

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532043
(P2005-532043A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/68
C12M 1/00
C12M 1/26
C12M 1/34
C12M 1/38

F 1

C 12 Q 1/68
C 12 M 1/00
C 12 M 1/26
C 12 M 1/34
C 12 M 1/38

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 2 9
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-584348 (P2003-584348)
(86) (22) 出願日 平成15年4月11日 (2003.4.11)
(85) 翻訳文提出日 平成16年12月8日 (2004.12.8)
(86) 國際出願番号 PCT/US2003/011384
(87) 國際公開番号 WO2003/087410
(87) 國際公開日 平成15年10月23日 (2003.10.23)
(31) 優先権主張番号 60/372,711
(32) 優先日 平成14年4月11日 (2002.4.11)
(33) 優先権主張國 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/457,847
(32) 優先日 平成15年3月24日 (2003.3.24)
(33) 優先権主張國 米国(US)

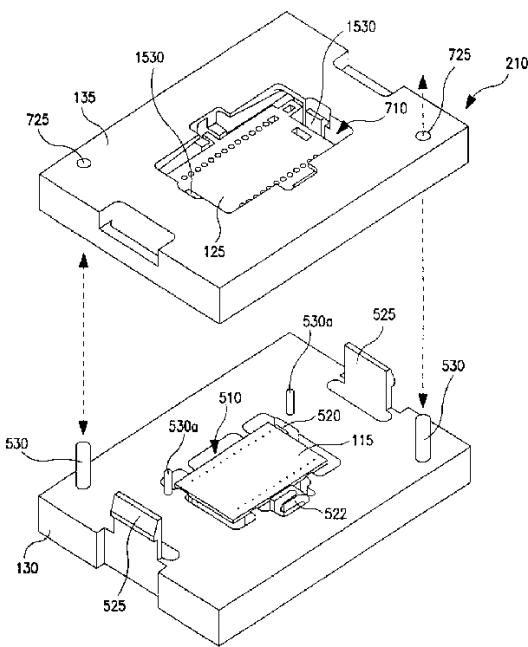
(71) 出願人 501113515
シーケンノム、 インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
21, サン デイエゴ, ジョン ホブ
キンス コート 3595
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者 リン, チャオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
30, サン デイエゴ, ハンターズ
グレン ドライブ 10676

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】固相支持体上で化学反応を実行するための方法および装置

(57) 【要約】

直接基板(115)において生化学反応を実行する装置および方法が提供される。基板アセンブリ(110)は、着脱可能に固定位置に基板(115)を支持するカートリッジ(130)、および、着脱可能に基板上面に配置される反応封入部材(120)を備える。反応封入部材(120)は、基板表面における1個以上の標的部位の直上にチャンバーを形成する1個以上の凹部を備える。これらのチャンバーは、基板(115)の直上で生化学反応を実行するのに使用されると共に、チャンバーに含まれる物質のサーマルサイクルを、基板に直接配される加熱要素を用いて実行するにも使用される。基板アセンブリ(110)は、好ましくは、物質をチャンバーに滴下し、チャンバーに含まれる物質の生化学反応を実行しながらも、その処理の間、基板アセンブリの、ある位置から別の位置への移動を要しない処理機と組み合わせて使用される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル物質を含むのに好適な少なくとも 1 個の標的部位を有する基板を保持するアセンブリであって、該アセンブリは、

該基板を固定位置に支持することが可能な少なくとも 1 個の取付部位を有するカートリッジ基盤と、

該基板の上部に着脱可能に配置される反応封入部材であって、該反応封入部材の底面は、該基板の上面と接触配置するようになっている該反応封入部材とを備え、該反応封入部材が該基板の上面に接触配置されると、該反応封入部材と該基板は共同して、該基板上の少なくとも 1 個の標的部位の上に位置する少なくとも 1 個のチャンバーを形成し、それによって該チャンバー内で化学反応が起こるのを可能にする、アセンブリ。
10

【請求項 2】

カートリッジカバーをさらに備える、請求項 1 に記載のアセンブリであって、前記カートリッジ基盤に着脱可能に嵌合して、該カートリッジ基盤と該カートリッジカバーの間の固定位置に基板を固定し、かつ、該基板上面の固定位置に該反応封入部材を固定する、アセンブリ。

【請求項 3】

前記取付部位は、前記基板の下面を該基板の一辺に沿って支持する棚を備える、請求項 1 に記載のアセンブリ。

【請求項 4】

前記棚は、前記基板の表面領域の 10 % 以下と接触するような大きさになっている、請求項 1 に記載のアセンブリ。
20

【請求項 5】

前記カートリッジ基盤は、該カートリッジ基盤を貫いて延びる開口部を有し、そのために、前記基板が固定位置にある場合、該基板は該開口部の上に配置され、該基板の底面が、該開口部を通じて少なくとも一部露出する、請求項 1 に記載のアセンブリ。

【請求項 6】

前記反応封入部材は、該反応封入部材の底面に少なくとも 1 本のチャネルを含み、該チャネルと前記基板の上面が共同して前記チャンバーを形成する、請求項 1 に記載のアセンブリ。
30

【請求項 7】

前記チャネルは細長く、前記反応封入部材が前記基板上面に接触配置された場合、該基板上面の、1 列の標的部位の上に位置する、請求項 6 に記載のアセンブリ。

【請求項 8】

前記反応封入部材は、前記細長いチャネルの第 1 末端と連絡する流入口、および、該細長いチャネルの第 2 末端と連絡する流出口を備える、請求項 7 に記載のアセンブリ。

【請求項 9】

前記反応封入部材は複数の細長いチャネルを備え、該反応封入部材が、前記基板の上面に接触配置された場合、該チャネルの各々は、該基板上面の 1 列の標的部位の上に位置する、請求項 7 に記載のアセンブリ。
40

【請求項 10】

前記チャンバーは、前記反応封入部材中のウェルによって形成され、該ウェルは、該反応封入部材の上面に開口を形成し、かつ、該反応封入部材の底面に開口を形成する、請求項 1 に記載のアセンブリ。

【請求項 11】

前記反応封入部材は複数のウェルを備え、請求項 10 に記載のアセンブリ。

【請求項 12】

前記反応封入部材を取り付けることができる反応封入部材背面プレートをさらに備え、かつ、該反応封入部材背面プレートは前記カートリッジカバーに取り付けることができる、請求項 2 に記載のアセンブリ。
50

【請求項 1 3】

前記反応封入部材が前記カートリッジカバーに取り付けられた場合、前記反応封入部材背面プレートは、該カートリッジカバーに対して可動である、請求項 1 2 に記載のアセンブリ。

【請求項 1 4】

前記カートリッジ基盤が前記カートリッジカバーと嵌合した場合、該カートリッジ基盤と該カートリッジカバーの間に配される、少なくとも 1 本の整列ピンをさらに備え、該整列ピンは、前記基板が固定位置にある場合、前記チャンバーが該基板の標的部位の上に位置するように、該カートリッジ基盤を該カートリッジカバーに対して位置づける、請求項 1 に記載のアセンブリ。

【請求項 1 5】

前記チャンバーは、前記基板が固定位置にある場合、該基板の上面の複数の標的部位の上に位置する、前記反応封入部材中の細長いフローチャネルによって形成され、該反応封入部材は、該フローチャネルに対する入口と、該フローチャネルに対する出口をさらに備える、請求項 1 に記載のアセンブリ。

【請求項 1 6】

サンプル物質を含むのに好適な少なくとも 1 個の標的部位を有する基板を保持するアセンブリであって、該アセンブリは、

該基板を固定位置に配置することが可能な、少なくとも 1 個の取付部位を有するカートリッジ；

該基板が固定位置にある場合、該基板と接触関係となるよう整列が可能な反応封入部材であって、該基板が、該基板に対して接触関係となるよう適正に整列された場合、該反応封入部材は、該基板上の少なくとも 1 個の標的部位の上にチャンバーを形成するチャネルを備える、反応封入部材；

該反応封入部材が取付けられる反応封入部材背面プレートであって、該反応封入部材背面プレートは該カートリッジに装着されると、該反応封入部材と該基板との接触関係を維持することが可能であり、かつ、該反応封入部材背面プレートは、該カートリッジに装着された場合、該カートリッジに対して移動が可能であり、それによって、該反応封入部材背面プレートが該カートリッジに装着された場合、該反応封入部材も移動して、該基板に対して整列されることを可能とする、反応封入部材背面プレート、
を備える、アセンブリ。

【請求項 1 7】

前記カートリッジは、カートリッジ基盤と、該カートリッジ基盤に着脱可能に嵌合するカートリッジカバーを備え、かつ、前記取付部位は、該カートリッジ基盤上にある、請求項 1 6 に記載のアセンブリ。

【請求項 1 8】

前記反応封入部材背面プレートは前記カートリッジカバーに取付けられる、請求項 1 7 に記載のアセンブリ。

【請求項 1 9】

前記チャネルは細長く、前記反応封入部材が前記基板上面に接触配置された場合、該基板上面の、1 列の標的部位の上に位置する、請求項 1 6 に記載のアセンブリ。

【請求項 2 0】

前記反応封入部材は、前記細長いチャネルの第 1 末端と連絡する流入口、および、該細長いチャネルの第 2 末端と連絡する流出口を備える、請求項 1 9 に記載のアセンブリ。

【請求項 2 1】

前記反応封入部材は複数の細長いチャネルを含み、該反応封入部材が、前記基板の上面に接触配置された場合、該チャネルの各々は、該基板上面の 1 列の標的部位の上に位置する、請求項 1 9 に記載のアセンブリ。

【請求項 2 2】

前記チャンバーを形成するチャネルは、前記反応封入部材の上面における開口と、該反応

10

20

30

40

50

封入部材の底面における開口を形成するウェルを備える、請求項 1 6 に記載のアセンブリ。

【請求項 2 3】

化学反応を実行する装置であって、

サンプル物質を受容するのに好適な底面と平坦な上面を有する基板であって、半導体材料から形成され、かつ該材料は、ガラスの熱伝導率よりも高い熱伝導率を持つ、基板；

該基板の平坦な上面に配される反応封入部材であって、該反応封入部材と該基板とは共同して、該平坦な上面に少なくとも 1 個のチャンバーを形成し、かつ、該反応封入部材は熱可塑性プラスチックから製造される、反応封入部材；

該基板底面のコーティングであって、電気的抵抗性材料で製造される、コーティング、
10 を備える、装置。

【請求項 2 4】

前記チャンバーは、前記反応封入部材中の細長いフローチャネルによって形成され、かつ、該反応封入部材は、該フローチャネルに対する入口と該フローチャネルに対する出口とをさらに備える、請求項 2 3 に記載の装置。

【請求項 2 5】

前記チャンバーは、前記反応封入部材において、該反応封入部材の上面における開口と、該反応封入部材の底面における開口を形成するウェルにより形成される、請求項 2 3 に記載の装置。

【請求項 2 6】

前記基板材料が、約 $0.5 \text{ W} / \text{mK}$ から $450 \text{ W} / \text{mK}$ の熱伝導率を有する、請求項 2 3 に記載の装置。

【請求項 2 7】

基板の上に少なくとも 1 個のウェルを形成する反応封入部材であって、

上側と底側を持つ本体であって、該本体は、

該本体底側に少なくとも 1 本の細長いフローチャネルを形成する、少なくとも一つの内面であって、該細長いフローチャネルは、本体の底側にそって開放している、フローチャネル；

該本体の上側に上方開口、および、該本体の内面に下方開口を定める流入ポート；

該本体の上側に上方開口、および、該本体の内面に下方開口を定める流出ポート；

該本体内に配される、少なくとも 1 個の圧解除腔であって、該腔は、該細長いフローチャネルを形成する内面の一つにそって肉薄領域を定めるように内面に対して配置される、圧解除腔；を備え

該本体は、該基板の上に、該細長いチャネルが該基板上面の 1 列の標的部位の上に整列されるように置かれ、そのため、該基板の表面と該本体の内面とが共同して、該細長いフローチャネル内の該 1 列の標的部位を封鎖することを可能とする、

、反応封入部材。

【請求項 2 8】

前記本体は、それぞれが対応する流入ポートと対応する流出ポートを有する、複数のフローチャネルを含み、かつ、該本体は、該フローチャネルの各々が、前記基板上の、対応する 1 列の標的部位に整列されるように該基板上に配置が可能である、請求項 2 7 に記載の反応封入部材。

【請求項 2 9】

前記本体は熱可塑性プラスチックから製造される、請求項 2 7 に記載の反応封入部材。

【請求項 3 0】

生物学的物質のサンプルを含む少なくとも 1 個の標的部位を有する基板の上で化学反応を実行する方法であって、

(a) 該基板の上面に反応封入部材を、該反応封入部材と該基板とが、該少なくとも 1 個の標的部位の直上に、共同してチャンバーを形成するように配置する工程；

(b) 流体を該チャンバーに投与して、該少なくとも 1 個の標的部位を該流体に露出する
50

工程；

(c) 該流体を用いて該チャンバー内で化学反応を実行する工程；

(d) 該基板を加熱して、該チャンバー内の温度を上げる工程

を包含し、工程(b)～(c)は、該基板が静止位置に留まる間に実行される、方法。

【請求項 3 1】

前記基板を、該基板を固定位置に保持するカートリッジに取付ける工程をさらに包含する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記基板の加熱は、

該基板上の抵抗性コーティングと、2個以上の電気的導体の間に第1組の接点を形成する工程であって、第1組の電気的導体の少なくとも1個は、第1抵抗器に対し直列に結合する、工程；

該基板上の抵抗性コーティングと、2個以上の電気的導体の間に第2組の接点を形成する工程であって、第2組の電気的導体の少なくとも1個は、第2抵抗器に対し直列に結合する、工程；

該第1組の電気的導体に第1電流を印加する工程であって、該電流が、第1組の電気接点から第2組の電気接点へ抵抗性コーティングを介して流れるようにする、工程；
を包含し、ここで、

該第1と第2抵抗器の抵抗値は相互に異なり、そのために、ある接点での電流は、別の電気接点に対して変動する、

請求項 3 0 または 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記チャンバーは、前記反応封入部材内の前記フローチャネルによって形成され、該フローチャネルは入口と出口を持ち、かつ、入口と出口を、その入口と出口に中空ピンを挿入することによって封鎖する工程をさらに包含する、請求項 3 0 または 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

標的生体分子の反応を実行する装置であって、

該標的生体分子を含む前記基板を取付けることが可能なワークステーション；

該ワークステーションに移動可能に結合された少なくとも1個の分注器であって、該基板が該ワークステーションに取付けられた場合、該分注器から材料が該標的生体分子に対して分注が可能な位置に移動される分注ピン；

該ワークステーションに結合されるサーマルサイクラーであって、該基板が該ワークステーションに取付けられた場合、該基板を加熱することが可能な少なくとも1個の加熱接点を備える、サーマルサイクラー；

を備える、装置。

【請求項 3 5】

前記基板は、基板アセンブリの一部として前記ワークステーションに取付けられ、該基板アセンブリは

該基板を固定位置に支持することが可能な少なくとも1個の取付部位を有するカートリッジ基盤；

該基板の上部に着脱可能に配置される前記反応封入部材を含み、該反応封入部材の底面は、該基板の上面と接触配置され、該反応封入部材が該基板上面に接触配置されると、該反応封入部材と該基板は共同して、該基板上の前記標的生体分子の上に配される少なくとも1個のチャンバーを形成し、それによって該チャンバー内で反応が起こるのを可能とする、請求項 3 4 に記載の装置。

【請求項 3 6】

前記分注器は、前記基板が前記ワークステーションに取付けられた場合、該基板に対して、3本の別々の軸に沿って移動することが可能である、請求項 3 4 に記載の装置。

【請求項 3 7】

前記サーマルサイクラーは、前記基板が前記ワークステーションに取付けられた場合、該

10

20

30

40

50

基板を冷却することが可能なクーラーをさらに備える、請求項 3 4 に記載の装置。

【請求項 3 8】

前記クーラーは、前記基板が前記ワークステーションに取付けられた場合、該基板の底面に空気を吹き付けるファンを備える、請求項 3 7 に記載の装置。

【請求項 3 9】

前記サーマルサイクラーは、前記基板が前記ワークステーションに取付けられた場合、該基板の温度を感受する温度センサーをさらに備える、請求項 3 4 に記載の装置。

【請求項 4 0】

標的生体分子の反応を実行する方法であって、

(a) 基板表面の存在下に該標的生体分子について 1 種以上の反応を実行する工程であって、該反応は、実質的に溶液中で実行され、該基板は該溶液と接触する 1 個以上の標的検出部位を備える、工程；

(b) 該基板表面の標的検出部位において 1 種以上の反応生成物を捕捉する工程であって、該捕捉は、反応生成物と、該基板表面、または、該基板表面に付着する官能基との間の非共有的相互作用を介して達成される、工程；および

(c) 該標的検出部位において該反応生成物を検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 1】

標的核酸分子の中の一つのヌクレオチドの本体を確定する方法であって、

該標的核酸分子の 1 本鎖部分を、標的核酸の該 1 本鎖部分のある領域に対して相補的なオリゴヌクレオチドに対し、前記基板上の不連続な検出部位において、溶液中で、かつ、捕捉官能基の存在下でハイブリダイズさせる工程；

前記ハイブリダイズした核酸とオリゴヌクレオチドを、該オリゴヌクレオチドの伸長を可能とする条件に暴露する工程；

伸長反応の生成物を、該基板表面の該不連続な標的検出部位で捕捉する工程であって、該捕捉は、該反応生成物と、該基板表面、または、該基板表面に付着する官能基との間の非共有的相互作用を介して達成される、工程

を包含する、方法。

【請求項 4 2】

捕捉が、イオン相互作用、ファンデルワールス力、または、水素結合を介して達成される
、請求項 4 0 または 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

捕捉が、反応生成物と、基板表面に付着した捕捉オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを介して達成される、請求項 4 0 または 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記捕捉された反応生成物を検出する工程をさらに包含する、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記反応生成物は、質量分析によって検出される、請求項 4 0 または 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記基板の表面はチャンバーの内面を形成する、請求項 4 0 または 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記生体分子は核酸である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記核酸の少なくとも 1 種の反応は、核酸分子の少なくとも一部の増幅を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 、リガーゼ連鎖反応 (L C R) 、および、鎖変位増幅 (S D A) から成る群から選択される増幅手順によって増幅される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

10

20

30

40

50

前記核酸の少なくとも 1 種の反応は、該核酸にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーの伸長を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記伸長プライマーは、前記基板表面に捕捉される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記伸長プライマーは、該伸長プライマーの、前記基板表面に固定化されたオリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションを介して捕捉される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

ハイブリダイゼーションは、前記伸長プライマーのプライマー部分の付加領域のヌクレオチドと、固定化オリゴヌクレオチドの相補配列の間に起こり、該伸長プライマーのプライマー部分の該付加領域のヌクレオチドは、標的生体分子の中には見られない、請求項 5 2 に記載の方法。
10

【請求項 5 4】

前記プライマーは、選択的に切断可能な部位を含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

工程 (c) に先立って、マトリックスが標的検出部位に堆積され、かつ、検出は M A L D I 質量分析によって実行される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 5 6】

検出に先立って、マトリックスが標的検出部位に堆積され、かつ、検出は M A L D I 質量分析によって実行される、請求項 4 4 に記載の方法。
20

【請求項 5 7】

少なくとも 1 種の反応は、加熱と冷却を含む、少なくとも 1 回のサーマルサイクル処理を経過する、請求項 4 8 または 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記加熱の速度は、約 3 / 秒から最大約 1 0 0 / 秒の範囲から選択される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記加熱の速度は、少なくとも約 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、95、および、少なくとも約 1 0 0 / 秒の加熱速度からなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の方法。
30

【請求項 6 0】

前記加熱は、熱伝導性または電導性を用いて達成される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記冷却の速度は、約 3 / 秒から最大 1 0 0 / 秒の範囲から選択される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記冷却の速度は、少なくとも約 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、95、および、少なくとも約 1 0 0 / 秒の冷却速度からなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の方法。
40

【請求項 6 3】

前記冷却は、水、空気、または、冷ブロックを用いて達成される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記オリゴヌクレオチドの伸長を可能とする条件は、加熱と冷却を含む、少なくとも 1 回のサーマルサイクル処理を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記加熱の速度は、約 3 / 秒から最大約 1 0 0 / 秒の範囲から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。
50

【請求項 6 6】

前記加熱の速度は、少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、95、および、少なくとも約100 /秒の加熱速度からなる群から選択される、請求項64に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記加熱は、熱伝導性または電導性を用いて達成される、請求項64に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記冷却の速度は、約3 /秒から最大100 /秒の範囲から選択される、請求項64に記載の方法。 10

【請求項 6 9】

前記冷却の速度は、少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、95、および、少なくとも約100 /秒の冷却速度からなる群から選択される、請求項64に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記冷却は、水、空気、または、冷ブロックを用いて達成される、請求項64に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記基板の表面は、取り外し可能な反応封入部材内の1個以上の反応チャンバーによって封鎖されている、請求項40または41に記載の方法。 20

【請求項 7 2】

単一の反応チャンバー内の温度差は、2.0、1.5、1.0、0.5、および、0.3から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 3】

個々の反応チャンバー間の温度差は、1.0、0.5、0.4、0.3、0.2および、0.1から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 4】

標的生体分子の反応を実行する方法であって、

(a) 基板表面の存在下に該標的生体分子について1種以上の反応を実行する工程であって、該反応は、実質的に溶液中で実行され、該基板は該溶液と接触する1個以上の標的検出部位を備える、工程； 30

(b) 該基板表面の該標的検出部位において1種以上の反応生成物を捕捉する工程、および

(c) 該標的検出部位において反応生成物を検出する工程を包含する方法。

【請求項 7 5】

標的核酸分子の中の一つのヌクレオチドの本体を確定する方法であって、

該標的核酸分子の1本鎖部分を、標的核酸の該1本鎖部分のある領域に対して相補的なオリゴヌクレオチドに対し、基板上の不連続な検出部位において、溶液中で、かつ、捕捉官能基の存在下でハイブリダイズさせる工程； 40

該ハイブリダイズした核酸とオリゴヌクレオチドを、該オリゴヌクレオチドの伸長を可能とする条件に暴露する工程；

伸長反応の生成物を、該基板表面の該不連続な標的検出部位で捕捉する工程を包含する、方法。

【請求項 7 6】

前記捕捉は、前記反応生成物と、前記基板表面、または、該基板表面に結合する官能基との間の非共有的相互作用を介して達成される、請求項74または75に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

【0001】

(関連出願)

2002年4月11日出願、発明の名称「Method and Device for Performing Chemical Reaction on a Solid Support」の米国仮出願第60/372,711号、代理人管理番号24736-P2064、および、2003年3月24日出願、発明の名称「Methods and Devices for Performing Chemical Reactions on a Solid Support」の米国仮出願、代理人管理番号24736-P2064Bに対して優先権が主張されている。本出願は、本願と同日に出願された、発明の名称「Methods and Devices for Performing Chemical Reactions on a Solid Support」なる米国出願番号(代理人管理番号24736-2064)と関連する。認められる場合、前記仮出願および米国出願それぞれの主題全体を、参考として援用する。10

