒から30分の範囲、例えば、10秒から15分の範囲、又は30秒から10分の範囲である。

【0372】

幾つかの実施形態において、装置中で行われる分析は、分析されるべき流体試料から核酸を放出させることをさらに含む。この目的のため、細胞膜及び/又はウイルスのキャプシドを破壊するために、(例えば、以下に記載されているような温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットを使用することによって)試料を加熱し得る。幾つかの実施形態において、この放出工程は、流体試料を上に記載されているような溶解試薬と接触させることを含む。

10

【0373】

さらなる実施形態において、装置中で行われる分析は、ウイルス感染と関連する核酸を増幅すること、すなわち、さらなる検出を容易にするために、試料をさらなる分析に供する前に、試料中に存在する核酸の量を増加させることをさらに含む。典型的には、核酸増幅は、上述のようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて達成される。

【0374】

とりわけ、この目的(すなわち、核酸増幅)のために、方法において使用される装置は、反応チャンバー内の温度を調節及び/又は制御するために、上述されているような温度調節ユニット及び/又は温度制御ユニットをさらに含む得る。

20

【0375】

反応チャンバー中の温度の測定は、上述のように実施することができる。

【0376】

幾つかの実施形態において、装置中で実施される分析は、複合体を形成することをさらに含み、各複合体はウイルス感染と関連する核酸及び捕捉分子を含み、捕捉分子はウイルス感染と関連する核酸の領域に対して特異的な結合部分及びアンカー基を含む。

【0377】

この実施形態において使用される「捕捉分子」という用語は、捕捉分子を検出されるべき核酸との複合体の形成に適したものとする、特異的な結合挙動及び/又は特徴的な反応性を示すあらゆる分子を表す。典型的には、捕捉分子として核酸が使用される。捕捉分子として使用することができる核酸の例には、デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)などの天然に存在する核酸及びとりわけ、ペプチド核酸(PNA)又は鍵型核酸(LNA)などの核酸類縁体が含まれる。天然に存在する核酸の具体例には、ゲノムDNA若しくはcDNA分子などのDNA配列並びにhnRNA、mRNA若しくはrRNA分子などのRNA分子又はこれらの逆相補核酸配列が含まれる。このような核酸は、あらゆる長さであり得、一本鎖又は二本鎖分子であり得る。典型的には、核酸捕捉分子は、10から150ヌクレオチドの、例えば、20から100ヌクレオチド、25から80ヌクレオチド又は30から70ヌクレオチドの長さを有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。特定の実施形態において、ある流体試料中に存在するあらゆる興味深い標的核酸を増幅するために、PCR中におけるプライマーとして捕捉分子が使用される。

30

40

【0378】

幾つかの実施形態において、捕捉分子は、ウイルス感染と関連する核酸(すなわち、標的核酸)の配列領域に対して相補的であり、従って、捕捉分子と検出されるべき核酸との間での塩基対形成を可能とする少なくとも1つの特異的配列領域(すなわち、上に参照されている結合部分)を含む。典型的には、特異的結合領域は、少なくとも12ヌクレオチド長、例えば、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド又は少なくとも22ヌクレオチドである。特に、捕捉分子の結合領域のヌクレオチド配列は、標的核酸の対応するヌクレオチド配列に対して相補的である。本明細書において使用される「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチド(すなわち、R

50

NA及びDNA分子)の両方を表すものとして理解すべきである。

【0379】

分析されるべき流体試料を導入する前に、装置の少なくとも1つの反応チャンバーの1つ又はそれ以上の中に、(例えば、凍結乾燥された形態又は乾燥形態で)捕捉分子を付与し得る。あるいは、捕捉分子は、試料とともに(すなわち同時に)又は試料が既に導入された後に、装置中に導入され得る。

【0380】

捕捉分子の1つ又はそれ以上の種を使用し得る。「1つ又はそれ以上の種」という用語は、異なるヌクレオチド配列を有する1つ又はそれ以上の核酸分子など、捕捉分子の1つ又はそれ以上の異なる種類を表す。同時に使用される捕捉分子の2以上の種は、「ライブラリー」とも称される。このようなライブラリーは、少なくとも2つの異なる分子を含むが、多くのさらなる異なる分子、例えば、少なくとも5つの異なる種、少なくとも10の異なる種、少なくとも30の異なる種なども含み得る。ライブラリーは、アレイ要素の形態で又は他のあらゆる空間的配置でも存在し得る。

【0381】

他の実施形態において、装置中で行われる分析は、検出されるべき核酸及び捕捉分子を含む複合体を、該複合体を第一の結合要素に結合させるために、捕捉分子のアンカー基を結合するように構成されている装置の第一の結合要素と接触させることをさらに含む。

【0382】

本明細書において使用される「第一の結合要素」という用語は、共有又は非共有相互作用により、捕捉分子のアンカー基を介して、捕捉分子を結合することができ、従って、このような捕捉分子を含むあらゆる複合体も結合することができるあらゆる固体マトリックスを表す。このようなマトリックスの例は、アレイ要素(上記参照)、又はとりわけ、磁気ビーズ(例えば、常磁性ポリスチロールビーズ(Dynabeads^(R))としても知られる。)及びラテックスビーズなどの合成粒子を含む。捕捉分子の種類、アンカー基の種類及び予定される用途に応じて、各事例において、多様な結合が可能である。例えば、捕捉分子のアンカー基は、結合要素に付着されているアビジン又はストレプトアビジン基に結合され得るピオチン部分であり得る。あるいは、捕捉分子は、結合要素に結合されたチミジン残基の対応する連なりと相互作用するアデノシン残基の連なり(例えば、10個のアデノシン残基)を含み得る。特異的な結合試薬は、様々な業者から市販されており、本分野において十分に確立されている(例えば、Sambrook, J. et al., 上記; Ausubel, F. M. et al., 上記、及び Lottspeich, F., and Zorbas H., 上記、参照)。

【0383】

分析されるべき流体試料を導入する前に、装置の少なくとも1つの反応チャンバーの1つ又はそれ以上の中に、第一の結合要素を付与し得る。これにより、捕捉分子と同じ1つ若しくはそれ以上の反応チャンバー中に、又は少なくとも1つの異なる反応チャンバー中に、結合要素を付与し得る。典型的には、ウイルス感染と関連する核酸との捕捉分子の複合体を形成する工程は、第一の結合要素と複合体を接触させる工程から空間的に隔てられて、すなわち、装置の異なる反応チャンバー中で(例えば、図17に引用されている「溶解ウェル」及び「中央ウェル」)実施される。このような実施形態において、捕捉分子及び第一の結合要素は、通常、異なる反応チャンバー中に付与される。試料を添加する前に、装置中に第一の結合要素を付与する代わりに、試料と一緒に(すなわち、同時に)又は試料が既に導入された後に、第一の結合要素を装置中に導入し得る。

【0384】

特定の実施形態において、方法は、典型的には第一の結合要素に関して、分析されるべき試料をPCRに供することによって増幅された標的核酸を捕捉する(すなわち、第一の結合要素上に標的核酸を固定化する)ことをさらに含む。

【0385】

他の特定の実施形態において、装置中で行われる分析は、ウイルス感染と関連する核酸

10

20

30

40

50

との複合体を形成することができ、及び装置の第二の結合要素上に捕捉され得る相互作用部位を含むレポーター分子を準備することをさらに含む。

【0386】

本明細書中において使用される「レポーター分子」又は「レポーター化合物」という用語は、検出されるべき標的核酸及び第二の結合要素の両方と相互作用することができるあらゆる分子を表す。これにより、相互作用は、レポーター分子中に含まれる共通の又は異なる結合領域を介して起こる。一般に、レポーター分子は、10から100のヌクレオチド、例えば、15から50のヌクレオチド又は20から30のヌクレオチドの長さを有する核酸分子（すなわち、上記のようなRNA又はDNA分子）である。通常、レポーター分子は、一本鎖核酸分子（すなわち、オリゴヌクレオチド）である。幾つかの実施形態において、核酸レポーター分子は、標的核酸と相互作用することが可能であるのみならず、第二の結合要素上にも捕捉され得る単一の結合領域を含む。典型的には、相互作用は可逆的である。第二の結合要素上に捕捉する工程は、捕捉分子に関して上述されているように、レポーター分子中に含まれるアンカー基を用いて達成され得る。一般に、レポーター分子中に含まれる特異的結合領域は、少なくとも12ヌクレオチド長、例えば、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド又は少なくとも22ヌクレオチドである。特に、レポーター分子の結合部分のヌクレオチド配列は、標的核酸の対応するヌクレオチド配列に対して相補的である。

10

【0387】

分析されるべき流体試料を導入する前に、本発明において使用される装置の少なくとも1つの反応チャンバーの1つ又はそれ以上の中に、（例えば、凍結乾燥された形態/乾燥形態で）レポーター分子を付与し得る。これにより、捕捉分子及び/又は第一の結合要素と同じ1つ若しくはそれ以上の反応チャンバー中に、又は少なくとも1つの異なる反応チャンバー中に、レポーター分子を付与し得る。あるいは、しかしながら、レポーター分子は、試料とともに（すなわち同時に）又は試料が既に導入された後に、装置中に導入され得る。

20

【0388】

幾つかの実施形態において、上記レポーター分子及びレポーター特異的捕捉分子は、ウイルス感染と関連する核酸への結合に関して競合する。すなわち、レポーター特異的捕捉分子中に含まれるそれぞれの結合領域及びレポーター分子は、標的核酸の同じ又は少なくとも類似の対応する配列を認識する。本明細書中において使用される「類似の配列」という用語は、1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドの不一致（すなわち、ヌクレオチドの非相補的な対）のみが異なる配列又は1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドの付加、挿入若しくは欠失（すなわち、ヌクレオチド残基の付加又は欠如）が異なる配列を表す。換言すれば、レポーター特異的捕捉分子及びレポーター分子中に含まれるそれぞれの結合領域は、少なくとも部分的に同一である。本明細書中において使用される「部分的に同一」という用語は、上述されているように、1つ若しくはそれ以上の単一ヌクレオチドにおいてのみ異なる配列、又は重複する結合部位を有する配列、すなわち、共通のヌクレオチド配列を共有するが、配列領域の少なくとも1つの他の部分が異なる配列を表す。しかしながら、競合する捕捉分子及び標的核酸中に含まれているそれぞれの結合領域は、レポーター分子の異なる重複していない（例えば、隣接する）配列を認識するが、レポーター分子への捕捉分子又は標的核酸の結合は、他の分子の結合を立体的に妨害することも可能である。

30

40

【0389】

本発明において使用するための典型的なレポーター分子及びウイルス感染と関連する核酸を検出するための典型的な競合的アッセイは、本明細書中に記載されている。

【0390】

本明細書中において使用される「第二の結合要素」という用語は、第一の結合要素と同じ固体マトリックスの種類（すなわち、第一及び第二の結合要素は、同一であり得る。）又は固体マトリックスの異なる種類を表し得る。分析されるべき流体試料を導入する前に、

50

本発明において使用される装置の少なくとも1つの反応チャンバーの1つ又はそれ以上の中に、第二の結合要素を付与し得る。これにより、捕捉分子及び/若しくは第一の結合要素及び/若しくはレポーター分子と同じ1つ若しくはそれ以上の反応チャンバー中に、又は少なくとも1つの異なる反応チャンバー中に、第二の結合要素を付与し得る。試料を添加する前に、装置中に第二の結合要素を付与する代わりに、試料と一緒に(すなわち、同時に)又は試料が既に導入された後に、第二の結合要素を装置中に導入し得る。

【0391】

幾つかの実施形態において、装置中で行われるアッセイは、

- 第二の結合要素からレポーター分子を放出させ、放出されたレポーター分子に、ウイルス感染と関連する核酸との複合体を形成させ、及びウイルス感染と関連する核酸と複合体を形成していないレポーター分子を第二の結合要素上に再捕捉させること；

- 第二の結合要素上に捕捉されたレポーター分子の量に対する指標となる1つ若しくはそれ以上の値を測定すること；及び/又は

- レポーター分子の量に対する指標となる値に基づいて、ウイルス感染と関連する核酸の量に対する指標となる1つ若しくはそれ以上の値を測定することをさらに含む。

【0392】

第二の結合要素からレポーター分子を放出させる工程は、第二の結合要素がその中に付与されている装置の1つ又はそれ以上の反応チャンバー中の温度を増加させることによって達成され得る。温度の変動は、上記のように1つ又はそれ以上の温度調節及び/又は温度制御ユニットを使用することによって達成され得る。このような温度増加は、例えば、装置中で行われるPCRの変性工程の間に起こり得る。レポーター分子と標的核酸の間での複合体の形成及び/又は第二の結合要素上の標的核酸と複合体を形成していないレポーター分子の再捕捉は、例えば、PCRの徐冷及び/又は伸長工程の間に、それぞれの1つ又はそれ以上の反応チャンバー中の温度を減少させることによって達成することができる。PCR増幅を実施するための実験的な設定及び温度特性は、本分野において十分に確立されている。従って、幾つかの実施形態において、レポーター分子を第二の結合要素から放出させ、放出されたレポーター分子に、ウイルス感染と関連する核酸との複合体を形成させ、及びウイルス感染と関連する核酸と複合体を形成していないレポーター分子を第二の結合要素上に再捕捉させながら、ウイルス感染と関連する核酸は、さらに増幅に供される。

【0393】

幾つかの実施形態において、方法は、実際の検出反応を実施する前に、装置の反応チャンバー中に、1つ又はそれ以上の検出可能な部分をそれぞれ含む1つ又はそれ以上の因子を導入することをさらに含む。すなわち、1つ又はそれ以上の検出可能な部分を含む因子は、上述のように、試料を導入する前に(すなわち、1つ又はそれ以上の反応チャンバー中に、因子は付与され得る。)、試料と同時に、又は直接若しくは充填ユニットを介して試料が導入された後に、反応チャンバー中に導入され得る。

【0394】

本明細書において使用される「1つ又はそれ以上の検出可能な部分を含む因子」という用語は、化学的、物理的又は酵素的反応において、検出可能な化合物又はシグナルを直接又は間接的に生成する、1つ又はそれ以上の適切な化学物質又は酵素(すなわち、1つ又はそれ以上の「部分」)を含むあらゆる化合物を表す。従って、このような因子は、目的の標的核酸及び/又はレポーター化合物との相互作用の形成を可能とすることによって、目的の標的核酸及び/又はレポーター化合物の検出のために必要とされ得、又は検出を容易にする。本明細書において使用されるこの用語は、検出可能なマーカーそのもの(「標識」とも称される。)及び1つ又はそれ以上のこのような検出可能なマーカーに結合されたあらゆる化合物を含むものと理解すべきである。さらに、標識による検出可能なシグナルの生成を妨害する部分(例えば、消光物質と蛍光色素が互いに近接する限り、蛍光色素の励起から生じた発光を「乗っ取る」消光物質)も、検出可能な標識に属する。検出可能

10

20

30

40

50

なマーカーは、例えば、修飾された及び／又は標識されたりボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド又はジデオキシヌクレオチドの形態の捕捉分子及び／又は標的核酸及び／又はレポーター分子の一部であり得、又はこれらに結合され得る。

【0395】

使用され得る検出可能なマーカー又は標識は上記されており、蛍光性標識が含まれる。

【0396】

本明細書において使用される「ウイルス感染と関連する核酸の存在及び／又は量に関して指標となる値を測定する」という用語は、所定の流体試料中に存在する標的核酸の定性的及び／又は定量的測定を可能とする、電気伝導度、酸化還元電位、光学的吸収、蛍光強度又は生物発光などのパラメータの検出／測定を表す。これらのパラメータの1つのみを測定することができるが、2以上のパラメータ（例えば、電気伝導度及び適切な標識によって引き起こされた蛍光シグナルの強度）を同時に又は連続して測定することも可能である。

10

【0397】

幾つかの実施形態において、方法は、ウイルス感染と関連する全核酸の存在及び／又は量の指標となる値に基づいて、患者中のウイルス負荷量に対する指標となる1つ又はそれ以上の値を測定することをさらに含む。本明細書において使用される「ウイルス負荷量」という用語は、血液の所定の容量中に存在するウイルスの量（血液1mL当りに存在するウイルスのコピー数として通常計算される。）を表す。ウイルスコピー数は、本分野において周知の適切なコンピュータソフトウェアパッケージ（上記参照）を使用することによって、とりわけ、所定の試料中に存在するウイルス核酸の全濃度に基づいて測定され得る。

20

【0398】

検出反応は、使用される装置の特定の反応チャンバー（「検出チャンバー」とも称される。）中で、又は「検出ゾーン」と称される反応チャンバーの特定のセグメント（例えば、透明な材料で作製されている、反応チャンバーの下部表面及び／又は上部表面の1つ又はそれ以上の部分の間に位置する領域）中で行われ得る。定量的な測定のために、それぞれ、既知の容量を有する検出チャンバー及び／又は検出ゾーンを含む装置が使用され得る。

【0399】

標的核酸の存在及び／又は量に対する指標となる値の検出／測定は、アッセイが行われる間に、一回だけ又は二回以上行われ得る。単一のアッセイの間に2回以上の検出工程の場合には、得られた結果の平均値が計算される。検出の1又はそれ以上のサイクルにおいて得られたデータは、とりわけ、1つ若しくはそれ以上の標的核酸の存在、長さ又は配列を測定するために、及び／又はその／それらの量を計算するために、当業者に公知の適切なコンピュータソフトウェアを用いて分析し、数学的に処理され得る。別の典型的な実施形態によれば、本発明は、ある流体試料中の、特に全血試料中のHIVを検出するための（すなわち、ウイルスの存在のみを決定するための）、本明細書中に記載されている方法の使用及び患者中のHIV負荷量を測定するための（すなわち、存在するウイルスの量を測定するための）使用に関する。

30

40

【0400】

別の典型的な実施形態によれば、本発明は、例えば、本明細書中に記載されている方法によって測定された全ウイルス核酸の量の、診断マーカーとしての使用に関する。特定の実施形態において、診断マーカーとして使用される全ウイルス核酸は、HIV核酸である。

【0401】

試料の「廃棄された」部分に存在している全てのポリヌクレオチドは、さらなる分析から除外されるので、試料の分画又はその他の加工処理工程が偽陰性のアッセイ結果を引き起こし得ることが見出されている。このことは、例えば、初期段階で病的状態の開始を証明するために、稀なポリヌクレオチド（すなわち、極めて低いコピー数で存在するに過ぎ

50

ない核酸)の確実な検出が必要とされる用途においてのみならず、例えば、このデータを、病状及び/又は進行を評価するためのマーカーとして使用するために、試料中に存在する1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドの正確な定量的測定を目的としたあらゆる使用においても特に重要である。

【0402】

例えば、感染すると、それらの宿主ウイルスは、直ちに複製を開始し、継続的なウイルス放出をもたらす、従って、ウイルスの増殖及び拡散をもたらす。これに加えて又はこれに代えて、ウイルスの少なくとも幾つかの種類が、例えば、宿主細胞のゲノム中に組み込まれたプロウイルスの形態で、複製の前に、潜伏(すなわち、静止)状態を経る場合があり得る。従って、患者が特定のウイルスによって感染されているかどうかを測定するために、方法は、活発に複製されたウイルス粒子に起因する核酸を検出することのみならず、標的細胞自体の密接な一部としてのプロウイルス核酸を検出することをも含み得る。さらに、ウイルスは、遊離の粒子又は「輸送担体」として使用される宿主細胞の表面に結合された粒子としても存在し得る。遊離の粒子として、及び/又は宿主細胞に付着された粒子として、及び/又はプロウイルスとして感染した患者中に付随して存在し得るウイルスの臨床的に重要な一例は、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)である。

【0403】

既に上述されているように、ウイルスの生活環は高度に多様であり得る。典型的には、感染に際して、ウイルスは、宿主細胞中で複製し、新たなウイルス粒子の集合後に、宿主細胞から子孫が放出される。しかしながら、宿主に感染して直ちに複製することに代えて、幾つかのウイルスは、潜伏したプロウイルスの形態で、宿主細胞のゲノム中へその遺伝情報を統合する。さらに、ウイルスは、専ら、例えば、血流中を循環する遊離のウイルス粒子の形態で宿主内を拡散し得る。他のウイルスは、遊離のウイルス粒子として存在するのみならず、例えば、血液細胞に付着された状態を保ち、血液細胞を輸送担体として使用する細胞随伴ウイルスの形態でも存在し得る。特に、このような多様なウイルスプールは、宿主中で異なる寿命(インビボ半減期)も示し得る(すなわち、異なる期間にわたって検出可能であり得る。)(図35も参照)。例えば、HIV感染の場合には、血漿中を循環する遊離のウイルスは平均0.3日の寿命(すなわち、0.24日のインビボ半減期)を有するのに対して、感染した細胞(例えば、HIVプロウイルスを有する白血球)は、2.2日の平均半減期(すなわち、1.6日のインビボ半減期)を有することが示されている(例えば、Perelson, A. S. et al. (1996) Science 271, 1582-1586)。

【0404】

従って、ウイルスの生活環の異なる状態を全て含み、ある宿主中に存在し得る全ての異なる(空間的に限局された)ウイルスプールを高い感度で検出する指標を用いることが、罹患した患者中の特定のウイルスを確実に検出するのに、及び/又はウイルスの負荷量を正確に測定するのに適切である。このことは、ウイルスコピー数の僅かな変化でさえ、例えば、再感染の開始に対する又は抗ウイルス療法の付随的(incident)効力に対する指標となり得るかなり低いウイルス負荷量(例えば、5000ウイルスコピー未満/mL血漿又は2000ウイルスコピー未満/mL血漿)のみを有する患者において特に重要であり得る。

【0405】

全ウイルス核酸の量、特に、患者から得られた処理されていない試料中の全ウイルス核酸の量は、ウイルス感染を診断するための優れた臨床マーカーとなり得る指標に相当することが見出された。

【0406】

例えば、患者がHIVに感染している場合には、その患者から得られた全血試料中に存在し得るHIV感染と関連する核酸は、遊離のHIVに由来するRNA分子(すなわち、血漿中を自由に循環しているウイルス粒子)、細胞に随伴しているHIVに由来するRNA分子(すなわち、血液細胞の何れかの種類に付着されたウイルス粒子)、宿主のゲノム

10

20

30

40

50

中に組み込まれているプロウイルスHIV DNA分子、逆転写されたHIV DNA分子及びプロウイルスDNAに由来するHIV転写物を含む。しかしながら、他の全てのHIV核酸種は患者の除去された血液細胞に随伴しているため、同じ患者から得られた血漿試料は、遊離のHIVに由来するRNA分子のみを含む。従って、全血試料に由来する全HIV核酸の量は、血漿試料に由来する全HIV核酸の量より信頼性が高いHIV用の診断マーカーに相当することが明らかである(図35も参照)。