【0002】

(発明の分野)

本発明は生化学処理システムに関する。より具体的には基板上における生化学的処理の実行に関する。

【背景技術】**【0003】**

生物学的物質の処理においては、試験・分析のために、サンプル物質を反応地点に自動移送することがよくある。大規模なバッチの遺伝学的サンプルに対して試験を行い、表現型の関連性を作製するため、および、そのような試験から得られた大量のデータセットの解釈を向上させるために、マイクロアレイが用いられてきた。サンプルは通常マイクロタイタープレート(MTP)と呼ばれるトレイで調製される。このMTPは、それぞれが生物学的物質のサンプルを保持するウェルのアレイを含む。様々な液体試薬物質がウェル中で組み合わされ、各種処理、たとえば、分析のためのDNA增幅法であるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法に供される。20

【0004】

PCR過程に従って、DNAサンプルを各種薬剤と混合し、このサンプルを一連の交互の加熱および冷却サイクルに供する熱サイクリング処理に供することによって、少量のDNAを複製する。典型的な熱的サイクル操作の場合、サンプルを取付したMTPを加熱サイクルブースに設置し、ここで、MTPを希望に応じて加熱・冷却し、これによってMTPウェルの内容物に作用を及ぼす。プレートを加熱・冷却する一つのやり方は、そのプレートを、MTPの下面に適合する金属プレート上面に設置することである。この金属プレートを加熱・冷却すれば、それによってまた、MTPも加熱・冷却されることになる。30

【0005】

熱的サイクル過程の前に、PCR用サンプルの調製は、代表的には、空のMTPをプレート処理ステーションに搬送することで始まる。次に、各種試薬および生物学的物質をMTPウェルに添加するが、これはロボットシステムによって実行される。ロボットシステムは、プレート処理ステーションからMTPを摘み上げ、生物学的試料サンプルに試薬を加え、それからそのMTPを次のステーションに移してその後の処理を実行する。別法として、人間のオペレータが手動で試薬を生物学的物質に加え、そして混合する。従って、PCR用のサンプル物質を調製する場合、MTPのウェルは、しばしば、いくつかの操作(通常、各ウェル中の溶液の混合および他の処理が含まれる)の結果そのもののサンプル物質が含まれる。このような操作の間、MTPは、いくつかの異なるステーションに、例えば、MTPをリンスするステーション、サンプルのあるMTPのウェルから別のMTPのウェルに移動させるステーションに移動させられることがある。40

【0006】

PCR過程が所定のサンプルのセットについて完了した後、得られたサンプル物質に、一つ以上の追加過程を実施することがあり得、そのような追加過程では、しばしば、先行50

する過程で用いられた装置の洗浄およびリンスが必要とされる。しばしば、最終サンプルは、基板上のスポットのアレイ中に置かれ、次に、一つ以上の分析、例えば、当業者には公知のマトリックス支援レーザー脱離／イオン化質量分析装置（M A L D I - M S）にかけられる。M A L D I - M S法によれば、標的プレート上のスポット中に含まれるサンプルは、ある一定波長の光を強く吸収するマトリックス物質中に分散される。次に、真空チャンバー内において、短いパルスのレーザー光線をこのサンプルに収束して、サンプルおよびマトリックスを揮発させてイオンを形成させる。この形成されたイオンを高圧電源により加速し、次に飛行管の中を押し流す。科学者は、イオンが飛行管の末端に到着するまでに要した時間量に基づいて、サンプルの成分の分子量について情報を集めることができる。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

前記の過程に関連して様々な負担が生じる。その負担の一つに、前記過程の実行に比較的長時間を要することが挙げられる。これはサンプル分析処理量を低下させる。前記過程を実行するのに要する時間には各種要因が関わる。例えば、熱的サイクル過程では、M T Pの加熱および冷却が、例えば、数時間のオーダーの長時間を費やし得る。各種ステーション間で、例えば、サンプルを調製する混合ステーションから、サーマルサイクリングを実行するサーマルサイクリングステーションへM T Pを移動させることにも時間がかかる。時間の浪費は、その他にも、P C Rおよびその後のその他の反応の後、サンプルをM T Pから取り出しM A L D I - M S用の基板に載せる場合にも生ずる。

20

【0008】

さらに別の負担として、過程を実行するのに要するスペースの量に関する負担がある。現在、過程の実施中に、数個のステーションの使用が必要とされ、ここで、各ステーションが他の目的のために使用し得るスペースを取ってしまう。様々なステーションは、それらステーション間でサンプルを移送させるために何らかの機構、例えば、ロボットシステムまたは人間オペレータの形態の機構を必要とするが、これらは、諸過程の金銭コストを増大させる。さらに別の負担は、過程を実行するのに必要な補給物資の容量に関する。例えば、P C Rの間に使用される試薬は非常に高価である。

30

【0009】

前記に鑑みて、このような分析に関連する各種負担を低減する生物学的サンプル処理の改良装置および改良法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

直接基板の上で生化学過程を実行するための装置および方法が提供される。基板アセンブリは、着脱可能に固定位置に基板を支持するカートリッジベース、および、着脱可能に基板上面に配置される反応封入部材を含む。反応封入部材および基板は共同して、基板表面の1個以上の標的位置の直上にチャンバーを形成する。これらのチャンバーは、基板の上での標的位置の定位置での生化学反応を実行するのに使用され得、ならびに、基板に直接配置される加熱エレメントを用いる、チャンバー内に含まれる物質のサーマルサイクリングを実行するのにも使用され得る。

40

【0011】

基板アセンブリは、処理機であって、物質をチャンバーに滴下し、チャンバーに含まれる物質の生化学反応を実行しながらも、その処理中、基板アセンブリの、ある位置から別の位置への移動を要しない処理機と組み合わせて使用することが可能である。このようにして、例えば、試薬や生化学物質のP C R調製を含む各種化学過程を、M A L D I - M S分析の準備を実行する孤立処理ステーションを含む処理機で実行が可能である。

【0012】

本開示のその他の特徴および利点は、実施例に基づいて示される下記の例示の実施態様の記載から自ずから明らかとなろう。

50

【 0 0 1 3 】

(詳細な説明)

(A . 定義)

別様に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明（単数または複数）の属する分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書における全開示を通じて引用された全ての特許、特許出願、公刊された出願および公報、ジーンバンクの塩基配列、ウェブサイトおよびその他の公刊資料は、別様に注記しない限り、その全体が本明細書において参考として援用される。本明細書の用語について複数の定義がある場合には、本節で紹介されるものが優先する。参照が、URLや、その他の特定符号またはアドレスについて行われる場合、そのような特定符号は変更の可能性があり、そして、インターネット上の特定の情報は変動する可能性があるが、等価な情報がインターネットを検索することによって発見が可能であることが理解される。情報に対する参照は、その情報の入手可能性および一般的普及を裏付けるものである。

10

20

30

【 0 0 1 4 】

本明細書で使用する場合、「生体分子」または「標的生体分子」とは、生きている生物に生じる全ての有機分子、特に、巨大分子をいう。生体分子としては、核酸、生体高分子、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、小有機分子、脂質および炭水化物、それら化合物グループの誘導体、および、それら分子の結合体が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。

【 0 0 1 5 】

本明細書で使用する場合、「基板表面の存在下において標的生体分子の1つ以上の反応を実行する」という言句は、少なくとも基板表面ともまた接触する反応混合液中において、何らかの生化学反応（例えば、增幅またはプライマー伸長反応、または、タンパク質間の結合反応）を実行することをいう。

20

【 0 0 1 6 】

本明細書で使用する場合、「反応（単数または複数）は、実質的に溶液内で実行される」という言句は、大多数の反応物質間の相互作用が溶液中で生じ、その結果、大多数の反応物質および任意の中間物質が溶液中に存在する反応をいう。特定の実施態様では、反応生成物（単数または複数）は、1個以上の、別々の標的検出部位（単数または複数）において、基板表面において捕捉される。

30

【 0 0 1 7 】

本明細書で使用する場合、「基板は、溶液と接触する1個以上の標的検出部位（単数または複数）を含む」という言句は、反応混合液に接触する基板の表面に、不連続な標的検出部位（単数または複数）が、各検出標的部位も、反応中、その混合物に接触するような形で存在することを指す。反応期間中、反応混合液に接触する標的検出部位が存在するということは、反応生成物を、標的検出部位を持たない一つの反応チャンバーから、標的検出部位を有する別の反応チャンバーに物理的に移送しなければならないという要求を回避させる。

40

【 0 0 1 8 】

本明細書で使用する場合、「標的検出部位」または「標的部位」またはその文法的な変種は、分析される、または、検出される標的分子の置かれる基板上の位置を指す。この標的分子は、通常、捕捉用官能基、例えば、核酸（例えば、ハイブリダイゼーションを通じて）によって、または、タンパク質または抗体によって、イオン相互作用ファンデルワールス力または水素結合を介して、捕捉される。

【 0 0 1 9 】

本明細書で使用する場合、「反応（単数または複数）は、・・・の存在下で行われる」という言句は、個別の標的検出部位において不連続に配される固相捕捉官能基内の一つ、または、それらの全てのサブセットという文脈で用いられる場合、その標的検出部位の周囲、上方、下方、または、近傍において反応が、生体分子反応物質を含む反応混合物が

50

、少なくとも 1 個の標的検出部位に接触するような形で起こることを指す。典型的には、反応は、基板上の標的検出部位の上方にて起こる。例えば、本明細書で提供される方法の特別の利点として、捕捉標的生体分子の検出を、捕捉前溶液相反応が実行された、その同じ部位にて行うことが挙げられる。従って、捕捉前溶液相反応の部位と、標的検出部位とは同じである。この特別の利点により、経費や時間が低減・短縮されるばかりでなく、高い処理能力方式で反応を自動的に実行しようとした場合必要とされる装置の規模や複雑性も低減される。この特長は、その内部において溶液相反応が起こる 1 個以上の反応チャンバーまたはチャネルを形成する反応封入部材を、標的検出部位における標的捕捉工程の終了後、基板から外すことによって達成される。従って、本明細書で提供される方法では、液相反応生成物を、標的生体分子の捕捉前に、その中に捕捉官能基を備える、新たな標的検出部位および / または新たな溶液への物理的移送が要求されない。例えば、基板がチップである場合、このチップは、溶液相反応期間中、少なくとも反応生成物（単数または複数）が捕捉されるまで、好都合にも静止を持続することが可能である。一旦反応生成物（単数または複数）が捕捉されたならば、チップは、取り外す、および / または、M A L D I - T O F 質量分析のような検出分析のために調製することが可能である。

10

【 0 0 2 0 】

本明細書で使用する場合、「非共有的相互作用」という言句は、2、4 または 6 個の電子の共有によって特徴付けられる原子間結合を含まない、全ての相互作用を指す。

20

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用する場合、「オリゴヌクレオチドの延長を許す条件」という語句は、鋳型にハイブリダイズさせる際プライマーを延長するのに使用される周知の反応条件のいずれか、例えば、本明細書の実施例の節に記載される条件を指す。

20

【 0 0 2 2 】

本明細書で使用する場合、「多型」とは、ある特定の核酸、例えば、遺伝子またはその一部の、一つより多い形態または対立遺伝子の共存を指す。例えば遺伝子のような核酸分節の一部または座位であって、少なくとも 2 種類の異なる形態、すなわち、2 種類の異なるヌクレオチド遺伝子座がある部分または座位は、「多型領域」と呼ばれる。多型領域は、その特定内容が、異なる対立遺伝子では別になる、單一ヌクレオチドであってもよい。多型領域はまた幾らかのヌクレオチド長であってもよい。多型は、ヌクレオチドの置換、挿入、重複、および、欠失を含む。多型は、ある特定の多型部位に見られる特定のヌクレオチド（単数または複数）、または、ヌクレオチド配列を指してもよい。

30

【 0 0 2 3 】

本明細書で使用する場合、「多型遺伝子」とは、少なくとも 1 個の多型領域を持つ遺伝子を指す。

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用する場合、「対立遺伝子」は、本明細書では「対立的変種」と相互交換的に使用されるものであり、ある核酸、例えば、遺伝子またはその一部の別形態を指す。対立遺伝子は、相同染色体において同一座位または位置を占める。被験体が、ある遺伝子について二つの同一の対立遺伝子を有する場合、その被験体は、その遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合性であると言われる。被験体が、ある遺伝子について異なる二つの対立遺伝子を有する場合、その被験体は、その遺伝子についてヘテロ接合体であると言われる。ある特定の遺伝子の対立遺伝子は、單一ヌクレオチドにおいて互いに異なることがあるし、いくつかのヌクレオチドにおいて互いに異なることもあります、ヌクレオチドの置換、欠失および挿入を含むこともある。また、一つの遺伝子の対立遺伝子は、一つの突然変異を含む、一形態の遺伝子であることもある。

40

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用する場合、「被験体」という用語は、生体分子分析の対象となり得る全ての生物を指す。この被験体という用語は、真核生物（例えば、酵母、植物、動物、特に哺乳類、および、特にヒト）、および、原核生物を含む。例えば、原核生物は、突然変異分析の対象となることがある。

50

【0026】

本明細書で使用する場合、「配列番号第×番に記載されるヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列」とは、配列番号第×番を有する核酸鎖の相補鎖の核酸配列を指す。「相補鎖」という用語は、本明細書では、「相補体」という用語と相互交換的に使用される。ある核酸鎖の相補体は、コード鎖の相補体であっても、非コード鎖の相補体であってもよい。2本鎖核酸に言及している際、配列番号第×番を持つ核酸の相補体とは、本明細書に配列番号第×番として列挙されているヌクレオチド配列を有する鎖の相補鎖、または、前記配列番号第×番の相補鎖のヌクレオチド配列を有する全ての核酸を指す。ヌクレオチド配列、配列番号第×番を持つ1本鎖核酸に言及している際、この核酸の相補体は、前記配列番号第×番のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を持つ核酸である。

10

【0027】

本明細書で使用する場合、「コード配列」という用語は、あるタンパク質のあるアミノ酸配列をコードする遺伝子部分を指す。

【0028】

本明細書で使用する場合、「センス鎖」という用語は、その2本鎖核酸分子によってコードされるアミノ酸配列をコードするmRNA配列を有する、2本鎖核酸分子の鎖を指す。

20

【0029】

本明細書で使用する場合、「アンチセンス鎖」という用語は、その2本鎖核酸分子によってコードされるアミノ酸配列をコードするmRNA配列の相補体である2本鎖核酸分子の鎖を指す。

【0030】

本明細書で使用する場合、ストリンジエンシー条件とは、非特異的プローブを除去するための洗浄条件、および、下記の高度、中度、および、低度のストリンジエンシーに相当する条件を指す。すなわち、

- 1) 高ストリンジエンシー - 0.1 × S S P E、0.1% SDS、65
- 2) 中ストリンジエンシー - 0.2 × S S P E、0.1% SDS、50
- 3) 低ストリンジエンシー - 1.0 × S S P E、0.1% SDS、50

別のバッファー、塩類、および、温度を用いることによって等価なストリンジエンシーを実現してもよいことが理解されよう。

30

【0031】

本明細書で使用する場合、「標的分子」とは、分析の対象とされる分子、例えば、生体分子を指す。標的分子の例としては、核酸、例えば、目的の遺伝子の多型領域の全てまたは一部を含む核酸、ペプチドまたはタンパク質、有機低分子または炭水化物が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。

【0032】

本明細書で使用する場合、「チャンバー」は、流体、例えば、反応混合物を含むことが可能な内部空間を定める、および/または、一つの区域を別の区域から隔てることを可能とする、少なくとも一つの底面と1個以上の壁で形成される囲い込みを指す。例えば、チャンバーは、基板、例えば、シリコンチップの表面における窪みとして形成されてもよい。別の例として、チャンバーは、中空円筒の開放端を基板表面に置くことによって形成してもよい。別の実施態様として、チャンバーは、円筒の半分を用いて形成することが可能である。さらに別の例として、チャンバーは、少なくとも2枚の壁を互いに平行に基板表面に置いてチャネルを創設することによって形成することも可能である。

40

【0033】

本明細書で使用する場合、「アレイ」は、要素、例えば、核酸のアセンブリを指す。典型的には、アレイは3個以上のメンバーを含む。対処可能なアレイは、代表的には、アレイのメンバーが固相支持体上の位置によって特定が可能なものである。従って、一般に、アレイのメンバーは、固相表面の、不連続な、特定可能な位置に固定化される。

50

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用する場合、「特異的にハイブリダイズする」とは、あるプローブまたはプライマーが、非標的配列に比べて、ある標的配列に優先的にハイブリダイズすることを指す。当業者であれば、ハイブリダイゼーションに影響を及ぼすパラメータ、例えば、温度、プローブまたはプライマーの長さや組成、バッファー組成および塩濃度には精通しており、標的配列に対してある核酸の特異的ハイブリダイゼーションを実現するためにこれらのパラメータを簡単に調節することが可能であろう。

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用する場合、「核酸」とは、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)のようなポリヌクレオチドを指す。この用語は、その等価物として、ヌクレオチド類縁体、1本鎖(センスまたはアンチセンス)ポリヌクレオチド、および、2本鎖ポリヌクレオチドから作製されるRNAまたはDNAの誘導体、変種、および、類縁体を含むものと理解しなければならない。デオキシヌクレオチドは、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、および、デオキシチミジンを含む。RNAでは、ウラシル塩基はウリジンである。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する場合、「質量分析」は、当業者には周知の適当な質量分析方式を全て含む。そのような方式としては、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化法、飛行時間法(MALDI-TOF)、電子スプレー法(ES)、IR-MALDI(例えば、国際PCT出願第WO99/57318号、および、米国特許第5,118,937号の公報参照)、イオンサイクロトロン共鳴法(ICR)、フーリエ変換法、および、それらの併用法が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。MALDI、特にUVおよびIRは、例示の方式として特記される。

20

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用する場合、「プライマー」および「プローブ」とは、DNA、RNAおよびそれらの類縁体、また、タンパク質核酸(PNA)およびそれらの混合物を含む核酸分子を指す。そのような分子は、典型的には、目的のゲノムにおいて統計的には一意(すなわち、ただ一度しか起こらない)となるような長さを有する。一般に、あるプローブまたはプライマーがヒトゲノムにおいて一意となるためには、目的の遺伝子に対して相補的な、または、同一の配列の、少なくとも14個、16個、または、連続したヌクレオチドを含む。プローブおよびプライマーは、10、20、30、50、100個以上の核酸長であってもよい。典型的には、プローブまたはプライマーは、1本鎖核酸分子である。

30

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する場合、「隣接」とは、一塩基多型(SNP、スニップ)部位に対する5'位置であって、その位置とSNP部位の間に対合しないヌクレオチドペアが存在する可能性のある位置を指す。

40

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する場合、支持体(またマトリックス支持体、マトリックス、不溶性支持体、または、固相支持体とも呼ばれる)とは、目的の分子、典型的には、生物分子、有機分子または生物特異的リガンドが結合する、または、接触する、固相もしくは半固体もしくは不溶の支持体全てを指す。このような物質としては、化学的・生物学的分子合成・分析に好適な親和性マトリックスまたは支持体として使用される全ての材料、例えば、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ナイロン、ガラス、デキストラン、キチン、砂、軽石、アガロース、多糖類、デンドリマー、バッキーボール、ポリアクリルアミド、シリコーン、ゴム、および、固相合成、親和性分離・精製、ハイブリダイゼーション反応、免疫定量法、その他の用途において支持体として使用される、他の材料が挙げられるが、ただし上記に限定されない。本明細書におけるマトリックスは粒状であっても、または、連続面の形を取っても、例えば、微量定量皿またはウェル、ガラススライド、シリコンチップ、ニトロセルロースシート、ナイロンメッシュ、または、その他の材料のような形を取ってもよい。粒状の場合、典型的には、粒子は、5~100μm範囲以下の少

50

なくとも一形態を持つ。このような粒子は、本明細書ではまとめて「ビーズ」という。これは、球形であることが多いが必ずしもそうでなくともよい。しかしながら、このように言及したからと言って、それはマトリックスの形状を限定するものではなく、マトリックスは、どのような形態であってもよく、例えば、ランダムな形状、針状、纖維状、および、細長状であってもよい。概して、球形「ビーズ」が、特に、脂質相において使用が可能な微小球がまた考えられる。ビーズは、追加成分を、例えば、磁性粒子または常磁性粒子（例えば、「ダイナビーズ」（登録商標）（Dyna1、オスロ、ノルウェー）参照）を、マグネットによって分離するために含んでもよい。ただし、その追加成分が、本明細書の方法や分析に干渉しない限りにおいてはあるが。

【0040】

10

本明細書で使用する場合、マトリックスまたは支持粒子とは、不連続粒子の形態を取るマトリックス材料を指す。この粒子はどのような形、大きさのものであってもよいが、典型的には、100mm以下、50mm以下、10mm以下、5mm以下、4mm以下、3mm以下、2mm以下、1mm以下、900μm以下、800μm以下、700μm以下、600μm以下、500μm以下、400μm以下、300μm以下、200μm以下、100μm以下、50μm以下、40μm以下、30μm以下、20μm以下、10μm以下、5μm以下、4μm以下、3μm以下、2μm以下、1μm以下、900nm以下、800nm以下、700nm以下、600nm以下、500nm以下、400nm以下、300nm以下、200nm以下、100nm以下、50nm以下、40nm以下、30nm以下、20nm以下、10nm以下、30nm以下、20nm以下、および、10nm以下である、少なくとも一つの大きさを有する。粒子は典型的には、 100 mm^3 以下、 50 mm^3 以下、 10 mm^3 以下、および、 5 mm^3 以下、 4 mm^3 以下、 3 mm^3 以下、 2 mm^3 以下、および、 1 mm^3 以下、 $900\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $800\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $700\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $600\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $500\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $400\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $300\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $200\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $100\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $50\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $40\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $30\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $20\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $10\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $5\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $4\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $3\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $2\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 $1\text{ }\mu\text{m}^3$ 以下、 900 nm^3 以下、 800 nm^3 以下、 700 nm^3 以下、 600 nm^3 以下、 500 nm^3 以下、 400 nm^3 以下、 300 nm^3 以下、 200 nm^3 以下、 100 nm^3 以下、 50 nm^3 以下、 40 nm^3 以下、 30 nm^3 以下、 20 nm^3 以下、 10 nm^3 以下または 5 nm^3 以下のサイズを持ち、そして立方ナノメートルのオーダーである。典型的には、粒子は、約1.5ミクロンで15ミクロン未満、例えば、約4-6ミクロンの直径を持つ。このような粒子をまとめて「ビーズ」と呼ぶ。

【0041】

20

本明細書で使用する場合、「基板」とは、その上で反応の実行が可能である、および/または、反応生成物を特定可能な遺伝子座に保持が可能である表面を提供できる不溶の支持体を指す。支持体は、ほとんどどのような不溶の、または、固相の物質からでも製造ができる。例えば、シリコーン、シリカゲル、ガラス（例えば、孔調節ガラス（CPG））、ナイロン、ワン樹脂、メリフィールド樹脂、Sephadex（登録商標）、Sephadose（登録商標）、セルロース、金属面（例えば、スチール、金、銀、アルミニウム、および、銅）、プラスチック材料（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリエステル、ポリフッ化ビニリデン（PVDF））がある。例示的な基板としては、例えば、ガラス纖維フィルター、シリコーン表面、ガラス面、金属面（スチール、金、銀、アルミニウム、および、銅）、および、プラスチック材料のような平坦支持体が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。固相支持体は、カートリッジ基盤に取り付けるのに適当ないずれの所望の形を取ってもよく、そのようなものとして、プレート、膜、ウェーファ（wafer）、小孔印刻ウェーファ（wafer with pit）、および、当業者には周知のその他の大きさ・形態が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。例示的な支持体は、不連続遺伝子座、例えば、サンプルを受容するか、含有するか、または、サンプルに結合するための親水性遺伝子座を取り囲む疎水性領域を備えた平面において、サンプルを受容する、または、サンプルに結合するように設計された平面

40

50

である。

【0042】

(B. 例示的な基板アセンブリ)

図1は、基板アセンブリ110の分解斜視図を示し、同基板アセンブリは、基板115、反応封入部材120、反応封入部材背面プレート125、カートリッジ基盤130、および、カートリッジカバー135を含む。図2に示すように、カートリッジカバー135は着脱可能にカートリッジ基盤130に組み合わさり、まとまって、下記にさらに十分に説明するように、基板115、反応封入部材120、および、反応封入部材背面プレート125を着脱可能にしっかりと保持するカートリッジ210を形成する。カートリッジカバー135はカートリッジ基盤130から外すことが可能であり、それにより、基板115を、処理後、カートリッジから取り出すことが可能となる。

【0043】

(C. 基板)

図3に示すように、基板115は、生物サンプルが堆積されてその上に複数の標的部位310を作る上側平面を形成する。一つの実施態様では、基板はチップの形を取る。基板は、急速熱応答や、基板全体に渡る熱均一性を実現するために熱伝導性の高い材料から形成される。この点で、基板は、約0.5W/mkのガラスの熱伝導率よりも大きい熱伝導性を有する材料から形成することも可能である。一つの実施態様では、基板115は、約0.5W/Mkから450W/Mkの範囲の熱伝導率を持つ材料から製造される。基板115は、シリコーンや当業者には公知のその他の材料のような半導体材料から製造してもよい。

【0044】

図3では例示が分かり易いように、図3に例示される基板115は、12×8の格子に配置された、96個の標的部位を含んでいるが、その標的部位の内の僅か二つだけを参照番号310で表示している。従って、基板115は、12列の標的部位および8行の標的部位を持つ。基板115は、その他様々の構成において配置される、他の数量の標的部位を持つことも可能であることを理解しなければならない。基板115のサイズも変更が可能である。ただし、一つの実施態様では、基板115は、約3cmの長さと約2cmの幅を持つ長方形を有する。標的部位310は、様々な容量の生物材料を含むことが可能である。一つの実施態様では、標的部位310は、0.0025mm²または1.0mm²の面積を占め、オリゴヌクレオチド量は10amolと10pmolの範囲にある。ただし、この量は変更が可能である。

【0045】

図4は基板115の側面図を示す。電気抵抗性コーティング410から成る加熱要素が、基板115の一つの面、例えば、標的部位を含む面と対向する面に配される。抵抗性コーティング410は、基板115に対して熱的に接触し、熱がコーティング410から基板115に向けて伝播可能となるようになる。抵抗性コーティング410は、加熱・冷却され、そのために基板115の加熱・冷却が可能となるような材料から成る薄膜またはコーティングを含む。抵抗性コーティング410は、電流が印加されると熱せられる材料、例えば、白金またはチタンタングステンから作製が可能である。抵抗性コーティング410は、基板115の全底面に渡って均一な厚みを持ち、基板115の表面上に均一な温度特性を実現するようにしてよい。しかしながら、抵抗性コーティングの形態、例えば、その厚みは変更が可能である。例えば、抵抗性コーティング410は、その抵抗性コーティング410が基板115のある領域のみに配されるようにパターン化され、基板における加熱の均一性を変化させることも可能である。さらに、抵抗性コーティング410は、生物サンプルが静置される基板115の上面に配することも可能である。図4は原寸大ではなく、基板115と抵抗性コーティング410の相対的サイズは、図示の明瞭と簡便のために誇張されていることを理解しなければならない。

【0046】

別の実施態様では、基板410は、抵抗性材料であって、電流が材料に印加されると加

10

20

30

40

50

熱される抵抗材料から製造される。この抵抗性材料は、上面における標的部位の形成を可能とするよう、上面に塗布された絶縁性薄膜を有していてもよい。

【0047】

(カートリッジ基盤およびカバー)

図2に示すように、基板115はカートリッジ基盤130に取付され、それによってカートリッジ基盤130が固定位置において着脱可能に基板115を支持することが可能となる。カートリッジ基盤130は、後述するように、カートリッジ基盤130と基板115の間に生じる熱の流れを最小とするやり方で基板115を支持する。図5は、カートリッジ基盤130の拡大斜視図を示す。開口部510は、カートリッジ基盤130の上面512から下面514までカートリッジ基板130を貫いて延びる。開口部510は、基板115がカートリッジ基盤130に取付される基板取付領域を定める。
10

【0048】

カートリッジ基盤130には、1種以上の取付部位515、例えば、開口部510辺縁が配されている。取付部位515とは、基板115をカートリッジ基盤130に取付したときに基板115に接触するカートリッジ基盤130の領域である。一つの実施態様では、基板115とカートリッジ基盤130の間の接触面積量は極力小さくされる。これは、基板115をカートリッジ130に取付した場合に、カートリッジ基盤130が、基板115の熱質量に対してほとんど、または、全く寄与することができないようにするためにある。この点で、カートリッジ基盤130と基板115の間ににおける熱流の可能性を最小にするためには、カートリッジ基盤130は、基板115の一辺の表面積の10%未満に接触可能とし、基板115の一辺の表面積の5%未満に接触可能とし、基板115の一辺の表面積の3%未満に接触可能とする。
20

【0049】

取付部位515は、段差のある棚を含むことが可能である。これらの棚は集まって、基板115のカートリッジ基盤130への取付を可能とする座位を形成する。この状況は、図6の、カートリッジ基盤130の、一部断面図においてさらに詳細に示される。各取付部位515において、段付き棚形態が、基板115が据えられる水平壁610と、基板115が動かないようにするために、基板115の辺縁と隣接する垂直壁615を定める。壁610、615のサイズは、基板115に対する十分な支持を確保し、また一方で、基板115とカートリッジ基盤130の間の熱接触量を最小にするように選ばれる。
30

【0050】

再び図5を参照すると、カートリッジ基盤130は、基板115がカートリッジ基盤130の取付部位515に取付された際に、基板115を固定位置に確保する、少なくとも1個の確保部材520を含む。確保部材520は、基板115が、取付部位515の段付き棚に据えつけられた際に、基板115の末端に対し第一方向に向けて力を及ぼすように付勢されたフィンガーを含んでいてもよい。この力は、基板115を1個以上の垂直壁615(図6に示す)に対して押し付けるので、基板115は、カートリッジ基盤130にしっかりと取付される。

【0051】

一つの実施態様では、カートリッジ基盤130はまた第2固定確保手段522を含む。これは、基板115が取付部位515の段付き棚に据えられた際に、基板115に対して第二の力を及ぼすものである。この第2確保部材522は、第1確保部材520によって施される力の方向に対して横断的に第二の力を及ぼすので、基板115に対して施される実際の合計力は、基板115の隅角の一つに向けられることになる。従って、第1確保部材520と第2確保部材522は共同して、基板115を、カートリッジ基盤の開口部510の隅角の一つに対してぴったりと据えられるように付勢する実際の合計力を与えることになる。これは、基板115が、取付部位において、常に同じ場所同じ方向に設置される確率を高めることになるから、カートリッジ基盤130における基板115の位置を登録することがより易しくなる。
40

【0052】

図2は、カートリッジ基盤130に取付された基板115を示す。カートリッジ基盤130に取付されると、基板115は、開口部510の上に宙吊りされることになる。このため基板115の底面は、少なくとも部分的には、開口部510を通して露出されることになる。このため基板の上面(すなわち、生物サンプルが静置される面)は、基板115がカートリッジ基盤130に取付されると、上に向かって露出されることになる。確保部材520、522は、基板115に対して、基板を取付部位515に確実に設置するように力を及ぼす。

【0053】

前述したように、カートリッジ基盤130はカートリッジカバー135と嵌合する。この点で、カートリッジ基盤は、1個以上の嵌合部材525(図2と図5の両方に示す)を含む。この部材は、下記にさらに詳述するように、カートリッジカバー135の対応嵌合部材と嵌合する。図5を参照すると、各嵌合部材525は、段付き面を持つ上方に延びる舌を含んでもよい。この舌は、カートリッジカバー135の対応開口部と嵌合・閉鎖して、カートリッジ基盤130とカートリッジカバー135の間に、カートリッジ基盤130とカートリッジカバー135を互いにしっかりと結合する力を及ぼすこと可能にする。カートリッジ基盤130とカートリッジカバー135を互いにしっかりと結合させるのに他の手段を用いてもよいことを理解しなければならない。

【0054】

一つの実施態様では、各嵌合部材525は、少なくとも2個の、段付き面のようなストッパーを含む。これは、カートリッジカバー135を、カートリッジ基盤130に対して二つの異なる固定位置において確保するためのものである。この段付き面はそれぞれ、カートリッジカバー135の対応開口部と嵌合する。第一固定位置では、カートリッジカバー135は、基板115に対して、基板がカートリッジ130の取付部位から外れることがないよう確保するのに十分な力で圧迫するように設置される。第一固定位置では、カートリッジカバーが基板115に対して及ぼす圧力は、カートリッジ基盤およびカバーの製造に使用された材料に変形クリープを全く生じさせることができない程度に十分に低いものである。カートリッジカバー135は、基板アセンブリ110の長期の保存や輸送の際には第一固定位置に設置される。これは、その保存や輸送の際カートリッジの成分にクリープの生ずる可能性を低減するためである。第二固定位置では、カートリッジカバー135は、第一設置位置におけるカートリッジカバー135よりも、より高度の力を、カートリッジ基盤130(および取付された基板115)に対して及ぼす。これは、基板と反応封入部材との間により高度の密閉度を実現するためである。カートリッジカバー135は、基板アセンブリが生物反応を実行するのに使用される際には、第二固定位置にある。

【0055】

さらに図5を参照すると、カートリッジ基盤130は、カートリッジ基盤130から上方に延びる1本以上の整列ピン530を含む。整列ピン530は、カートリッジカバー135(または、反応封入部材背面プレート125)の対応する整列穴と嵌合が可能である。これらは、下記に詳述するように、嵌合中、カートリッジ基盤130のカートリッジカバー135に対する軸を揃える。

【0056】

図7は、カートリッジカバー135の拡大斜視図である。開口部710はカートリッジカバー135を貫いて延びる。カートリッジカバー135の開口部710は、カートリッジカバー135とカートリッジ基盤130が嵌合された場合、カートリッジ基盤130の開口部510の上に配される。従って、開口部710は、基板115がカートリッジ基盤130に取付され、カートリッジカバー135がそれらと嵌合された場合、基板115の直上に配されることになる。カートリッジカバー135は、スロットから成る嵌合部材715を含む。スロットは、カートリッジ基盤130の対応する嵌合部材525(図5に示す)と雌雄関係で嵌合する。雄部材をカートリッジカバー135に設置し、雌部材をカートリッジ基盤130に配することも可能であることを理解しなければならない。

【0057】

10

20

30

40

50

図7を参照すると、1本以上の整列穴725がカートリッジカバー135を貫いて延びている。各整列穴725は、カートリッジ基盤130の対応整列ピン530と軸が揃い、嵌合する。整列穴725と整列ピン530の軸が互いに揃えられると、嵌合部材525と715のみならず開口部515と710の軸も揃い、そのために、図2でもっとも良く見て取れるように、カートリッジ基盤130のカートリッジカバー135への結合が促進される。カートリッジカバー135はまた、開口部710の辺縁周囲に設置される、1個以上の背面プレート取付用スロットまたは穴730を含む。この取付用穴730は、下記にさらに詳述するように、カートリッジカバー135に対して背面プレート125(図1に示す)を取付するのに使用される。

【0058】

10

(反応封入部材)

図8は、反応封入部材120の第一実施態様の斜視図を示す。図8に示す反応封入部材120は、下記にさらに詳述するように、基板115に近接し、カートリッジ210に取付されて、基板115上面の上に1個以上のチャンバーを形成する。この点で、反応封入部材120は、反応封入部材120の辺縁に沿って延びる、一列の流入ポート810、および、流入ポート810の列と向かい合って、反応封入部材120の辺縁に沿って延びる、対応する一列の流出ポート815を含む。各流入ポート810は対応する流出ポート815を持つ。このために、各流入ポート810と流出ポート815はペアとして配置されることになる。フローチャネル820は、任意の流入／流出ポートペアについて、流入ポート810の下端を流出ポート815の下端に接続する。例えば、図8において、流入ポート810aと流出ポート815aから成るペアは、この流入ポート810aを流出ポート815aに接続するフローチャネル820aを含む。フローチャネル820は、下記にさらに詳述するように、反応封入部材120の内面によって形成される。図面の明瞭のために、図8は、流入ポート、流出ポート、および、フローチャネルの内のいくつかに対してのみ参照数字表示を含める。

20

【0059】

20

流入ポート810、流出ポート815、および、フローチャネル820の配置を、図9Aを参照しながらさらに詳細に説明する。同図は、フローチャネル820の内の一つについて、その長さに沿って得られた反応封入部材120の断面図を示す。各ポート810、815は同一サイズ・形態を持つ。流入ポート810および流出ポート815はそれぞれ、反応封入部材120の上面から下面へと延長する内壁によって形成される貫通孔を含む。このため、ポート810、815は、反応封入部材120の上面と下面に開口を形成する。反応封入部材120の上面の開口部は様々の形態を取ることが可能である。一つの実施態様では、開口部は円形であり、約10ミクロンから5ミリメートルの範囲の直径を有する。一つの実施態様では、各開口部の直径は1ミリメートルである。

30

【0060】

30

ポート810、815は、ウェルを下方に移動するに従ってそのサイズが漸次減少する断面を有するように図示されている。しかしながら、サイズは一定であることも可能である。図9Bの拡大図においてもっとも良く見て取れるように、各流出ポート815の下端は、ステップ1010を形成する。この目的は下記にさらに詳述する。流入ポート815も、図9Bには示されていないけれども、ステップを持つ。ポート815の下端は、それぞれのフローチャネル820に開放する。

40

【0061】

40

図10は、フローチャネル820の内の一つの、一部切り取り断面図を示す。フローチェンネル820は、反応封入部材120内の一組の内面1015によって形成される。内面1015は、両側面と上面においてフローチャネル120を囲むが、フローチャネル120の底部は開放したままに放置する。図10では、内面1015が平坦であり、そのために、フローチャネルは長方形断面を持つように描かれているが、内面1015は丸くなっていたり、または、その他の輪郭を持ち、そのためにフローチャネル820が別の断面形を持つことになることも可能であることを理解しなければならない。

50

【0062】

再び図9Aを参照すると、フローチャネル820は、流入ポート810の下端から流出ポート815の下端まで水平に延びる。このためポート810、815はフローチャネル820に開放することになる。ポート810、815の間では、フローチャネル820は、その上縁を、反応封入部材120の下面によって区切られることになる。フローチェンネル820はその底部が開放されており、そのため、反応封入部材120が図9Aに示すように平面950に設置された場合、フローチャネル820は、流入ポート810の下端を流出ポート815の下端に接続する、トンネルの形をした細長いチャンバーを形成する。チャンバーは、底部は平面950によって、上面は反応封入部材120の内面によって囲われる。

10

【0063】

フローチャネル820は、約10ミクロン(μm)から1mmの範囲の高さH(図9Bに示す)を持つ。一つの実施態様では、高さHは約200μmである。単一フローチャネル820は、約10ナノリットルから100マイクロリットルの容量を含み得るが、別の実施態様では、50ナノリットルから10マイクロリットルである。

20

【0064】

図9Aに図示するように、反応封入部材120には1個以上の圧解除腔955が設けられる。圧解除腔955は、反応封入部材120のばらばらの位置に設置される。各圧解除腔955は、フローチャネル820の一部に沿って見られる壁厚の薄い領域960を形成するように配置される。このために、もしもフローチャネル820によって形成されるトンネルが加圧されたとしても、領域960の壁厚の薄さにより、フローチャネル820が膨張し、トンネルの圧を解除することが可能になる。これは、反応封入部材120のサーマルサイクル中に起こる可能性がある。

20

【0065】

図11は反応封入部材120の上面図である。反応封入部材は、上から見下ろした場合、対応する基板115の形・サイズに実質的に一致する形・サイズを持つ。例えば、図11に示す反応封入部材120は、図3に示す基板115に対し、対応するサイズのみならず、その長方形に一致する長方形を有する。反応封入部材120の流入ポート810と流出ポート815は、反応封入部材120が基板115の上面と軸が揃えられ得、そのために各フローチャネル820が、基板115の対応列の標的部位の上に揃えられるように、空間的に配置されている。このように整列されると、標的部位の各列について、流入ポート810は、列の標的部位の一つの直上に揃えられ、流出ポート815は、列の標的部位の一つの直上に揃えられる。一つの実施態様では、流入ポート810がある列の最外側標的部位に揃えられ、流出ポート815が、同じ列の対向する最外側標的部位に揃えられる。この一つの例が図11に示される。同図において、反応封入部材120の下に設置される基板115上に、例示の、一列の標的部位310の位置が示される。この標的部位の列は、対応するフローチャネル820aの下に整列されており、そのフローチャネルの流入ポート810aは、その列の最外側の標的部位に整列され、かつ、流出ポート815aは同じ列の反対の最外側標的部位に整列されている。図の簡明のために、基板115上の他の列の標的部位は示されていないが、各列は、対応的に整列されるフローチャネル820を有することを理解しなければならない。

30

【0066】

図11を参照すると、反応封入部材120は、1個以上の整列穴1110を含んでもよい。この穴は、反応封入部材120の基板115に対する適正な整列を促進する。整列穴1110は背面プレート125の対応する整列ピンと嵌合し、それによって、反応封入部材120を背面プレート125に整列させることができある。反応封入部材120の基板115に対する適切な整列の実現をさらに支援するために、下記に詳述するように、反応封入部材120は、反応封入部材背面プレート125と結合することによって適切な整列を支援することも可能である。

40

【0067】

50

図8に示す反応封入部材120は、約5mmの厚み T_F を持つ。ただしこの厚みは変更が可能である。反応封入部材120は、熱可塑性材料のような柔らかい材料、または、シリコーンで製造してもよい。

【0068】

図12Aは、反応封入部材1215を含む、反応封入部材の別の実施態様の上面図を示す。この反応封入部材1215は、アレイ状に配される複数のウェル1217を含む。各ウェル1217は、反応封入部材1215の全長を貫通し、反応封入部材1215の上面に開口を形成し、底面に開口を形成する貫通孔を含む。ウェル1217によって形成されるこれらの貫通孔は、図13の反応封入部材1215の側面図において想像線で示される。

10

【0069】

ウェル1217は、各ウェル1217が、基板115の1個以上の標的部位310の上に整列され得るように空間的に配されている。従って、反応封入部材1215は、基板115の上に、各ウェル1217が、基板115上の、少なくとも1個の対応する標的位置310の上に整列され、それによってその標的部位の上にチャンバーを形成するように配置することが可能である。チャンバーは、基板の上面とウェル1217の壁によって定められる。反応封入部材1215は全くフローチャネルを必要としない。なぜなら、各ウェル1217は、基板の上に1個以上の対応標的部位を持つからである。

【0070】

図12Aに示す反応封入部材1215は、 6×4 の格子に配置された24個のウェル1217を持つ。従って、反応封入部材1215は、 6×4 の格子に配置され、反応封入部材1215上のウェル1217と同じ間隔を持つ24個の標的部位を持つ基板115と共に使用することが可能である。流入ポート810の量および空間的配置は、いずれの基板に対してもそれに合致するよう変更が可能であることが理解されるべきである。例えば、反応封入部材1215は、図3に示したような基板115と使用できるように、 12×8 の格子に配置された96個の標的部位を持つことも可能である。反応封入部材1215は、対応する基板の形・サイズに一致する形・サイズを持つ。反応封入部材1215はまた、反応封入部材1215を取り扱う際に掴むことが可能なタブ区画1220を持つ。

20

【0071】

図13は、図8に示す反応封入部材120の厚みより小さくあり得る厚み T_F を持つ反応封入部材1215の側面図を示す。一つの実施態様では、反応封入部材1215は約1mmの厚み T_F を持つ。反応封入部材1215は、シリコーンや、ゴムのような熱可塑性材料を含む様々な材料で製造されてよい。

30

【0072】

図12の反応封入部材1215は、反応封入部材1215が、図12Bに示す様式の反応封入部材となるように、流入ポート810、流出ポート815、および、フローチャネル820を構成することも可能であることが理解されるべきである。さらに、反応封入部材120(図8に示す)の実施態様も、図12Aおよび13の反応封入部材1215において示される配置に従って多数のウェル1217を有することが可能である。

40

【0073】

使用時、反応封入部材120(または反応封入部材1215)は、基板115のごく近傍に設置され、そのため、反応封入部材120の底面は、図14に示すように、基板115の上面に近接する。図8に示す実施態様を使用する際には、下記で詳述するように、反応封入部材120は基板115に整列され、そのため、反応封入部材120の各フローチャネル820が、基板の対応する標的部位列の直上に配されて、その標的部位列の上に細長いチャンバーを形成する。反応封入部材1215の実施態様が使用される場合は、反応封入部材1215は基板115と整列され、そのため、反応封入部材1215の各ウェル1217が、基板115の対応する少なくとも1個の標的部位310の上に配されて、その標的部位の上にチャンバーを形成する。これについては下記にさらに詳述する。

【0074】

50

(反応封入部材背面プレート)

反応封入部材120は、図14に示すように、基板115に対して、さまざまなやり方で、例えば、反応封入部材120の底面と基板115の上面の間に配置された接着剤を使用することによって、固定確保することが可能である。一つの実施態様では、反応封入部材背面プレート125が、反応封入部材120が基板115に対して適切に整列されるように、反応封入部材120を基板115の上に確保するために使用される。図15は、反応封入部材背面バックプレート125の斜視図であるが、これが、図16に関連して下記に詳述するように、反応封入部材120が設置・固定され得る座位1510を定める。

【0075】

反応封入部材背面プレート125は、反応封入部材が座位1510に設置された場合、反応封入部材120の流入ポート810と整列される複数の流入ポート1515を持つ。反応封入部材背面プレート125はまた、反応封入部材が座位1510に設置された場合、反応封入部材120の流出ポート815に整列される複数の流出ポート1520を持つ。反応封入部材背面プレート125はまた、カートリッジカバー135と嵌合して、反応封入部材背面プレート125を同カバーに固定するための、上方突出フィンガーのような、1本以上の嵌合部材1530を含む。図2に、反応封入部材背面プレート125の、カートリッジカバー135に固定されているところが示される。