【0407】

マーカーとして使用される全HIV核酸の量は、HIVを検出し、患者中のHIV負荷量を測定し、HIVに感染した患者中での疾病の進行をモニタリングし、及び/又はHIVに感染した患者の抗ウイルス治療の効率性をモニタリングするための指標であり得る。全HIV核酸の量は、遊離のウイルス及び細胞に随伴したウイルスに由来する核酸を含むことができ、この核酸は、次いで、遊離のウイルスに由来するRNA、細胞に随伴したウイルスに由来するRNA、プロウイルスDNA、逆転写されたウイルスDNA及び転写されたプロウイルスRNAを含み得る。

【0408】

図1aを参照すると、分子標的を測定するための方法100は、(アンカー基を有する捕捉分子の存在下で、試料、例えば、全血を溶解するための)溶解工程102、(HIV核酸とアンカー基を有する捕捉プローブの複合体を形成するための(例えば、ハイブリッド形成))複合体形成工程110、(アンカー基を介して、固体マトリックス上に複合体を捕捉するための)捕捉工程114、(全ての非結合材料、例えば、核酸、タンパク質、低分子量きょう雑物質などを除去するための)洗浄工程118、(捕捉された核酸を増幅及び標識するための)増幅工程120及び(アンプリコンを検出するための)検出工程126を含む。方法100に従って、ポリヌクレオチドは、試料の1つ又はそれ以上の標的病原体から放出される。標的病原体に伴われている放出されたポリヌクレオチドは、表面で捕捉される。捕捉されたポリヌクレオチドは、試料のきょう雑物質(例えば、増幅阻害剤)から分離される。分離された、捕捉されたポリヌクレオチドは増幅されて、アンプリコンを形成する。ポリヌクレオチドの存在は、アンプリコンを検出することによって決定される。増幅されたポリヌクレオチドは標的病原体に伴われているので、1つ又はそれ以上の標的病原体の存在及び/又は正体を(例えば、定性的に及び/又は定量的に)決定することができる。典型的な実施形態において、方法100は、血液試料中に存在する1つ又はそれ以上のウイルスの測定に基づいて、ウイルス負荷量を測定することを含む。次に、方法100の様々な工程について論じる。

【0409】

溶解工程102において、血液試料104中に存在する病原体からポリヌクレオチド106が放出される。ポリヌクレオチドは、所望に応じて(例えば、熱的に、化学的に、機械的に又はこれらの組み合わせによって)、標的病原体から放出させることができる。典型的な実施形態において、試料中の病原体を溶解する物質を含む溶解液と試料104を混ぜ合わせることによって、ポリヌクレオチドが放出される。病原体を溶解することができる液体の例は、「BoomR., Sol CJ., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J., Rapid And Simple Method For Purification Of Nucleic Acids, J. Clin. Microbiol. 1990 Mar; 28(3): 495-503」(参照により、本明細書に組み込まれる。)に見出される。

【0410】

典型的な溶解液は、変性剤(例えば、グアニジンチオシアナート(GuSCN)(例えば、約4.57M))、pH緩衝液(例えば、Tris-HCl(例えば、pH6.4、45mM))、キレート物質(例えば、EDTA20mM)及び界面活性剤(例えば、TritonX-1001.2%(w/v)及び/又はサポニン(例えば、0.2%))、塩(例えば、MgCl₂(例えば、75mM)及び/又はZnCl₂(例えば、1mM))

10

20

30

40

50

の1つ又はそれ以上を含む。

【0411】

溶解工程102は、放出されたポリヌクレオチド106、試料104のきょう雑物質（例えば、細胞成分、増幅阻害剤、タンパク質及び他の物質）及び捕捉分子108iを含む混合物を形成することを典型的に含む。各捕捉分子108iは、ポリヌクレオチド結合部分109i及びビオチンアンカー基111を含む。各ポリヌクレオチド結合部分109iは、ポリヌクレオチド106の異なる領域に対して相補的な（例えば、特異的な）ポリヌクレオチド配列である。例えば、捕捉分子108aは、ポリヌクレオチド106の標的領域113に対して相補的な結合部分109aを含み、捕捉分子108bはポリヌクレオチド106の異なる標的領域115に対して相補的な結合部分109bを含む。典型的には、各ポリヌクレオチドを測定するために、少なくとも1つの（例えば、2つ又はそれ以上、3つ又はそれ以上、4つ又はそれ以上）異なる捕捉分子が使用される。

10

【0412】

幾つかの実施形態において、ポリヌクレオチド106は、捕捉分子108iの存在下で、標的病原体から放出される。これは、例えば、捕捉分子108i及び溶解液成分と試料104を実質的に同時に混ぜ合わせることによって達成することができる。試料104は捕捉分子108iと混ぜ合わせることができ、溶解液の成分は、捕捉分子108i及び液体状態又は乾燥された（例えば、凍結乾燥された）状態の溶解液成分と混ぜ合わせることができる。

【0413】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドは試料104の病原体から放出され、得られた混合物は捕捉分子108iと混ぜ合わされる。例えば、試料104及び捕捉分子108iを除外した溶解液成分を混ぜ合わせ、温置された混合物を捕捉分子108iと混ぜ合わせる前に、一定の時間、温置することができる。

20

【0414】

典型的な実施形態において、ポリヌクレオチド106はHIV-RNAであり、捕捉分子108iの結合部分109iはその領域に対して相補的である。

【0415】

複合体形成工程110に話を変えると、1つ又はそれ以上の捕捉分子108iはポリヌクレオチド106と結合して（例えば、ハイブリッドを形成して）、複合体112を形成する。複合体形成工程110は、例えば、複合体112を形成するのに十分な捕捉分子108iの存在下で、十分な時間、放出されたポリヌクレオチド106を温置させることによって実施することができる。幾つかの実施形態において、温置期間は少なくとも約60秒（例えば、少なくとも約120秒、少なくとも約360秒）である。幾つかの実施形態において、温置期間は約600秒又はそれ以下（例えば、約480秒又はそれ以下、約420秒又はそれ以下）である。典型的な実施形態において、温置期間は約5分である。

30

【0416】

測定されるべき各ポリヌクレオチドに関して、捕捉分子108iの総濃度は、典型的には、複合体112中のポリヌクレオチドの多く（例えば、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも90%、実質的に全て）を捕捉するのに十分である。幾つかの実施形態において、捕捉分子108iの1つ又はそれ以上（例えば、ほとんど又は全て）のそれぞれの濃度は少なくとも約0.1 μ M（例えば、少なくとも約0.25 μ M、少なくとも0.5 μ M）である。捕捉分子の1つ又はそれ以上（例えば、ほとんど又は全て）の各々濃度は、典型的には、約2 μ M又はそれ以下（例えば、約1.5 μ M又はそれ以下、約1 μ M又はそれ以下）である。典型的な実施形態において、捕捉分子の1つ又はそれ以上（例えば、ほとんど又は全て）の各々濃度は、約0.625 μ Mである。

40

【0417】

捕捉工程114に話を変えると、複合体112と捕捉粒子117は結合されて、捕捉複合体119を形成する。各捕捉複合体119は、1つ又はそれ以上の112及び捕捉粒子117を含む。複合体112は、典型的には、粒子117に非選択的に結合されている。

50

各捕捉粒子117は、ストレプトアビジン捕捉表面116を含む。捕捉粒子117は、捕捉分子108iの1つ又はそれ以上のビオチンアンカー基とストレプトアビジン捕捉表面116の間での相互作用によって、各複合体112を捕捉する。典型的な捕捉粒子117は、エタノールを除去するために、 d_2H_2O で予め洗浄された、約34 μm の直径を有するストレプトアビジンセファロースビーズ(Amersham)を含む。アッセイ当たり約10000から20000個のビーズが使用され、全血10 μL 当たりビオチン約3nmolの結合能に相当する。

【0418】

典型的には、捕捉工程114は、複合体112を形成するのに十分な時間、ポリヌクレオチド106及び捕捉分子108iとともに試料104を温置した後に開始される。例えば、得られた混合物を捕捉粒子117と結合させる前に、試料104を、溶解液と捕捉分子108iの存在下で温置することができる。

10

【0419】

典型的には、捕捉分子108i及び粒子117の総濃度が、試料104中の1つ又はそれ以上の標的病原体の各々に伴われている1つ又はそれ以上の選択されたポリヌクレオチド106の各々を定量的に捕捉するのに十分である。従って、測定されるべき各ポリヌクレオチド106に関して、ポリヌクレオチドの実質的に全て(例えば、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%又は実質的に全て)が、捕捉分子108i及び粒子117によって捕捉される。

【0420】

20

洗浄工程118に話を変えると、捕捉複合体119は、粒子117によって捕捉されなかったきょう雑物質(例えば、核酸、タンパク質、細胞成分、溶解試薬など)から分離される。幾つかの実施形態において、捕捉複合体119の通過を妨げるのに十分小さいが、粒子117によって捕捉されなかった物質の通過を許容するのに十分大きい孔を有するフィルターを用いて、捕捉複合体119がろ過される。

【0421】

捕捉複合体119は、並存する物質の分離を強化するために、洗浄液で洗浄することができる。幾つかの実施形態において、2つ又はそれ以上の異なる洗浄液が使用される。幾つかの実施形態において、疎水性相互作用を介して、粒子に接着している低分子量物質、タンパク質及び他の細胞成分を除去するために、第一の洗浄液は界面活性剤を含有し、第二の洗浄液は、除去しなければ、その後の増幅プロセスを妨害し得る界面活性剤を除去する。典型的な第一の洗浄液は、0.15M LiCl、0.1% SDS(SDSはPCR阻害剤なので、PCR手順前に除去され得る。)、10mM Tris-HCl pH 8.0及び1mM EDTAを含む。典型的な第二の洗浄液は、0.15M LiCl、10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM EDTAを含む。典型的な洗浄液は、例えば、米国特許出願公開20040215011A1に記載されている。

30

【0422】

増幅工程120に話を変えると、ポリヌクレオチド106は、プローブ122を用いて増幅される。典型的には、増幅はPCR増幅である。典型的な実施形態において、ポリヌクレオチド106はRNAであり、増幅はRT-PCRである。幾つかの実施形態において、病原体はHIVである。

40

【0423】

図1dを参照すると、幾つかの実施形態において、増幅工程120はアンプリコン130を産生する。ハイブリッド形成条件下(例えば、温度)において、アンプリコン130は、粒子117のストレプトアビジン表面116に固定された捕捉プローブ分子108a、108b及び108cによって捕捉される。アンプリコンは、光学的標識124(例えば、蛍光標識)及びアンプリコン130の一領域に対して相補的なポリヌクレオチド部分129を含む蛍光標識剤125で標識される。

【0424】

図1eを参照すると、別の実施形態において、各プローブ122は、光学的標識124

50

(例えば、蛍光標識)を含む。他のプローブ108jは、アンプリコン130のある領域に対して相補的なポリヌクレオチド部分109jを含み、ビオチンアンカー基111も担持する。プローブ分子108jは、粒子117のストレプトアビジン表面116に捕捉される。増幅工程124は、それぞれ標識124を含む直接標識されたアンプリコン130を産生する。アンプリコン130は、固定化されたプローブ分子108jによって、粒子117のストレプトアビジン表面116上に捕捉される。プローブ108jの結合部分109jは、捕捉工程114に使用されるプローブ108iと同一であり得、又は異なり得る。プローブ108j及び/又はビーズ117は、増幅工程120を実施するために使用される他の成分と一緒に、ポリヌクレオチド106と結合され得る。

【0425】

検出工程126において、(例えば、標識111の蛍光検出によって)アンプリコン130が検出される。検出工程126は、粒子117のストレプトアビジン表面116に捕捉されたアンプリコン130を用いて実施することができる。検出工程126は、プローブ122を含まない液体とアンプリコンを最初に混合せずに実施することができる。例えば、検出工程126は、第一の表面と第二の表面の距離を低下させた後に、第一の表面と第二の表面の間に存在する捕捉されたアンプリコン130を用いて実施することができる。検出工程126を実施するためのこの方法の実施形態は、図1b及び図1cに関して、次に論述されている。

【0426】

図1b及び図1cを参照すると、方法100の少なくとも検出工程126を実施するためのシステム200は、微小流体カートリッジ202、検出システム210、ステンシルアクチュエータ212並びに検出システム210及びアクチュエータ212と連動しているプロセッサ218を含む。

【0427】

カートリッジ202は、第一の基材206及び第二の基材208を含み、両者で検出チャンバー204を画する。第一の基材206は、アンプリコン130の標識124由来の蛍光を励起及び検出するために有用な光の波長に関して、典型的には、光学的に透過性(例えば、透明)である。第一の基材206は、例えば、ポリマー、ガラス又はシリカから形成され得る。第二の基材208は、可撓性の又は柔軟な物質(例えば、弾性ポリマー)から形成される。一般に、第一の基材206は、第二の基材208より柔軟性が低い。

【0428】

アクチュエータ212は、ステンシル214並びに第二の基材208に向かうように、及び第二の基材208から離れるようにステンシルを駆動するように構成されたステンシル駆動装置236を含む。ステンシル駆動装置236は、例えば、圧縮空気、電磁気、圧電又は別の適切な駆動作用によって作動され得る。図1cから明らかなように、第二の基材208の壁238に向かうように作動される場合、ステンシル214は第一の基材206の内壁232と第二の基材208の内壁234の間の距離[d]を減少させる。図1cの距離が減少した状態において、捕捉されたアンプリコン130を有する少なくとも幾つかの捕捉粒子117は、表面232、234の間に留まる。これに対して、粒子117を取り囲む液体の多くは、表面232、234の間から排除される。

【0429】

検出システム210は、図1cの距離が低下した状態において、カートリッジ202により、アンプリコン130の存在を検出するように構成される。検出システム210は、光源246(例えば、レーザー)、画像検出装置240及び光学システム242を含む。使用時に、光源246は、基材206、208の内面232、234の間に存在する物質を照射する。アンプリコン130由来の標識124から放射される蛍光250が検出される。検出された蛍光250は、アンプリコン130の存在の指標である。プロセッサ218は、検出された蛍光の指標である、検出システム210由来のシグナルを受信する。プロセッサ218は、アンプリコン130の存在を測定することができ、従って、試料104中の対応する病原体の存在を測定することができる。

10

20

30

40

50

【0430】

一般に、内面232、234の間に残存する液体は、アンプリコン130の存在と関連しないバックグラウンド蛍光252を放射する。バックグラウンド蛍光252の強度は、内面232、234の間に残存する液体の量に、一般に比例する。しかしながら、アンプリコン130の標識124由来の標識蛍光250の強度は、粒子117の近くに、空間的に局在化されている。画像化検出装置240は、標識蛍光250とバックグラウンド蛍光252の両方を受光し、検出する。しかしながら、図1cの距離が減少した状態では、内面232、234間の液体は排除されるので、図1bの減少していない状態より、バックグラウンド蛍光250に対する標識蛍光252のシグナル対ノイズが高い。

【0431】

方法100の典型的な実施形態は、以下のように行うことができる。毛細血液（例えば、指の先、耳たぶ）の約5及び10 μ lを個体から採取する。溶解成分及び捕捉分子108iを含む溶解緩衝液約90 μ lと、血液試料を混ぜ合わせる。21で、約5分間、撹拌しながら、得られた混合物を温置する。温置された混合物を、スラリー約10 μ lと等しい粒子117の量（3nmolピオチンの結合能と対応する。）と合わせる。すなわち、20%エタノール中の粒子のスラリーとして、粒子を購入する。21で、約5分間、撹拌しながら、粒子との混合物を温置する。温置後、カートリッジ300を稼働させるためのステンシルアクチュエータシステム350によって上清を除去する。第一の洗浄緩衝液で（例えば、各回50 μ lの容量を用いて3回）、次いで、第二の洗浄緩衝液で（例えば、各回50 μ lの容量を用いて3回）、粒子を洗浄した。洗浄後、上清を除去する。洗浄された粒子を増幅培地と混合し、捕捉されたポリヌクレオチド106の検出（例えば、定量）のためにqRT-PCR増幅に供する。

【0432】

図14を参照すると、（例えば、図1b及び1cに示されているような装置の減少した距離モードを用いて）アンプリコン130からの蛍光が検出される。アンプリコン130は、増幅の複数の異なる加熱及び冷却サイクルの各々の後に検出することができる。このようにして、アンプリコン濃度の蓄積を経時的に追跡することができる。アンプリコンは、典型的には、粒子117に結合されながら検出される。

【0433】

方法100は、病原体からポリヌクレオチドを放出させる工程を含むものとして記載されているが、方法100は、ポリヌクレオチドを提供するための他の工程を含むことができる。幾つかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、非病原性細胞（例えば、植物、ヒト、動物など）から放出される。幾つかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、遺伝子発現分析の産物である。幾つかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、放出工程を必要とせずに、及び/又は細胞若しくは他の生物学的試料から既に放出されたポリヌクレオチドとして提供される。

【0434】

次に、方法100のほとんどの（例えば、全ての）工程を典型的に実施することができるアッセイシステム及び微小流体カートリッジの実施形態について論じる。

【0435】

図2を参照すると、微小流体カートリッジ300は、第一の基材301、第二の基材303及び微小流体ネットワーク305を含む。第一及び第二の基材301、303は、カートリッジ202の基材206、208に対して記載されているものと類似の特性を有することができる。

【0436】

微小流体ネットワーク305は、試料及び様々な試薬材料を受容し、これらの材料に対して行うべき手順（例えば、混合、輸送及び温置）を可能とし、1つ又はそれ以上の標的病原体の存在の指標となるアンプリコンの検出を促進するように構成される。

【0437】

微小流体ネットワーク305は、チャンネル304によって溶解チャンバー306へ接続

10

20

30

40

50

された試料注入口302（溶解チャンバー306は、チャンネル308及び合流部307によって、検出チャンバー332へ接続されている。）；第一の液体注入口310は、チャンネル312によって、第一の試薬チャンバー314へ接続されており、第一の試薬チャンバー314は、チャンネル316によって、合流部307へ接続されており；第二の液体注入口318は、チャンネル319によって、第二の試薬チャンバー320へ接続されており、第二の試薬チャンバー320は、チャンネル332によって、合流部307へ接続されている。第三の液体注入口324は、チャンネル326によって、増幅標識試薬チャンバー328へ接続されており、増幅標識試薬チャンバー328はチャンネル330によって合流部307へ接続されている。合流部307は、廃棄チャンネル336を介して、廃棄チャンバー334へ接続されている。検出チャンバー332は、廃棄チャンネル340を介して、廃棄チャンバー334へ接続されており、廃棄チャンネル340は、方法100の洗浄工程118において記載されているように、粒子317の通過を妨げるが、捕捉されていない材料の通過を許容するサイズにされたフィルターを含む。

10

【0438】

典型的には、試薬チャンバー306、314、320、328は、方法100に対して記載されている工程を実施するために使用される凍結乾燥された試薬（例えば、ペレットとして）を含む。使用時には、液体（例えば、水、緩衝液、水性溶媒又は他の液体）が、チャンバーに対応する注入口に導入される。液体は、凍結乾燥された試薬を可溶化して、液体を形成する。典型的な実施形態において、溶解チャンバー306は、標的病原体及び病原体のポリヌクレオチドに対応する捕捉分子308iの溶解を促進するために、凍結乾燥された試薬を含む。典型的には、チャンバー306の凍結乾燥された試薬は、単独で、又は添加された液体と組み合わせて、試料（例えば、全血試料）によって可溶化される。典型的な実施形態において、チャンバー314は、注入口310に導入された液体と混合されたときに、洗浄液（例えば、第一の洗浄液（緩衝液））を形成するための凍結乾燥された試薬を含む。典型的な実施形態において、チャンバー320は、注入口318に導入された液体と混合されたときに、洗浄液（例えば、第二の洗浄液（緩衝液））を形成するための凍結乾燥された試薬を含む。典型的な実施形態において、チャンバー328は、注入口324に導入された液体と混合されたときに、増幅混合物（例えば、第二の洗浄液（緩衝液））を形成するための凍結乾燥された試薬を含む。

20

【0439】

装置300の使用前に、粒子116は、チャンバー306の下流に位置するネットワーク305内に、典型的に配置される。例えば、粒子116は、使用前に、検出チャンバー332内に配置され得る。粒子116は、次に論述されているように、ステンシルの適切な動作によって、チャンバー306、314、320、328からの液体で洗浄され得る。

30

【0440】

図3を参照すれば、微小流体カートリッジ300が、カートリッジ300を作動させるためのステンシルアクチュエータシステム350と組み合わせて示されている。アクチュエータシステム300は、アクチュエータ基部352及び複数のステンシル354iを含む。各ステンシル354iは、ステンシル駆動装置236と類似の対応するステンシル駆動装置によって作動される。使用時に、カートリッジ300は、アクチュエータ基部352及びステンシル354iと向かい合う柔軟な基材303とともに配置される。各ステンシル354iは、微小流体ネットワーク305の異なる位置に空間的に対応する。例えば、ステンシル354dは、廃棄チャンネル336に対応する。作動されると、ステンシル354dはチャンネル336の上に横たわる基材303を圧縮することにより、チャンネル336を閉塞し、チャンネル336に沿った流体の通過を妨げる。

40

【0441】

従って、第二の基材303又はカバー要素の柔軟な特性は、ステンシル354iが柔軟な第二の基材303の専用の部分上に機械的力を発揮したときに、第二の基材303又はカバー要素が可逆的な様式で変形できるようにする。換言すれば、可逆的なバルブ作用が

50

望まれるのであれば、ステンシル354iによって付与される力が取り除かれたときに、対応するチャンネル336を沿って、再度、流体が通過できるように、第二の基材303がその元の位置の方向に戻る程度まで、第二の基材303の変形は可逆的である。

【0442】

これに対して、第一の基材301の堅固な特性は、第一の基材301上に、ステンシル354iによる力が加わった際に、バルブ機能に対して影響を有し得る第一の基材301の変形が起らないように、第一の基材301の素材が構成されているという事実を表す。その結果、第二の基材303は柔軟性を与えるのに対して、第一の基材301は安定性を与える。

【0443】

他のステンシルは、ネットワーク305の他のチャンネルへ同様に対応する。ステンシル354a、354cは、それぞれ、廃棄チャンネル340及び合流部307に対応する。ステンシル354、354cの作動は検出チャンバー332を密封し、その中の液体を著しく喪失することなく、複数の加熱及び冷却を実施することを可能とする。フィルター341は、粒子を喪失することなく、チャンバー306、314、320、328からの液体を用いて、チャンバー332内の粒子116を洗浄することを可能とする。さらに別のステンシルは、それぞれ、チャンバー306、314、320、328及び332に対応する。これらのステンシルの反復動作は、(例えば、試料及び試薬の)混合を促進するために、チャンバー内の材料(例えば、液体)を攪拌するために使用することができる。チャンネルに沿って液体を移動させるために、チャンネルに沿ってステンシルを順次動作させることを使用できる。チャンバーの内容物は、例えば、チャンバーの上流、下流及びチャンパーに作動するそれぞれのステンシルの動作によって空にすることができる。

【0444】

一実施形態において、反復されたステンシルの動作及び除去(例えば、少なくとも10の動作及び除去、又は少なくとも50の動作及び除去)の際に、特定のステンシルの下に横たわる微小流体ネットワークの一部が繰り返し閉塞及び再開放され得るように、基材がその元の位置に向けて戻る点で基材は十分に可逆的である。