【0076】

図16は、反応封入部材背面プレート125の断面図を示す。背面プレート125は、座位1510を形成する下面凹部を定める形を取る。この座位は、図16では、背面プレート125の直下にあるものとして描かれている反応封入部材120をその中に受容するような大きさに作られている。反応封入部材120は、座位1510内にぴったりと適合し、かつ、接着剤を使用してまたはプレスばめを介して座位1510内に固定することが可能である。背面プレート125の流入ポート1515と流出ポート1520は、反応封入部材120が座位1510内に適切に設置されると、反応封入部材120上の、それぞれ対応する流入ポート810と流出ポート815に整列する。次に、基板を、標的310が流入ポートと流出ポートの下で適切に整列されるよう、反応封入部材の下に設置することが可能となる。

【0077】

(カートリッジの組み立て)

再び図1と2を参照すると、基板アセンブリ110は、図5と6に関連して前述したように、先ず基板115をカートリッジ基盤130に取付することによって組み立てる。図2はカートリッジ基盤130に取付された基板115を示すが、その際、基板115は、基板115の底面は開口部510越しに下方に向け、基板115の上面(すなわち、生物サンプルが静置される面)は上に向けて、開口部510の上に設置される。

【0078】

次に、反応封入部材120が、流入ポート810、流出ポート815、および、フローチャネル820が、前述のように基板115の標的部位と整列されるように、基板115の上面に設置される。反応封入部材1215を使用する場合は、その反応封入部材を、基板の上に、各ウェル1217が、基板115の少なくとも1個の対応する標的部位の上に配されるように設置する。前述のように、反応封入部材120は、接着剤を用いて基板115の上に設置されてもよい。

【0079】

別の実施態様では、反応封入部材120は、図16に示すやり方で反応封入部材120を背面プレートの座位1510に挿入することによって、先ず反応封入部材背面プレート125に結合される。一旦反応封入部材120が背面プレート125に結合されたならば、次に、図2に示すように、背面プレート125を、その背面プレートの嵌合部材1530をカートリッジカバー135の対応するスロットに挿入することによって、カートリッジカバー135に装着することが可能である。一つの実施態様では、背面プレート125とカートリッジカバー135の間の嵌合配置により、背面プレート125は、カートリッジカバー135に固定される。

10

20

30

40

50

ジカバー 135 に対してある程度の動きを持つことが可能となり、そのために、パックプレート 125 は、カートリッジカバー 135 に対して「浮く」ことになる。背面プレート 125 は、カートリッジカバー 135 に対して、3 軸に沿って少なくとも約 2 ミリメートルの範囲の動きを持つことが可能である。これによって、後述するように、背面プレート 125 / 封入部材 120 および基板 115 間の適切な位置合わせが促進される。背面プレート 125 はまた、カートリッジカバー 135 に対してある程度の回転運動を持つようになっていてもよい。

【0080】

背面プレート 125 と反応封入部材 120 がカートリッジカバー 135 に装着された後、カートリッジカバー 135 はカートリッジ基盤 130 に固定される。前述のように、カートリッジ基盤 130 は整列ピン 530 を含む。このピンは、カートリッジカバー・基盤間の適正な整列と位置合わせばかりでなく、反応封入部材 120 と基板 115 の適切な整列と位置合わせを促進するために、カートリッジカバー 135 の対応する整列穴 725 と嵌合する。整列ピン 530 は、背面プレート 125 の対応する整列穴と嵌合する特別整列ピン 530a (図 2 に示す) を含む。カートリッジカバー 135 が下降し、カートリッジ基盤 130 と嵌合するにつれて、整列ピン 530a は、背面プレート 125 の穴に滑り込んで嵌合する。前述のように、背面プレート 125 は、カートリッジカバー 135 およびカートリッジ基盤 130 に対して移動が可能であり、そのために、カートリッジカバー 135 がカートリッジ基盤 130 と嵌合した際に、背面プレート 125 (および付属の反応封入部材 120) を動かして、基板 115 に対して適正な位置合わせ位置に置くことが可能となる。基板 115 はまた、プレスばめ方式によって背面プレート 125 と嵌合し、それによって適正な整列を確保することも可能である。この場合も、背面プレート 125 は、カートリッジカバー 135 が基盤 130 と結合した場合に、基板と適正な整列を実現する位置に移動する。

【0081】

図 17 は、組み立てられた基板アセンブリ 110 の断面模式図である。基板アセンブリ 110 の成分の構造的詳細のいくつかは省略した。また、各種成分の相対的大きさは、図 17 の簡明と描画の簡便のために誇張されている。基板 115 はカートリッジ基盤 130 に取付され、その際、反応封入部材 120 は基板 115 の上に配され、カートリッジカバー 135 によって所定の位置に確保される (図 17 では、反応封入部材背面プレート 125 は、その使用は可能であるけれども、示されていない)。反応封入部材 120 のフローチャネル 820 は一列の標的部位 310 の上に配される。標的部位は、図 17 では、フローチャネル 820 内の四角で表される。従って、フローチャネル 820 は、この一列の標的部位 310 を囲み、かつ、流入ポート 810 を通じて入口を、流出ポート 815 を通じて出口を持つ細長いチャンバーを形成する。流体は、図 17 の矢印で示されるように、流入ポート 810 を通じて注入し、流出ポート 815 を通じてフローチャネル 820 から流出させることによってフローチャネル 820 の中を流通され得る。

【0082】

図 18 は、図 12A・12B に示した反応封入部材 1215 の実施態様を使用して組み立てられた基板アセンブリ 110 の断面模式図である。反応封入部材 1215 は多数のウェル 1217 を含み、これらのウェルはそれぞれ対応する標的部位に整列する。各ウェル 1217 は、対応する標的部位 310 を含むチャンバーを形成する。

【0083】

(基板アセンブリによるサンプルの処理)

基板アセンブリ 110 は、基板 115 の標的部位に生物サンプルを静置したり、また、標的部位を試薬のような各種物質に浸し、それによって、基板の上に形成されるチャンバー内でそれら物質を用いる化学反応を実行するのに使用が可能である。これは、図 19 に示す装置 1910 のような基板処理システムの上に基板アセンブリ 110 を設置することによって達成が可能である。装置 1910 は、ワークステーションを形成する、実質的に水平な平面 1915 を定めるテーブルのような構造を含む。この平面には、基板 115 を

10

20

30

40

50

含む基板アセンブリ 110 を載置することが可能である、ワークステーションが形成される。基板アセンブリ 110 は、表面 1915 上で、基板アセンブリ 110 の上面または天辺が上を向くように、それによって、流入ポート 810 および流出ポート 815 も上を向くように、または、ウェル 1217 の開口部が上を向くように設置することが可能である。

【 0 0 8 4 】

装置 1910 はまた、ナノ分注器 1920 やマイクロ分注器 1922 のような 1 個以上の可動性分注器を含む。分注器は、反応封入部材 120 の流入ポート 810、または、ウェル 1217 の中に、周知のやり方で挿入が可能な 1 個以上の投薬ノズルを含む。一つの実施態様では、ナノ分注器 1920 は、約 1 ナノリットルという最低容量下限まで流体を投入することが可能であり、また、マイクロ分注器は、約 0.5 マイクリリットル μ L という最低容量下限まで流体を投入することが可能である。ただし、投入容量は変更が可能であることを理解しなければならない。

【 0 0 8 5 】

分注器 1920、1922 は、支持構造 1930 に移動可能に取り付けられる単一の投薬ヘッド 1925 に装着される。支持構造は表面 1915 から上方に延び、投薬ヘッド 1925 を表面 1915 の上に宙吊りする。別態様として、分注器 1920、1922 は、別々の投薬ヘッドに装着することも可能である。支持構造 1930 は、テーブル 1902 に可動的に装着され、それによって、支持構造を、基板アセンブリ 110 に関して第 1 水平軸 1935 によって定められる方向にそって移動可能となるようにしてよい。投薬ヘッド 1925 は、支持構造 1930 の上に可動的に装着され、それによって、投薬ヘッドを、基質アセンブリに対して、垂直に延びる第 2 軸 1936 によって定められる方向に沿って移動可能となるようにしてよい。投薬ヘッド 1925 はまた、基質アセンブリに対して第 3 軸にそって移動可能とし、それによって、分注器 1920、1922 が、基板アセンブリ 110 に対して、異なる三つの軸にそって移動可能となるようにしてよい。従って、分注器 1920、1922 は、表面 1915 のワークステーションに設置された場合、移動して、基板アセンブリ 110 の流入 / 流出ポートまたはウェルと嵌合することが可能となる。分注器 1920、1922 はまた、作業表面 1915 上の様々な部位に移動して、作業表面 1915 のその他の品目と交渉することも可能である。一つの実施態様では、投薬ヘッド 1925 と支持構造 1930 の移動は、周知の方法で、ロボット的に、かつ、遠隔的に制御することが可能である。

【 0 0 8 6 】

表面 1915 は、基板アセンブリ 110 に加えて他の品目を支持するスペースを提供できるほどに十分に大きい。例えば、表面 1915 は、流体、例えば、試薬やその他の物質を含むための複数のウェルを含む微小定量プレート 1937 を置くのに十分なスペースを持つことも可能である。分注器 1920、1922 は、分注器の先端が、微小定量プレート 1937 のウェルの中に進入し、ウェルから物質を吸引できるような位置に移動することが可能である。次に、分注器 1920、1922 は嵌合位置に移動し、そこで、分注器の先端を基板アセンブリ 110 のウェルまたは流入ポートに挿入し、試料をそのウェルまたはポートに注入することも可能である。表面 1915 または、装置 1910 の別のどちらかの部分が、例えば、分注器 1920、1922 を水洗するための水のような追加の材料を含む、他のウェルまたは容器を含むことも可能である。

【 0 0 8 7 】

装置 1910 はまたサーマルサイクラーを含んでもよい。このサーマルサイクラーは、表面 1915 のワークステーションに設置される基板アセンブリ 110 に配される基板の温度を周期変化させるのに使用が可能である。このサーマルサイクラーのある特定の実施態様をさらに下記に説明する。

【 0 0 8 8 】

好都合なことに、PCR および他の化学過程を含む様々な過程が、装置 1910 を用い、基板の標的部位に含まれる生物材料に対して、基板を装置 1910 のワークステーション

10

20

30

40

50

ンから移動させることなく、実行が可能である。試薬のような物質を、分注器から投与して流入ポート 810 に流し込み、物質が流入ポート 810 の対応標的部位の上を流れるようにもよい。フローチャネル 820 を有する反応封入部材 120 を使用する場合は、図 17 に示すように、单一流入ポート 810 を用いて、試薬を、全体列の標的部位の上に流すことが可能である。別様として、反応封入部材 1215 を用いてもよいし、また、複数の標的部位について、各標的部位専用の流入ポート 810 を用いて、個別に曝露させてもよい。

【0089】

ある状況では、フローチャネルの流入および / または流出ポートを密閉することが必要となることがある。ポートの密閉は様々なやり方で実行が可能である。一つの実施態様では、図 20 に示すように、各流入ポートおよび / または流出ポートを、ポートの中に、そのポートに対する栓として挿入される密閉ピン 2010 によって密閉する。密閉ピン 2010 は、下端が開放されていて、それを通じて、密閉ピン 2010 がポートに挿入される際に、余分な空気の漏出が可能とされる内部軸 2015 を含むことも可能である。密閉の際、密閉ピン 2010 はポートに向かって押し下げられ、それによって、ピン 2010 は、過度のサイズによる押し込み適合によって、または、ステップ 1010 (図 9B に示す) を押し下すことによってポートを塞ぎ、ポートを底部において閉鎖する。反応封入部材の微小定量基板実施態様におけるウェルを密閉するには、一組の固相密閉ピンの使用も可能である。

【0090】

図 21 は、ポートを密閉する別の方法を示す。この場合、水平力 2110 が、反応封入部材 120 の両側面に印加されて、流入ポート 810 および / または流出ポート 815 を捻って閉鎖する。この密閉法を用いた場合、反応封入部材 120 は、力 2110 の印加によってウェルの捻転閉鎖を可能とするほど十分に柔らかい材料から製造される。

【0091】

図 22 は、反応封入部材 1215 におけるウェル 1217 を密閉するためのさらに別の方法を示す。この方法では、平面 2210 が反応封入部材 120 の上に設置される。この平面はウェルの上部開口部を被い、それによってウェルの開口部を密閉する。一つの実施態様では、この平面はプラスチックであってもよい。このプラスチックは圧縮を避けるために加熱してもよい。

【0092】

(サーマルサイクラー)

図 23 は、基板を、PCR 工程のように、サーマルサイクルにかけることを可能とするサーマルサイクラー 2310 の模式図を示す。このサーマルサイクラーは、下記にさらに詳述するように、図 19 に示す装置 1910 に、例えば、表面 1915 の作業部位に組み込まれる。基板 115 は、このサーマルサイクラー 2310 の支持面に設置される。その際、基板 115 は基板アセンブリ 110 の内部に配される。ただし、図 23 は、カートリッジ基盤 130、カートリッジカバー 135 および反応封入部材 120 を示していない。サーマルサイクラー 2310 は、基板 115 を加熱するのに用いられる、1 個以上の加熱接点 2315 を含み、かつ、基板を冷却するのに使用される冷却システム 2320、および、基板 115 の温度を測定するのに用いられる温度プローブ 2330 も含むことが可能である。制御器 2333 は、サーマルサイクラー 2310 を制御するのに使用される。

【0093】

加熱接点 2315 は、例えば、金属の細長いロッドのような伝導性ロッドを含んでもよい。加熱接点 2315 の一部、例えば、加熱接点 2315 の上端は、基板の抵抗性コーティング 410 に接触する。加熱接点 2315 を通じてこの抵抗性コーティングに電流を印加すると、これは抵抗性コーティングを発熱させるので、基板 115 と抵抗性コーティング 410 の間の熱的接続を通じて基板 115 も加熱される。加熱接点 2315 は、抵抗性コーティング 410 全体に渡って均一な電流シートを形成する。加熱接点 2315 と抵抗

10

20

30

40

50

性コーティングの間の接触面積が大きければ大きいほど、抵抗性コーティング410の上により均一な熱の分布が得られることが従来から判明している。しかしながら、こうするとそれはまた、基板と電気接点の間により高い熱流を生じる結果を招き、それは、接触点が基板115の温度に影響を及ぼす可能性があるということで望ましいことではない。従って、一般に、加熱接点2315と基板115の間の接触面積量と、加熱接点2315と基板115の間の熱流量との間にはバランス点が存在する。

【0094】

図24に示す加熱接点2315の一つの実施態様では、各加熱接点は、スプリング2420に上に取り付けられたポゴピン2410を含む。基板115とポゴピン2410の相対的大きさは、図24では図示の簡明のために誇張されている。スプリング2420は、基板115がポゴピン2410の先端に設置されると、ポゴピン2410に対して負荷を与えるので、ピン2410の上端は基板115の底面の抵抗性コーティング410を圧迫する。スプリング2420とポゴピン2410から構成される加熱接点2315は、図9に示すように、装置1910の平面1915上に設置されてもよい。

【0095】

一つの実施態様では、二つの加熱接点2315が、基板の対向縁に沿って設置され、基板115の長さに沿って約1/3間隔で隔てられる。加熱接点2315についてはその他の間隔・設定配置の使用も可能であることを理解しなければならない。加熱接点2315は、基板115の接触面積を最小にするが、それでも加熱接点2315と基板115間の接続は確保するために、一般に球形の先端を持つ。前述のように、接触面積を最小にすることは、ピンと基板115の間の熱流を最小にすることとなり、ピンは基板115の温度にはほとんどまたは全く影響を及ぼさない。

【0096】

図23に示すように、温度プローブ2330は基板115と接触して基板の温度を測定する。温度プローブ2330は、一般に、プローブ先端と基板との間の熱伝導をきわめて低いものとするような形態を取る。このため、プローブ2330は基板115の温度に影響を与えない。この点で、温度プローブ2330は一般に熱質量は低い。図25Aは、温度感知要素としてサーミスタを含む温度プローブ2330の第一実施態様を示す。サーミスタは、基板115に接触する平面を持つ、小さな金属製接触要素2510に埋め込まれる。接触要素は、金属（例えば、アルミニウムまたは黄銅）から作られる。接触要素2510は、針2515によって、針を軸として回転し、それによって、接触要素2510の平面と基板115の間の接触を維持可能とするように保持される。接触要素2510は、埋め込まれたサーミスタを介して基板115の温度を測定し、その温度を示す信号を、針2515に付属する、または、埋め込まれるワイヤを通じて周知の様式で伝送する。温度読み取り器2530は、この温度を周知の様式で監視し、記録する。

【0097】

図25Bに示す温度プローブの別の実施態様では、針2515の先端は、接触要素2510内の球形空洞中に収められたボール2540に付着する。このボールは、球形空洞と、接触要素2510を回転可能に維持し、それによって基板115との接触を維持可能とするやり方で相互作用を持つ。さらに別の実施態様では、基板115の温度は基板上に一体化された温度センサーを用いて測定される。前述したように、サーマルサイクル時には、環境が基板115に及ぼす熱寄与を最小にすることが望ましい。この点で、温度プローブ2330のある部分は、接触の結果として、プローブが、基板115に対して熱を伝播する、または、基板から熱を引き込む可能性を低下させる温度に加熱してもよい。例えば、針2515は、針2515と基板の間の熱交換を最小にするように加熱し、それによって、針2515が、基板115の温度に対してほとんどまたは全く影響を持たないようにすることも可能である。針2515は、針2515と基板間に熱交換の生じないよう基板と同じ温度に加熱することも可能である。このようにすると、接触要素の温度は基板115の温度を正確に反映することになる。

【0098】

10

20

30

40

50

再び図19を参照すると、温度プローブ2330は、一般に、装置1910の平面1915の上に、例えば、表面1915から上方に延びる、いくつかのタイプの支持構造を用いて取り付けられる。支持構造は、基板アセンブリ110の上位位置に温度プローブ2330を支持し、プローブが基板115の温度を測定することが可能である。

【0099】

再び図23を参照すると、冷却システム2320は、所望の温度サイクルによって要求された場合に基板を冷却するように機能する。冷却システム2320は、基板115から熱を取り去る。一つの実施態様では、冷却システム2320は、冷却のために基板上に空気を吹き付けるファンを含む。ファンは加熱中は切ることも可能である。別態様として、ファンは常にオンのまま放置して、ヒーター電力を調節して加熱を変えてよい。基板115を冷却するには他にも方法がある。例えば、(1)流体、例えば、水またはアルコールの霧を、基板底面に吹き付けること、(2)冷塊を基板に接触させて基板から熱を吸収すること、(3)ノズル(ファンではなく)を用いて圧縮空気を基板上に吹き付けること、(4)圧縮空気渦巻きクーラーの使用、が挙げられる。冷却システム2320は、装置1910の、例えば、表面1915の下に取り付け、基板アセンブリ110には、表面1915の穴を通じて接触することも可能である。

【0100】

サーマルサイクラー2310の各種成分は、基板の上面または底面への接触を要求することがある。例えば、温度プローブ2330、加熱接点2315、および、冷却システム2320は、基板の表面との接触を要求する成分を持つことがある。好都合なことに、基板アセンブリ110は、基板115がカートリッジに取り付けられた場合でも基板表面への接触を用意する。カートリッジ基盤130は開放口510(図5に示す)を持つが、これによって、基板をカートリッジに取り付けた場合、基板115の底面に対する接触が可能となる。同様に、カートリッジカバー135は開放口710(図2に示す)を持つが、これによって基板115の上面への接触が実現される。開放口510および710によって、基板115がカートリッジ内に包み込まれた場合でも、複数の電気接点、複数の温度プローブ、および、冷却システムに対し基板表面の接触は実現される。

【0101】

図26は、サーマルサイクラー2310の各種成分の斜視図を示す。ワークステーション2610は、基板アセンブリ110の取付可能な平面を含む。ワークステーションは、装置1910(図19に示す)の表面1915に、サーマルサイクラー2310のワークステーション2610も、装置1910のワークステーションとなるようなやり方で組み込まれる。ワークステーション2610の平面は、装置1910の表面1915と一体的に形成されてもよいし、または、別の平面であってもよい。基板アセンブリ110は装置1910の平面1915の上に設置されるが、基板アセンブリ110が静止位置を維持している間、マイクロおよびナノ分注器1920、1922を通じて物質投与を可能にしながら、サーマルサイクルの実行を可能とするやり方で設置される。作業領域2610は、基板アセンブリ110と接触できるように、作業領域上に上向きに配された複数の接点2315を含む。図26に示す冷却システム2320は、空気を、上方、基板アセンブリ110の基板に向かって吹き付けるファン2335を含む。前述のように、冷却システム2320は、装置1910の中に取り付けることも可能である。

【0102】

前述したように、サーマルサイクラー2310は、基板115の面を横切る均等な熱分布を実現する。図27は電気接点界面の模式図を示す。この中間体は、各接点2315を通じて電流を「整形」する能力を持ち、基板115の全面を横切る均等な熱パターンを実現する。第1組の接点2315aは基板115の一端に沿って配置され、第2組の接点2315bは基板115の対向端に沿って配置される。抵抗器Rが、接点2315a, 2315bの少なくとも一つと直列に設置され、また、一つの実施態様では、接点2315a、2315bの全てと直列に設置される。電流センサー2710も、趣致の様式で各接点2315と、各接点2315に対する電流を感知・監視するために、直列に設置される。

電流センサー 2710 を用いて、電流調節のために、測定した電流を制御器にフィードバックすることも可能である。

【0103】

次に、電流を第1組接点 2315a に与え、基板 115 の第1辺縁から、抵抗性コーティングを通じて、対向辺縁の第2組接点 2315b に向けて電流を流す。当業者であれば、第1組接点 2315a における正味電流は、第2組接点 2315b における正味電流と等しいことが了解される。一定電圧を維持しながら、抵抗器 R の内の1個以上の値を他の抵抗器 R に対して変え、それによって、電気接点 2315a, 2315b を流れる電流を個別に調節することも可能である。例えば、抵抗器 R1 は、抵抗器 R10 に対して、二つの間では同じ電圧を維持しながら、より高い抵抗を持っててもよい。これによって、抵抗器 R1 に付着する接点 2315 に対する電流はより低くなる。従って、複数の接点 2315 を通じて流れる相対的電流は、一方の接点に対する他方の接点の抵抗レベルを調節することによって調節することが可能である。すなわち、各接点 2315 を流れる電流は、他の接点に対して増減させることができあり、そのために、基板 115 表面を横切る温度プロフィールを調節することも可能である。温度プロフィールはまた、基板 115 の抵抗性熱コーティングをパターン化することによって調節することも可能であるけれども、図 27 に示したセットアップを、抵抗性コーティングをパターン化することに関連する困難や出費を避けるために使用することも可能である。図 27 は、基板 115 の対向辺縁に沿って設置される 5 個の接点 2315 を示す。しかしながら、接点 2315 の量・位置は、他の加熱プロフィールを実現するよう変更することも可能であることが理解される。