【0445】

カートリッジ300は、以下のように作動することができる。試料(例えば、全血)のある量(例えば、約5から10 μ lの間)及び必要に応じて添加される液体(例えば、水)のある量(例えば、約5と50 μ lの間)が、注入口302を介して、チャンパー306ネットワーク305に導入される。液体のある量(例えば、約20と200 μ lの間)は、対応する注入口を介して、チャンパー314、320、328へ導入される。それぞれに導入された試料及び必要に応じて使用される液体は、チャンパー306、314、320、328中に存在する凍結乾燥された試薬を再び可溶化する。各チャンパーに対応するステンシルは、チャンパー内の液体試薬混合物を攪拌して、混合を促進するために作動される。溶解チャンパー306内において、溶解緩衝液は、(例えば、溶解工程102におけるように)病原体からポリヌクレオチド106を放出する。放出されたポリヌクレオチドは、(例えば、複合体形成工程110におけるように)捕捉分子108iと結合して、複合体112を形成する。

【0446】

チャンパー306の溶解混合物は、検出チャンパー332に移動され、粒子116と合わされ、捕捉複合体119(例えば、捕捉工程114におけるように)を形成するために温置される。チャンパー332内の混合物は、例えば、ステンシルを用いて攪拌することができる。捕捉工程114の温置の終了時に、カートリッジ300を作動させるためのステンシルアクチュエータシステム350を用いて、検出チャンパー332から廃棄チャンパー334へ、液体/上清を除去する。

【0447】

廃棄チャンパー332から液体/上清を除去し、洗浄液をチャンパー314から除去した後、(例えば、洗浄工程118におけるように)複合体119から付随物を分離するた

10

20

30

40

50

めに、チャンバー 3 1 4、3 2 0 からの洗浄液を、チャンバー 3 3 2 を通じて移動させる。チャンバー 3 3 2 は、洗浄の間、ステンシル 3 5 4 b を介して攪拌することができる。

【 0 4 4 8 】

チャンバー 3 3 2 内の複合体 1 1 9 から付随物を分離した後、チャンバー 3 2 8 からの増幅試薬が検出チャンバー 3 3 2 へ移動され、（例えば、増幅工程 1 2 0 におけるように）得られた内容物は複数の PCR サイクルへ供せられる。

【 0 4 4 9 】

1 つ又はそれ以上の各増幅サイクル後に、検出チャンバー 3 3 2 の対向する内面間の距離を減少させるために、ステンシル 3 5 4 b が作動される。複合体 1 1 9 は、存在すれば、内面の間に捕捉されたままであるのに対して、他の内容物は、図 1 c 中の装置 2 0 0 に関して論述したように、相対的に排除される。典型的には、検出は、（例えば、装置 2 0 0 に対して記載されているように）蛍光検出システムを用いて実施される。検出は、（例えば、検出工程 1 2 6 におけるように）ハイブリッド形成され、複合体 1 1 9 として、粒子 1 1 7 に結合された状態の複合体 1 1 2 のアンプリコン 1 3 0 を用いて、典型的に実施される。各サイクル後に、アンプリコン 1 3 0 の集団が増加する。捕捉複合体 1 1 9 から得られた蛍光強度は、これに従って増加する。アンプリコン 1 3 0 を定量することができる閾値サイクルを決定するために、サイクル数に伴う蛍光強度の増加をモニタリングすることができる。ポリヌクレオチド 1 0 6 は、（例えば、捕捉工程 1 1 4 におけるように）定量的に捕捉されるので、アンプリコン 1 3 0 の定量的検出によって、試料中に存在するポリヌクレオチド 1 0 6 の量を定量的に測定することが可能となる。従って、例えば、病原体がウイルス（例えば、H I V）である場合には、試料（例えば、全血）内のウイルス負荷量を測定することができる。

【 0 4 5 0 】

カートリッジ 3 0 0 は、それぞれが異なる病原体サブタイプのポリヌクレオチド配列に対応する複数の固定化されたポリヌクレオチドを含むアレイをさらに含むことができる。検出工程 1 2 6 の後、病原体サブタイプを決定するために、アンプリコン 1 3 0 のハイブリッド形成が行われる。典型的な実施形態において、アレイは、H I V のサブタイプを決定するように構成されたポリヌクレオチドを含む。

【 0 4 5 1 】

カートリッジ 3 0 0 の動作は液体試薬の添加を含むものとして記載されているが、液体試薬は、プリスターパックとして、カートリッジ上に保存し、使用の間に放出させることができる。

【 0 4 5 2 】

標識 1 2 4 の存在を光学的に測定するのに適したシステムの他の例は、以下の出願：米国を指定国とし、2 0 0 4 年 5 月 6 日に提出されたドイツ国特許出願 D E 1 0 2 0 0 4 0 2 2 2 6 3 号の優先権を主張する 2 0 0 5 年 1 月 6 日に提出された国際特許出願 P C T / E P 2 0 0 5 / 0 0 4 9 2 3 号の米国継続出願、出願番号 U S 1 1 / 5 9 3 , 0 2 1 を有し、2 0 0 6 年 1 月 6 日に提出された米国継続出願の各々に記載されている。

【 0 4 5 3 】

次に、図 4 から図 1 6 を参照すると、典型的な実施形態に従った分析手順の間の様々な工程が説明されている。

【 0 4 5 4 】

図 4 は、溶解チャンバーを図解する。

【 0 4 5 5 】

図 5 から図 1 0 は、固体マトリックス上への RNA 複合体の捕捉を図解する。

【 0 4 5 6 】

図 1 1 は、洗浄を図解する。

【 0 4 5 7 】

図 1 2 及び図 1 3 は、増幅を図解する。

【 0 4 5 8 】

10

20

30

40

50

図14から図16は、検出を図解する。

【0459】

図17aは、試料からの標的を捕捉する工程、標的を増幅する工程及び試料中の標的の存在の指標となる1つ又はそれ以上の値を検出する工程を少なくとも実施するための典型的なシステム400を図解する。

【0460】

図17bは、試料からの標的を捕捉する工程、標的を増幅する工程及び試料中の標的の存在の指標となる1つ又はそれ以上の値を検出する工程を少なくとも実施するための、作動状態にある典型的なシステム400を図解する。

【0461】

図17cは、図17a及び17bに図示されているバルブユニット435に対する典型的な実施形態を図解する。

【0462】

図17dは、図17cに図示されているバルブ2に対する典型的な実施形態を図解する。

【0463】

図17a及びbを参照すると、典型的なシステム400は、微小流体カートリッジ401、検出システム455、カートリッジ451の少なくとも一部分を加熱及び/又は冷却するためのシステム、アクチュエータ要素441から444及びアクチュエータ437から440、バルブユニット435、コンプレッサ431、液体貯蔵槽461及びプロセッサ471を含む。

【0464】

カートリッジ401は、基材402及び第一のカバー要素403を含み、両者で第一及び第二のウェル408及び407を画する。カバー要素が基材402の方向へ可逆的に押圧され得るようにするために、第一のカバー要素403は、少なくとも部分的に柔軟である。カートリッジは第二のカバー要素をさらに含み、第二のカバー要素は基材402とともに、チャンネル410、411、412を画する。幾つかの実施形態において、第二のカバー要素も、少なくとも部分的に柔軟である。チャンネル及びウェルは、穴413、414、415、416によって相互接続されて、微小流体ネットワークを形成する。

【0465】

様々な実施形態において、基材402は、プラスチック、ガラス、金属又は半導体などのあらゆる適切な材料から構成されたあらゆる物理体であり得る。基材402は、実質的に平面状の(すなわち、二次元の)又は非平面状の(すなわち、三次元の)あらゆる表面であり得る。このような三次元の物体の例は、(チャンネルのような)流体路を含む反応チャンパー(その中で、生物学的、化学的又は生化学的反応が起こり得る。)を含む空洞又はウェルを有する物理体である。

【0466】

溶解ウェルとも表記され得る第一のウェル408は、流体を収容するように、及びシステム400によって分析すべき標的分子を含む、細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出するように適合されている。例えば、第一のウェル408は、上述のように、溶解試薬409を含むことによって、細胞、芽胞又はウイルスの内容物を放出するように適合され得る。溶解試薬409は、乾燥された形態で提供し得る。

【0467】

中央ウェルとも表記され得る第二のウェル407は流体を収容するように適合され、第一の結合要素としての粒子406を含み(該粒子は、捕捉分子と複合体を形成した標的を捕捉するように適合されている。)、及び、レポーター分子を捕捉するように適合された第二の結合要素407を必要に応じて含む。第二のウェル407は、粒子406の通過を妨げるが、気体、液体及び液体中に溶解された物質の通過を許容するフィルター要素405をさらに含む。ウェル407及び408は、穴415及び414を介して、チャンネル411によって相互接続されている。

10

20

30

40

50

【0468】

より一般には、第一及び第二のウェル408、407はあらゆる構造、すなわち試料又は物質を受容するための担体としての役割を果たし得るあらゆる物理的実体であり得る。特に、このような構造は、溝、ウェル又はチャンネルなどの陥凹を含むことができ、又はその中に物質を収容し、それを通じて、ゲルなどの物質を移動させることができる材料を覆うこともできる。

【0469】

様々な実施形態において、結合要素は、特異的な立体構造を有する分子を結合するように構成されている成分を含む。このような結合要素は、表面上に固定化された分子であり得、又はあり得ない。結合能は、表面立体構造（例えば、多孔性表面構造）からも直接生じ得る。結合要素は、ビーズ又は多孔性支持体などの三次元要素として、又は三次元要素上に提供されることも可能である。このような三次元要素又は三次元要素の表面に付着されたさらなる分子（例えば、粒子）の表面は、その後、結合要素として役割を果たし得る。異なる分子に対して感受性を示す異なる結合要素も、（例えば、マトリックス様の様式で）構造の表面上に配置し得る。結合要素の例は、本明細書に開示されている様々な方法に関して上述されている。

10

【0470】

溶解ウェル408及び中央ウェル407の容積は100µlであり得る。典型的な実施形態において、チャンネル410から412の幅は200µmであり、チャンネル410から412の高さは100µmである。

20

【0471】

様々な実施形態において、このような微小流体ネットワークは、互いに相互接続され得る1つ又はそれ以上のチャンネル及び/又はウェルを含み得る。例えば、このような微小流体ネットワークの様々なチャンネルは、二股に分かれ又は分岐することができ、これにより、所定の経路（図示せず）に沿って、微小流体ネットワークを通じた液体の輸送が可能となる。

【0472】

システム400は、空気圧式アクチュエータ437、438、439、440によって駆動されるアクチュエータ要素441、442、443、444を含むアクチュエータシステム、バルブユニット435、コンプレッサ431及び圧縮空気用貯留槽433も含む。コンプレッサ431は、圧縮空気用貯留槽433の中が所定の圧力になるように絶えず調整し得る。

30

【0473】

アクチュエータ要素441、442、443、444の各々は、対応するアクチュエータによって作動される。使用時に、カートリッジ401は、アクチュエータ及びアクチュエータ要素と向かい合う少なくとも部分的に柔軟なカバー要素403とともに配置される。各アクチュエータ要素は、カートリッジ401の微小流体ネットワークの異なる位置に空間的に対応する。例えば、アクチュエータ要素442は穴414に対応し、チャンネル411及び穴415を介して、ウェル407に通じる。作動されると、アクチュエータ要素442は、穴414の上に横たわる少なくとも部分的に柔軟なカバー403を圧縮し、これにより、穴414を閉塞し、穴414に沿った流体の通過を妨げる。他のアクチュエータ要素は、同様に、他の構造に対応する。例えば、アクチュエータ要素443及び444は、それぞれ、穴415及び416に対応する。アクチュエータ要素415、416の作動は第二のウェル407を密封し、例えば、その中の液体を著しく喪失することなく、複数の加熱及び冷却サイクルを実行できるようにする。

40

【0474】

アクチュエータ要素442の典型的な動作のために、調節ユニットはバルブユニットに信号を送る。バルブユニットは、アクチュエータ438への空気圧式接続436を開放し、これにより、アクチュエータ438に圧力をかける。従って、アクチュエータ要素442は外に移動し、穴414の上に横たわる少なくとも部分的に柔軟なカバー403を圧縮

50

する。アクチュエータ要素を開放するために、調節ユニットはバルブユニットにそれぞれの信号を送る。バルブユニットはアクチュエータ 4 3 8 に通じる空気圧式接続を閉鎖し、これにより、アクチュエータ 4 4 2 を元に戻し、穴 4 1 4 の上に横たわる少なくとも部分的に柔軟なカバー 4 0 3 を開放する。

【 0 4 7 5 】

アクチュエータ要素は、第一の柔軟なカバー 4 0 3 を弾性的に変形させて様々な作業を行うように適合させ得る。例えば、上述のように、アクチュエータ要素 4 4 2 は、穴 4 1 4 の上に横たわる少なくとも部分的に柔軟なカバー 4 0 3 を圧縮するように適合されることにより、穴 4 1 4 を閉塞し、穴 4 1 4 に沿った流体の通過を妨げるのに対して、アクチュエータ要素 4 4 1 は、ウェル 4 0 8 の上に横たわる第一の柔軟なカバーを繰り返し押圧し、開放することによって、ウェル 4 0 8 内の液体を移動させるように適合される。

10

【 0 4 7 6 】

一実施形態において、アクチュエータ要素は、機械的な力によって微小流体ネットワークの構造の各構造を選択的に開放又は閉鎖するように移動できる要素であり得る。例えば、このようなアクチュエータ要素は、柔軟なカバー要素を基材の表面上に押圧することにより、チャンネルを選択的に開放又は閉鎖するために、柔軟なカバーに対して押圧され得るピン又はステンシルであり得る。

【 0 4 7 7 】

幾つかの実施形態において、アクチュエータ要素 4 4 1、4 4 2、4 4 3、4 4 4 の先端は、シリコン、ゴムなどの弾性材料で作製されている。アクチュエータ要素 4 4 2、4 4 3 及び 4 4 4 の直径は、穴 4 1 4、4 1 5 及び 4 1 6 の直径の 1.5 倍であり得る。穴 4 1 4、4 1 5 及び 4 1 6 に対する典型的な直径は 0.5 mm である。

20

【 0 4 7 8 】

上述されているように、アクチュエータ 4 3 7 から 4 4 0 に連結された空気圧式バルブユニット 4 3 5 が提供される。バルブユニット 4 3 5 は、調節ユニット 4 7 1 からの駆動シグナルを受信する。従って、調節ユニット 4 7 1 はアクチュエータ要素 4 4 1 から 4 4 4 の作動を調節する。

【 0 4 7 9 】

マイクロプロセッサなどの調節ユニット 4 7 1 が取り付けられ、流体試料の標的分子が結合要素 4 0 6 に捕捉される様式で、流体試料の分析を調節するように適合される。調節ユニット 4 7 1 は、中央ウェル 4 0 7 中の標的分子の増幅をさらに調節する。さらに、調節ユニット 4 7 1 は、標的分子の存在及び / 又は量に対する指標となり、並びに結合要素 4 1 7 に捕捉された化合物の検出を調節する。標的分子の分析の間の全ての固相結合手順は、中央ウェル 4 0 7 中の結合要素 4 0 6 において行われる。特に、溶解ウェル 4 0 8 中では、固相結合手順は行われない。

30

【 0 4 8 0 】

ある実施形態において、調節ユニットは、装置の 1 つ又はそれ以上の他の要素の機能を調節することができ、及び各コンポーネントの機能を特に調和させ得る電気的要素であり得る。調節ユニットには、特定の分析、実験又はアッセイを実施することができるように、コード又はアルゴリズムを格納することができ、又はソフトウェアで、ハードウェアで、又は混成形態（すなわち、ソフトウェア及びハードウェアコンポーネントを含む。）でユーザ定義することができる。特に、このような調節ユニットは、処理能力を有し（場合により、保存能も有する）、特定の実験プロトコルを実施するように構成されたプロセッサを含み得る。特に、このような調節ユニットは、マイクロプロセッサ又は CPU（中央演算装置）であり得る。

40

【 0 4 8 1 】

空気圧式冷却装置 4 5 3、温度センサー（図示せず）及び基材 4 0 2 の上面の近くに配置された加熱及び / 又は冷却プレート 4 5 1 及び中央ウェル 4 0 7 中での分子の光学的検出を可能とするために、中央陥凹部 4 5 9 を有する第二の環状加熱及び / 又は冷却プレート 4 5 1 を含む温度操作ユニットによって、中央ウェル 4 0 7 中の流体の温度を操作する

50

ことができる。幾つかの実施形態において、加熱及び/又は冷却プレートは、加熱プレートの及び/又は第二のウェルの温度を調整するための温度センサーを含む。調節ユニット471は、プレート451の温度分布を調節することにより、(例えば、分析の間に標的分子を増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応を実施するための温度系列に従って)中央構造407中の液体の温度を操作し得る。特に、温度操作ユニット451は、中央ウェル407中に配置された液体の温度を95℃まで上昇させる能力を有する。

【0482】

加熱/冷却要素又はプレート451は、柔軟に戴置され得る。柔軟な戴置は、加熱/冷却要素全体の柔軟な戴置であり得る。加熱/冷却要素451を支持するフレームは、蝶番が加熱/冷却要素又はプレート451全体の柔軟な配置を可能とするように、例えば、担体構造へ蝶番で接続され得る。

10

【0483】

これに代えて又はこれに加えて、柔軟に戴置することはまた、それ自体、加熱/冷却要素451の柔軟性でもあり得る。これは、例えば、加熱/冷却源/ドレーンを含む、柔軟性のある層により達成され得る。加熱/冷却要素層を作動させるために、柔軟性のある層の後ろにある種の作動装置が提供され得る。このような作動装置は、例えば、可膨張式エアピローであり得る。しかし、柔軟性のある層はまた、裏面に弾性部材とともに提供され得、これにより、本構造に押し付けられた際に柔軟に適合するようになる。

【0484】

従って、加熱/冷却要素の少なくとも1つを柔軟に備え付けることによって、柔軟性のある加熱/冷却要素451が本構造又はプローブデバイスに柔軟に適応し得るので、効率的な熱転移が行われ得る。

20

【0485】

加熱/冷却要素451は、連結された柔軟性のある加熱/冷却要素451全体であり、柔軟性のある、加熱/冷却要素451そのものであり得る。

【0486】

実際に、また2つの加熱/冷却要素451も柔軟に備え付けられ得る。プローブデバイスを挟み込むために、両方の加熱/冷却要素がバタフライ様に配置され得る。同様にして、圧縮カウンタープレートとともに1個の加熱/冷却要素451が配置され得る。これにより、プローブデバイスを挿入した際に、特にプローブデバイスがその最終的位置に到達した後に加熱/冷却要素451がプローブデバイスの表面に向かって移動させられる際に、スクラッチが回避され得る。

30

【0487】

基材402とカバー要素404の間に、流体界面418が提供され、チャンネル410及び穴413を介して、水若しくは緩衝液などの液体又は空気などの気体を微小流体システム中に挿入することを可能とする。試料481を微小流体システム中に挿入することを可能とする別のインターフェース482を備え得る。

【0488】

幾つかの実施形態において、基材402は、少なくとも部分的に、光学的に透明であることにより、以下で説明されているように、中央ウェル407中のコンポーネントの光学的放射をベースとした検出を可能とする。

40

【0489】

レーザーダイオードなどの光学的光源(図示せず)を含む検出システム455は、第二の加熱要素451中の陥凹部459を通じて中央チャンバー407中に衝突する電磁波照射光線を生成するように適合される。このチャンバー407中の蛍光マーカの存在下で、第二の加熱要素451中の陥凹部459を通じて伝播することができる第二の電磁的光線が生成され、光ダイオードなどの検出システム455中の検出装置(図示せず)によって検出され得る。標的分子の濃度の指標となる検出装置システム455の検出シグナルは、調節ユニットインタフェース456を介したさらなる処理のために、調節ユニット471へ提供され得る。従って、図17から明らかなように、調節ユニット471は、検出装

50

置システム 455 の機能も協調させる。

【0490】

幾つかの実施形態において、検出の間、柔軟なカバー要素 403 と 404 の間の距離又は柔軟なカバー要素 403 及び 404 と基材 402 の距離を低下させることにより、検出ゾーンから、結合要素 406 又は 417 の一つに結合されていない材料を含む液体を除去するために、検出アクチュエータ 457 は中央ウェルを圧縮する。

【0491】

ウェル 408、407 によって、通過穴 413、414、415、416 によって、及びチャンネル 410、411、412 によって形成された微小流体ネットワークを通じて、水又は緩衝液などの液体を拍出させるために、液体供給 461 が付与される。

10

【0492】

装置 400 を通じた液体の輸送は、陰圧によって液体を吸引することによっても実施することができる（図示せず）。

【0493】

以下で典型的に説明されているように、チャンバー 408 中の流体レベルを調節するために、光学センサー 464 を付与することができる。ウェル 408 に液体供給 461 からの液体が充填されるべき場合には、調節ユニット 471 は、インターフェース 446 を介して、バルブユニット 435 へ対応するシグナルを送信する。バルブユニットはバルブを開放して、空気圧式接続 463 を介して、液体供給 461 に圧力をかけ、これにより、液体接続 462、チャンネル 410 及び穴 413 を介して、ウェル 408 中に液体供給 461

20

【0494】

光学センサー 464 がウェル 408 中の液体の存在の指標となるシグナルを検出すると、センサーはインターフェース 465 を介して調節ユニット 471 へシグナルを送信する。次いで、調節ユニット 471 は、バルブユニット 435 へシグナルを送信する。バルブユニットはバルブを閉鎖することにより、液体供給 461 に対する圧力を停止し、これにより、ウェル 408 外への液体の移動を停止させる。

【0495】

チャンネル（410、411、412、センサーは図示せず）又はウェル（407、センサーは図示せず）などの他の構造中の液体レベルを調節するために、他の光学センサーを取り付け得る。

30

【0496】

様々な実施形態において、試料 481 は、あらゆる固体、液体若しくは気体物質又はこれらの組み合わせを含み得る。例えば、物質は液体又は懸濁物であり得、より具体的には、生物学的物質（血液、特に全血など）であり得る。このような物質には、タンパク質、ポリペプチド、核酸、脂質、炭水化物、ウイルス、細菌などが含まれ得る。複数の実施形態において、試料は、標的を含んでいる可能性がある組成物である。

【0497】

図 17 から理解できるように、調節ユニット 471 は、インターフェース 447 を介して、ポンプ 431 も調節する。圧縮された空気に対する貯蔵槽 433 は、ポンプ手順をアクチュエータ 437 から 440、空気圧式冷却装置 453 及び検出アクチュエータ 457 の実行と調和させるように付与され得る。

40

【0498】

システム 400 は、入力/出力装置とも表記され得るユーザインターフェースユニット 472 をさらに含む。ユーザインターフェースユニット 472 を介して、ユーザは、システム 400 によって実行される実験を定義することができる。換言すれば、ユーザインターフェース 472 によって、特定のアッセイを実行するように、ユーザはシステム 400 をプログラムすることが可能となり得る。ユーザインターフェース 472 は、LCD、プラズマ装置又は陰極線管などのディスプレイユニットを有するグラフィカルユーザインターフェース（GUI）を含むことができる。さらに、ユーザインターフェース 472 に、