【0104】

基板アセンブリ 110 と処理装置 1910 は、生物材料のサンプルを基板 115 に静置し、その材料に対して多種多様な処理・分析を実行するのに使用が可能である。例えば、基板アセンブリは、標的部位に含まれる生物サンプルに対して、一ヌクレオチド多型 (SNP) 検出処理、または、多種多様な生化学的処理の内のいずれかを実行するのに使用が可能である。このような過程の内の第一工程では、生物材料、例えば、捕捉オリゴの 1 個以上のサンプルが周知の様式で採取され、次に、基板 115 に静置されて複数の標的部位を形成する。次に、基板 115 はカートリッジに取付されて基板アセンブリを形成する。

【0105】

次に、この標的部位は、反応封入部材 120 によって基板 115 の上に形成されるチャンバーに物質を投入することによって、様々な物質の内のどれかに曝露することが可能である。好都合なことに、図 19 に示す装置 1910 は、物質をチャンバーに投与するのに使用が可能である。反応封入部材 120 を使用する場合は、分注器 1920 または 1922 が、図 28 に示すように、試薬のような物質を流入ポート 810 に注入する。試薬は、図 28 の矢印の示すように、流入ポート 810 を流下して、フローチャネル 820 によって形成されるチャンバーを流れる。このようにして、試薬は、このチャネル内に配置される標的部位の全てに曝露される。試薬は、出口ウェル 815 を通じてチャネル 820 から流出する。別態様として、各標的部位を、反応封入部材 1215 を用いて、個別に物質に曝露することも可能である。この場合、分注器は、図 29 に示すように、反応チャンバーの各ウェル 1217 に対して 1 個の投薬ピンを備えた、一連の投薬ピンアレイを含むことになる。標的部位に対し、流入ポート・流出ポートを用いて、試薬以外の物質を曝露させることも可能であることを理解しなければならない。

【0106】

チャンバー内に含まれる物質のサーマルサイクル処理は、基板 115 をカートリッジから取り外すことなく、かつ、基板を装置 1910 の同じ位置に静置したままで、図 23 に示す温度サイクル装置 2310 を用いて実行が可能である。電流を基板 115 に与えて、所望の温度サイクルに従って基板 115 を加熱する。基板 115 は、サーマルサイクラーの冷却システム 2320 を用いて冷却する。次に、基板 115 は、カートリッジ基盤 130 からカートリッジカバー 135 を取り外すことによって、カートリッジから外すことが可能である。次に、基板 115 を当業者には公知の適当な装置に移動することによって、

10

20

30

40

50

基板 115 に M A L D I - M S を実施してもよい。

【 0107 】

(D . 反応実行法および反応分析法)

本明細書では、基板表面において、生物分子を含む 1 種以上の反応を実行し、かつ、得られた 1 つ以上の反応生成物を分析するというその両方のための方法が提供される。本発明の特定の実施形態では、少なくとも 2 種以上の反応が実行される。別の実施形態では、少なくとも 3 種以上の反応が実行される。一つの実施形態では、たった一つの反応が実施される場合、その反応は、ハイブリダイゼーション反応ではない。ある特定の実施形態では、反応（単数または複数）は実質的に溶液中で実行される。実質的に溶液中で実行される反応とは、大多数の反応物質間の相互作用が溶液の中で行われ、大多数の反応物質および任意の中間体が、溶液中に存在する反応である。ある特定の実施形態では、反応生成物（単数または複数）は基板の表面に捕捉される。

【 0108 】

上記方法のうちの一つの実施形態では、反応（単数または複数）および少なくとも検出プロセスの開始は、それぞれ、同じ單一の標的検出位置の存在下で実行される。上記方法のうちの別の実施形態では、反応（単数または複数）および少なくとも検出プロセスの開始は、それぞれ、同じ 2 個以上の標的検出位置の存在下で実行される。ある特定の実施例では、標的生物分子（例えば、核酸）は、基板上の、標的捕捉部分を付着させた不連続部位（標的検出位置と呼ばれる）に適用される。この標的検出位置の存在下で、標的分子を含む 1 種以上の反応が実行され、得られた生成物は固相によって固定化される。標的検出位置にて反応生成物（単数または複数）を捕捉したならば、反応生成物（単数または複数）の分析または検出が、その標的検出位置で進行する。例えば、M A L D I 質量分析によって分析する場合、捕捉された反応生成物は、マトリックス物質に接触させて M A L D I - M S をやり易いようにされ得、そしてレーザーに暴露されて、標的検出位置における反応生成物（単数または複数）のイオン化を開始される。この標的検出位置は、一つのチャンバーまたはチャネルの中に含まれてもよい。

【 0109 】

本明細書において提供される方法の特定の利点は、捕捉した標的生物分子を、捕捉前溶液相反応が実行されたのと同じ位置で検出することである。従って、捕捉前溶液相反応の位置と、標的検出位置とは同じである。この特定の特徴は、コストおよび時間を低減し、高処理能形式でその反応を自動的に実行しようとした場合必要とされる装置の量および複雑性を低減する。この特徴は、その内部において液相反応が生じる 1 個以上の反応チャンバーまたはチャネルを形成する反応封入部材を、標的検出位置における標的捕捉工程の終了後に、基板から除去することによって実現される。従って、本明細書で提供される方法では、液相反応生成物を、標的生物分子の捕捉前に、その中に捕捉部分を備える新たな標的検出位置および / または新たな溶液へと物理的に移送することが要求されない。例えば、基板がチップである場合、このチップは、溶液相反応期間中、少なくとも反応生成物（単数または複数）が捕捉されるまで、好都合にも静止を持続することが可能である。一旦反応生成物（単数または複数）が捕捉されたならば、チップは、取り出され得、そして / または、M A L D I - T O F 質量分析のような検出分析のために調製することが可能である。

【 0110 】

この方法は、生物分子の正体、構造的特性および / または機能的特性に関する情報、または、あるサンプル中における特定の生物分子の存在または不在に関する情報を得るために生物分子の分析が実行される、様々な用途で使用が可能である。そのような用途としては、生物科学、生物医学および製薬科学における、重要な診断法、スクリーニング法、発見および検出法が挙げられる。例えば、ある核酸レベルまたはタンパク質レベルにおける特定の多型または変異の正確な決定は、遺伝子障害の診断に用いられることがよくある。レセプターまたは他の細胞成分、および / または、その機能的結果に対する分子（例えば、ペプチドまたは有機低分子）の結合の正確な検出は、疾患処置用治療剤をスクリーニン

10

20

30

40

50

グする方法において、しばしば用いられる。病原因子（例えば、細菌およびウイルス）の特徴的要素の検出は、しばしば感染症の診断に用いられる。生体高分子（例えば、核酸およびタンパク質）の配列の決定、または、多型ヌクレオチドの正体の決定は、診断法、遺伝子型決定法、および、多型性同定法においてよく用いられる。

【0111】

本明細書で提供される、生体分子を含む反応を実行および分析するための方法の特定の実施形態では、反応（単数または複数）は、実質的に溶液中で実行される。溶液相反応は、反応が固相支持体の上で実行される場合に課される不利、制限および限界を免れる。例えば、溶液相反応は3次元で起こるが、一方、固相支持体上での反応は2次元に制限され、立体阻害、十分な攪拌の不足、または、反応物質の吸着によって、重大な影響を被り得る。さらに、ある種の反応（例えば、特定の分子形状の認識、立体配置の認識、または、活性部位の認識を必要とする反応）は、固相支持体の上で実行すると抑制され得る。なぜなら、表面の上に固定化された分子は、溶液相にある時とは異なる形態または立体配置を有し得るからである。これらの制限は、特に、本明細書で用いられる反応にとって不可欠であり、かつ、分析の標的生体分子であり得る、酵素およびタンパク質のような高度に機能的な高分子に対して大きな影響を及ぼす。

【0112】

本明細書に提供される、生体分子を含む反応を実行および分析するための特定の方法では、反応の生成物は、基板（例えば、反応が実行されるチャンバー中にあり得る基板）上に捕捉される。これによって、その生成物は、定められた位置（例えば、標的検出位置）に、分析または検出のために保持される。典型的には、反応生成物（単数または複数）はチャンバーの内側底部で捕捉され、この底部は、例えば、基板であり、この基板は、反応生成物を、他の分子をチャンバーから除去するかまたは洗浄するのに用いられるプロセスの間、基板に付着させることによってその反応生成物を保持する様式で反応生成物（単数または複数）と特異的相互作用可能である。これらの方法で分析される生成物が捕捉されることとは、いくつかの利点を提供する。例えば、基板（例えば、チャンバー中）の生体分子に対して実行される反応は、溶液中で実行が可能であり、反応生成物の反応後処理および分析前調製は全て、反応が、固相支持体に固定化された生体分子に関して実行される場合に課され得る制限を伴うことなく、実行が可能である。さらに、分析される反応生成物を捕捉することは、分析前の生成物の単離および精製をやり易くすることにより、分析をあいまいにし得る試薬、化学物質、ならびに、他の分子および汚染物質を低減または除去する。さらに、捕捉された反応生成物（単数または複数）は、基板の特定領域に配置され、この領域は、別の領域に固定化された他の反応生成物を付着させてもよい。従って、多数の異なる反応を、別々のチャンバーまたは单一のチャンバー内で実行するが、基板における反応生成物の別個の位置にあることを利用して個別に分析し得る。

【0113】

本明細書に提供される方法は、基板表面で（例えば、單一チャンバー内で）、僅かな容量で実行することによって、試薬の量、試薬および生成物の移送、ならびに生体分子の実行および分析に必要とされる処理時間が低減され得る。この方法は小型化にきわめて好適である。この方法は、多数反応の平行処理用のマルチチャンバー方式で実行され得、そしてまた、多数の異なる生体分子を、單一チャンバー内において反応および分析するよう実行することも可能である。従って、本明細書に提供される方法は、多数の異なる生体分子の、高速、高感度、および、正確な分析（例えば、高処理能力スクリーニングプロセスにおいてなされ得るような分析）に対して特に好適である。本明細書において特定の実施形態において記載されるように、2種以上の個別の別個の反応が、基板（例えば、チップ）の上の、2個以上のそれぞれの不連続な位置で並列して起こる。基板の反応封入部材内部で反応（単数または複数）を実行するのに用いられる反応チャンバーまたはチャネルの総数は、基板の大きさ、および／または反応封入部材成形上の制限に応じて、所望される程度に多さであり得る。一つの実施形態では、單一反応封入部材の中に、最大5,000個以上の反応チャンバーが、本明細書における使用について企図される。例えば、反応封

入部材における反応チャンバーまたはチャネルの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、最大5000以上の範囲であり得る。

【0114】

同様に、基板上、および／または、特定の反応チャンバーまたはチャネル内の標的検出位置の総数は、所望される化学反応を実行するのに十分なサンプルサイズが存在することが保証される限り、望むだけ多くの別個のサンプル検出位置であり得る。一つの実施形態では、反応封入部材内部の各単一反応チャンバーは、一つの基板の上に、最大5,000個以上の別個の標的検出部位を含み得る。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、96、100、200、300、384、400、500、600、700、800、900、1000、1500、1536、2000、3000、4000、最大5000以上の、不連続な標的検出位置が、一つの基板上の、1個以上の反応チャンバーまたはチャネルの中に限定され得る。

【0115】

本明細書の一つの実施形態において記述するように、上記反応は、捕捉生体分子を載せた基板表面の存在下で、溶液中で行われる。一つの実施形態では、その反応（例えば、PCRおよび／またはプライマー伸長）は、捕捉生体分子を載せた基板表面において行われ、その基板表面はまた、反応封入部材のチャンバーまたはチャネルによって囲まれ、そのために、上記プロセスを通じて、反応は、単一標的検出位置に限定される（図12Aおよび13）。例えば、8個の標的検出位置12列を持つ96標的位置チップを利用する一つの実施形態では、96種の不連続溶液相反応混合物が、例えば、並列して用いられ、この結果、溶液中の各反応混合物は、その上に捕捉生体分子を載せた対応する96個の不連続標的部位を持つ基板表面により限定される（図12Aおよび図13参照）。チャンバーの周囲の壁は、例えば、チャネル、チャンバーを形成するかまたはマイクロタイタープレートのウェルを模倣するために、円形、正方形、長方形等どのような形であってもよい。

【0116】

別の実施形態では、上記一種以上の反応は、反応封入部材のチャンバーまたはチャネルによって囲まれる、捕捉生体分子を載せた基板表面で起こり、この反応封入部材は、反応を、上記プロセスを通じて2個以上の標的検出位置に限定する。ある特定の実施形態では、反応（単数または複数）は、基板表面（チップ）全体に含まれる全標的検出位置のうちのサブセットのみに限定される。例えば、8個の標的検出位置12列を持つ96標的検出位置チップを用いる実施形態では、12種の不連続溶液相反応混合物が、並列して使用され、これにより、溶液中の各反応混合物は、その上に捕捉生体分子を載せた8個の不連続な標的検出位置を持つ基板表面により限定される（図12B参照）。この実施形態では、上記12種の不連続溶液相反応混合物は、反応封入部材において、各反応混合液を分け隔てるチャネルによって限定される。他の実施形態では、一つの反応封入部材の中に収められた20個の反応チャンバーまたはチャネルが、各反応チャネルまたはチャンバー内に10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上の不連続検出位置を有する基板の上に重ねることが、企図される。

【0117】

（サーマルサイクル処理）

本明細書で提供される方法および装置を使用する利点のうちの一つは、高速サーマルサイクル処理能である。従来利用可能なサーマルサイクラーは、標準的マイクロタイタープレートを加熱するための大きな熱ブロックを含む。これら従来のシステムでは、ブロックの大きな熱質量のために、熱上昇（thermal ramping）（例えば、ブロックまたはシステムの加熱速度）は、約1～2／秒である。さらに、試薬容量が比較的大きい（例えば、5～25μl）ために、流体の温度上昇ならびに冷却速度は、さらに低減

させられる。コンピュータシミュレーションでも示されているこれらの従来のシステムに関する別の不利は、金属ヒーターそのものの温度分布は均一であるが、およそ数の不均一なサンプル温度分布が存在することである。これらの不利点は、マイクロタイタープレートそのものの許容度と関連する技術的困難と折り合いを付けられる。例えば、製造業者によるマイクロタイタープレート設計の変動に起因して、熱プロックに対するマイクロタイターウェルの堅固な直接接触は、必ずしも常には実現されない。標準的マイクロタイタープレートの使用時に、空気ギャップが、ウェルと熱プロック壁との間に存在し、これがさらに、不均一な加熱および温度分布を招く。さらに、加熱速度は、さらに多くの電力を用いることによって増大され得るが、冷却は、しばしば、ヒータープロックの高い熱質量に起因して、より困難である。

10

【0118】

本明細書に提供される方法および装置は、有利なことに、大きな熱質量の使用、およびサンプル容量を加熱するための二次プラットフォームの使用を避ける。さらに、サーマルサイクル処理のために熱プロックの中に安置される容器を用いることをせず、本明細書に提供される方法および装置は、サーマルサイクル処理するのに反応容器（すなわち、基板）そのものを用いる。本明細書に記載する通り、基板（例えばチップ）が、サーマルサイクラーそのものとして振舞う。例えば、一つの実施形態では、個々のウェルは、シリコンギャスケット（すなわち反応封入部材）によって、例えば、標準の96ウェル、384ウェル、または、それ以上の個数のウェルの形式（例えば、図11参照）と適合する形式で形成される。

20

【0119】

本明細書で提供される方法および装置の基板内部においてサーマルサイクル機能を一体化したことは、従来のサーマルサイクラーのヒータープロックに見出される空気ギャップを排除する。本明細書で提供される方法および装置の特定の実施形態では、基板（例えば、シリコンチップ）およびサンプル量は、マイクロタイタープレートにおける従来のサンプル容量よりも数桁小さいので、反応混合物のより速い加熱（例えば熱上昇）および冷却が、実現される。

【0120】

標的生体分子が核酸であり、反応の一つが核酸增幅反応および/またはプライマー伸長反応である、ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、有利なことに、本明細書に記載する通りに調製された、高速サーマルサイクルチップを利用する（例えば、図1～29参照）。この実施形態では、取り外し可能な反応封入部材を含むチップは、高速サーマルサイクル温度変化を経過して增幅反応（単数または複数）を促進する。高速サーマルサイクルは、チップを直接加熱および冷却することによって実現される。冷却および加熱に要求される時間が、サーマルサイクル反応の持続時間に関する主要な寄与因子である。冷却および加熱の速度を増すことによって、本明細書で提供する方法は、好都合にも、このような反応のための総合処理時間を短縮する。

30

【0121】

一つの実施形態では、直接加熱は、チップの背面の抵抗性コーティング（例えば、金属の薄層、図4参照）に調節可能な電流を通すことによって媒介され得る。加熱は、基板（例えばシリコンチップ）の背面に堆積させた金属に対する電気ピン接触を介して実現される。多数の接触が、最適な温度均一性のために基板の様々な点にてなされる。加熱速度（例えば、熱上昇）を上げるには、この金属化された基板に、さらに大きな電力を容易に適用し得る。

40

【0122】

特定の実施形態では、約1～2 /秒を利用する従来のサーマルサイクラーの熱上昇速度に対して、約3 /秒から約100 /秒の範囲の加熱上昇速度が、使用され得る。一つの実施形態では、少なくとも約3 /秒、4 /秒、5 /秒、6 /秒、7 /秒、8 /秒または9 /秒の加熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約10 /秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約15 /秒の熱

50

上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 20 / 秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 25 / 秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 30 / 秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 35 / 秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 40 / 秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 45 / 秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 50 / 秒の熱上昇速度が使用される。別の実施形態では、少なくとも約 60 / 秒、70 / 秒、80 / 秒、90 / 秒、最大 100 / 秒またはそれ以上の熱上昇速度が使用される。従って、本明細書で提供される方法では、加熱速度は、少なくとも約 3 / 秒、4 / 秒、5 / 秒、6 / 秒、7 / 秒、8 / 秒、9 / 秒、10 / 秒、15 / 秒、20 / 秒、25 / 秒、30 / 秒、35 / 秒、40 / 秒、45 / 秒、50 / 秒、60 / 秒、65 / 秒、70 / 秒、75 / 秒、80 / 秒、85 / 秒、90 / 秒、95 / 秒、および、少なくとも約 100 / 秒の加熱速度からなる群より選択され得る。
10

【0123】

本明細書で提供される方法・装置によって達成されるもう一つの利点は、サーマルサイクラーの冷却において実現される冷却速度の上昇である。一つの実施態様では、ナノ基板（例えば、ナノチップ）の冷却は、基板の下面を、冷却ファンを用い、空気の強制対流に暴露することによって実現が可能である。さらに高い冷却速度を実現する他の実施態様では、水使用冷却法をナノ定量基板設計に対して採用することが可能である。この実施態様では、各サイクルの間ににおいて、水ジェット噴霧が、基板（例えば、シリコンチップ）の背面を均等に冷却する。別の実施態様では、定常な冷却温度に維持された冷却ブロックで、增幅反応の冷却相において基板の背面と定期的に可逆的に接触される冷却ブロックの採用が可能である。
20

【0124】

冷却速度は、従来のサーマルサイクラーの 1 ~ 2 / 秒の冷却速度に比べて、本明細書で提供されるサーマルサイクル基板の場合、約 3 / 秒から約 100 / 秒の使用が可能である。一つの実施態様では、少なくとも約 3、4、5、6、7、8、または、9 / 痘の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 10 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 15 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 20 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 25 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 30 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 35 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 40 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 45 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 50 / 秒の冷却速度が使用される。別の実施態様では、少なくとも約 60、70、80、90、最大 100 / 秒またはそれ以上の冷却速度が使用される。従って、本明細書で提供される方法では、冷却速度は、少なくとも約 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、95、および、少なくとも約 100 / 秒の冷却速度からなるグループから選択することが可能である。
30

【0125】

本明細書に提供される方法では、反応封入部材を含めたチップは小さい熱質量を持つが、これによって、微小定量プレートや微小定量チューブを反応容器として利用する従来のサーマルサイクラーと比べて、極めて高い冷却・加熱速度が可能となる。熱勾配率の上昇を冷却速度の上昇と組み合わせたこと、これが、この有利な、サーマルサイクル処理速度の全体的上昇をもたらしたのである。例えば、本明細書で提供される方法を用いた一つの実施態様において、40 ~ 55 回サーマルサイクル P C R 反応は、従来法では典型的には 100 から 150 分が必要とされるのに対して、約 20 分内で実行することが可能である。この P C R 反応速度は、サーマルサイクル当たり約 22 から 30 秒の範囲に相当する。本明細書で示される他の実施態様では、本明細書で示される反応（例えば、プライマー伸
40

長反応、および／または、増幅反応）におけるサーマルサイクル速度は、サイクル当たり約5秒から最大約150秒の範囲にあることが可能である。例えば、一つの実施態様では、プライマー伸長反応または増幅反応の1サイクルは、約150秒、約140秒、130秒、120秒、110秒、100秒、90秒、80秒、70秒、60秒、50秒、40秒、30秒、20秒、15秒、10秒、9秒、8秒、7秒、6秒、約5秒から選ばれる時間内で実行される。

【0126】

従って、ある実施態様では、40 - 55回サーマルサイクル（例えば、40、45、50または55サイクル）反応（例えばプライマー延長または増幅）は、約15分で実行される。別の実施態様では、40 - 55回サーマルサイクル反応は、約10、約9、約8、約7、または、約6分から選ばれる時間内に実行される。別の実施態様では、40 ~ 55サーマルサイクル反応は約5分で実行される。従って、本明細書で使用される時間当たりのサーマルサイクル率は、約20サーマルサイクルから最大約500サーマルサイクル／時（例えば、約0.3 ~ 8.3 P C R サーマルサイクル／分）の範囲になる。少なくとも約9、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上の、1分当たりサーマルサイクル率も本発明では想定が可能である。従って、本明細書で提供される方法は、サーマルサイクル処理、例えば、核酸プライマー伸長反応、および／または、増幅反応（例えば、P C R）を利用する反応を実行するのに必要とされる負担と時間の、目だった低下をもたらす。

【0127】

ナノウェルを横切る、また、一つのウェルから隣のウェルを横切る温度分布の均一化も、本明細書で提供される基板の重要な機能である。C F C R C ソフトウェアと実験結果を使用したコンピュータシミュレーションにより、本明細書で提供されるナノ定量チップシステムは、均一な温度分布の下に同時に96通りのP C R を実行可能であることが示された。例えば、ナノ定量チップ3相熱加温シミュレーションを95（368K）で実行した。チップの半分は、チップの対称性によるように設計した。典型的には、高温での、この場合は95であるが、熱均一性は、低温に比べて難しい。比較として、チップ辺縁近くに位置する2個のナノウェルと、チップ中央近くの別ペアの温度プロットを作成した。その結果、ウェル内には約0.8の温度差が観測され、ウェル間では約0.1の温度差が観測されることが示された。この温度差は、数度の桁の温度差が簡単に観測される標準的微小定量プレートに比べると目覚しい改善である。従って、特定の実施態様では、単一反応チャンバー内の温度差は、（以下）2.0、1.5、1.0、0.5、または、0.3から選ぶことが可能である。このことは、単一反応チャンバーにおいて、温度は、反応混合液内の任意の2点間ににおいて、これらの量だけしか変化しないということを意味する。