50

キーパッド、ジョイスティック、ボタン、トラックボール又は音声認識システムのマイクロフォンなどの入力要素を付与することができる。ユーザインターフェース472は、データ接続を介して、調節ユニットに接続される。

【0499】

図17c及びdを参照すると、幾つかの実施例において、バルブユニット435は、多数の(n)単一バルブ(2)からなる。各バルブは、チャンネル(2.3)及び固定子(2.2)(何れも連続的に戴置され、一定の圧力をかけるために、4つのバネで固定されている。)を含むローター(2.1)から構成されている。各バルブは4つの穴(a、b、c、d)を有しており、aは換気装置と接続されており、b)はコンプレッサに接続されており、c)は空気圧式アクチュエータと接続されており、及びd)はアクチュエータの換気部位に接続されている。

10

【0500】

キャリア(3)は、チューブ内側に配置されているボールネジ(4)に接続されている。チューブ(6)内のスロットは、キャリアを移動可能とする。駆動シャフト(5)の回転移動はボールネジ及び接続されたキャリアをX方向に移動させる。これにより、各バルブ(2)の位置にキャリアが移動可能となる。キャリアは、ローター(2.1)の中に嵌まり込む。チューブ(6)の90°移動は、キャリア(3)及びローター(2.1)の90°移動をもたらす。ローター円板中のローター及びポケットは、バルブ接続を開放又は閉鎖させる(a、b及びc、d; d, a及びb、c)。

【0501】

20

以下では、図18及び図19を参照して、別の典型的な実施形態に係る装置500を説明する。図18は前面図を示し、図19は装置500の背面図を示す。装置500は、装置500に試料を供給することができる挿管(図示せず)を挿入するための、基材402の中に形成された溝501を含む。溶解のために必要とされる材料を乾燥された形態でその中に保存することができる溶解チャンバー502が取り付けられている。中央ウェル512は、装置500を作動させるのに必要とされる全ての固相カップリング手順を実施する役割を果たす。その中に様々なさらなる物質が乾燥された形態で提供され、洗浄手順、PCR手順などの役割を果たすことができるさらなるウェル504、506、508及び510が設置されている。もはや分析のために不要となった液体をその中に輸送することができるウェルとして、廃棄チャンバー514が設置されている。

30

【0502】

図18及び図19には示されていないが、廃棄チャンバー514に入る流体を吸収することができる液体吸収性材料を廃棄チャンバー514に取り付け得る。この措置を講じることによって、装置500の他の部分中への廃棄チャンバー514からの液体の望ましくない逆流を確実に予防し、これにより、一切のきょう雑を回避し得る。例えば、(おむつ中に使用し得る)膨潤可能なポリマーをこのような目的のために使用し得る。

【0503】

図18から具体的に理解できるように、チャンネルの様々な1つを接続する流体接続ポート520、524、521、525、540、542、544、545、548、578、580、558、562、564、560、561、552、550、516、554、530、528、532及び526の複数が付与され、これらは以下で説明される。

40

【0504】

図19から明らかなように、さらなる流体接続ポート541、560、566、519、512が示されている。さらに、チャンネル538、522、518、527、529、536、572、574、576、539、562、570、546、556、568及び534の複数は、様々な流体接続ポート520、524、521、525、540、542、544、545、548、578、580、558、562、564、560、561、552、550、516、554、530、528、532、526、541、560、566、519並びにウェル502、504、506、508、510及び512を接続することが予想される。この他に、流体注入ポート593が示されており、流体注

50

入ポート593を介して、水などの流体を装置500中に注入し得る。流体排出ポート594を介して、(圧力を低下させるために除去された空気などの)流体を装置500から除去し得る。さらなる流体注入/排出ポート597も示されている。

【0505】

光障壁によって到達可能な第一のウィンドウ部分598及び光障壁によって到達可能な第二のウィンドウ部分599が示されており、これらは、装置500内の流体カラムのメニスカスが光障壁に関連する透明なウィンドウ部分598、599を通過するとき、光学的に検出する役割を果し得る。ウィンドウ部分598、599に対応するチャンバーの1つが液体又は流出液に満たされていることを光障壁の1つが検出すると、これは光学的に検出されることができ、調節ユニット(図18及び図19には図示されていない。)を調節し、対応して、装置500の動作を調節するために調節シグナルを生成する役割を果し得る。

10

【0506】

挿管の第一の部分が溝501中に挿入されると、患者から血液試料を採取し、全血試料を装置500中に直接注入するために、挿管の第二の部分は患者の中に挿入され得る。

【0507】

図18及び図19には示されていないが、ピンが流体接続ポート520、524、521、525、540、542、544、545、548、578、580、558、562、564、560、561、552、550、516、554、530、528、532、526、541、560、566、519の何れか各1つを選択的に開放又は閉鎖して、バルブ機能を実現するように、流体接続ポート520、524、521、525、540、542、544、545、548、578、580、558、562、564、560、561、552、550、516、554、530、528、532、526、541、560、566、519の何れの一つも、アクチュエータピン(図18及び図19には図示されていない。)によって圧縮され得る柔軟な部材によって覆われ得る。

20

【0508】

図18及び図19には示されていないが、ピンがウェル502、504、506、508、510及び512上に選択的に押圧する役割を果たし、混合装置又はポンプとしての役割を果たせるように、ウェル502、504、506、508、510及び512の何れの一つも、アクチュエータピン(図18及び図19には図示されていない。)によって圧縮され得る柔軟な要素によって覆われ得る。

30

【0509】

図18から理解できるように、中央ウェル512を形成するコンポーネント587は、基材402の溝585、583の中に挿入され得る成型されたプラスチック部材である。このプラスチック部材587は、コンポーネント590、591、578、548、580、558などが形成されるように、両側からパターン化され、又は構造化され得る。

【0510】

以下では、特に中央ウェル512を基礎とする装置500中で行われるアッセイが説明されており、このアッセイは、迅速に、例えば1時間以内に、HIV存在量の測定を実行することを可能とし得る。

40

【0511】

中央チャンバー512の中には、ビーズを付与し得る。これらのビーズは、予め溶解された試料からの標的分子(例えば、HIV RNA)を捕捉するように構成され得る。例えば、ビーズは、捕捉分子のアンカー基を結合して、標的ヌクレオチドと捕捉分子を含む複合体を結合するように構成することができ、捕捉分子は、標的ポリヌクレオチドの一領域に対して特異的な結合部分とアンカー基を含む。

【0512】

参照番号541は、圧縮された空気が要素538、518、516を通過し、ウェル502の中に入ることができるように、圧縮された空気(図19の矢印を参照)への接続を表す。従って、圧縮された空気を用いて、ウェル502を汲み出して空にすることができ

50

る。溝501を介して供給された血液試料を水で希釈すべき場合には、このような水は、流体注入口593を介して供給され得る。

【0513】

一実施形態において、例えば溶解のために、全血試料（又は他の何らかの試料）をウェル502中に輸送し得る。まず、チャンバーを圧縮し、溶解チャンバー502と接触している毛管に血液を付与し、次いで、溶解チャンバー502を開放することにより、血液を装置500中に浸すことによって、血液を装置500の中に浸すことができる。

【0514】

この目的のために、上述されているような対応する溶解剤が、溶解ウェル502中に、乾燥された形態で提供されている。溶解ウェルは、それぞれアンカー基と標的ポリヌクレオチドのある領域に対して特異的な結合部分とを含む捕捉分子をさらに含み得る。それぞれ標的ポリヌクレオチドと捕捉分子を含む複合体をこの時点で含み得る試料は、次いで、（圧縮された空気を介して）コンポーネント554、556を介して、コンポーネント558に輸送することができる。このシナリオでは、コンポーネント552は、対応するアクチュエータによって閉鎖される。コンポーネント558、580を介して、中央ウェル512中に試料を輸送され得る。この目的のために、中央ウェル512の溝591、590は、流体の流れる力の影響下にある中央ウェル502から、このウェル502中のビーズが除去されないように、フリット（図18及び図19には図示せず）などのフィルターを備えることができる。従って、溝591、590中のフィルター又はフリットを介して、溶解された試料は、コンポーネント576を介して、中央ウェル512中へ輸送され得る。

【0515】

中央ウェル512には、標的又は標的ポリヌクレオチドと捕捉分子を含む複合体が中央チャンバー512中の固体捕捉構造上で結合できるように、ビーズ又は表面機能化などの第一の結合要素を付与され得る。ビーズが試料材料と適切に混合するように、温置を実行し得る。

【0516】

空気の流れが、コンポーネント558、560、561を介して、中央ウェル512から廃棄514中へ液体（すなわち、溶解された試料の捕捉されていないコンポーネント）を押圧する。従って、中央ウェル512中のビーズによって捕捉されなかった試料コンポーネントの多くは、廃棄チャンバー514の中に輸送される。従って、標的のみが中央ウェル512中に留まり、全血試料の残りは、この時点で、廃棄514の中に存在する。従って、中央ウェル512は、この時点で、捕捉プローブと標的を含む複合体と一緒に、ビーズを収容する。

【0517】

その後、中央ウェル512を洗浄することができ、洗浄ウェル504中に、固体様式で与えられた洗浄緩衝液に対するコンポーネントが、洗浄緩衝液を作製するために使用される。特に、全血が使用される場合、又は溝501の中に挿入された挿管を介して試料が供給される場合、捕捉手順後に、幾らかの不純物がチャンバー502中に存在し得るので、このような洗浄手順は有利であり得る。

【0518】

洗浄液は、空気圧の影響下で、コンポーネント541、540、542、546、548、578、591、574、512を介して拍出され得る。

【0519】

既に上述されているように、洗浄緩衝液は洗浄ウェル504中で調製される。洗浄ウェル504では、このような洗浄緩衝液のための塩が乾燥された形態で存在し得る。洗浄緩衝液を調製するために、水がコンポーネント521（開放）に供給されるように、（コンポーネント554を閉鎖しながら）コンポーネント564、562、570、552、527（コンポーネント532、525、530は閉鎖されている。）を介して、コンポーネント566から水を輸送し得る。コンポーネント520に連結された透過性ウィンドウ

10

20

30

40

50

が水で満たされるまで（水で満たされたことは、コンポーネント520の隣の透過性ウィンドウに隣接する光障壁を通過するメニスカスを検出することによって検出し得る。）、水を洗浄ウェル504の中に汲み入れ得る。対応する検出シグナルを受領した時点で、水の供給が停止され得る。

【0520】

次いで、洗浄ウェル504を覆う柔軟なカバー要素を圧縮して、洗浄ウェル504の中に提供されている塩を溶解するための混合を実施するために、アクチュエータ（図示せず）を上下に往復運動させ得る。

【0521】

次いで、廃棄チャンパー514中に水が汲み入れられるように、様々なバルブの対応する調節によって、及び圧縮された空気を供給することによって、水で満たされたチャンネルを空にすることができる。

10

【0522】

洗浄手順が中央ウェル512中で実施され得るように、洗浄ウェル504中の調製された洗浄緩衝液は、次いで、中央ウェル512中へ押し出され得る。この洗浄後、洗浄溶液は廃棄チャンパー514中に拍出され得る。

【0523】

次に、標的RNAを対応するDNAへ転化させるために、逆転写を行うことができる。このような手順は、HIVなどのレトロウイルス科を検出する場合に特に必要であり、例えば、DNAウイルスが検出される場合など、他の事例では省略することができる。この

20

【0524】

必要に応じて、逆転写ウェル508中の成分は、逆転写の間に産生された中央ウェル512中のDNA分子を捕捉する特異的能力を有し得るさらなる捕捉分子の別の組も含み得る。

【0525】

逆転写後に、標的DNAはチャンパー512のビーズに留まらないので、溶液を廃棄容器514中へ輸送することは試料の量を低下させる。この目的のために、試料は、この時点で、中央ウェル512からPCRウェル510中へ拍出され、この試料内のPCRを溶解することができ、PCRウェル510中のPCR緩衝液は、標的ポリヌクレオチド、プライマー及び/又は緩衝液と複合体を形成することができるポリメラーゼ、レポーター分子を含み得る。あるいは、逆転写緩衝液は合成されたDNA鎖へ誘導される捕捉分子を含有し、これらの鎖の捕捉はHIV核酸の最初の捕捉と同様に起こる。この後、試料はポンプ作用で中央ウェル512中に汲み戻すことができる。

30

【0526】

しかしながら、実際のPCR増幅は、その後、中央ウェル512中で行われる。この目的のために、温度サイクルを実施することによって、すなわち、例えば95で5秒及び60で10秒の手順を40回繰り返すことによって、中央ウェル512中でPCRが行われる。別の実施形態において、例えば、95で20秒、55で30秒及び72で30秒の30サイクルなど、3つ又はそれ以上の異なる温度を含む温度サイクルを実施することができる。しかしながら、他のPCRサイクルプロトコールも、中央チャンパー中で実施することができる。

40

【0527】

幾つかの実施形態において、中央ウェル512中の温度を調整するために、中央ウェル512の上及び下に、2つの加熱及び/又は冷却プレートを取り付けることができる。別の実施形態において、2つの加熱及び/又は冷却ウェル又はプレートのうちの一方は連続的であり得、及び他方は、その後の光学的検出を可能とするために陥凹を有し得る。

【0528】

幾つかの実施形態において、PCRウェル510から中央ウェル512に送り出された

50

試料の容積は、中央ウェルの圧が上昇するような容積であり得る。この圧上昇により、2枚の加熱及び/又は冷却プレートに対して中央ウェルの柔軟性のあるカバー素子が押し付けられ、これにより、とりわけ、加熱/冷却プレートと中央ウェルとの間の熱転移が効率的になる。

【0529】

幾つかの実施形態において、増幅の間に、上述のように検出が行われ得る。

【0530】

例えば、第一の実施形態において、捕捉分子の競合的アッセイは中央ウェル512中で行い得る。従って、この実施形態において、ビーズなどの第一の結合要素は、それぞれ標的分子と捕捉分子を含む複合体を捕捉するために使用され、中央ウェル512中に固定化されたレポーター特異的捕捉分子のアレイを含む第二の結合要素は検出のために使用される。競合的アッセイは、標的核酸の量の少なくとも一部との、レポーター化合物の量の一部の複合体を形成することを含み、これらの複合体の形成は中央ウェル512中に固定化されたレポーター特異的捕捉分子のアレイによるレポーター化合物の捕捉を阻害する。中央ウェル512中に固定化されたレポーター特異的捕捉分子は、標的ポリヌクレオチドと複合体を形成していないレポーター化合物の量の少なくとも残りの一部を捕捉することができる。検出のために、ウェル512中にレポーター特異的捕捉分子の異なる種類のアレイを与えることによって、HIVウイルスの異なる型、例えば、1型HIVと2型HIVを区別することが可能であり、HIVウイルスの異なる再タイプ間を識別することさえ可能であり得る。

【0531】

第二の実施形態において、同じく検出のために、捕捉手順のために既に使用された同じ結合要素、例えばビーズを使用することが可能である。この実施形態において、アンカー基を介してビーズに付着されている捕捉オリゴヌクレオチドは、それ自体蛍光標識を含み得る増幅された標的DNAの複合体とハイブリッドを形成し得る。

【0532】

捕捉されたレポーター化合物又は捕捉された標的分子は、例えば上述のような蛍光標識を用いて、光学的検出によって検出され得る。特に、光源(図示せず)及び光検出装置(図示せず)を有する光学システムは、PCRの間にシグナルの時間依存性を測定する様式で作動することができ、これは、HIVのウイルス負荷量を導くことができる。換言すれば、蛍光シグナルの時間依存性が獲得され、評価され得る。

【0533】

以下では、図20を参照して、典型的な実施形態に係る装置600を説明する。

【0534】

図20の実施形態は図18、19の実施形態と類似しているため、対応するコンポーネントは同じ参照数字で表記されている。簡略化及び明確化のために、図20中では、チャンネル及び流体ポートは参照数字を用いて表記されていない。対応する説明のために、図18及び図19が参照される。

【0535】

図20は、ウェル504、506に対して作用する、及び様々な流体連通ポートに対して作用するアクチュエータを調節するための調節信号を測定するための基礎として、メニスカスの検出を可能とするための、従って、流出の検出を可能とするための、ウェル504に関連するウィンドウ部分602及びウェル506に関連するウィンドウ部分604を示している。

【0536】

幾つかの実施形態において、何れの位置において装置600が作動され得るかを示すために、重力ベクトルgの方向が示されている。これらの実施形態において、装置600の動作は、重力と圧力空気接続部606と水供給接続部を介して付与される液体輸送力との組み合わせに基づいている。さらに、対応する流体構造に排出口を作るための排出口接続610及び排出口接続612が設けられている。

10

20

30

40

50

【0537】

図20は、図20の一体的解決法の代わりに、その中で様々なモジュールと一緒に組み立てられる、ユーザ定義される装置を形成するために他のモジュールと組み合わせることができる別個のモジュールとして与えられ得る部分613を模式的に示している。

【0538】

以下では、図21を参照して、別の典型的な実施形態に係る装置700を説明する。

【0539】

装置700は、その中に第一の通過穴709と第二の通過穴707が形成されている堅固な基材704を含む。基材704の第一の主表面上に、第一のウェル720及び第二のウェル708が形成されている。基材704の反対側主表面上には、チャンネル706が形成されている。チャンネル706は、それぞれ、通過穴709、707を介して、ウェル720、708と流体連通している。

10

【0540】

堅固な基材704の上面には、第一の柔軟なカバー要素708が形成されており、堅固な基材704に接着されている。基材704の下面上には、第二のカバー要素705が形成されており、堅固な基材704と層板化されている。

【0541】

図21からさらに理解され得るように、第一のアクチュエータ要素701と第二のアクチュエータ要素702が付与されており、第一のアクチュエータ要素701は、通過穴チャンネル709又はウェル全体720を選択的に閉鎖するために、カバー要素720の第一の部分に押圧するように適合されている。対応する様式で、第二のアクチュエータ要素702は、ウェル708及び/又は通過穴707を選択的に開放又は閉鎖し得る。従って、ウェル720又は708の一方又は両方中への流体通過チャンネル706の流れを調節することができる。

20

【0542】

図22は、本発明に従う典型的な競合的アッセイの模式図を表す。標識された核酸レポーター分子(灰色の波線として示されている。)は、結合要素(ここでは、ビーズとして例示されている。)上の核酸捕捉分子(黒い波線として示されている。)を介して付着されている。検出すべき標的核酸は、二本鎖形態で試料中に存在する(2つの鎖は、薄い灰色/黒い波線として示されている。)(循環増幅反応の)変性工程へ試料を供することによって、標的核酸の鎖を解離させ、結合要素からレポーター分子を放出させることができる。その後の徐冷工程の間に、レポーター分子の量の一部を標的核酸の量の少なくとも一部と複合体を形成させる(標的核酸/レポーター分子複合体の形成は、レポーター分子の結合に関する捕捉分子と核酸標的の競合のために、結合要素上に捕捉されているレポーター分子の能力を阻害する)。標的核酸と複合体を形成していないレポーター化合物の量の残りの一部を、結合要素の上に再捕捉させる。この段階で、結合要素上に捕捉されたレポーター化合物の存在及び/又は量に対する指標となる値及びこれに基づいて、標的核酸の存在及び/又は量に対する指標となる値は、受容体分子中に含まれる標識によって生成されたシグナルを検出することによって測定される。徐冷工程と連続して又は同時に、増幅反応の伸長工程が実施される。次いで、試料は、別の増幅サイクルに供することができる。

30

40

【0543】

図23は、同じ標的を用いて行われる標準的なTaq-manアッセイと比べて、試料中のヒトポリオウイルス1DNA(「エンテロウイルスDNA」に対して「EV」と表記される。)の量を測定するための本発明に従う典型的な競合アッセイの結果を示している。それぞれ 10^4 DNAコピーを含有する2つの試料を平行して分析した。第一の試料(図表中の標識「プローブ」)は、製造業者の指示に従い、Rotor-Gene 600リアルタイム回転式PCR分析装置(Corbett Life Sciences, Sydney, Australia)を用いて、PCR増幅に供した。用いたPCRプライマーは、150塩基対のDNA断片の増幅をもたらした。断片の検出は、それぞれ、そ

50

の5'末端に6-カルボキシ-フルオレセイン(FAM)標識及びその3'末端に6-カルボキシテトラメチルローダミン-スクシンイミジルエステル(TAMRA)標識を含むいわゆるTaqman^(R)プローブ(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)を用いて実施された。計50のPCRサイクルを行った。第二の試料(「競合的アッセイ」)は、Taqman^(R)プローブと同じヌクレオチド配列を有するレポーター分子をさらに含んだが、FAM/TAMRA標識の代わりに、その3'末端にCY3カルボシアニン標識(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)を含み、本発明の一実施形態に係る装置を用いて増幅された。増幅の間に検出された、得られた蛍光シグナルが、図表中に示されている。

10

【0544】

図24は、試料中のHIV gag/env PCR産物の量を測定するための、アレイをベースとする本発明の典型的な競合的アッセイの原理及び結果を示している。図24Aは、アッセイの原理を模式的に図解している(図22も参照)。当初、増幅されたPCR産物、すなわち標的核酸は存在しない。標識された蛍光核酸レポーター分子は、アレイの基材上に捕捉されたレポーター特異的プローブに結合される。

【0545】

PCR産物が産生されない場合には、レポーター特異的プローブにハイブリッド形成するレポーター分子の量は、増幅反応の各サイクル後に一定のままであるので、測定される蛍光シグナルも一定のままである。PCR産物が合成される場合には、レポーター特異的プローブにハイブリッド形成するレポーター分子の量は各PCRサイクル後に減少し、その結果、測定される蛍光シグナルも対応して減少する。図24Bは、151塩基対HIV gag/env PCR産物の量を測定するためのアレイをベースとする競合的アッセイ結果を示している。その5'末端にCY3カルボシアニン標識(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)を含むレポーター分子(「(anti_cds029_5'CY3)」)と一緒に、断片の異なる量(10⁴から10⁶コピーに対応する。)をPCR増幅の36サイクルに供した。プローブ分子の2つの異なる種類(非特異的なプローブ分子(「ara_54986_NH2」)及びレポーター特異的プローブ分子(「cds029_NH2」))を図25Aに示されている配置でアレイ基材上に捕捉し、使用されるアッセイ装置の反応チャンバー内に配置した。Iconoclustソフトウェア(Clondiag Chip Technologies GmbH, Jena, Germany)を用いて、CT値(「閾値」、すなわち、蛍光の増加、従って、DNA量の増加が線形的に起こる指数的増幅期の開始に対する指標)を求め、校正曲線を作成するために、用いたそれぞれのDNA濃度に対してプロットした(図24C)。受容体特異的プローブを使用する全ての試料において、PCRサイクルの数が増加するにつれて、蛍光強度の段階的減少が観察された。これに対して、非特異的プローブを用いた試料では、蛍光は観察されなかった(図24B)。

20

30

【0546】

図25は、PCR増幅の異なる段階において、図24に示されているアッセイ中で使用されるアレイを図示する。アレイ基材上の異なるスポットの配置が、図25Aに模式的に図解されている。黒丸はレポーター分子を捕捉するために特異的プローブ(図24参照)が使用されたスポット(4つの平行試料)を表すのに対して、白丸はレポーター分子を捕捉するために非特異的プローブが使用されたスポット(4つの平行試料)を表す。灰色の丸は、蛍光標識がアレイ基材上にスポット付与された陽性対照を表す。図25Bは、それぞれ、1、12、18及び21増幅サイクル後に撮影されたアレイ(図24B中の10⁵ DNAコピー試料に対応している。)の写真を示している。特異的プローブ分子を介してアレイ上に捕捉された試料中では、PCR増幅の過程に、蛍光シグナル強度の減少を観察することができる。

40

【0547】

図26AからDは、本発明に従うポリヌクレオチドの検出のための競合的方法の典型的

50

実施形態の模式的図解を表す。図26Aに示されているように、増幅されたPCR産物、すなわち標的核酸は当初存在しない。標識された核酸レポーター分子（黒い波線として示されており、標的/プローブ特異的レポーターと表記されている。）は、アレイの基材上に捕捉されたレポーター特異的プローブに結合されている。シグナルは、アレイの基材上に捕捉された内部対照特異的プローブに結合されている標識された内部対照分子（薄い灰色の波線として示されている。）のものと対応している。図26Bに示されているように、PCRが初期指数関数期に入ると、レポーター分子は、基材上に捕捉されたレポーター特異的プローブに結合するのみならず、PCR産物のレポーター特異的領域にも結合する。従って、PCR産物が合成される場合には、基材上に捕捉されたレポーター特異的プローブにハイブリッド形成するレポーター分子の量は減少し、その結果、測定されるシグナルも対応して減少する。PCRが指数関数期に入ると、指数シグナルは著しく減少する（図26C参照）。PCRが安定期に達すると、基材上に捕捉されたレポーター特異的プローブ上のシグナルは低い状態を保つ（図26D）。

【0548】

図27は、試料中のHIVサブタイプB及びHIVサブタイプO₂の量を測定するための本発明に係る競合的アッセイの典型的な実施形態の結果を示している。図27Aの基礎となる実験において、HIVサブタイプBのみが試料中に存在した。HIVサブタイプO₂（HIVsubO₂）に対して特異的な標識された核酸レポーター分子に対応するシグナルは一定のままであるのに対して、HIVサブタイプB（HIVsubB）に対して特異的な標識された核酸レポーター分子に対応するシグナルは、PCRの約13サイクル後に著しく減少することが明らかである（図26参照）。図27Bの基礎となる実験では、HIVサブタイプO₂のみが試料中に存在した。HIVサブタイプB（HIVsubB）に対して特異的な標識された核酸レポーター分子に対応するシグナルは一定のままであるのに対して、HIVサブタイプO₂（HIVsubO₂）に対して特異的な標識された核酸レポーター分子に対応するシグナルは、PCRの約25サイクル後に著しく減少することが明らかである（図26参照）。

【0549】

図28は、試料中のHIVサブタイプBの異なる量を測定するための本発明に係る競合的アッセイの典型的な実施形態の結果を示している。HIVの10⁶コピーが試料中に存在する場合には、HIVサブタイプ（HIVsubB）に対して特異的な標識された核酸レポーター分子に対応するシグナルは、PCRの約13サイクル後に著しく減少する（図28A参照）。HIVの10⁴コピーのみが試料中に存在する場合には、HIVサブタイプ（HIVsubB）に対して特異的な標識された核酸レポーター分子に対応するシグナルは、PCRの約19サイクル後に著しく減少する（図28B参照）。シグナルの減少が検出可能となる前に必要とされるPCRサイクルの量は分析すべき試料中に存在する標的核酸の量についての結論を可能にすることが図28から明らかである。

【0550】

図29は、52名のHIV感染患者からの血漿試料及び全血試料中のHIV-I RNAの個々のコピー数を決定するPCRに基づくアッセイの結果を示す（COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIVアッセイ；Roche Diagnostics、Mannheim、Germany）。簡潔に述べると、静脈穿刺により患者の全血試料を得た。凝固を防ぐためにEDTAを試料に添加した。4000×gで5分間、全血試料を遠心し、細胞残屑を除去することにより、血漿を精製した。製造者の説明書に従い、COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48装置（Roche Diagnostics、Mannheim、Germany）において、血漿試料1mL及び全血試料10μL（990μLリン酸緩衝食塩水と混合）を自動的に処理した。COBAS AmpliLinkソフトウェアパッケージによりウイルスコピー数（試料体積1mLあたり）を自動的に計算し、血漿試料に対する全血試料の散布図として示す。全血試料に対して得られる値に係数100をかけ、様々な血液試料体積に対して補正した（1mL血漿に対して10μL全血）。検出されたウイルスコピーが40未満で

10

20

30

40

50

あるこれらの血漿試料に対して、図30に記載のようにコピー数を計算した。対数目盛のため、血液又は血漿試料の何れかにおいて陰性の結果となる試料（即ち1 mLあたり0ウイルス）は示さない。

【0551】

図30は、検出されたHIV-I RNAがないか又はHIV-I RNAが40コピー未満であったこれらの血漿試料に対して図29で示されるアッセイの結果を示す。個々のコピー数/mL試料に対する全計算値に基づき検量線を作成することによって、ウイルスコピー数（試料1 mLあたり）を手動で計算した（即ち得られたAmpliLink結果ファイルで与えられる閾値）。

【0552】

図31は、245名のHIV感染患者からの血漿及び全血試料中のHIV-I RNAの個々のコピー数を調べる、図1で示されるような別のアッセイの結果を示す（図29で調べられた52名の患者を含む。）。

【0553】

図32は、HIV抗ウイルス療法を受けるHIV陽性患者（患者#028）の個々の血漿及び全血ウイルス負荷量の測定を示す。ウイルス負荷量は、図29のアッセイに従い決定した。投薬計画中に異なる日に全血及び血漿試料を回収した。コンプライアンスの問題のために（即ち患者は処方どおりに薬物を摂取していなかった。）、薬物療法に対する患者の反応の監視開始後約60日に、全血試料中でHIV負荷量の急激な上昇が観察された（しかし血漿試料では観察されなかった。）。

【0554】

図33は、HIV抗ウイルス療法を受ける2名のHIV陽性患者の個々の血漿及び全血ウイルス量の測定を示す：患者#003（図33A）及び患者#004（図33B）。図29のアッセイに従い、ウイルス量を測定した。投薬計画中の異なる日に全血及び血漿試料を回収した。両患者において、血漿中のウイルス量は低く、全血中のウイルス量は比較的高いことが観察された。これらのデータから、投薬計画中、ウイルスは依然として活発に複製するが、HIVプールの複製は主に細胞結合型であり、従って血漿試料中のウイルス量が非常に低いままであることが理解され得る。

【0555】

図34は、HIV抗ウイルス療法を受ける2名のHIV陽性患者の個々の血漿及び全血ウイルス量の測定を示す：患者#009（図34A）及び患者#066（図34B）。図29のアッセイに従い、ウイルス量を測定した。投薬計画中の異なる日に全血及び血漿試料を回収した。患者#009において、血漿中のウイルス量は検出限界以下であったが、全血では（明らかに主に細胞結合型）HIVを検出することができた。患者#066において、服薬遵守の問題によって（即ち患者は処方どおりに薬物を摂取していなかった。）、薬物療法に対する患者の反応の監視を開始してから35日後まで両方の全血試料でHIV量の上昇が観察された。後で、別の療法を開始し、その結果、ウイルス量が低下した。全血及び血漿ウイルス量に対して観察される個々の経時変化は同様であったが、絶対数において、全血試料中のウイルス量は常に血漿試料のウイルス量よりも高かった。

【0556】

図35は、全血及び血漿試料中で観察されるウイルスコピー数の典型的な経時変化を示す。「IdI」という表記は、行われる分析の検出下限を示す。全血試料中で観察されるウイルスコピー数は常に血漿試料の個々のコピー数よりも多い（「d e 1」及び「d c 2」は「コピー数の違い」を指す。）。しかし、多くの場合、それぞれ、血漿試料中で、ウイルスコピー数はより早くから低下し、増加するのは全血試料よりも遅い（「d t 1」及び「d t 2」は「時間の違い」を指す。）。

【0557】

次に、図36を参照して、別の代表的実施形態による装置800を説明する。

【0558】

溶解の必要がある物質が乾燥形態で保存され得る溶解チャンバー802が提供される。

10

20

30

40

50

中央ウェル 812 は、装置 800 を操作するために必要な全ての固相カップリング手順ならびに標的の増幅を行うのに役立つ。様々なさらなる物質が乾燥形態で提供され、洗浄手順、PCR 手順などに役立つ。さらなるウェル 804、806 及び 808 が提供される。例えば、アッセイ開始前の元の状態において、溶解ウェル 802、PCR/RT 緩衝液ウェル 808、洗浄緩衝液ウェル 806 及び洗浄緩衝液ウェル 804 は、アッセイの個々の段階に対する適切な薬剤を含有する。分析に必要な液体が輸送され得るウェルとして、廃液チャンバー 814 が提供される。

【0559】

図 36 では示されないが、廃液チャンバー 814 において、廃液チャンバー 814 に入る液体を吸収し得る液体吸収材が提供され得る。この措置を取ることにより、廃液チャンバー 814 から装置 800 のその他の部分への液体の不要な逆流を安全に防ぎ得、これにより汚染を回避することができる。例えば、このような目的のために膨潤性ポリマー（おむつでも使用され得る。）が使用され得る。

10

【0560】

廃液チャンバー 814 は、装置 800 を通気するための隙間 815 を含み得る。気体のみが通過でき、液体、エアロゾル及び DNA 又は RNA などの巨大分子が装置から出るのを防ぐフィルターによってこの隙間に蓋をすることができる。

【0561】

さらに、流体リザーバー 816 は、これを介して装置内に流体が保存され得、及び/又は装置 800 に注入され得ることが示される。ある実施形態において、流体リザーバー 816 は、分析に必要とされ得る水又は別の溶媒を含有するリザーバーであり、このリザーバーは様々な容積である。容積を小さくすることにより、例えば作動装置 817 を介して外力をかけることにより、リザーバー 816 の内容物が装置 800 に注入され得る。ある実施形態において、流体リザーバー 816 は、隔壁を介してマイクロ流体ネットワークに連結されるチャンバーである（示さない。）。分析開始前に、このチャンバーは、流体ネットワークから流体的に分離されている。分析を開始する際に、隔壁が開けられ、それにより流体リザーバーが流体ネットワークに連結され、それによって外力下でリザーバーの内容物が装置 800 のチャンネル及びウェルに放出されるようになる。

20

【0562】

特に図 36 から分かるように、複数の流体連結ポート 820 - 826 が提供される。図 36 では示されないが、作動装置ピンが流体連結ポート 820 - 826 の何らかの個々の 1 つを選択的に開閉するのに役立つように、作動装置ピンにより圧縮され得る柔軟性のある部材によって、流体連結ポート 820 - 826 の何れか 1 つがカバーされ得、このようにして、例えば図 17a 及び b 又は図 21 で説明されるように、バルブ機能が発揮される。さらに、複数のチャンネル 830 - 837 のマイクロ流体ネットワークは、様々な流体連結ポート 820 - 826 及びウェル 802、804、806、808 及び 812 を連結することが予測される。

30

【0563】

光バリアにより接近可能な窓部 840 は、装置 800 内の液体カラムのメニスカスが光バリアに関して透明な窓部 840 を通過する際に光学的に検出するのに役立つことが示される。光バリアの 1 つが、窓部 840 に対応するチャンバーの 1 つに液体が満たされるか又は溢出したことを検出した場合、これは光学的に検出され得、対応して装置 800 の操作を調節するために、調節ユニットを調節するための調節シグナルを生成させるのに役立つ（図 36 では示さない。）。

40

【0564】

図 36 では示されないが、作動装置ピンがウェル 802、804、806、808 及び 812 を選択的に圧縮するのに役立つように、作動装置ピンにより圧縮され得る柔軟性のある部材によって、ウェル 802、804、806、808 及び 812 の何れか 1 つがカバーされ得（図 36 では示されない。）、従ってこれらのウェルはミキサー又はポンプとして作用する。

50

【0565】

参照数818は、圧搾空気が装置800へ導入され得るような、圧搾空気への連結部を示す。例えば、流体連結ポート821 - 824及び826が閉じられ、流体連結ポート820及び825が開かれる場合、圧搾空気は、連結部818を介してウェル802に、連結ポート820、チャンネル830、流体連結ポート825を介して、ウェル812に流れ得る。このようにして、ウェル802に液体が満たされると、圧搾空気を用いてウェル812にウェル802の内容物を送り込むことができる。例えば、本装置は、空気又は気体を本装置に送り出すために、穿孔され得る隔壁を含み得る。装置に空気又は気体を送り出すことにより、個々のバルブ又は流体連結ポートを開くことによって、ウェル802、804、806及び808から中央ウェル812に液体を押し進めるか又は押し出すことができる。

10

【0566】

次に、特に中央ウェル812に基づく、装置800で行われる代表的アッセイは、速い方法で、例えば1時間未満でHIV量の決定を行うことを可能にし得るといえる。

【0567】

中央チャンバー812内で、ピース812aなどの結合部材が提供され得る。前もって溶解された試料から標的分子(例えばHIV RNA及びDNA)を捕捉するために、この結合部材が構成され得る。例えば、この結合部材は、標的ポリヌクレオチド及び捕捉分子を含む複合体を結合させるための捕捉分子のビオチンなどのアンカー基を結合するために構成され得、この捕捉分子は、標的ポリヌクレオチド及びアンカー基の領域に特異的な結合部分を含む。中央ウェル812には、中央ウェル812のピースが流体の流動力の影響下でこのウェルから除去されるのを防ぐガラス原料などのフィルター(図36では示されない。)が備えられ得る。

20

【0568】

ある実施形態において、例えば溶解のために、全血試料(又は何らかのその他の試料)がウェル802に輸送され得る。血液をキャピラリー801に最初に添加し、キャピラリー801が溶解チャンバー802と接触し、次いでプラグでキャピラリーを閉じ(示さない。)、それによってキャピラリー801内の圧が上昇し、溶解チャンバー802へと血液試料が押し進められるか又は押し出されることによって、装置800に血液が導入され得るか又は押し出され得る。

30

【0569】

このために、溶解ウェル802において乾燥形態で上述のような対応する溶解剤が提供される。この溶解ウェルは、アンカー基及び標的ポリヌクレオチドの領域に特異的なビオチン部分をそれぞれ含む捕捉分子をさらに含み得る。次に、標的ポリヌクレオチド及び捕捉分子をそれぞれ含む複合体を含み得る試料が中央ウェル812に輸送され得る。

【0570】

中央ウェル812において、標的ポリヌクレオチド及び捕捉分子を含む標的又は複合体が中央チャンバー812の固体捕捉構造で結合され得るように、ピース812a又は表面官能化などの第一の結合部材が提供され得る。ピースが的確に試料物質と混合するように、温置が行われ得る。

40

【0571】

中央ウェル812は、空気パネとして機能するさらなるウェル850又はチャンバーを伴う例えばチャンネル836を介した流体輸送路中にあり得る。ばねウェルとしても示されるさらなるウェル850は、中央ウェル812の内容物を受容するのに適切であり得る。中央ウェル812は(内容物がそこから移動する。)、中央ウェル812に液体が提供される際、マイクロ流体ネットワークを介して連結される。液体提供前に中央ウェル812に含まれている充填物質(通常は空気)は、ばねウェル850中に保存され得る。ばねウェルは、濃度にかかわらず、あらゆる物質、即ち液体及び気体を保存し得ることに注意されたい。

【0572】

50

バネウェル 850 はまた、中央ウェル 812 からの内容物を受容する際に圧が上昇するようになされ得る。ウェル 850 はまた、内容物、例えば気体又は空気を中央ウェルに放出することにより、中央ウェル 812 へ上昇した圧を放出するようになされ得る。このようにして、ウェル 850 は空気バネとして機能し得、これによって、開放されたバルブ 825 を通じて中央ウェル 812 から液体を移動させることができる。この実施形態において、例えば外部圧縮空気の代わりに、上昇した圧力が、中央ウェル 812 から収容液体を移動させるのに役立つので、例えば外部圧縮空気供給による能動的移動が無用になり得る。

【0573】

例えば、中央ウェル 812 を充填する場合、空気バネに含まれる空気又は気体が圧縮され、空気バネ内の圧が上昇する。このようにして、中央ウェルを充填する場合、加圧下で、例えば 500 から 2000 mbar、例えば 800 mbar の圧で、液体が導入され得る。充填圧が低くなる場合（例えばバルブ 825 を開くことにより）、挿入溶液が中央ウェル 812 から搾り取られ又は押し出されるように、空気バネ 850 の圧が充填圧よりも高くなる。

10

【0574】

空気バネ 850 は、そこにおける上昇蓄積圧が中央ウェルの内容物を廃液容器 814 へと移し完全に空にするのに十分となるように寸法が決められ得る。例えば、空気バネウェル 850 の容積は、基本的に中央ウェル 812 と同じ大きさであり得る。ある実施形態において、空気バネの容積は中央ウェル 812 の 2 倍もしくは 3 倍の容積であるか又は中央ウェル 812 の容積の半分である。例えば、空気バネウェル 850 の容積は、50 から 300 μ L の間、例えば 100 μ L、150 μ L、200 μ L 又は 250 μ L などであり得る。

20

【0575】

ウェル 850 は、ウェル 850 と中央ウェル 812 との間に、流体輸送路、即ち液体又は気体輸送路としてのチャンネル 836 とともに提供され得る。中央ウェル側のチャンネル 836 の開口部は、標準操作位置の重力の方向と逆の方向に位置し得る。これは、開口部が標準重力条件において中央ウェル 812 の上部にあることを意味する。このようにして、中央ウェル 812 の収容液が意図せずにウェル 850 に放出されることを回避することができる。ウェル 850 は、マイクロ流体ネットワークを介した中央ウェル 812 との流体輸送路であり得る。従って、ウェル 850 は、圧力リザーバー又は圧縮ガスバネとして機能を果たし得、第二の構造から離れて位置し得る。

30

【0576】

代表的実施形態に従い、検出装置 840、例えば光バリアは、中央ウェル 812 とウェル 850 との間に提供され、検出装置 840 は、中央ウェル 812 に収容される収容液の存在を検出するのに適している。装置 840 は、中央ウェル 812 とウェル 850 との間の流体連結部の任意の場所であり得る。

【0577】

ばねウェル 850 において（例えば流体連結ポート 825 及び 826 を開くことにより）上昇圧を放出することによって、液体（即ち溶解した試料の非捕捉成分）が中央ウェル 812 から廃液 814 へと押し進められるか又は押し出される。このようにして、中央ウェル 812 でビーズにより捕捉されていない試料成分が廃液チャンバー 814 に輸送される。このようにして、標的物のみが中央ウェル 812 に残り、このときに全血試料の残りは廃液チャンバー 814 にある。このようにして、このときに中央ウェル 812 は捕捉プローブ及び標的物を含む複合体とともにビーズを収容する。

40

【0578】

続いて、中央ウェル 812 が洗浄され得るが、洗浄緩衝液を生成させるために洗浄緩衝液ウェル 804 にて固形で提供される洗浄緩衝液用の成分が使用される。捕捉手順後、チャンバー 812 にある程度の不純物が残存し得るので、このような洗浄手順は有利であり得る。

50

【0579】

上記で既に述べたように、洗浄緩衝液ウェル804において洗浄緩衝液が調製される。洗浄ウェル804において、このような洗浄緩衝液のための塩が乾燥形態で存在し得る。洗浄緩衝液を調製するために、部品821に連結された透明な窓840に水が満たされるまで（ウェル804の隣の透明な窓に隣接する光バリアを通過するメニスカスを検出することにより検出され得る。）、液体リザーバー816からの水が（流体連結ポート820、822、823、825及び826が閉じられる一方で）チャンネル830、833及び流体連結ポート821を介して洗浄ウェル804に輸送され得る。対応する検出シグナルを受け取ると、水の供給が停止され得る。

【0580】

ある実施形態において、混合を行ってそこで提供される塩を溶解するため、洗浄ウェル804をカバーする柔軟性のあるカバー部を圧縮するために作動装置（示さない。）が上下に往復運動し得る。

【0581】

次に、中央ウェル812で洗浄手順が行われ得るように、部品818、831、804、821、833、830、825を介して圧をかけることによって、洗浄緩衝液ウェル804中の調製済み洗浄緩衝液が中央ウェル812に送り出され得る。ウェル804の内容物をウェル812に送り出すことによって、ウェル850の圧が上昇する。この洗浄後、例えば上述のように、ウェル850の圧を放出することにより、廃液チャンバー814に洗浄溶液が送り出され得る。

【0582】

次に、ウェル806及び808中の緩衝液を調製し、同様にチャンバー812へ及びチャンバー812から、輸送し得る。

【0583】

次に、対応するDNAに標的RNAを変換し、続いてDNAを増幅するために、逆転写とそれに続くPCRを行い得る。このような手順は、特に、HIVなどのレトロウイルスを検出する場合に必要であり、逆転写段階は、例えばDNAウイルスが検出される場合など、その他の場合には不必要であり得る。このような逆転写PCRを行うために、プライマー、酵素及び緩衝液などの逆転写に必要な成分がRT/PCRウェル808から中央ウェル812に送り出され得る。

【0584】

次に、中央ウェル812でPCR増幅が行われる。このために、温度サイクルを行うことにより、即ち、例えば95で5秒間及び60で10秒間の手順を40回繰り返すことにより、中央ウェル812でPCRが行われる。別の実施形態において、例えば、95で20秒間、55で30秒間、72で30秒間の30又は40サイクルを含む3以上の異なる温度を含む温度サイクルが行われ得る。しかし、その他のPCRサイクリングプロトコールも中央チャンバーで行われ得る。

【0585】

ある実施形態において、中央ウェル812において温度を調整するために、中央ウェル812の上下に2枚の加熱プレートが提供され得る。別の実施形態において、この2枚の加熱ウェルの1枚は連続的であり得、他方は続く光学検出を可能にする凹所を有し得る。ある実施形態において、加熱プレートは、ペルティエ素子などの加熱及び/又は冷却プレートであり得る。

【0586】

ある実施形態において、増幅中、上述のように検出が行われ得る。

【0587】

例えば、第一の実施形態において、中央ウェル812で捕捉分子の競合アッセイが行われ得る。このようにして、この実施形態において、標的分子及び捕捉分子をそれぞれ含む複合体を捕捉するためにビーズなどの第一の結合部材が使用され、中央ウェル812に固定化された一連のレポーター特異的捕捉分子を含む第二の結合部材が検出のために使用さ