【0128】

これら、および、その他の実施態様では、ウェル間の温度差は、1.0、0.5、0.4、0.3、0.2、または、0.1である。このことは、同じ基板（例えば、チップ）上の、二つの別々の反応チャンバー間では、温度は、任意の二つの隣接反応チャンバーにおいて、これらの量を越えては変化しないことを意味する。別の実施態様では、同じ基板上の任意の二つの反応チャンバー間の温度は、これらの量を越えては変化しない。

【0129】

特定の実施態様では、核酸反応生成物は、反応チャンバーまたはチャネル内の不連続な標的検出部位（单数または複数）で捕捉されるので、その存在下に、サーマルサイクル反応（单数または複数）は、その反応生成物を捕捉に先立って別の場所に物理的に移送する必要を生ずることなく実行される。一つの実施態様では、増幅反応（例えば、P C R）に続いて、かつ、捕捉工程の前に、反応チャンバーまたはチャンネル内の増幅された標的核酸にプライマー伸長反応を施す。好都合にも、本明細書で提供される方法は、標的核酸の増幅、増幅生成物のプライマー伸長、および、それに続く、固相捕捉官能基（例えば、捕

10

20

30

40

50

捉オリゴヌクレオチド)による反応生成物(単数または複数)の捕捉が单一の反応チャネルまたはチャネルにおいて実行されるのを可能とする。

【0130】

従って、本明細書で提供されるものは、標的核酸分子のヌクレオチドを特定するための方法であって、同方法は、標的核酸分子の1本鎖部分を、前記標的核酸分子の1本鎖部分のある領域と相補的なオリゴヌクレオチドに対して、溶液中で、不連続な標的検出部位にある捕捉官能基の存在下にハイブリダイズすること、このハイブリダイズした核酸とオリゴヌクレオチドを、同オリゴヌクレオチドの伸長を可能とする条件に暴露すること、この伸長反応の生成物(単数または複数)を、基板表面の不連続標的検出部位に捕捉することを含み、前記捕捉は、反応生成物(単数または複数)と基板表面、または、基板表面に付着する官能基間における非共有相互作用によって実現されることを特徴とする。

【0131】

さらに、本明細書で提供される方法は小型化には特に好適である。反応封入部材の設計、高速サーマルサイクル処理、および、基板そのものを、分析台としてばかりでなく、精製計画の中心部分として使用する方法は、従来の周知のシステムに比べて、10倍以上の著明な容量低下をもたらす選択肢となる。このような容量低下は、好都合なことに、酵素のような高価な成分や試薬負担を下げるという点で負担低下をもたらす。同時に、基板や反応封入部材の周囲に、従来の器具(例えば、液体処理やサーマルサイクル処理用)よりも小型の器具の設置が許されるので、スペース面での負担低下も実現される。典型的には、本明細書に記述される生化学反応は、反応容器として、5~50マイクロリットルの全反応量を持つ、比較的大きな微小定量プレートまたは微量リットル管において実施される。本明細書で提供される方法に要する全反応量は、主に、反応封入部材と基板の設計に依存する。反応封入部材および基板によって形成されるチャネルまたはウェルは、マイクロリットルで表して、約1000、900、800、700、600、500、400、300、250、200、150、100、50、25、20、15、10、5、4、3、2以下、または、約1マイクロリットル以下の容量を持つ、または、ナノリットルで表して、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900以下、または、約1000ナノリットル以下の容量を持つが、ただしそれらに限定されない。典型的に用いられる全反応量は、約4、3、2、1.5、または1マイクロリットル以下、または、約900、800、700、600、500、400、300、200、100、または、50ナノリットル以下である。

【0132】

(1. 生体分子)

興味のある全ての生体分子が、本明細書で提供される方法で反応・分析が可能である。そのような生体分子としては、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、および、他の小型有機分子、および、このような分子の複合体が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。生体分子はいくつかの供給源から入手が可能である。例えば、生体分子は、被験体からのサンプル、例えば、細胞サンプル、組織サンプル、および、血液、唾液、尿、生検試料、および、細胞培養液のような流体サンプルから入手が可能である。

【0133】

(a. ヌクレオチドおよび核酸)

ヌクレオチドおよび核酸は、本明細書に記載される方法、および、当業者に周知の標準法を用いて入手が可能である。このような技術は、例えば、血液、唾液、皮膚、および、生体組織からDNAを単離し、スクリーニング法で使用が可能な核酸を合成するのに用いられる。

【0134】

分析される核酸の一般的供給源は、血液銀行および診断検査所から入手が可能な血液である。血液からのDNAの単離は、例えば、下記のように実施される。各種バッファー・

10

20

30

40

50

洗浄剤を用いた一連の遠心を通じて、白血球ペレットが血液サンプルから単離される。次に、この細胞溶解液からタンパク質を沈殿させ、遠心によって核酸から分離する。この核酸を、等量の100%イソプラノールの添加と遠心によって上清から回収する。核酸合成の方法も従来技術において周知である。

【0135】

(b. アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質)

アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質は、本明細書に記載する方法、および、当業者に周知の標準法を用いて入手が可能である。このような技術は、例えば、タンパク質を、細胞、血液、唾液、皮膚および生体組織から単離し、スクリーニング法で使用が可能なペプチドおよびタンパク質を合成するのに用いられる。

10

【0136】

ペプチド・タンパク質の単離・合成法は従来技術で周知である(Martin, R. 「Protein synthesis: methods and protocols」、Totowa発行、ニュージャージー州、Human Press, c1998)。さらに、ファージディスプレー法によるタンパク質の生成は、ファージディスプレー法同様、従来技術においてよく知られている(Mathews, C. K. ら「Bacteriophage T4」、アメリカ微生物学会発行、Washington, D. C., c1983、Canton, C. ら、「Genomics」、John Wiley & Sons, Inc. 発行、ニューヨーク州、c1999、Park, JHら、「Biomaterials」, 2002, 23, 1797-1808)。

20

【0137】

(c. 有機分子)

有機分子は、周知の供給源から抽出が可能であり、市販の化合物ライブラリーから入手が可能であり、または、化学的組み合わせ法を含む、従来技術で周知の様々な方法を用いて合成が可能である。

【0138】

(d. 炭水化物)

炭水化物は、細胞サンプルおよび組織サンプルのような供給源から単離が可能である。炭水化物はまた、従来技術で周知の様々な方法を用いて合成が可能である(例えば、Hase, W. C. ら、「Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinational Carbohydrate Synthesis and Combinational Carbohydrate Libraries」、1-13、Kadota K. ら、2001, 42, 8661-8664参照)。

30

【0139】

(2. 生体分子の反応)

本明細書で提供される方法において分析される生体分子は、その分析の前に、および/または、分析時に、1種以上の反応を経過する。生体分子は、基板に印加される、例えば、一枚以上の壁、および/または、内部底として基板を持つ、本明細書に記述されるチャンバーに導入され、その基板において反応(单数または複数)が起こり、また、そこから反応生成物が分析される。本法の特定の実施態様では、多数の反応が、例えば、2種以上、または、3種以上の反応が、基板上の单一部位にて、または、単一チャンバーにて実行される。

40

【0140】

導入された生体分子(单数または複数)を巻き込むチャンバー内で実行される反応(单数または複数)は、実質的にまたは完全に溶液内で、かつ、チャンバー内の低容量において実行が可能であり、また、いずれのタイプの化学的、酵素的、または、生化学的反応であってもよい。本明細書で提供される方法の特定の実施態様では、反応の少なくとも一つは、反応混合物の温度の変更を含む。一般に、反応は、導入された生体分子に関する情報、例えば、その本体、構造、機能的特徴、または、モノマー単位の配列(例えば、その生

50

体分子が核酸またはペプチドのような生体高分子の場合)に関する情報を与える生成物を最終的に生成するように設計される。本明細書で提供される方法で実行が可能な反応のタイプの実際例としては下記のものが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

【0141】

(a. 核酸を含む反応)

多様な反応およびその変種が、一般に、核酸分析において実行される。このような反応に共通する原理は、核酸が増幅されて、分析用標的核酸の量を増大させる酵素反応である。その他の反応としては、例えば、プライマー伸長反応、配列決定反応、断片化反応(例えば、特異的エンドヌクレアーゼによる)、核酸のミスマッチヘテロ二重鎖の切断反応、オリゴヌクレオチドの連結反応、および、1本鎖立体構成反応が挙げられる。

10

【0142】

((1) 核酸増幅反応)

いくつかの核酸増幅反応が従来技術で周知であり、本明細書でも記述される。ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)と呼ばれる一般的増幅反応は、従来技術で周知のいずれの方法によっても実行が可能である。例えば、一つのP C Rプライマーでは、細胞のゲノムD N Aは、2本のP C Rプライマーに暴露され、必要な量の増幅D N Aを产生するのに十分なサイクル数増幅を実施される。プライマーは、例えば、約50と350、500、または、1000塩基対も離れて配置される。多重P C R増幅を実行しなければならない場合は、最初に、核酸分子の1分節を越える大領域を、その領域外のプライマーを用いて増幅し、次に、各部位に特異的なプライマーを用いて、サブ領域または分節を増幅することが可能である。多重P C Rの限界をいくつか挙げるならば、標的部位以外に、P C Rプライマー間で、P C Rプライマーと、他のプライマーまたはゲノムD N Aの他の領域の間で部分的に結合が生じ、これが副生成物の生成や、所望のP C R生成物の減収を招くことが挙げられる。従来技術に通常の熟練度を持つ当業者であれば、多重P C Rの設計・限界には精通しているであろう。

20

【0143】

核酸を増幅するその他の方法としては、ミニP C R、リガーゼ鎖反応(L C R)(Wiedmannら、(1994)P C R Methods Appl. Vol. 3, pp. 57-64; Barnay(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88:189-93)、鎖変位増幅(S D A)(Walkerら、(1994)Nucleic Acids Res. 22:2670-77)、R T - P C R(Higuchiら、(1993)Bio/Technology 11:1026-1030)、ローリングサークル増幅、自己触媒法、例えば、Q J レプリカーゼ、T A S、3 S Rを用いるもの、および、その他全ての好適な、当業者に周知の方法が挙げられる。

30

【0144】

別の増幅法としては、自己維持配列複製法(Guatelliら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:1874-1878)、転写増幅システム(Kwohら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardiら(1988)Bio/Technology 6:1197)、または、その他の全ての核酸増幅法で、その後に、当業者には周知で、かつ、本明細書で記述される技法による増幅核酸の検出が挙げられる。これらの検出スキームは、このような分子が非常に低い数で存在する場合、核酸分子の検出のため特に有用である。

40

【0145】

別法として、選択的P C R増幅法に依存する、対立遺伝子特異的増幅技法を用いてよい。特異的増幅用プライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、その分子の中央に興味の対立遺伝子変異を担持しても(従って、増幅は差次のハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989)Nucleic Acids Res. 17:2437-2448)、または、一方のプライマーの3'末端に興味の対立遺伝子変異を担持してもよい。後者の場合、適当な条件下で、ミスマッチが、ポリメラーゼ伸長を阻害する

50

か、低下させる (Prossner (1993) Tibtech 11 : 238 ; Newtonら (1989) Nucl. Acids Res. 17 : 2503)。さらに、変異領域に制限部位を導入し、切断依存性検出法を実現することが好ましい (Gaspariniら (1992) Mol. Cell Probes 6 : 1)。

【 0146 】

((2) プライマー伸長反応)

プライマー伸長反応は、鎖伸長停止因子、例えば、ジデオキシヌクレオチドを伸長反応に組み込むことによって、ポリメラーゼ介在性核酸鎖伸長を特異的に停止させることを含む。いくつかのプライマー伸長依存法が従来技術において公知であり、核酸配列の中の特定ヌクレオチドの同定に従来から使用されている (例えば、PCT出願 PCT / US 96 / 03651 (WO 96 / 29431)、PCT / US 97 / 20444 (WO 98 / 20166)、PCT / US 97 / 20194 (WO 98 / 20019)、PCT / US 91 / 00046 (WO 91 / 13075) 号、および、米国特許第 5,547,835 号、同第 5,605,798 号、同第 5,622,824 号、同第 5,691,141 号、同第 5,872,003 号、同第 5,851,765 号、同第 5,865,092 号、同第 5,900,481 号、同第 6,043,031 号、同第 6,133,436 号、および、同第 6,197,489 号を参照)。一般に、ある特定の核酸分子の中の興味の部位、例えば、多型部位の近くに特異的にハイブリダイズするプライマーが調製される。次に、このプライマーを、1種以上のジデオキシヌクレオチドの存在下に、典型的には、その部位の多型であるヌクレオチドの相補体であるジデオキシヌクレオチドの内の少なくとも一つの存在下に、伸長させる。プライマー伸長および / または伸長したヌクレオチド (単数または複数) の特定はいくつかのやり方で決定が可能である。特定的方法では、伸長は質量分析法によって決定される (例えば、PCT出願 PCT / US 96 / 03651 (WO 96 / 29431)、PCT出願 PCT / US 97 / 20444 (WO 98 / 20166)、PCT出願 PCT / US 97 / 20194 (WO 98 / 20019)、PCT出願 PCT / US 91 / 00046 (WO 91 / 13075)、および、米国特許第 5,605,798、5,622,824、5,856,092 号参照)。

【 0147 】

プライマー伸長反応の一変法では、ジデオキシヌクレオチドとデオキシヌクレオチドの両方が用いられる。例えば、このような反応を、二つの対立遺伝子の内的一方にハイブリダイズするプライマーを伸長するのに用いた場合、一つの多型部位に対して可能な伸長生成物は、この場合、一方の遺伝子型に対しては通常 1 塩基伸長生成物であり、他方の可能な遺伝子型に対しては 2 (またはそれ以上) 塩基伸長生成物である。この反応設計と関連させて伸長を決定するには質量分析が特に好適である。なぜなら、この可能な生成物は、事実上、分子量が異なるからである。2本鎖核酸分子 (例えば、PCR 生成物) が鋳型として用いられる場合、プライマー伸長反応はサーマルサイクル処理し、検出可能となるほど十分に高い反応生成物を実現するべきである。周期的温度プログラムでは、2本鎖構造を一時的に変性させて、未伸長のプライマーを、相補的 PCR 鎖と競合させながら、興味の部位の近傍にアニールさせる。これは、標準的サーマルサイクラー装置設定を用いると、約 90 分以上を要する手間隙を要する過程であることがある。本明細書で提供される装置 (すなわち、小型のチップ基板と、チップ表面を直接内部底とするチャンバーに含まれる低容量の反応混合液を加熱する高速サーマルサイクラー) を用いると、このサーマルサイクル過程の持続時間は約 15 分に短縮することが可能である。

【 0148 】

((3) 断片化反応)

PCR 生成物またはその他の增幅生成物を含む特定の核酸の中に、1種以上の変異、例えば、多型現象が存在するか否かは、その核酸の断片に基づいて決定することが可能である。断片は、様々な化学的および / または酵素的反応によって產生が可能である。これらの断片化反応のいずれに対しても、反応後に得られた核酸断片 (単数または複数) の分子量は、質量分析によって決定が可能である (例えば、米国特許第 5,605,798 号、

10

20

30

40

50

同第6, 043, 031号、同第6, 197, 498号、同第6, 221, 601号、同第6, 221, 605号、同第6, 235, 478号、同第6, 258, 538号、同第6, 268, 144号、同第6, 277, 573号および同第6, 300, 076号、および、国際出願公報WO96/29431を参照)。

【0149】

標的核酸は、その断片化全体パターンを通じて、完全配列を明らかにすることによって、または、断片化パターンから選ばれた一部を通じて、その特徴が明らかにされる。核酸のある断片は、例えば、基板上のハイブリダイゼーションによる捕捉を通じて、または、他の特異的相互作用を通じて、例えば、1種以上の断片のビオチン／ストレプトアビジン親和性を通じて、選択的に単離および精製することが可能である。生成された断片の全てまたは大部分を単離および精製するための方法としては、例えば、基板上でのハイブリダイゼーションによる特異的および非特異的(例えば、ポリイノシンの使用による)捕捉、および、イオン結合、水素結合または疎水性相互作用、キレート性リガンド、アフィニティー相互作用、または、当業者には公知のその他の手段で、断片を結合させる基板が挙げられる。

【0150】

核酸(好ましくは、增幅生成物由来)の断片を作製するための1つの方法は、1つ以上の制限酵素の使用である。反応生成物の数、サイズおよび/または組成を分析することは、1つまたは複数の位置における核酸およびその改变体についての情報を提供する。例えば、増幅生成物内の特異的なヌクレオチド多型は、制限エンドヌクレアーゼ部位を含み得、これは、別の対立遺伝子改变体のヌクレオチド配列において存在しない。これは、2つの大きく異なる生成物を作製し、これは、選択的に分離および分析され得る。他のアッセイ設計において、制限酵素は、1つ以上の多型部位の周りに特徴的な断片を作製し得る。

【0151】

この方法と同様にして、RNASEによる切断を用いて、RNAまたはRNA/DNAキメラを断片化することも可能である。核酸は、PCR、および/または、DNA依存性RNAPリメラーゼによるインピトロ転写のような周知の増幅法によって生成することが可能である(Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. (2001)「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Chap. 10. 27-10. 33)。これらの生成物は、基板の上に捕捉して、質量分析による分析の前にRNASEによって精製および処理することが可能である。表面での断片化に対する別法として、この工程を溶液の中で実施し、いくつかの断片を、その相補体に対するハイブリダイゼーションを通じて、または、断片特異的修飾、例えば、ビオチン化を通じて特異的に抽出することが可能である。

【0152】

核酸のウラシル特異的切断は、ウラシル-N-グリコシラーゼを核酸と反応させることによって実行が可能である(例えば、国際PCT出願公報WO98/54571を参照)。グリコシラーゼで処理した核酸は、ウラシル塩基を用いて増幅反応に生成させ、増幅生成物中に組み込むことが可能である。核酸の切断を招く全ての反応において、反応後に得られたDNA断片(单数または複数)の分子量は、質量分析によって決定され、核酸中における変異の有無の検出に使用が可能である(例えば、米国特許第5,605,798号、同第6,043,031号、同第6,197,498号、同第6,221,601号、同第6,221,605号、同第6,235,478号、同第6,258,538号、同第6,268,144号、同第6,277,573号、および同第6,300,076号、および、国際PCT出願公報WO96/29431を参照)。再び、完全な断片化パターン、または、個々の断片は、前述のようにして分離および分析が可能である。

【0153】

((4)配列決定反応)

10

20

20

30

30

40

40

50

様々な核酸配列決定反応が当該分野で公知であり、また、特定の核酸を特定するのにも使用が可能である。例示の配列決定反応としては、MaxamおよびGilbert((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560)、または、Sangerら((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463)によって開発された技法に基づくものが挙げられる。当業者であれば、ある種の実施態様では、核酸塩基の内、ただ一つ、二つ、または、三つの出現を、配列決定反応で決定する必要のある場合があることは明白であろう。例えば、A-トラック配列決定法、または、その等価な、例えば、ただ一つのヌクレオチドのみ検出される決定法も実行可能である。他の配列決定法も公知である(例えば、名称「Method of DNA sequencing employing a mixed DNA-polymer chain probe」なる米国特許第5,580,732号、および、「Method for mismatch-directed in vitro DNA sequencing」なる米国特許第5,571,676号を参照)。

10

20

30

【0154】

特定の方法では、配列決定反応の生成物は質量分析で分析してもよい(例えば、米国特許第5,547,835、5,691,141号、および、H.Koesterによる、名称「DNA Sequencing by Mass Spectrometry」なる国際PCT出願PCT/US94/00193(WO94/16101)、米国特許第5,547,835、5,622,824、5,851,765、5,872,003、6,074,823、6,140,053、および、H.Koesterによる名称「DNA Sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradation」なる国際PCT出願PCT/US94/02938(WO94/21822)参照)。本明細書で提供される方法の特定の例では、配列決定すべき標的核酸を、サンガー型配列決定反応を実行するのに必要な試薬全てと共に、プライマーも含めて、基板に与える。反応で得られた配列決定用断片を、全配列決定用プライマーの一部の相補体である配列を含む、基質結合オリゴヌクレオチドハイブリダイズすることによって基質表面に捕捉する。基質表面の脱塩および基板表面に対するマトリックスの添加に次いで、各配列決定断片について、基板表面に捕捉された断片位置において、すなわち、標的検出部位において開始するMALDI質量分析によって検出および分析が可能である。

30

40

50

50

【0155】

((5)ミスマッチ切斷反応)

ヌクレアーゼ、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムのような切断剤からの、および、ピペリジンを用いる保護を用いて、RNA/RNA、DNA/DNA、または、RNA/DNAヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出することが可能である(Myersら(1985) Science 230:1242)。一般に、"ミスマッチ切斷"法は、RNAまたはDNAのような標的核酸分子に対するオリゴヌクレオチド相補鎖を、サンプルから入手したRNAまたはDNAのような核酸とハイブリダイズさせることによって形成される、ヘテロ二重鎖を設けることによって始まる。この2本鎖二重鎖は、二重鎖の1本鎖領域、例えば、上記オリゴヌクレオチドとサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチによって形成される二重鎖を切断する薬剤で処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖はRNAアーゼで処理することが可能であるし、DNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼで処理して、そのミスマッチ領域を酵素的に消化することも可能である。従って、ミスマッチ(変異の存在を示し得る)は、標的核酸の切斷を生じる。特定の方法において、切斷生成物は、質量分析法によって検出され得る(例えば、米国特許第5,605,798号、同第6,043,031号、同第6,197,498号、同第6,221,601号、同第6,221,605号、同第6,235,478号、同第6,258,538号、同第6,268,144号、同第6,277,573号、および同第6,300,076号、および、国際PCT出願公報WO96/29431を参照)。

他の実施態様では、DNA / DNA または RNA / DNA 二重鎖のいずれかを、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで、かつ、ペペリジンで処理し、ミスマッチ領域を消化することが可能である。ミスマッチ領域の消化後、得られた材料を、例えば質量分析で分析し、任意の核酸断片の有無および分子量を決定することが可能である。本明細書で提供される方法の特定の例では、ミスマッチ切断反応で生成された断片は全て、その断片の全てまたは一部に対して相補的な配列を有する、固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせることによって基質表面に捕捉される。基質表面の脱塩および基板表面に対するマトリックスの添加に次いで、各断片について、基板表面に捕捉された断片位置において、すなわち、標的検出部位において開始する MALDI 質量分析によって検出および分析が可能である。

10

【0157】

ミスマッチ切断反応に関連する例示の実施態様では、DNA 標的の SNP 領域に対して相補的なリボ - オリゴヌクレオチドを、固相支持面に付着させることも可能である。この DNA 標的を、表面上において、PCR その他の方法によって増幅する。増幅生成物の 1 本鎖を除去する、または、増幅を、標的 DNA が過剰に生産される方向に向ける。この DNA 標的鎖を、表面付着の、相補的リボ - オリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズさせることによって捕捉する。単一塩基ミスマッチが SNP 部位で起こっている場合には、形成された二重鎖は縮んで (puckered) おり、従って部分的に 1 本鎖状となっている。次に、1 本鎖を切断する切断試薬（例えば、RNASE）を用いて、この部位でリボ - オリゴヌクレオチドを切断する。この切断により、リボ - オリゴヌクレオチドの短い遊離部分が生成されるが、これは、表面にマトリックス化合物を添加して後 MALDI - TOF 質量分析による分析が可能である。サンプル中にミスマッチが存在する場合にのみ、切断されたリボ - オリゴヌクレオチド断片に相当するピークが見られるが、一方、完全なマッチに対しては MALDI - MS 信号は現れない。一つの実施態様では、このシステムは、質量分析ではなく、表面付着のリボ - オリゴヌクレオチドの末端に蛍光タグを付けることによって、蛍光で分析することも可能である。リボ - オリゴヌクレオチドと PCR 生成物の間にミスマッチが生じた場合、切断は、リボ - オリゴヌクレオチドの短い遊離部分をもたらし、これが表面に蛍光信号を生ずる。しかしながら、完全なマッチの場合、表面に蛍光信号をもたらす切断は起こらない。

20

【0158】

30

別の実施態様では、DNA 標的増幅のための PCR やその他の方法は、表面上で実施することも可能である。増幅生成物の 1 本鎖を除去する、または、増幅を、標的 DNA が過剰に生産される方向に向ける。次いで、PCR 生成物の SNP 型対立遺伝子の内の一つに対して相補的なリボ - オリゴヌクレオチド配列を添加する。次に、リボ - オリゴヌクレオチド配列と PCR 生成物の間に生じたミスマッチした、および / または、マッチしたハイブリッドが溶液中に形成される。次いで、RNASE A が溶液に添加される。上記実施態様の場合と同様、リボ - オリゴヌクレオチド配列と PCR 生成物の間にミスマッチが生じた場合、リボ - オリゴヌクレオチド配列の切断が起こる。完全なマッチが起こった場合、切断は明白にはならない。切断されるかされないかによらず、リボ - オリゴヌクレオチドは、そのリボ - オリゴヌクレオチドの少なくとも一部に対して相補的な表面付着オリゴにハイブリダイズすることによって表面に捕捉される。マトリックス添加後、MALDI - TOF 質量分析を用いて、この切断および未切断生成物を特定する。ある特定の実施態様では、このシステムは、質量分析ではなく、リボ - オリゴヌクレオチド配列の 5' または 3' 末端に蛍光タグを設けることによって蛍光によって分析することが可能である。表面付着オリゴヌクレオチドは、蛍光タグに対向する標的配列の末端において、かつ、潜在的な切断部位の上流でもっぱら捕捉されるように設計が可能である。切断が起こった場合は、蛍光信号は検出されず、一方、切断が起こらない場合は、蛍光信号が検出される。

40

【0159】

((6) オリゴヌクレオチド連結反応)

オリゴヌクレオチド連結反応と呼ばれる、別の核酸反応設計では、1 本鎖標的核酸の配

50

列末端に隣接するようにハイブリダイズできるように設計された2個のオリゴヌクレオチドを、サンプル核酸と混ぜる。厳密な相補配列がサンプル核酸の中に見られると、そのオリゴヌクレオチドは末端が隣接するようにハイブリダイズし、連結基質を形成する。従つて、サンプル中の核酸は、オリゴヌクレオチド連結定量法(OLA)を、例えば、米国特許第4,998,617号、および、Landegrenら、Science 241:1077-1080(1988)に記載されるやり方で用いて検出が可能である。Nickersonらは、PCRとOLAと特性を組み合わせた核酸検出定量法を記述している(Nickersonら(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:8923-8927)。この方法では、PCRを用いて標的DNAの指數関数的増幅を実行し、次にこのDNAをOLAを用いて検出する。

10

【0160】

このOLA法に基づく技法がいくつか開発されており、遺伝子の多型領域の、特異的対立遺伝子改変体の検出に使用され得る。例えば、米国特許第5,593,826号は、3'-アミノ基と5'-リン酸化オリゴヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを用いてホスホラミダート結合を有する結合体を形成するOLAを開示する。

【0161】

リガーゼ連鎖反応(PCR)に基づく他のプロトコルにおいて、標的核酸を、一組の連結エダクト(ligationeduct)および熱安定性DNAリガーゼとハイブリダイズさせ、リガーゼエダクト(ligaseeduct)同士を互いに共有結合させて連結生成物を形成する。特定の方法において、この連結生成物を、質量分析によって検出し、周知の値と比較し得る(例えば、米国特許第5,605,798号、第6,043,031号、第6,197,498号、第6,221,601号、第6,221,605号、第6,235,478号、第6,258,538号、第6,268,144号、第6,277,573号、および、第6,300,076号、ならびにPCT国際出願WO96/29431を参照)。反応を周期的に実施する場合、得られた連結生成物を増幅して、小容量の標的核酸の検出をさらに促進し得る。連結点での野生型プライマーと変異プライマーとの選択によって、点変異の検出が得られ得る。

20

【0162】

本明細書中で提供される方法の特定の実施形態において、リガーゼ連鎖反応は、溶液中に固相支持体の表面上で実質的に実施され得、例えば、一ヌクレオチド多型を決定し得る。例えば、連結生成物の一部に対して相補的なオリゴヌクレオチドを固相支持体に結合させ得る。この固相支持体固定化オリゴヌクレオチドの上で、およびその存在下で、先ずPCRを実施し、次いで連結反応を実施する。この連結反応のために、3本の連結プライマーが溶液に添加される。1本は、表面に結合したオリゴヌクレオチドに対して相補的であり、1本のプライマーは野生型SNPを含み、別の1本のプライマーは変異型SNPを含む。次に、野生型、および/または、変異型配列に相当する連結生成物は、表面上に捕捉され、質量分析、例えば、MALDI-TOF質量分析によって、その分子量に基づいて特定される。蛍光による分析のための別の実施形態において、野生型および変異型SNPを含む連結プライマーは、それぞれ、別々の蛍光タグによって標識される。例えば、野生型プライマーをcy5で標識し、一方、変異型プライマーをcy3で標識し得る。このようにして、変異型および/または野生型配列の存在が同定され得る。特定の実施形態において、多重PCRおよび連結反応が実施される。

30

【0163】

別の実施形態において、表面固定化オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションを通じてPCR生成物を捕捉し得る。次に、この連結生成物を、表面に捕捉されたPCR生成物にハイブリダイズさせる。

40

【0164】

(b. 核酸反応に使用され得る試薬)

核酸を含む反応の型から明らかなように、このような反応には多くの試薬が使用され得る。試薬としては、酵素(例えば、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレア

50

ーゼ、S 1 ヌクレアーゼ、リガーゼ)、プライマー、オリゴヌクレオチド、デオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)、および、ジデオキシヌクレオシド三リン酸(ddNTP)が挙げられる。

【0165】

((1) プライマー)

プライマーとは、目的の領域、例えば、多型領域の近傍位置において核酸配列(しばしばテンプレートと呼ばれる)に対して特異的にハイブリダイズ可能な核酸をいう。プライマーは、そのプライマー近傍のテンプレートに対して相補的なヌクレオチドまたはそのアナログが、伸長するヌクレオチド鎖に対して添加される過程において、酵素(例えば、ポリメラーゼ)の作用を通じて伸長され得る。例えば、RNAテンプレートが使用される場合、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーは逆転写酵素の作用によって伸長し、そのRNAテンプレートに対して相補的なcDNAを生成する。DNAテンプレートが使用される場合は、プライマーは、DNAポリメラーゼの作用によって伸長するされ得る。

10

【0166】

プライマーは、例えば、標的核酸の同一性(identity)、および/または存在に関する情報を提供するように設計されたプライマー伸長反応において単独で使用され得るか、あるいは、プライマーは、例えば、増幅反応の場合のように、少なくとも1本の他のプライマーまたはプローブと共に使用され得る。核酸の少なくとも一部を増幅するために、順プライマー(すなわち、5'プライマー)と逆プライマー(すなわち、3'プライマー)を用いるのが好ましい。順プライマーおよび逆プライマーは、2本鎖核酸の相補鎖にハイブリダイズし、それによって、各プライマーの伸長により、2本鎖核酸が増幅される。

20

【0167】

本明細書中に記載されるプライマー(RNA、DNA(1本鎖または2本鎖)、PNAおよびそのアナログ)は、その目的の本質を変えることなく、例えば、制限部位または他の有用な配列を組み込むように設計されたヌクレオチドを末端添加することによって改変され得る。

20

【0168】

プライマーは、当該分野で周知の方法に従って調製され得、例えば、Sambrook, J. および Russell, D. (2001)「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載される。例えば、不連続なDNA断片を、制限酵素を用いて、調製およびクローン化し得る。あるいは、プライマーは、適当な配列を有するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて調製され得るか、または、合成され得る。

30

【0169】

プライマー、特に、対立遺伝子改变体検出法において実行される反応に用いられるプライマーは、多型部位で対立遺伝子の一部に特異的にハイブリダイズために十分な長さである。代表的には、その長さは、供給源生物ゲノムの複雑性に依存する。ヒトでは、その長さは少なくとも14~16個のヌクレオチド、代表的には、20個、30個、50個、100個以上のヌクレオチドであってもよい。

40

【0170】

((2) ヌクレオシド/ヌクレオチド)

核酸を含む多くの反応は、デオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)およびジデオキシヌクレオシド三リン酸(ddNTP)を構築用ブロックとして含む。このブロックは、例えば、伸長反応、増幅反応および配列決定反応においてプライマーを伸長するために使用され得る。特定の反応において、反応生成物の同定および/または検出を容易にするために、または、異なる反応生成物を区別するために、改变dNTPを用いることが所望され得る。例えば、異なる反応の核酸生成物間の分子量の相違は、核酸配列自体(組成または長さ)、またはこの生成物に質量修飾性官能基(mass-modifying fu

50

nationality) の導入のどちらかによって達成され得る。例えば、質量修飾は、核酸増幅過程の際に組み込まれ得る。

【0171】

質量修飾性部分 (mass-modifying moiety) は、例えば、核酸生成物の 5' 末端、核酸塩基、リン酸骨格に、およびヌクレオシドの 2' 位置、ならびに / または末端 3' 位置に、結合され得る。質量修飾性官能基の例としては、例えば、ハロゲン、アジド、または X R 型 (ここで、X は結合基であり、そして R は質量修飾性官能基である) が挙げられる。従って、質量修飾官能基は、核酸生成物分子の中に、規定された質量増加を導入するために使用され得る。

【0172】

プライマーの合成の間の核酸配列の 5' 末端を修飾は、2 個以上の核酸生成物の質量に違いを導入する一つの方法である。5' 末端修飾の多くは、例えば、捕捉配列と核酸生成物との間に形成されるハイブリッドの安定性または、3' 末端に起こるプライマー伸長反応の効率を妨げない。この修飾は、合成の間にも、例えば、ホスホラミダイト化学によって、ならびにこのクラスの広範な種々の市販の化合物 (ヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体、デオキシリボース - 3' - リン酸、デオキシリボース - 5' - リン酸、および他の有機 - 3' - リン酸基) と共に、導入され得る。

【0173】

質量修飾官能基は、ヌクレオチド官能基内の様々な位置に配置され得る (例えば、米国特許第 5,547,835 号および国際 PCT 出願 WO 94/21822 を参照)。例えば、質量修飾官能基 M は、核酸塩基 (C⁷-デアザヌクレオシドの場合は C-7 にも)、アルファリン酸の三リン酸基、または、ヌクレオシド三リン酸の糖環の 2' 位置のいずれかに結合され得る。例えば、アルファ - チオヌクレオシド三リン酸塩の場合のように、フォスフォジエステル結合に導入された修飾は、これらの修飾が、正確なワトソン・クリック型の塩基対に干渉せず、さらに、完全な核酸分子について、(例えばアルキル化反応によって) 1 工程合成後部位特異的修飾を可能とするという利点を有する (例えば、Nakamayeら (1988) Nucleic Acids Res. 16: 9947-59 を参照)。ホウ素修飾核酸もまた、ポリメラーゼによって核酸の中によりよく組み込まれるという点で有用な質量修飾官能基である (例えば、Porterら (1995) Biochemistry 34: 11963-11969; Hasanら (1996) Nucleic Acids Res. 24: 2150-2157; Li ら (1995) Nucleic Acids Res. 23: 4495-4501 を参照)。

【0174】

さらに、質量修飾官能基は、鎖停止に影響を及ぼすように (例えば、それをヌクレオシド三リン酸における糖環の 3' 位置に結合させることにより) 添加され得る。当業者には、本明細書で提供される方法において多くの組み合わせが使用され得ることは明白である。同様にして、当業者は、鎖伸長性ヌクレオシド三リン酸もまた、同じ様式で、官能基および結合位置に数多くのバリエーションおよび組み合わせを用いて質量修飾され得ることを認識する。

【0175】

例えば、特定のいかなる理論にも縛られることなく、質量修飾は、オリゴヌクレオチドのポリエチレングリコール誘導体を用いて、X R の X および R の代わりに導入され得る。この場合の質量修飾增加分 (m) は 44 であり、すなわち、5 通りの質量修飾分子種を、ただ m を 0 から 4 に変えるだけで (従って核酸分子 (例えば、ヌクレオシド三リン酸) に、45 (m = 0)、89 (m = 1)、133 (m = 2)、177 (m = 3)、および、221 (m = 4) の質量単位を加えるだけで)、生成し得る。オリゴヌクレオチドのポリエチレングリコール誘導体も、低級アルキル (例えば、メチル、エチル、プロピル、イソブロピルおよび t - ブチルが上げられるが、それらに限定されない) によって、モノアルキル化され得る。質量修飾化合物において、他の化学を使用し得る (例えば、「Oligonucleotides and Analogues, A Practical Ap-

proach」F. Eckstein 編、IRL Press, Oxford, 1991
に記載される化学を参照)。

【0176】

オリゴスクレオチドのポリエチレングリコール誘導体以外にも、様々の質量修飾性官能基Rを、適当な結合化学薬品Xを介して選択および結合させ得る。単純な質量修飾は、例えば、Hを、ハロゲン(例えば、F、Cl、Brおよび/もしくはI)または擬ハロゲン(例えば、CN、SCN、NCS)と置換することによって、あるいは種々のアルキル、アリルまたはアラルキル官能基(例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、t-ブチル、ヘキシル、フェニル、置換フェニル、ベンジル)を用いることによって、あるいは、CH₂F、CHF₂、CF₃、Si(CH₃)₃、Si(CH₃)₂(C₂H₅)₁₀、Si(CH₃)(C₂H₅)₂、Si(C₂H₅)₃のような官能基を用いることによって、達成され得る。さらに別の質量修飾は、核酸分子(例えば、またはスクレオシド三リン酸)を介してホモペプチドまたはヘテロペプチドの結合により得られ得る。質量増加57を伴う質量修飾分子種の生成において有用な一つの例は、核酸分子(r)へのオリゴグリシン(m)の結合であり、例えば、74(r=1, m=0)、131(r=1, m=1)、188(r=1, m=2)、245(r=1, m=3)の質量修飾が達成される。単純なオリゴアミド類も使用され得る。例えば、74(r=1, m=0)、88(r=2, m=0)、102(r=3, m=0)、116(r=4, m=0)の質量修飾が得られ得る。本明細書中に記載される例に加わるバリエーションは、当業者にとって明白である。
20

【0177】

(c. 核酸反応に用いられる条件)

核酸を含む反応は、代表的には、2種以上の核酸分子をハイブリダイズする工程を包含する。ハイブリダイゼーションの程度および特異性は、反応条件(特に、温度および塩濃度)によって変動する。ハイブリダイゼーション反応条件は、代表的には、ストリンジェンシーに換算して(例えば、低、中、および、高ストリンジェンシーとして)言及される。これらのストリンジェンシーは、当業者に公知であり、本明細書中に例示されている様々な温度および塩濃度の下で達成される。従って、例えば、ハイブリダイズする核酸間の不完全なマッチの量を減らすために、より高いストリンジェンシー条件(例えば、より高温およびより低い塩濃度)を採用し得る。
30

【0178】

さらに、核酸を含む反応はまた、二本鎖核酸を変性して1本鎖分子を生成する工程を包含し得る。変性は、例えば、反応混合物の温度が特定の二本鎖核酸の融解温度を越える条件下で、達成され得る。

【0179】

多くの核酸反応(例えば、增幅反応)が、温度の上昇と低下から成る反復周期を包含し、核酸ハイブリッドの鎖の変性およびアニーリングを提供する。本明細書で提供される装置は、比較的質量が小さく、熱伝導性の高いチャンバーの基板底を、直接、迅速かつ効率的に、加熱および冷却すること、ならびに反応物質を別のサーマルサイクル装置へ移送するいかなる工程も回避することによって、チャンバーにおける反応混合物の温度の変動を促進する。
40

【0180】

(d. タンパク質またはペプチドを含む反応)

本明細書で提供される方法において使用が企図される、タンパク質またはペプチドを含むいくつかの異なるタイプの反応が存在する。例えば、タンパク質およびポリペプチドは、オリゴスクレオチドまたはDNAマイクロアレイの上に捕捉され得る(Brockman, J.ら(1999)Journal of the American Chemical Society 121:8044-8051)。エピトープタグ化タンパク質は、Ni²⁺キレート化表面、または、抗体結合表面に対する親和性を介して捕捉され得る(Nelson, R.W.ら(1999)Anal. Chem. 71:2858-2859)
50

65)。タンパク質もまた、表面結合酵素への表面に捕捉される(Nelson, R. W.ら(1997)Anal. Chem. 69:4369-4374; Nelson, R. W.ら(2001)Anal. Chem. 73:1-7; Nedelkov, D.ら(2000)Analytica Chimica Acta 423:1-7)。他の実施形態において、タンパク質固定化表面に対するタンパク質の相互作用を用いて、液相の標的タンパク質またはペプチドを、固相基板上に捕捉し得る(MacBeath, G.ら(2000)Science 289:1760-1762; Lin, S.ら(2000)72:2635-2640)。

【0181】

((1) タンパク質の、オリゴヌクレオチドまたはDNA固定化表面への捕捉)

10

特定のタンパク質の機能は、特異的オリゴヌクレオチド配列を認識することである。それらのタンパク質における、例えば一塩基多型に起因する立体構造的变化は、そのようなタンパク質の機能を阻害し得る。本明細書中で提供される技術的基盤と方法において、タンパク質 / オリゴヌクレオチド相互作用を研究するために、目的の捕捉オリゴヌクレオチドを表面に固定し得る。先ず、目的のタンパク質を、cDNAファージライブラリーから発現させる。次に、これらのタンパク質を表面に導入し、そしてタンパク質は、表面固定化オリゴに対する親和性を介して捕捉される。洗浄および表面へのマトリックス化合物の添加に次いで、MALDI - TOF質量分析による生成物の分析が行われ得る。表面上に捕捉されたタンパク質の同一性、および存在するタンパク質の量が、測定され得る。別の実施形態において、表面上に捕捉されたタンパク質は、そのタンパク質に、フルオレセインまたはcy5のような蛍光タグを標識することによって蛍光により分析され得る。種々のタンパク質が使用される場合、各タンパク質は異なる蛍光タグで標識される。このようにして、表面上のタンパク質の同一性および相対量を決定し得る。

20

【0182】

((2) Ni²⁺キレート化、抗体または抗体固定化表面へのタンパク質親和性捕捉)

30

他の実施形態において、表面に固定化された酵素、抗体、および、Ni²⁺キレートに対するタンパク質およびペプチドの独特の親和性を通じて、タンパク質およびペプチドが単離され得、特徴付けられ得る。これらの実施形態において、新規のタンパク質が特徴付けられ得る。一つの実施形態において、タンパク質は、一般に、そのタンパク質を生体分子でタグ標識することによって捕捉され得る。このようにして、タンパク質は、対応する表面結合生体分子に対するタグの親和性を通じて表面上に捕捉される。タグは、DNAタグを、クローニングベクター、または、CD - タギングのような挿入ビヒクルを用いて遺伝子に挿入することによって、タンパク質に導入され得る(Jarvik, J. W.ら(1996)Biotechniques 20:896-904)。タグ含有タンパク質はまた、タンパク質発現後に得られる。トリプシンによる消化後、タグ含有ペプチドフラグメントを、タグの表面結合生体分子に対する親和性を介して捕捉し得る。タグは、Ni²⁺キレート表面に対して高度の親和性を有するヒスチジン富酰ポリペプチドであり得る。Ni²⁺キレート表面は、ニトリロ三酢酸誘導体化表面上にNi²⁺緩衝液を流すことによって形成される。捕捉されたタンパク質およびポリペプチドは、MALDI - MSマトリックスを表面に適用後、MALDI - TOF質量分析によって同定され得る。

40

【0183】

別の実施態様では、タンパク質を、表面固定化酵素および / または抗体に対する親和性を通じて表面に捕捉することが可能である。例えば、酵素または抗体の一級アミンが、表面に共有結合され得、N - ヒドロキシスクシンイミド、アミノプロピルカルボジイミドを用いて活性化され得る。捕捉されたタンパク質の質量は、MALDI - TOF質量分析によって測定することが可能である。同様に、これらの捕捉されたタンパク質を、それらのタンパク質に蛍光タグを結合させることによる蛍光によって分析することも可能である。各タンパク質に異なる蛍光タグが用いられ得る。このようにして、表面のタンパク質の同一性や相対量を計測することが可能である。

【0184】

50

((3) タンパク質結合表面へのタンパク質の捕捉)

本明細書で提供される方法の他の実施態様では、タンパク質 - タンパク質相互作用が、目的のタンパク質を表面に固定化することによって分析され得る。一つの実施態様では、タンパク質のリジン残基を、例えば、シップの塩基形成によるアルデヒド表面に共有結合させることができある。従って、次いで、タンパク質をこの表面上に捕捉することが可能である。洗浄、および、表面に対する M A L D I - M S マトリックス塗布後、タンパク質の質量を、M A L D I - T O F 質量分析によって得ることができる。同様に、これらのタンパク質が蛍光マーカでタグ化される場合、タンパク質と、それらタンパク質の相対量は、蛍光を介して測定され得る。

【 0 1 8 5 】

(e . 小型有機分子に関する反応)

タンパク質 / 小型有機分子相互作用の研究は、タンパク質の機能を明らかにすること、ならびに、小型有機分子の可能性のある治療関連性の情報を得ることが重要である。小型有機分子を表面に捕捉するのいくつかの周知の反応がある。例えば、一つの実施態様では、小型有機分子をタンパク質固定化表面に捕捉することが可能である。目的のタンパク質のリシン残基は、例えば、シップの塩基形成によるアルデヒド表面に共有結合することが可能である。次に、目的の小型有機分子を、そのタンパク質構造への特異的結合または非特異的結合のために上面に導入することが可能である。捕捉された有機分子は、M A L D I - T O F 質量分析によって同定され得る。別の実施態様では、有機分子はまた、蛍光を使用して、同定され得る。この方法では、使用される各有機分子は、異なる蛍光タグを有する。有機分子の同一性ならびに相対量も測定される。