10

20

30

40

50

れる。競合アッセイは、標的核酸の少なくとも一部とレポーター化合物の一部の複合体を形成させることを含むが、これらの複合体の形成により中央ウェル 8 1 2 に固定化されたレポーター特異的捕捉分子によるレポーター化合物の捕捉が阻害される。中央ウェル 8 1 2 に固定化されたレポーター特異的捕捉分子は、標的ポリヌクレオチドとの複合体中になし、少なくともレポーター化合物の残りを捕捉することができる。検出のためのウェル 8 1 2 における様々な種類のレポーター特異的捕捉分子のアレイ 8 1 2 b を提供することによって、H I ウイルス、例えば 1 型 H I V 及び 2 型 H I V の様々なタイプを識別することが可能となり、H I ウイルスの異なるサブタイプを識別することも可能になり得る。

【 0 5 8 8 】

別の実施形態において、検出のための捕捉手順に対しても既に使用されている同じ結合部材、例えばビーズなど、を使用することができる。この実施形態において、アンカー基を介してビーズに結合させられている捕捉オリゴヌクレオチドは、それ自身が蛍光標識を含み得る増幅標的 D N A の複合体とハイブリッド形成し得る。

【 0 5 8 9 】

捕捉されたレポーター化合物又は捕捉された標的分子は、光学的検出により、例えば上述のような蛍光標識を用いて、検出され得る。特に、P C R の間のシグナルの時間依存性を測定するために、光源（図示せず。）及び光検出器（図示せず。）を有する光学系を操作し得、これにより H I V のウイルス量を導くことができる。換言すれば、蛍光シグナルの時間依存性が得られ、評価され得る。

【 0 5 9 0 】

代表的実施形態によると、中央ウェル 8 1 2 は、P C R 開始前に不可逆的に密封される。入口及び必要に応じて出口を溶接することによってこの密封を行うことができる。第三の構造、例えば空気パネ又はばねウェル 8 5 0 がある場合、入口のみを密封することができる。例えばバルブ 8 2 5 又はチャンネルに押し付けられる（これによって、プラスチックが溶融し、バルブ又はチャンネルを密封する。）ホットピンを使用することによって、密封を行うことができる。このように、P C R チャンバーを安全に密封することができる。

【 0 5 9 1 】

さらなる代表的実施形態によると、柔軟性のある第一及び第二の面又はカバー層が凸曲するように、P C R 用の中央ウェルが満たされる。このように、この層を加熱 / 冷却素子に押し進めるか又は押し付けることができ、従って、加熱 / 冷却素子と中央ウェルとの間の効率的な温度遷移が可能となる。

【 0 5 9 2 】

ある実施形態において、この試験に対して、本装置のキャピラリー 8 0 1 に血液が満たされる。キャピラリーをカバーで被覆した場合（図 3 6 では示されない。）、溶解チャンバー又は溶解ウェルに血液が供給される。本装置は、ここで、検出器に挿入され、アッセイが開始される。最初に、全てのチャンバー又はウェル（中央のウェルは除外）に水が満たされる。個々のバルブ又は流体連結ポートが開かれ、ウェル 8 0 2 の上部の光バリア又は検出装置 8 4 0 が、ウェル 8 0 2 が満たされたというシグナルを送るまで、リザーバー 8 1 6 からウェルに水が押し出される。個々のウェルに対する水流が停止され、次のウェルが満たされる。水で満たすことにより、個々のウェル中の乾燥薬物又は試薬が溶解される。個々の溶液を使用する準備ができたなら、最初に、溶解ウェル 8 0 2 の内容物が中央ウェル 8 1 2 に押し出される。このために、両ウェル間の流体連結が確立されるように、溶解ウェル下のバルブ又は流体連結ポートならびにバルブ又は中央ウェルを連結する流体連結ポートが開かれる。標的核酸を含有する溶解混合物は中央ウェル 8 1 2 に流れ、標的核酸は、中央ウェルの結合マトリクス上に捕捉分子を介して捕捉される。標的核酸を捕捉する効率を向上させるために、中央ウェルと溶解ウェルとの間で複数回動かすことによって、溶解混合物を複数回、中央ウェルに押し出す。

【 0 5 9 3 】

次に、上述のように空気パネ 8 5 0 を用いることによって、溶解液が廃液容器に押し出

10

20

30

40

50

される。

【0594】

以下の実施例によって、本発明をさらに記載するが、以下の実施例は、本発明な具体的実施形態を例示することを目的とするものに過ぎず、いかなる意味においても、本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。

【0595】

実施例

【実施例1】

【0596】

ヒトポリオウイルス1 DNAを測定するための競合的アッセイ

10

実施した競合的アッセイの原理は、図22中に模式的に示されている。適切な発現ベクター中(pCR^(R)2.1-TOPO^(R), Clontech, Inc. Palo Alto, CA, USA)にクローニングされたヒトポリオウイルス1単離株TCDCO1-861(GenBank受付番号AF538843)のDNAをDNAテンプレートとして使用した(本明細書では、「EV」(エンテロウイルス)DNAとも表記される)。

【0597】

それぞれ10⁴ DNAコピーを含有する2つの試料を平行して分析した。第一の試料は、製造業者の指示に従い、Rotor-Gene 6000リアルタイム回転式PCR分析装置(Corbett Life Sciences, Sydney, Australia)を用いて、PCR増幅に供した。

20

【0598】

第二の試料(「競合的アッセイ」)は、Taqman^(R)プローブと同じヌクレオチド配列を有するレポーター分子をさらに含んだが、FAM/TAMRA標識の代わりに、その3'末端にCY3カルボシアニン標識(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)を含み、加熱可能な基部表面上にアレイが配置されているアッセイ装置の反応チャンバー中で直接使用して増幅された。

【0599】

以下のPCRプライマーを使用した。

【0600】

30

フォワードPCRプライマー:

pr__for__EV__02:5'-CAAACCAGTGATTGGCCTGTCGT
AACG-3'(AF538843のヌクレオチド位置492から518に対応する。)

リバースPCRプライマー:

pr__rev__EV01:5'-TTCACCGGATGGCCAATCCAATT
CG-3'(AF538843のヌクレオチド位置617から641に対応する。)

【0601】

かくして、PCRは、150塩基対のDNA断片の増幅をもたらした。PCR試料は、製造業者の指示に従って、PCRプライマーの各200nM(最終濃度)並びにEnzymMix^(R)及びUltrasenseRT-PCRKit(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)の反応緩衝液を含有した。

40

【0602】

さらに、Rotor-Gene6000リアルタイム回転式PCR分析装置を用いて、増幅されたPCR断片を検出するために、相応するPCR試料は、それぞれ、その5'末端に6-カルボキシ-フルオレセイン(FAM)標識(すなわち、蛍光色素)及びその3'末端に6-カルボキシテトラメチルローダミン-スクシンイミジルエステル(TAMRA)標識(すなわち、消光物質)を含む、二重標識されたいわゆるTaqman^(R)プローブの100nM(最終濃度)を含有した(両標識は、Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USAから購入した。)。プローブ

50

は、以下の配列を有する。

【0603】

HP__EV2__001:FAM-5'-ACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTT-3'-TAMRA

(AF538843のヌクレオチド位置536から561に対応する。)

【0604】

競合的分析を実施するために、PCR試料は、同じ配列を有するが、Taqman^(R)プローブと異なる標識、すなわち、CY3カルボシアニン標識をその3'末端に有するレポーター分子(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA):

EV2__02CY3:5'-ACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTT-3'-CY3

(AF538843のヌクレオチド位置536から561に相当する。)の20nM(最終濃度)をさらに含有した。

【0605】

リアルタイムPCRは、以下の温度プロファイルに従って行った。94 で2分、続いて94 で5秒、62 で30秒及び72 で30秒の50サイクル。

【0606】

PCRの間、両反応に対する蛍光シグナルが図23に示されている。

【実施例2】

【0607】

HIV1gag/envDNAを測定するための、アレイをベースとする競合的アッセイ

実施した競合的アッセイの原理は、図24A中に模式的に示されている。発現ベクターpCR^(R)2.1-TOPO^(R)(Clontech, Inc. Palo Alto, CA, USA)のEcoRIエンドヌクレアーゼ制限部位中にクローニングされた合成HIV1gag/env融合構築物(EMBL受付番号A06258)のDNAをDNAテンプレートとして使用した。

【0608】

さらに、以下のPCRプライマーを使用した。

【0609】

フォワードPCRプライマー:cdia:5'-TGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTATGTC-3'(A06258のヌクレオチド位置214から232に対応する。)

リバースプライマー:

cdis:5'-ATCAAGCAGCCATGCAAATGTT-3'(A06258のヌクレオチド位置384から405に対応する。)

【0610】

かくして、PCRは、以下の配列:5'-ATC AAG CAG CCA TGC AAA TGT TAA AAG AGA CCA TCA ATG AGG AAG CTG CAG AAT GGG ATA GAT TGC ATC CAG TCC ATG GAG GGC CTA TTG CAC CAG GCC AGA TGA GAG AAC CAA GGG GAA GTG ACA TAG CAG GAA CTA CTA GTA CCC TTC A-3'を有する151塩基対のDNA断片の増幅をもたらした。

【0611】

PCRは、加熱可能な基部表面上にアレイが配置された、アッセイ装置の反応チャンバー中で行った。PCR試料は、PCRプライマーの各200nM(最終濃度)並びにEnzymMix^(R)及びUltrasenseRT-PCRKit(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)の反応緩衝液を

10

20

30

40

50

含有した。較正曲線を作成するために、 0 、 10^4 、 10^5 及び 10^6 DNAコピー（それぞれ、4つ組みで行われる。）に対応する、DNAテンプレートの異なる量（ $1\ \mu\text{L}$ 中）を使用した。

【0612】

競合分析を実施するために、PCR試料は、その5'末端にCY3カルボシアニン標識を有するレポーター分子（Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA）： $\text{anti_cdso29_5'CY3:CY3-5'-TCCCATTCCTGCAGCTTCCTCATTGATGGT-3'}$ （以下に記載されているcdso29_NH2プローブ分子と相補的）の $10\ \text{nM}$ （最終濃度）をさらに含有した。

10

【0613】

PCRは、以下の温度プロファイルに従って行った。 95°C で30秒、続いて 95°C で5秒、 50°C で30秒及び 72°C で30秒の36サイクル。

【0614】

プローブの2つの種類を有するレポーター分子の相互作用は、アッセイ装置の上面の反対側に配置された光学的検出システム及びIconoclustソフトウェアパッケージ（Clondiag Chip Technologies GmbH, Jena, Germany）を用いて徐冷工程の終了時に、各サイクルにおいて測定した。データ獲得の間の曝露時間は2.5秒であった。

20

【0615】

プローブ分子の2つの異なる種類は、図25Aに示されている配置でアレイ基材上に捕捉された。蛍光標識のみを、陽性対照として用いた。以下のプローブを使用した。

【0616】

非特異的プローブ：

$\text{ara_54986_NH2:5'-ACCAGCTTTGAACCCAAACAC-3'}$
受容体特異的プローブ：

$\text{cdso29_NH2:5'-ACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGA-3'}$ 。

【0617】

Iconoclustソフトウェア（Clondiag Chip Technologies GmbH, Jena, Germany）を用いて、蛍光の増加、従って、DNA量の増加が線形的に起こる指数関数増幅期の開始に対する指標としてCT値（「閾値」）を求め、較正曲線を作成するために、用いたそれぞれのDNA濃度に対してプロットした（図24C）。求められた平均CT値は、以下のとおりであった。 10^4 DNAコピー試料中22.0、 10^5 DNAコピー試料中18.5及び 10^6 DNAコピー試料中15.0。

30

【0618】

受容体特異的プローブを使用する全ての試料において、PCRサイクルの数が増加するにつれて、蛍光強度の段階的減少が観察された。これに対して、非特異的プローブを用いた試料では、蛍光は観察されなかった（図24B）。

40

【0619】

アレイ基材上の異なるスポットの配置が、図25Aに模式的に図解されている。黒丸はレポーター分子を捕捉するために特異的プローブ（図24参照）が使用されたスポット（4つの平行試料）を表すのに対して、白丸はレポーター分子を捕捉するために非特異的プローブが使用されたスポット（4つの平行試料）を表す。灰色の丸は、蛍光標識がアレイ基材上にスポット付与された陽性対照を表す。

【0620】

図25Bは、それぞれ、1、12、18及び21増幅サイクル後に撮影されたアレイ（図24B中の 10^5 DNAコピー試料に対応している。）の写真を示している。特異的プローブ分子を介してアレイ上に捕捉された試料では、PCR増幅の間に、蛍光シグナル強

50

度の段階的減少を観察することができ、これは、次いで、対応する較正曲線との比較によって定量することができる、増幅されたPCR産物の量の付随する増加に対応する。

【実施例3】

【0621】

HIV陽性患者の血液試料中のHIV量の測定

HIV救急、Friedrich-Schiller-University Jena、Germanyで投薬を受けた52名のHIV感染患者から、最初に血液試料を得た。患者らの性別、年齢、HIV感染の病因、臨床徴候、存在するHIVの種/サブタイプ、付随する疾患などによって患者はグループ分けされていない。

【0622】

患者から静脈穿刺によって患者の全血試料を得た。試料の凝固（即ち血栓形成）を防ぐために、5mMの最終濃度でEDTAを試料に添加した。試料を4℃で保存し、試料回収後24時間以内に分析した。

【0623】

4000×gで5分間遠心し、細胞残屑を除去することによって、全血試料から血漿を精製した。血漿試料1mL及び全血試料10μL（990μLリン酸緩衝食塩水と混合）をさらなる分析に供した。ウイルス検出のために用いられるCOBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIVアッセイ（Roche Diagnostics、Mannheim、Germany）を行うために、1mLの試料体積が必要である。

【0624】

製造者の説明書に従い、COBAS AmpliPrep装置において、全血及び血漿試料を自動的に処理した。簡潔に述べると、あらゆる核酸を放出するために、プロテイナーゼKの存在下でカオトロピック緩衝液中で試料850μLを溶解した。さらに、陰性対照（核酸なし）及びそれぞれ約500コピー/mL及び500,000コピー/mLのウイルス量に対応するRNA標準物質を含有する2つの陽性対照を調製した。

【0625】

磁性シリカ粒子上での非特異的捕捉によって、試料中に存在する核酸を精製した。洗浄後、75μLの溶出緩衝液を添加することによって、シリカ粒子から核酸を溶出した。溶出物50μLをCOBAS TaqManマスターミックス（HIV特異的PCRプライマーも含む。）50μLと混合し、製造者の説明書に従い、定量的RT-PCRを行うためにCOBAS TaqMan 48装置に移した。

【0626】

COBAS AmpliLinkソフトウェアパッケージによって、処理開始前に各試料に添加された標準的RNAに関して正規化された試料のウイルス量（即ちHIVコピー数/mL試料）を自動的に計算した。全血試料に対して得られた値に係数100をかけ、様々な血液試料体積を補正した（1mL血漿に対して10μL全血）。

【0627】

特に、この自動データ解析に含まれるのは、AmpliLinkソフトウェアの検出限界に相当する、HIV-I RNAの少なくとも40コピーが検出された試料のみである。HIV-I RNAのコピー数が40未満であるあらゆる試料（即ち、使用される様々な試料体積に対して補正される場合、実際には、HIV-I RNA 40コピー/mL血漿及びHIV-I RNA 4,000コピー/mL全血に相当する。）を手動で分析した。個々のコピー数/mL試料に対する全ての計算値に基づき検量線を作成することによって、ウイルスコピー数/mL試料を計算した（即ち得られたAmpliLink結果ファイルで与えられる閾値）。

【0628】

得られた結果を次の表1でまとめるが、これは、なし（「陰性」）、HIV RNAの、40コピー未満/mL（「<40」）及び40コピー超/mL（「陽性」）が検出された、全血及び血漿試料の個々の番号を示す。

10

20

30

40

50

【0629】

結果（対応する血漿試料から計算されたものに対する全血試料から計算された値の散布図として表される。）はまた図30及び31でも示す。特に、図29は、AmpliLinkソフトウェアにより行われる自動データ解析によって得られる結果を示し、一方、図30は、血漿及び全血試料に対する手動計算により得られた結果を示し、ここでは、検出されたHIV RNAが全くないか又は40コピー未満であった。

【0630】

【表1】

表1

試料の数		全血 10 μ L		
		陰性	<40	陽性
1 mL 血漿	陰性	13	8	6
	<40	3	8	8
	陽性	0	4	18

10

【0631】

得られた結果から、HIVを検出するために血漿試料を使用することによって結果が偽陰性となり得ることが明らかとなる。分析したHIV感染患者の一部における血漿試料中のウイルス量は陰性であり、このことから、対応する全血試料中にかなりのコピー数のHIV RNAが検出され得たにもかかわらず、血流中を循環する感染HIV粒子がないことが示唆される。

20

【0632】

これらの結果は、245名のHIV感染患者の集団を含む次の分析において確認された（最初の分析で調べた52名の患者を含む。）。上述のようにアッセイを行った。得られた結果（散布図として表される。）を図31で示し、また、次の表2でもまとめる。

【0633】

【表2】

表2

分析される試料	総数	陰性	陽性<40
血漿 1mL	245	109 (44%)	42 (17%)
全血 10 μ L	245	50 (20%)	36 (15%)

30

【0634】

分析した245名の血漿試料の61%が、HIV陰性であるか又は、含有されたHIV-I RNAが40コピー未満であり（即ち、実際には、使用された様々な試料体積に対して補正された場合、HIV-I RNA 40コピー/mL血漿及びHIV-I RNA 4.000コピー/mL全血に相当）、一方、分析した245名の全血試料のうち、これに相当するのは35%のみである。言い換えると、血漿試料がHIV-I RNAを含まないか又は含まれるコピー数が40コピー未満である65名（43%）の患者において、対応する全血試料は実際にはHIV-陽性であった（即ちHIV-I RNA 40コピー超が検出され得た。）。

40

【0635】

HIVのこの「さらなる」プールは、主に、感染細胞での連続的ウイルス複製に対する重要なマーカーに相当すると考えられる、好中球、Bリンパ球、血小板及び赤血球（上記背景セクションでの考察を参照）などの血液細胞に接着しているHIV粒子に起因するという仮説を立てたい。このようにして、血漿試料を用いたアッセイ法は、細胞結合型HIV由来の核酸を検出できず、従って、偽陰性の結果が生じ、罹患患者に不利益となる可能

50

性があり得る。従って、総HIV核酸量は、血漿中のウイルス量よりも、正確であり信頼性の高い診断マーカーとなると思われる。

【実施例4】

【0636】

診断マーカーとしての全血試料中のHIV量の使用

投薬計画中の様々な時間点で、実施例1に記載のアッセイに従い、HIV抗ウイルス療法を受けている上記対象集団からの5名のHIV陽性患者（即ち、患者#028、#003、#004、#009及び#066）の個々の血漿及び全血ウイルス量を調べた。得られた個々の結果を次の表3から7ならびに図33から35でまとめる。

【0637】

患者#028に関して、HIV療法に対する患者の反応の監視開始後、様々な日（即ち第5、25、61及び68日）に全血及び血漿試料を回収した。得られたアッセイ結果を表3ならびに図32で示す。

【0638】

【表3】

表3：HIV#028

試料収集の日	ウイルス負荷量血漿 (コピー/mL)	ウイルス負荷量全血 (コピー/mL)
5	0	280
25	7	100
61	0	410
68	0	16384

【0639】

驚くべきことに、薬物療法に対する患者の反応の監視開始後第68日に回収された試料において、全血中のHIV量の劇的かつ急激な上昇が観察され、一方で、血漿中のHIV量は検出不能のままである。Jena University HospitalのHIV救急にこの観察を報告後、投薬計画中に患者が処方どおりの薬剤摂取を停止していることが分かった。明らかに、このコンプライアンス問題により、HIV複製が増加した（全血でのみ検出され得る。）。

【0640】

この現象の原因は依然として不明であるが、HIVコピー数の全体的増加は主に血液細胞に接着し続けているHIV粒子数（即ち血漿試料で検出することができないHIVプール）の増加に起因する。

【0641】

患者#003及び#004に関して、HIV療法に対する患者の反応の監視開始後、様々な日に（即ち#003に対して第0、60、98及び172日；及び#004に対して第0、42、98及び158日）全血及び血漿試料を回収した。得られたアッセイ結果は、それぞれ表4及び5ならびに図34A及び34Bで示す。

【0642】

【表4】

表4：HIV#003

試料収集の日	ウイルス負荷量血漿 (コピー/10 μ L)	ウイルス負荷量全血 (コピー/10 μ L)
0	0.26	260.5
60	5.65	2565
98	2.04	2460
172	2.31	2470

10

【0643】

【表5】

表5：HIV#004

試料収集の日	ウイルス負荷量血漿 (コピー/10 μ L)	ウイルス負荷量全血 (コピー/10 μ L)
0	0.24	21.1
42	0.20	112
98	2.19	259
158	0.97	249

20

【0644】

両患者において、血漿中で低ウイルス量及び全血中で比較的高いウイルス量が一貫して観察された。これらのデータから、投薬計画中にウイルスが依然として活発に複製しているが、この場合も、複製HIVプールが主に細胞結合型であり、従って血漿試料においては検出可能ではないことを理解することができる。

【0645】

患者#009及び#066に関して、HIV療法に対する患者の反応の監視開始後、様々な日に（即ち#009に対して第0、66及び136日；及び#066に対して第0、11、35及び42日）全血及び血漿試料を回収した。得られたアッセイ結果は、それぞれ表6及び7ならびに図35A及び35Bで示す。

30

【0646】

【表6】

表6：HIV#009

試料収集の日	ウイルス負荷量血漿 (コピー/10 μ L)	ウイルス負荷量全血 (コピー/10 μ L)
0	0	43.5
66	0	15.7
136	0	3.6

40

【0647】

【表 7】

表 7 : HIV#006

試料収集の日	ウイルス負荷量血漿 (コピー/10 μ L)	ウイルス負荷量全血 (コピー/10 μ L)
0	2.3	61.4
11	1400	5410
35	4650	6675
42	75.8	292

10

【0648】

患者#009において、血漿中のウイルス量は検出限界以下であったが、全血中ではHIVを検出することができた。従って、この場合も、この活発に複製するHIVのプールは主に細胞結合性であると思われる。

【0649】

患者#066において、コンプライアンス問題のために（即ち本患者は処方どおりに薬剤を摂取しなかった。）、薬物療法に対する患者の反応の監視開始後35日まで、両方の全血試料において、HIV量の上昇が観察された。その後、別の治療が開始され、結果としてウイルス量が低下した。絶対数で全血及び血漿ウイルス量に対して観察される個々の経時変化は同様であるが、全血試料中のウイルス量は常に血漿試料よりも高かった。

20

【0650】

このようにして、これらの結果に基づき、全血中のHIV量は、HIV感染患者における疾患進行を監視するためだけでなく、抗ウイルス療法の効率を監視するためにも、血漿中のHIV量よりも意義深く重要な診断マーカーとなるとと思われる。

【0651】

「含む」という用語は他の要素又は特徴を除外するものではなく、「1つ」は複数を除外するものではないことを銘記すべきである。また、異なる実施形態と関連して記載されている要素は組み合わせることができる。

【0652】

特許請求の範囲における参照符号は特許請求の範囲を限定するものと解釈してはならないことも銘記すべきである。

30

【図1a】

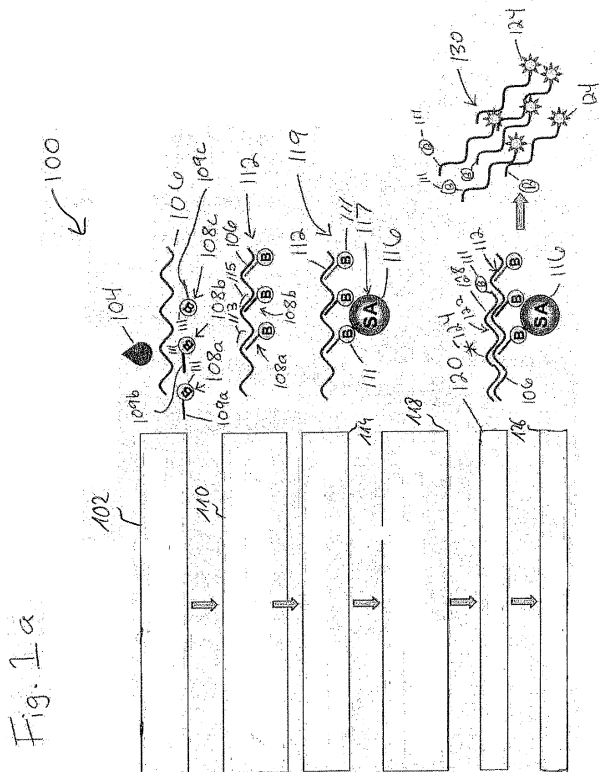


Fig. 1a

【図1b】

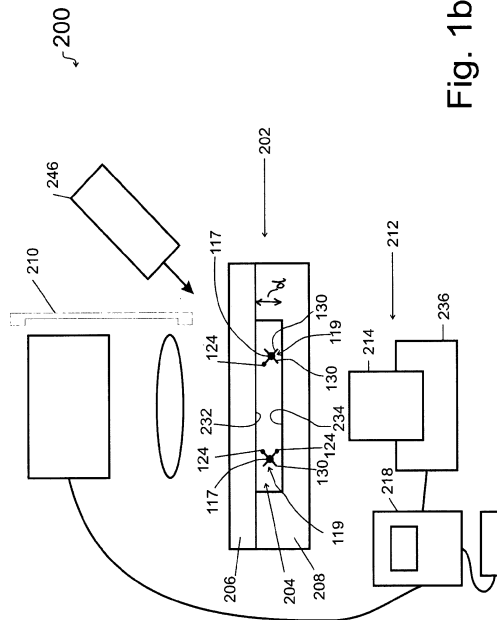
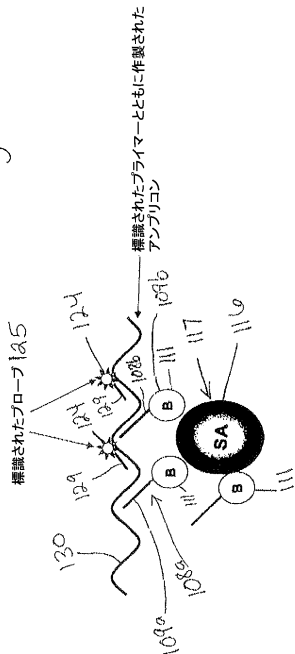


Fig. 1b

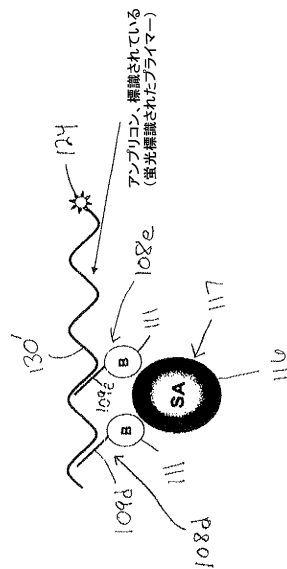
【図1c】

Fig. 1d

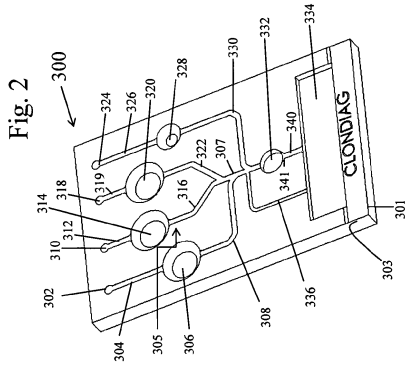


【図1d】

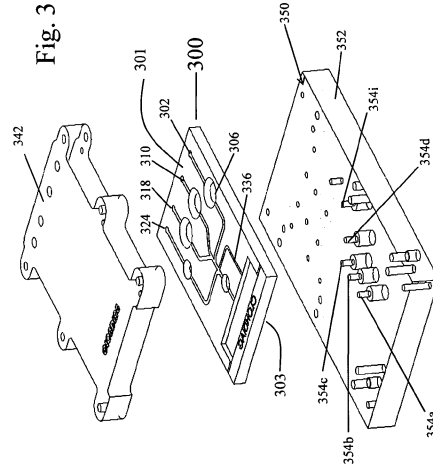
Fig. 1e



【 図 2 】



【 図 3 】

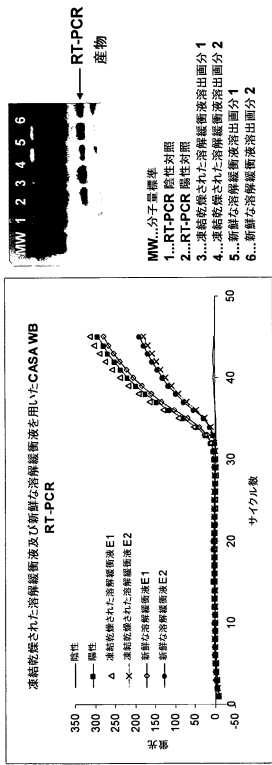


【 図 4 】

Fig. 4

1. 工程 - 溶解

ストレプトアビジンセファロース、RNA 及び 10 µl 全血を用いた捕捉アッセイ試験。凍結乾燥された溶解緩衝液対新鮮な溶解緩衝液



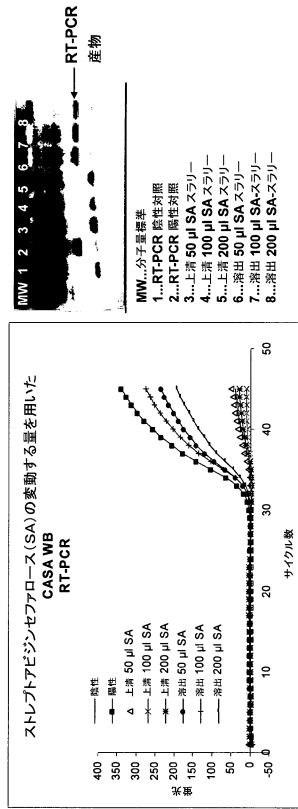
→ 溶解緩衝液は、効率性の喪失なしに、凍結乾燥し、再懸濁することができる

【 図 5 】

Fig. 5

2. 工程 - 固体マトリックス上への RNA 複合体の捕捉 (I)

ストレプトアビジンセファロース、RNA 及び 10 µl 全血試験を用いた捕捉アッセイ試験。凍結乾燥された溶解緩衝液対新鮮な溶解緩衝液



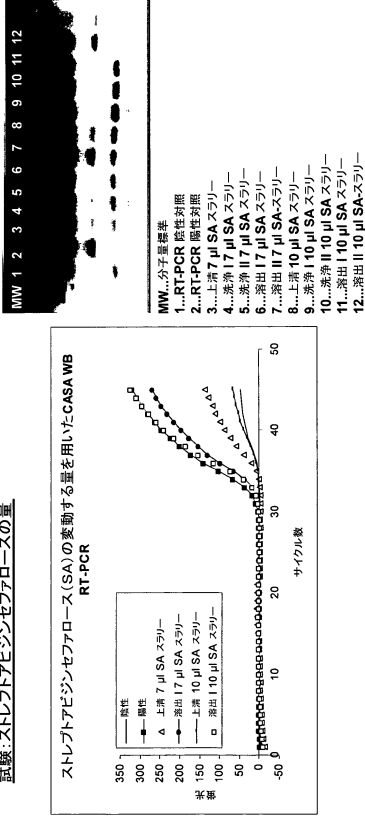
→ 50 から 200 µl の SA-スラリーを用いた場合に、上清中にはRNAは検出されない

【 図 6 】

Fig. 6

2. 工程一固体マトリックス上へのRNA複合体の捕捉(II)

ストレプトアビジンセファロース、RNA及び10µl全血試験を用いた捕捉アッセイ
試験:ストレプトアビジンセファロースの量



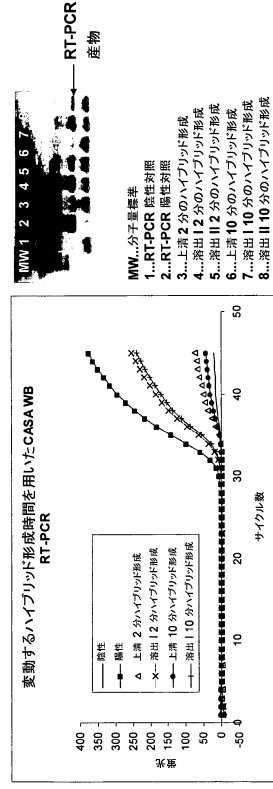
→ SAスラリー7µlを用いると、上清中にRNAが検出されるが、RNAを完全に捕捉するのに、SAスラリー10µlが十分である

【 図 7 】

Fig. 7

2. 工程一固体マトリックス上へのRNA複合体の捕捉(III)

ストレプトアビジンセファロース、RNA及び10µl全血試験を用いた捕捉アッセイ
試験:ハイブリッド形成時間



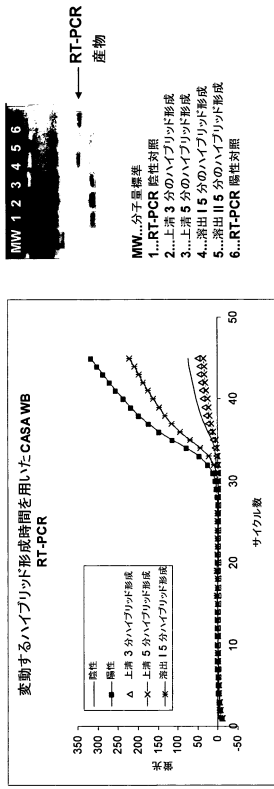
→ ハイブリッド形成時間の2分後、ハイブリッド形成の10分後より多くのRNAが上清中に検出される

【 図 8 】

Fig. 8

2. 工程一固体マトリックス上へのRNA複合体の捕捉

ストレプトアビジンセファロース、RNA及び10µl全血試験を用いた捕捉アッセイ
試験:ハイブリッド形成時間



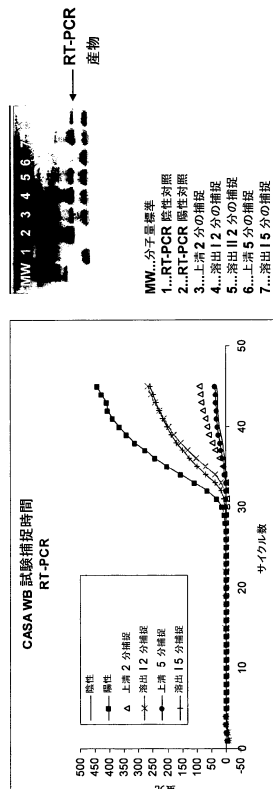
→ ハイブリッド形成時間の5分がRNAを完全に捕捉するのに十分である

【 図 9 】

Fig. 9

2. 工程一固体マトリックス上へのRNA複合体の捕捉

ストレプトアビジンセファロース、RNA及び10µl全血試験を用いた捕捉アッセイ
試験:捕捉時間

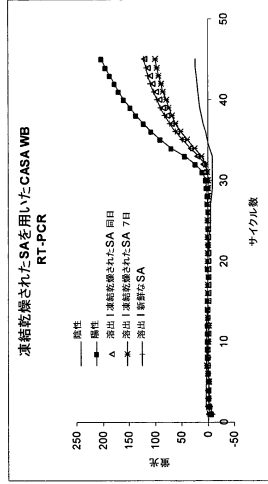


→ 捕捉時間の5分がRNAを完全に捕捉するのに十分である

【 図 1 0 】

Fig. 10

2. 工程一増幅
 ストレプトアビジンセファロース、RNA及び10 µl 全血試験を用いた捕捉アッセイ
 試験:凍結乾燥されたストレプトアビジンセファロースの安定性

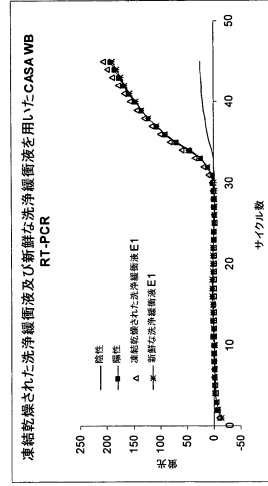


→ ストレプトアビジンセファロースは、機能の大幅な喪失なしに凍結乾燥することが可能であり、長期安定性試験を実施しなければならぬ

【 図 1 1 】

Fig. 11

3. 工程一洗浄
 ストレプトアビジンセファロース、RNA及び10 µl 全血試験を用いた捕捉アッセイ
 試験:凍結乾燥された洗浄緩衝液対新鮮な洗浄緩衝液

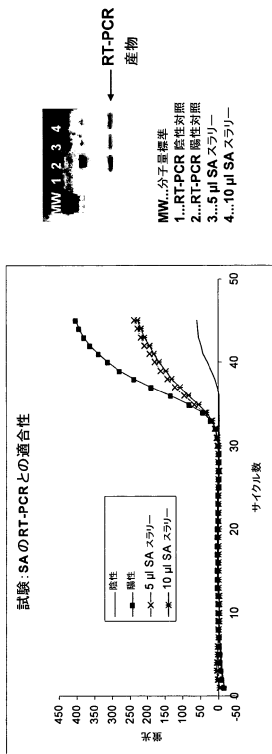


→ 洗浄緩衝液は効率性の喪失なしに凍結乾燥することができる

【 図 1 2 】

Fig. 12

4. 工程一増幅
 試験:ストレプトアビジンセファロースのRT-PCRとの適合性

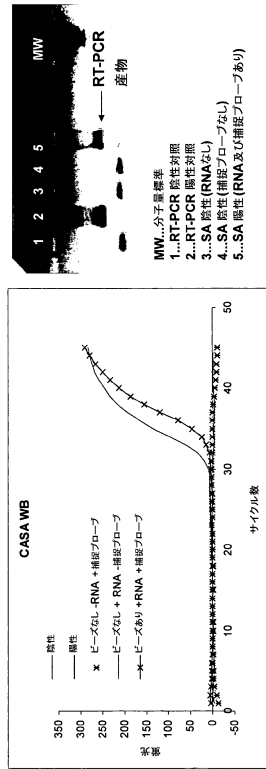


→ 凍結乾燥されたSA 10 µl (RNAを完全に細くするために必要とされるスラリーの量)は、RT-PCRを阻害しない(同じat値、但し、最終蛍光は対照(SAスラリーなし)を用いた場合より低い)

【 図 1 3 】

Fig. 13

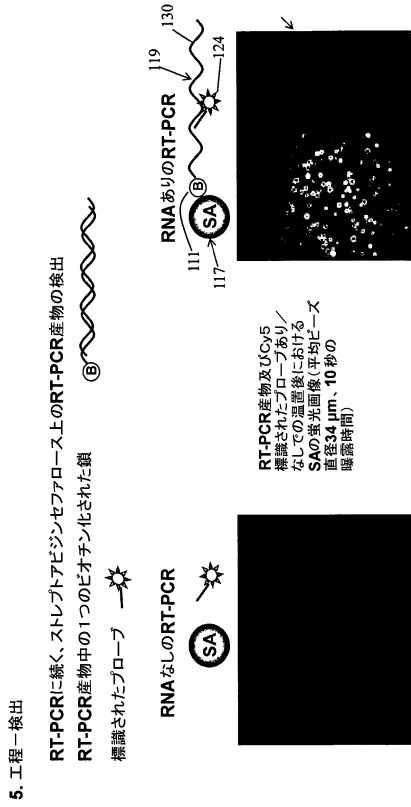
4. 工程一増幅
 全血を用いた捕捉アッセイ後におけるSAを用いたRT-PCR
 -血液10 µlの存在下のHIV RNAがストレプトアビジンセファロース上に捕捉された
 -精製されたRNAを加えたストレプトアビジンセファロースを、RT-PCRのためのテンプレートとして使用した(溶出なし)
 -陰性対照:血液及び捕捉プローブあり、RNAなし
 血液及びRNAあり、捕捉プローブなし



→ アッセイは特異的である。RNA/DNAは捕捉/増幅されず、RNAはストレプトアビジンセファロースへ非選択的に結合しない
 → 増幅前に、RNAの溶出及びストレプトアビジンセファロースの分離は必要とされない

【 図 14 】

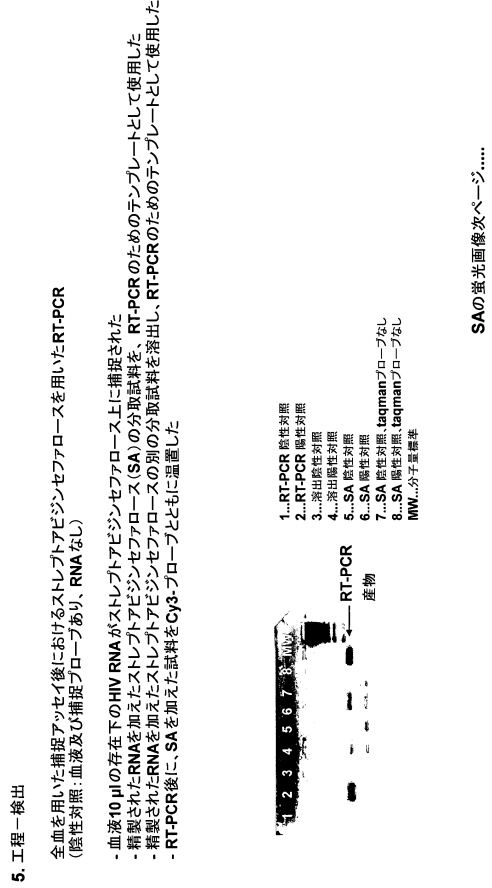
Fig. 14



→ 増幅された産物は、ストレプトアビジンセファロース上に濃縮され、可視化される
 → ストレプトアビジンセファロースの自己蛍光は低い

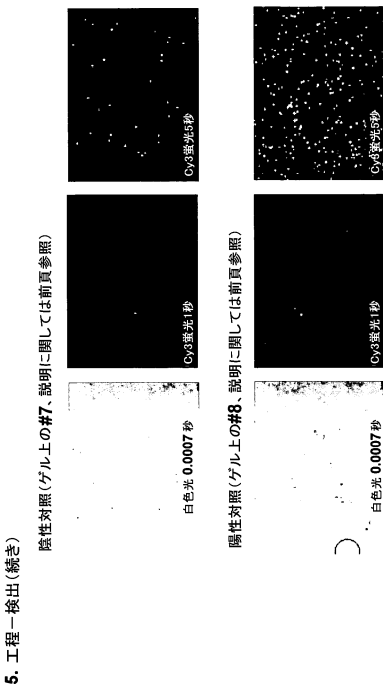
【 図 15 】

Fig. 15



【 図 16 】

Fig. 16



→ 陽性対照では、より多くの蛍光ビーズが見えるが、検出を最適化する必要がある
 (SAへの蛍光プローブの非特異的結合)

【 図 17 a) 】

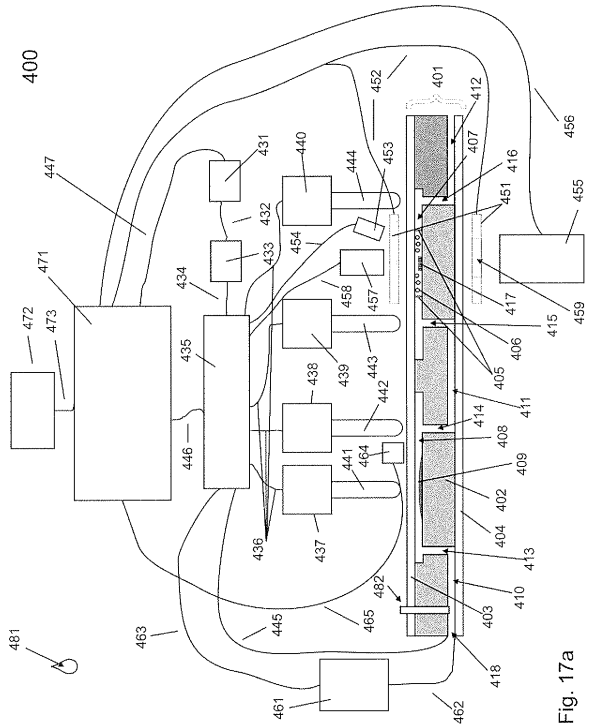


Fig. 17a

【図17b】

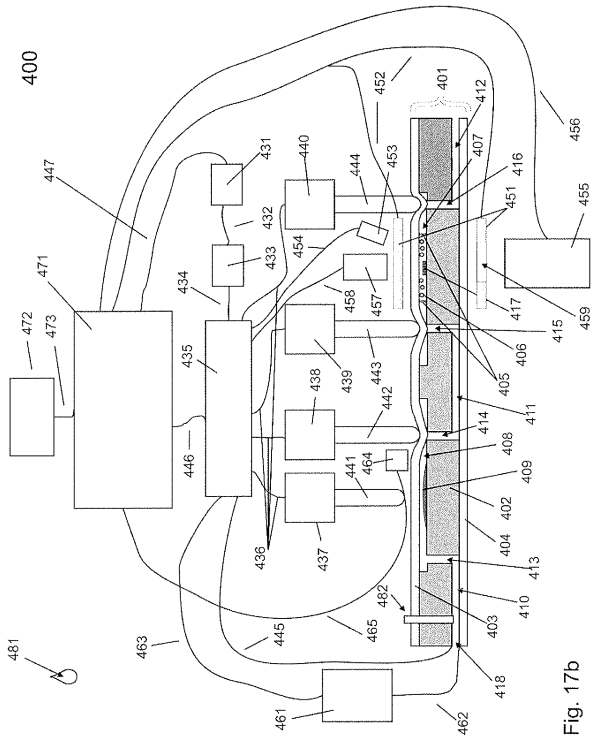


Fig. 17b

【図17c】

Valve Unit 435

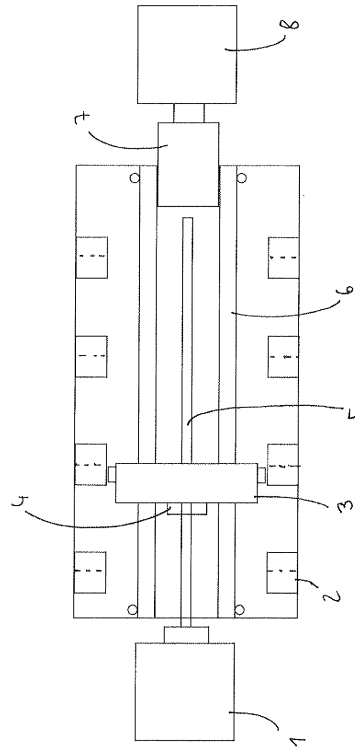


Fig. 17c

【図17d】

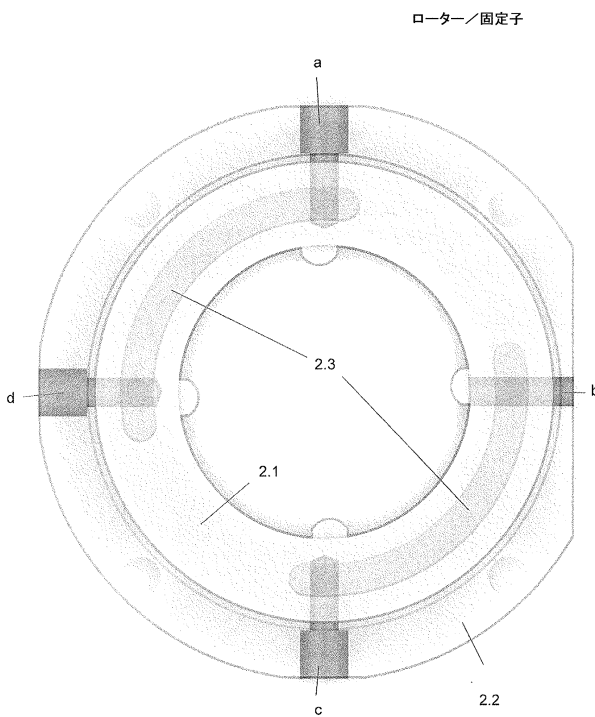


Fig. 17d

【図18】

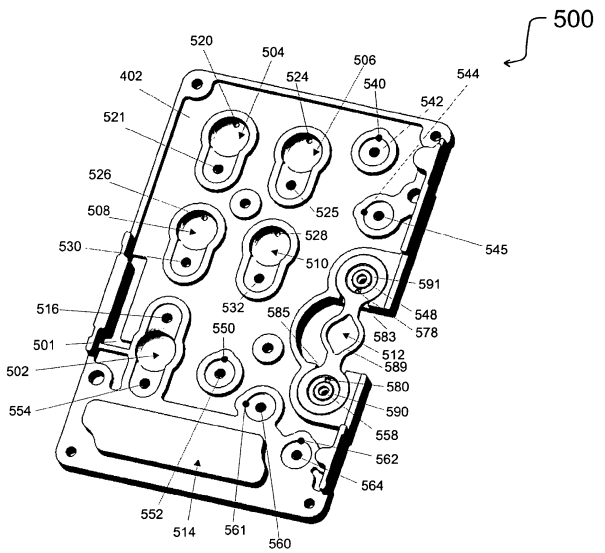


Fig. 18

【 図 19 】

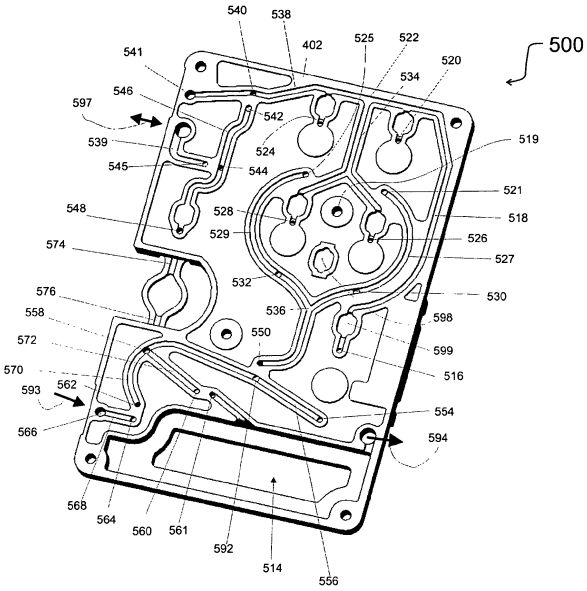


Fig. 19

【 図 20 】

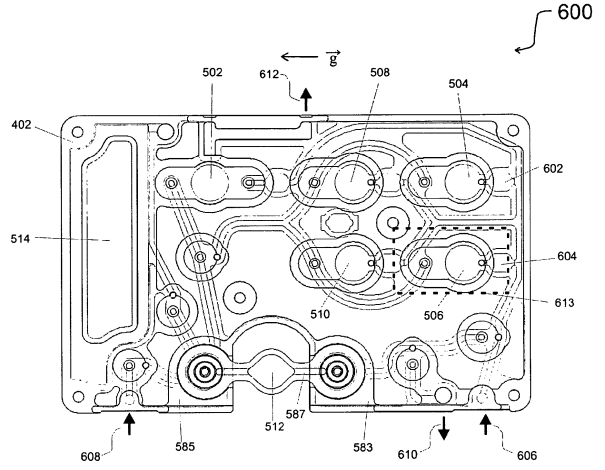
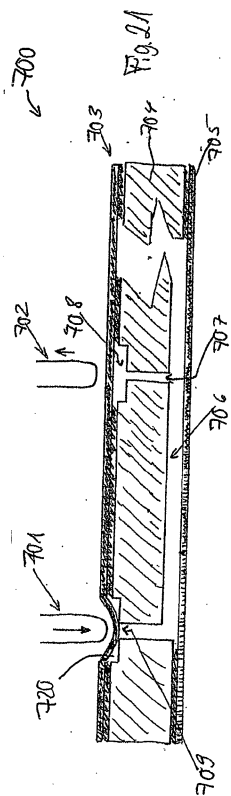


Fig. 20

【 図 21 】



【 図 22 】

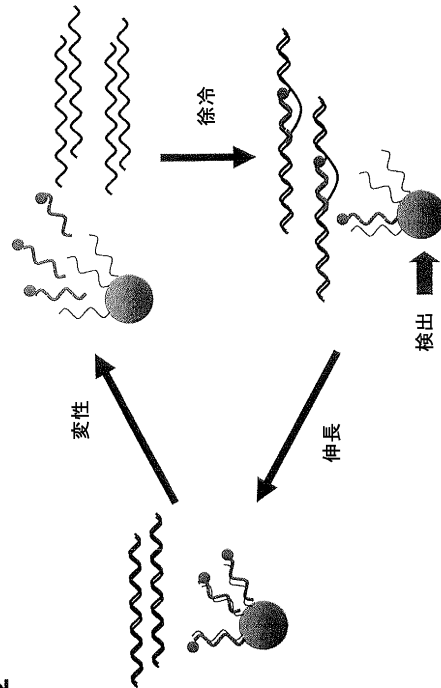
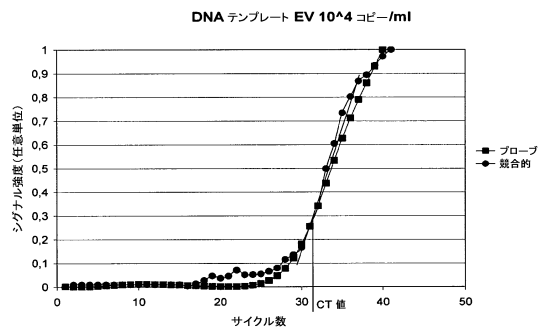
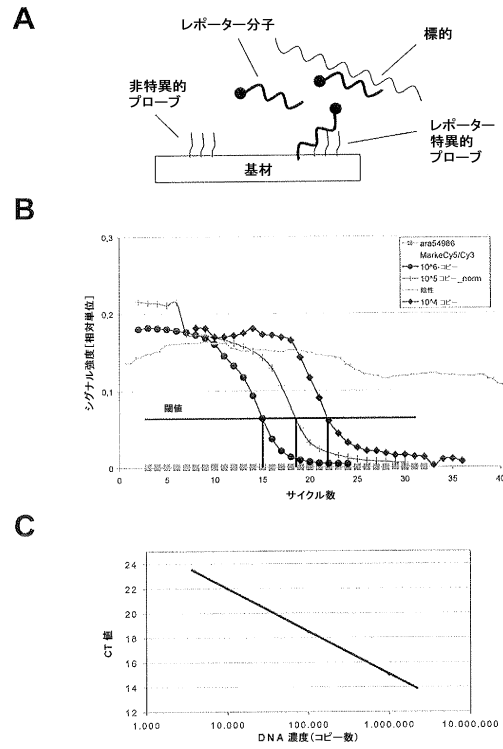


FIG. 22

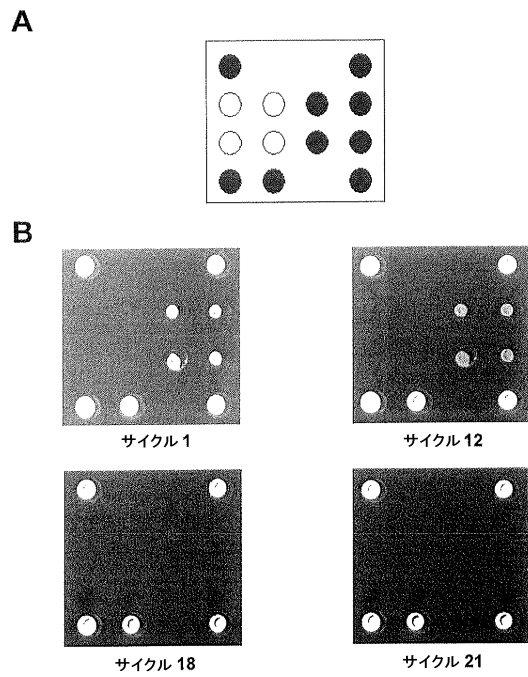
【 図 2 3 】
FIG. 23



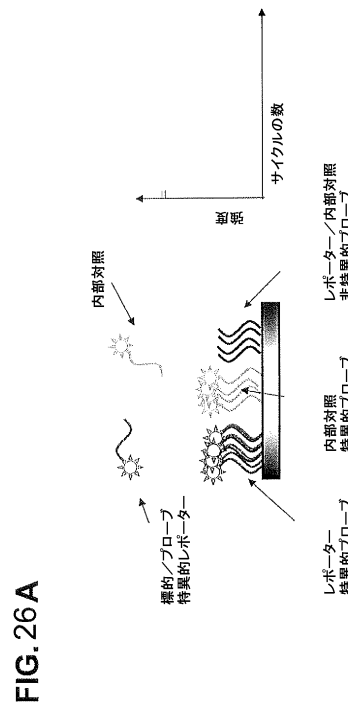
【 図 2 4 】
FIG. 24



【 図 2 5 】
FIG. 25



【 図 2 6 A 】



【 図 26 B 】

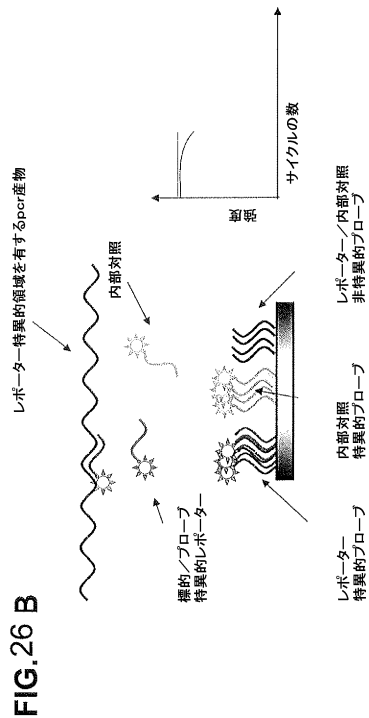


FIG.26 B

【 図 26 C 】

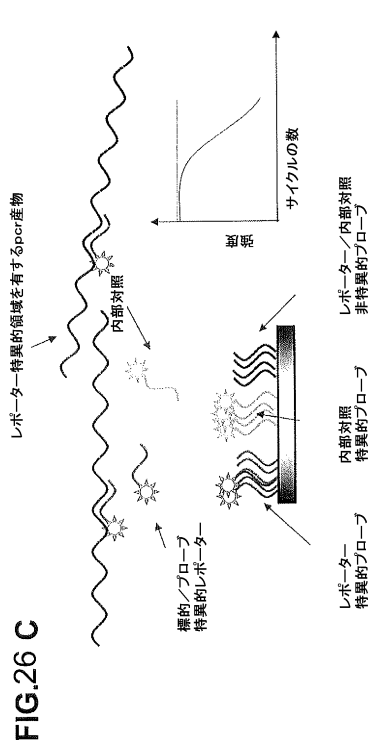


FIG.26 C

【 図 26 D 】

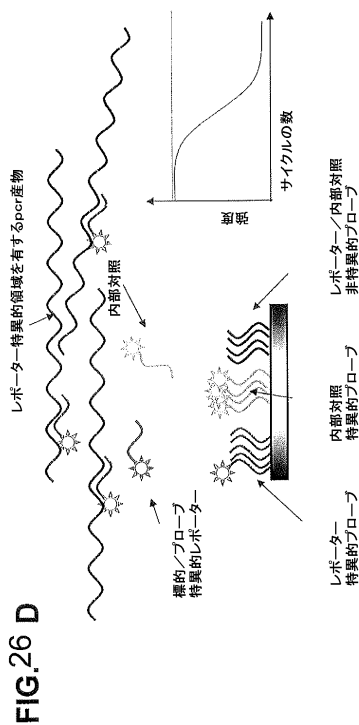


FIG.26 D

【 図 27 A 】

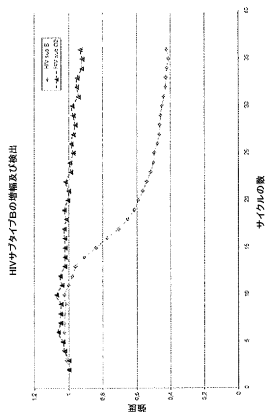


FIG.27 A

【 図 27 B 】

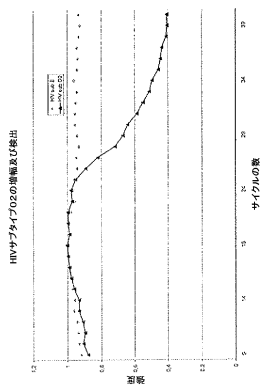
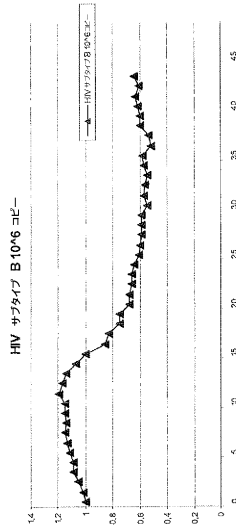


FIG.27 B

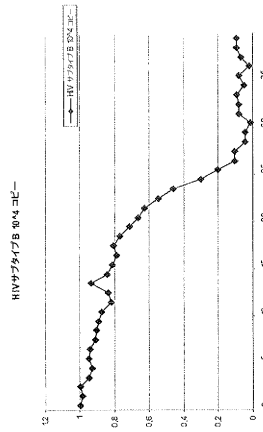
【 図 28 A 】

FIG. 28 A



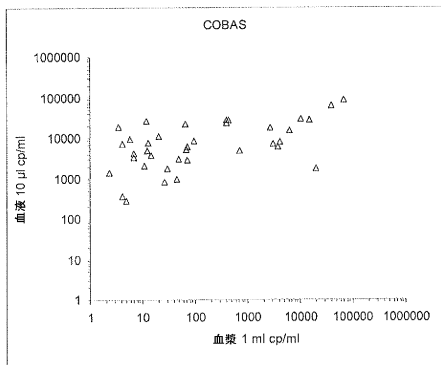
【 図 28 B 】

FIG. 28 B



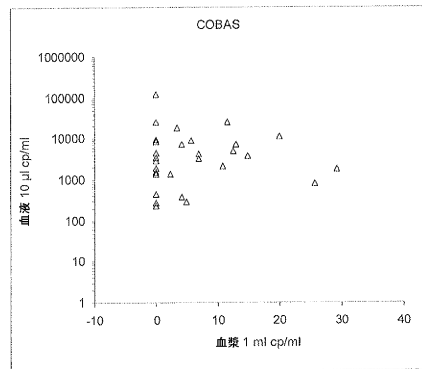
【 図 29 】

FIG. 29

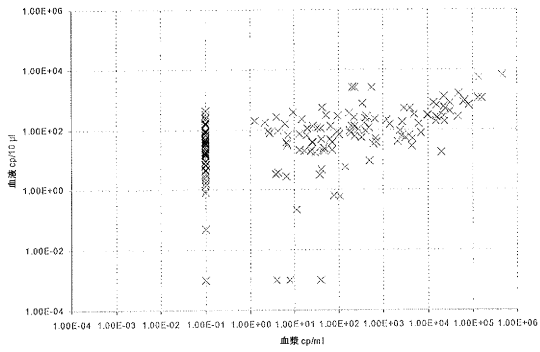


【 図 30 】

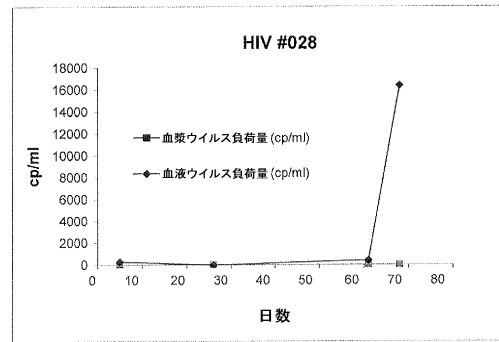
FIG. 30



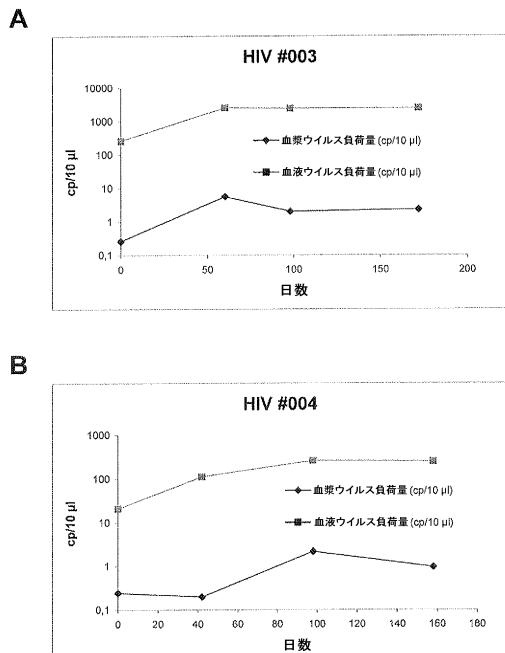
【 図 3 1 】
FIG. 31



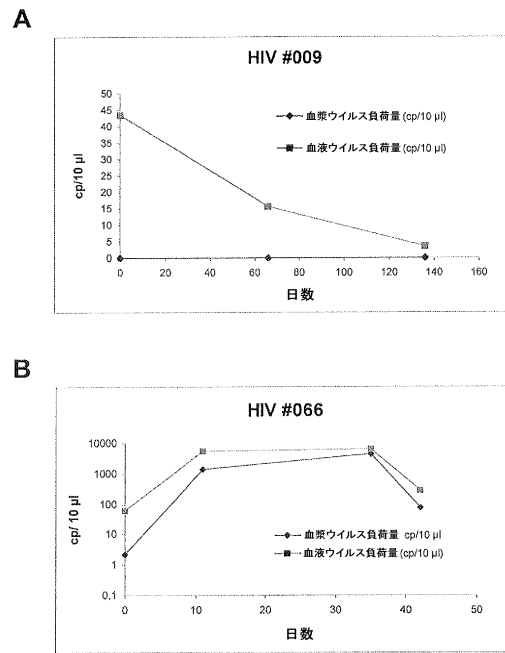
【 図 3 2 】
FIG. 32



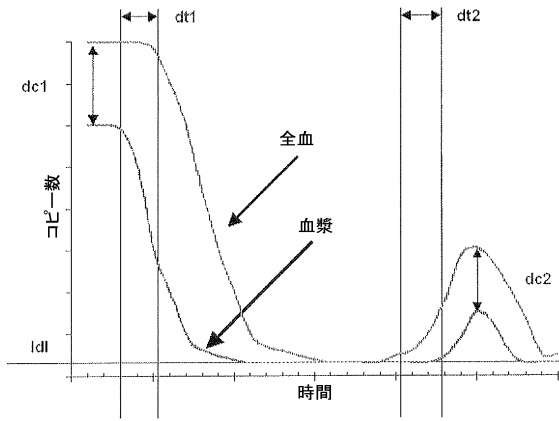
【 図 3 3 】
FIG. 33



【 図 3 4 】
FIG. 34



【図35】
FIG.35



【図36】

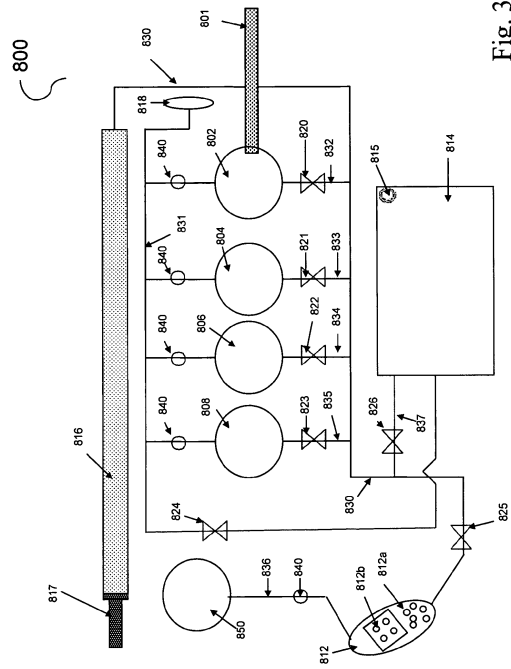


Fig. 36

【配列表】

0006755533000001.app

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	37/00	1 0 1
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N 33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/569	L
C 1 2 N 15/49	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
		C 1 2 N	15/49	

- (72)発明者 トルステン・シュルツ
ドイツ国、07749・イエーナ、フランツ・クグラール・シュトラッセ・8
- (72)発明者 カトリーン・シュタインメッツァー
ドイツ国、07743・イエーナ、リヒャルダ・フーフ・ベーク・23
- (72)発明者 トーマス・ウルリヒ
ドイツ国、07745・イエーナ、マルベンベーク・12

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 特開平06-277062(JP,A)
特表2006-516743(JP,A)
特表2007-536504(JP,A)
Analytical Chemistry, 2004, Vol.76, Iss.7, pp.1824-1831
Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 2002, Vol.9, No.6, pp.1385-1388

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0
C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)