【 0 1 8 6 】

(f . 炭水化物に関する反応)

いくつかの抗原の宿主レセプターは、炭水化物から構成される。さらに、宿主レセプターもまた、細胞表面に位置される複雑な炭水化物であり得る。宿主のレセプター / 抗原 / 抗体相互作用に関してさらに理解を深めることによって、感染症の経路についてさらに多くの情報が得られ得る。さらに、このような情報に基づいて、これらの疾患を予防する薬物を設計することが可能になる。炭水化物マイクロアレイは、当該分野で公知である (W a n g , D ら、 2 0 0 2 , N a t u r e 2 0 , 2 7 5 - 2 8 1)。一つの実施態様では、炭水化物含有抗原を、ニトロセルロースまたはナイロン由来表面に固定化する。次に、蛍光タグ化抗体を表面に導入する。様々な表面固定化抗原に対する特異的抗体の親和性は、蛍光によって、または、M A L D I - T O F 質量分析によって同定され得る。

【 0 1 8 7 】

(3 . 反応生成物の捕捉)

(a . 反応生成物を捕捉するための基板)

反応生成物は、その上で反応が実行される基板表面（例えば、チャンバーの内部底面）に捕捉される。特定の実施態様では、反応（単数または複数）は、基板を含むチャンバー内で実行されるか、またはチャンバーの底部が基板となり、基板は、反応生成物（単数または複数）と特異的に相互作用し得、そのために、他の分子をチャンバーから除去するか、または、洗い流すために使用される過程の間、反応生成物が基板に結合されたままである。この相互作用は、反応生成物と、基板そのものの実際の化学的成分の間に起こるものでも、または、反応生成物と、基板材料の中に組み込まれた成分、例えば、誘導体化、または、官能基化された基板との間に起こるものであってもよい。反応生成物（単数または複数）の特異的捕捉を実現できるものであれば、いずれのタイプの基板も使用が可能である。

【 0 1 8 8 】

例えば、基板は、平坦な 2 次元表面であっても、または、3 次元表面であってもよいし、ビーズであってもよい。平坦基板の場合、チャンバーは、基板表面から突出する壁によつて、例えば、本明細書で提供される装置の一実施態様において記述される「マスク」によつて提供されても、あるいは、不連続で隔離されたチャンバーを設けるために、基板表

面にウェル、柱、または、チャネルをエッティングすることによって作製されてもよい。基板が作製され得る可能な材料としては、シリコーン、上面酸化物層を有するシリコーン、ガラス、白金、金、ポリマー、および、プラスチックが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施態様では、基板はシリコンチップ、すなわち、ウェーハである。

【0189】

平坦基板は、チャンバー内の反応混合物の温度調節を容易にするために、熱伝導性材料を含むように修飾されてもよい。ある特定の実施態様では、基板は、金属材料でコーティングされた平坦なシリコンチップである。例示的な基板は、本明細書中に記載され、そして本明細書中に記載され、そして提供されるデバイスと共に使用され得る。

【0190】

(b. 核酸反応生成物の捕捉)

核酸反応生成物は、様々な方法でチャンバー内に捕捉され得る。例えば、ある反応生成物と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを、その生成物の特異的捕捉のために基板に結合され得る。

【0191】

((1) 表面結合オリゴヌクレオチド)

(1. 合成)

オリゴヌクレオチドは別々に合成し、次に基板に結合させてもよいし、または、合成を基板表面でインシリコで実行してもよい。オリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technology (IDT; Coralville, IA), Fidelity Systems (Gaithersburg, MD), Proligo (Boulder, CO), MWG, Operon (Qiagen; Valencia, CA) および Metabion (Planegg-Martinreid, Germany)などを含めた多数の企業から購入することが可能である。

【0192】

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド誘導体は、当該分やで公知の標準法（例えば、DNA自動合成機（Bioscience (Novato, CA); Applied Biosystems (Foster City, CA) などから市販されているものと同様のもの）の使用）を、孔調節多孔性ガラス（CPG）またはポリスチレンや他の樹脂のような固相支持体、ホスホラミダイト法、H-ホスホネート法、または、ホスホトリエステル法のような化学的方法と組み合わせて合成が可能である。オリゴヌクレオチドはまた溶液中で、または、可溶性支持体の上で合成することが可能である。例として、ホスホチオエート・オリゴヌクレオチドは、Steinらの方法（1988, Nucleic Acids Res. 16: 3209）によって合成が可能である。メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、例えば、孔調節多孔性ガラスポリマー支持体の使用によって調製が可能である（Sarinら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7448 - 7451）。

【0193】

表面結合オリゴヌクレオチドは、アッセイ生成物の目的の領域、例えば、伸長プライマーに対して、または、その近傍にハイブリダイズする核酸である。捕捉性オリゴヌクレオチドは、一般に、チャンバー内で起こる反応のどれにも実質的には関与しない。好ましいオリゴヌクレオチドは、標的ヌクレオチド配列に対して特異的ハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な数のヌクレオチドを有する。表面結合オリゴヌクレオチドは、典型的には、6 ~ 30 塩基長であり、そして配列は、特定の標的核酸（下記のオリゴヌクレオチドのタイプを参照のこと）の配列に対して相補的であるように選ばれる。オリゴヌクレオチドは、天然のヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは、相補配列に対してハイブリダイズする特異性を改変するため、あるいは、形成されたハイブリッドの安定性を改変するためのヌクレオチド模倣物から作製することが可能である。

【0194】

特異性の変更は、捕捉配列の中に、または、標的核酸の前駆体の中に普遍的塩基または

10

20

30

40

50

部位を組み込むことによって達成され得る。配列内部の一つの塩基をイノシンで置換することによって、例えば、標的核酸生成物の多型部位に対する普遍的ハイブリダイゼーションが実現される（例えば、Ohtsukarら（1985）J. Biol. Chem. 260：2605；Takahashirら（1985）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82：1931を参照のこと）。ハイブリッドの安定性は、例えば、RNA（DNA標的に指向される場合）、ロック核酸（LNA）（Braaschirら（2001）Chemistry & Biology 8：1-7）、ペプチド核酸（PNA）（Armitagelら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94：12320-12325）、または、他の修飾された核酸誘導体を、捕捉または標的核酸の配列内に、完全にまたは部分的に使用することによって有意に増加させることができる。この安定性はまた、1個または数個の無塩基部位、非ハイブリダイズ性塩基誘導体、または、ホスホロチオエートのような融解温度の低下をもたらす核酸修飾を組み込むことによって低下させることもできる。両方のアプローチが、ほとんど全ての配列や長さのものの融解温度を所望の融解温度を調節するのに使用され得る。

10

【0195】

（オリゴヌクレオチド合成）

溶液中の、または固相支持体上でのオリゴヌクレオチド合成法は、当該分野で周知である（例えば、Beaucagelら（1981）Tetrahedron Lett. 22：1859-1862；Sasakiら（1993）Technical Information Bulletin T-1972, Beckman Instrument；Seligerら（1990）DNA and Cell Biol. 9：691-696を参照のこと）。

20

【0196】

（オリゴヌクレオチドのインサイチュ合成）

光指向合成法を使用するガラスおよびシリコーン表面でのインサイチュオリゴヌクレオチド合成は、当該分野で周知である（例えば、McGallirら（1997）J. Am. Chem. Soc. 119：5081-5090；Wallraffら（1997）Chemtech 27：22-32；McGallirら（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93：13555-13560；Lipshutzら（1994）Curr. Opin. Structural Biol. 4：376-380；および、Peaseら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91：5022-5026を参照のこと）。

30

【0197】

（2. 基板への結合）

オリゴヌクレオチドは、化学的に誘導される基板、または、官能基を有するポリマーまたはプラスチックのような基質に結合され得る。オリゴヌクレオチドは、写真平板、共有結合、または、イオン相互作用、ファンデルワール結合および水素結合のような非共有的相互作用による受動的結合を含む、様々な過程を通じて固相支持体に結合させることができ。オリゴヌクレオチドは、5'または3'末端修飾を通じて表面に共有結合され得る。オリゴヌクレオチドを表面から遠ざけるために、典型的にはリンカーが用いられる。例えば、オリゴヌクレオチドが、5'末端を介して結合される場合、リンカーは、その5'修飾の直前の5'末端に存在することになる。使用される典型的なリンカーとしては、ヘキシリエチレングリコール（1つ以上の単位）、および、オリゴデソキシチミジンdT_n（n = 5 ~ 20を有する）が挙げられる。

40

【0198】

（化学的誘導体化）

種々の方法が、反応性官能基を備えるように化学的に誘導体化された表面にオリゴヌクレオチドを結合させるのに使用され得る。例えば、アミノ修飾オリゴは、エポキシド活性化表面と反応して共有結合を形成する（例えば、Lamtureら（1994）Nuc. Acids Res. 22：2121-2125を参照のこと）。同様に、アミノ修飾オ

50

リゴヌクレオチドの共有結合は、カルボン酸修飾表面 (S to ther ら (2000) J . Am . Chem . Soc . 122 : 1205 - 1209) 、イソチオシアネート、アミン、チオール (Pen chovsk y ら (2000) Nuc . Acids Res . 28 : e 98 - 1 - 6 ; Len igk ら (2001) Langmuir 17 : 2497 - 2501) 、イソシアネート (L indroos ら (2001) Nuc . Acids Res . 29 : e 69 1 - 7) 、および、アルデヒド修飾表面 (Z ammatte o ら (2000) Anal . Biochem . 280 : 143 - 150) で達成され得る。

【0199】

典型的には、シリコーン表面は、化学的に誘導体化されて、次に、本明細書に記載されるようにオリゴヌクレオチドが固定化される (B enters ら (2002) Nuc . Acids Res . 30 : e 10 1 - 7 をも参照のこと)。例えば、表面の洗浄後、表面をアミノプロピルトリメトキシランで処理して表面上にアミノシロキサン層を形成する。この表面を、二官能性クロスリンクカー 1 , 4 - フェニレンジイソチオシアネートで活性化する。クロスリンクカーの一方のイソチオシアネート基は、表面のアミノ官能基と反応して安定なチオウレア結合を形成する。ここで、第二の表面結合されたイソチオシアネート基は、他の、アミノ基を有する分子と共有結合をするために待機する。次の工程で、デンドリマーポリアミン、例えば、スターバースト (PAMAM) デンドリマー、世代 4 、 6 4 個の末端アミノ基を有する (例えば、SIGMA - Aldrich , St . Louis , MO) が活性化表面と反応して、高密度の共有結合したアミノ基を有する基板の上に均一な中間層を形成する。表面のこれらの官能基は、1 , 4 - フェニレンジイソチオシアネートを用いて再び活性化される。未反応のアミンは、4 - ニトロ - フェニレン・イソチオシアネートを用いてブロックされる。ここで、アミノ修飾オリゴヌクレオチドは、活性化デンドリマー中間層に対して、同じタイプの反応を通じて架橋結合される。最終工程では、未反応イソチオシアネートは、ヘキシルアミンのような小型の一級アミンを用いてブロックされる。

【0200】

(3. 基板上の配置)

オリゴヌクレオチドは、基板上に、周知の不連続の位置に結合される。各位置は、同じ配列を有するオリゴヌクレオチドの複数コピーからなる。あるいは、各位置は、異なる配列を有するオリゴヌクレオチドの複数コピーを有し得る。これは、多重反応のためのオリゴヌクレオチドの好ましい配置である。同一位置にある異なる配列のオリゴヌクレオチドは、同様配列を有するグループと一緒に混合されるか、または、同様配列を有するグループに分離することが可能である。多重化のためには、2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、または、それ以上の異なるオリゴヌクレオチドが利用され得る。利用される異なるオリゴヌクレオチドの数は、一つの位置において各異なる配列に結合する生成物を分解する能力によってのみ制限される。例えば、米国特許第 5 , 990 , 479 号および同第 6 , 207 , 392 号は、100 種以上の異なるオリゴヌクレオチドを分解し得るナノ結晶検出手段を提供する。

【0201】

基板の上の異なる位置は、典型的には、異なる配列のオリゴヌクレオチドを含む。ある一つの位置のオリゴヌクレオチドは、典型的には、0 . 0025 mm² から 2 . 0 mm² (例えば、1 . 4 mm²) の面積を占め、オリゴヌクレオチド量は 10 amol と 10 pmol の範囲にある。典型的な形式は、1 枚の基板について、大きさ 20 × 30 mm 、 8 × 12 、 16 × 24 または 32 × 48 のパターンと間隔を有する 96 、 384 または 1536 位置であり、これらは、標準的反応プレートと等価である (中心間距離が、2 . 25 mm 、 1 . 125 mm 、または、0 . 5625 mm) 。一つの実施態様では、位置は、質量分析で用いられるレーザーの直径よりも大きくはない。基板のサイズ、位置の総数、および、位置の配置されるパターンは、基板の上にアレイを作製するため、液体処理のため、および / または、分析のために使用されるデザイン面および装置に一致され得る。例えば、間隔やスポットサイズは、アレイを形成する装置の正確度および / または滴下サイズ

10

20

30

40

50

に適合するものであってもよい。基板の1列または1行に置かれる、オリゴヌクレオチドの位置の数は、M A L D I - T O F 質量分析のレーザーが同時に一つ以上の位置を含まないようされ得る。

【0202】

オリゴヌクレオチドのグループは、基板表面において、どのような配置で設置されてもよい。例えば、オリゴヌクレオチドは、基板の中に形成された個々のウェルの中に設置されてもよい。基板の上にあるウェルの数は、基板のサイズに応じて変動してよいが、96ウェルまたは384ウェルがもっとも頻繁に使われている。唯一の制限は、ウェルがそれぞれ別々に分離されたままで維持されなければならないことである。オリゴヌクレオチドは、基板において、それぞれ、共通の上段試薬チャネルを共有する、列または行の、周知の不連続位置に設置されてもよい。別の実施態様では、オリゴヌクレオチドはまた、全体として平坦な平面で、周知の不連続位置に、任意の配置で設置されてもよい。位置はまた、さらに、個々のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの混合物を含む、より小なる面積の小区画に分割されてもよい。試薬用のチャネルまたはウェルは、基板の上層に設置されるのと同じ材料、または、異なる材料から成るマスクで形成されてもよい。さらに、基板上のウェルおよびチャネルは、ビーズを局在させる、または、それらを、例えば、サイズによって分離および仕分けするように設計されてもよい。この設計では、ビーズは、反応生成物の核酸および誘導体を捕捉するために使用されるオリゴヌクレオチドのキャリアである。

【0203】

(4. オリゴヌクレオチドの型)

オリゴヌクレオチドの配列、長さおよび組成は、捕捉される核酸の性質に依存して変動する。オリゴヌクレオチドは、各アッセイ生成物に対して特異的であってもよく、または、ある多型部位に関して2種以上の対立遺伝子改变体の共通領域に対して、相補的であってもよい。例えば、プライマー伸長反応アッセイでは、表面固定化相補性オリゴヌクレオチドは、多型部位の両方の対立遺伝子に由来する伸長生成物に対してハイブリダイズすることが可能である。これは、多型領域とハイブリッドを形成していないためである。オリゴヌクレオチドは、多型領域に対して5'の伸長生成物とハイブリダイズする。しかし、各オリゴヌクレオチドは、単一多型領域の対立遺伝子とのみハイブリダイズする。

【0204】

あるいは、一般的オリゴヌクレオチド(「ジップコード」オリゴヌクレオチド)を基板上に固定化することも可能である。ジップコードオリゴヌクレオチドはどのような長さであってもよいが、代表的には6から25ヌクレオチド長である。捕捉されたアッセイ生成物は、表面結合オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするようジップコード相補配列を有する。ジップコードは、一つの部位で各種多型を捕捉および検出するために使用されるアッセイ生成物によって共用されてもよい。種々の組のジップコードおよび相補的ジップコード配列を用いて、種々の部位における種々の多型部位のアッセイ生成物を、單一アッセイ生成物として、ならびに異なるアッセイ生成物の小グループにおけるアッセイ生成物として分離するために使用し得る。遺伝子ジップコード配列の使用は、基板の製造および品質管理を単純化する。上述の戦略は、多重化サンプルの処理および分析を容易にする。

【0205】

ジップコード法の可能な改変は、伸長プライマーに切断部位を組み込むことである。例えば、ジップコード配列は、アッセイ生成物から切断されて、質量分析のような分析法により適切なアッセイ生成物を作製することが可能である。切断可能部位は、酵素的にまたは塩基的に切断可能な部位である。例えば、デオキシリボヌクレオチドの配列中の单一リボヌクレオチドは、リボヌクレアーゼまたは塩基によって切断され得る。オリゴヌクレオチドの合成の間に無塩基部位を組み込むことも可能であるし、酵素や化学物質で誘導することも、塩基性条件下で、または、酵素によって切断することも可能である。反応生成物の分析にM A L D I - T O F 質量分析法を用いる場合は、切断用の酵素または試薬は、マトリックスと一緒に捕捉核酸に添加し得る。他の方法としては、酸切断部位(例えば、

10

20

30

40

50

質量分析用のマトリックスによって、または、マトリックス添加物によって切断可能な部位)が挙げられ、ホスホラミデート結合(例えば、S h c h e p i n o v ら(2001)Nucleic Acids Res. 29:3864-3872を参照のこと)または光切断部位の場合、レーザー使用質量分析法においてレーザーで切斷され得る。ジスルフィド結合も使用され得、ジチオスレイトールのような還元剤の存在下で、切斷され得る。

【0206】

別の実施形態では、表面結合オリゴヌクレオチドは、活性化基板またはチップに付着するようになった増幅生成物である。基板は、本明細書に、すなわち、実施例2に記載されるように、オリゴヌクレオチド添加の点まで活性化される。表面に対するPCR生成物の付着は、PCRの間およびPCR後に起こる。PCR生成物の化学的付着は、PCRプライマー(単数または複数)の5'-改変を介して達成される。また、表面に対するPCR生成物の受動的付着は、例えば、静電的相互作用、ファンデルワールス力および水素結合によって生じ得る。アッセイ生成物、例えば、プライマー伸長生成物は、表面固定化増幅生成物に対するハイブリダイゼーションによって捕捉される。

【0207】

あるいは、前述したように、一般的オリゴヌクレオチド(「ジップコード」オリゴヌクレオチド)を基板上に固定化し得る。増幅生成物は、結合オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションを可能にすることによりジップコード相補配列を付着させている。増幅生成物は同時にアッセイ生成物を捕捉する。ジップコードオリゴヌクレオチドは、例えば、RNA、LNA(PNA)、または、その他の改変核酸誘導体を、全体として、または、部分的に、その配列内で用いることによって形成されたハイブリッドの安定性が、顕著に改善され得るように修飾され得る。ジップコードとおよび増幅生成物の対応領域も、形成されたハイブリッドの反応基を介して、互いに恒久的に架橋結合され得る。別の実施形態では、一般ジップコードオリゴヌクレオチドが基板上に固定化される。増幅生成物の1本鎖は、一端で、1本鎖突出配列を有するように設計されている。PCRまたは他の任意の増幅法の後、ハイブリダイゼーションによる捕捉は、一部は、表面のジップコードに対して相補的であり、他の一部では、増幅生成物の標的鎖のさらなる突出配列に対して相補的な配列を有する第3のオリゴヌクレオチドによって仲介される。従って、表面では、増幅生成物とジップコード配列との間の接触を仲介することにより形成されたハイブリッドはさらに、標的鎖を、例えば、リガーゼ反応を使用することによって表面に恒久的に結合するのに使用され得る。共有結合付着は、適切な緩衝液条件下で、第2鎖および仲介オリゴヌクレオチドを洗い流すことによって、単一鎖増幅生成物の単離を可能にする。基板における1本鎖単離は、例えば、固定化標的DNA内部に、プライマー伸長反応によってSNP部位を同定する反応をその後に実行され得る。アッセイ生成物は最終的には捕捉され、固定化標的DNAとハイブリダイズされることによって分析に適切な状態にする。

【0208】

(c. タンパク質およびペプチドの捕捉)

タンパク質またはペプチドがアッセイされる実施形態では、タンパク質およびペプチドは、例えば、表面付着オリゴヌクレオチド、タンパク質、および、表面固定化酵素に対するハイブリダイゼーションまたは他の相互作用機構を介して捕捉され得る。表面付着オリゴヌクレオチドまたはDNAマイクロアレイに対するタンパク質相互作用の研究は、遺伝子発現、複製、および、組換えの制御および調節について知るために重要である(Brockman, J.ら(1999)Journal of the American Chemical Society 121:8044-8051)。さらに、タンパク質がどのようにしてある種のオリゴヌクレオチド配列を認識するのかを理解することは、治療タンパク質の発現を調整するために使用され得る薬剤を設計するに当たって有用である。Nelson, R.W.ら(1999, Anal. Chem. 71:2858-2865)は、エピトープ標識タンパク質の一つの方法を記載している。この方法では、エピトープタグはヒスチジンであり、次いで、この標識タンパク質を表面固定化Ni²⁺キレー

10

20

30

40

50

トに捕捉する。この技術では、 Ni^{2+} キレート化表面に結合することによって捕捉されたのはヒスチジンタグである。この Ni^{2+} キレート化表面は、 Ni^{2+} 緩衝液を、ニトリロ三酢酸誘導化表面に流すことによって形成される。別の実施形態では、タンパク質は、表面固定化酵素に対するその結合親和性によって表面に捕捉され得る (Nelson, R. W. ら (1997) *Anal. Chem.* 69: 4369 - 4374; Nelson, R. W. ら (2001) *Anal. Chem.* 73: 1 - 7; Nedelkov, D. ら (2000) *Analytica Chimica Acta* 423: 1 - 7)。酵素上の一次アミンは、N-ヒドロキシスクシニミドアミノプロピルカルボジイミドによって活性化された表面に共有的に付着し得る。MacBeath, G. ら (2000, *Science* 289: 1760 - 1762) は、本発明で使用するのに適した別のプロセスを記述している。その方法では、タンパク質は表面に固定化され、タンパク質チップを形成し得る。この実施形態では、タンパク質上のリシン残基は、例えば、シップの塩基形成によるアルデヒド面に対して共有的に付着し得る。この表面固定化タンパク質に対する他のタンパク質および小型分子の捕捉による相互作用は、タンパク質機能に関する重要な情報ならびに小型分子の可能な治療性に関する情報をもたらし得る (Lin, S. ら, (2000) *Anal. Chem.* 72: 2635 - 2640)。

10

20

30

40

50

【0209】

(d. 小型有機分子の捕捉)

小型有機分子とタンパク質間の相互作用は、タンパク質機能を明らかにするばかりでなく、小型分子が、良好な薬剤候補となり得る可能性を発見する点でも重要な場合がある (MacBeath, G. ら (2000), *Science* 289: 1760 - 1762; Lin, S. ら (2000) *Anal. Chem.* 72: 2635 - 2640)。小型有機分子とタンパク質の相互作用は、目的のタンパク質を表面に固定化することによって研究され得る。この実施形態では、タンパク質上のリジン残基を例えれば、シップの塩基形成を介してアルデヒド面に、または、チオウレア結合形成を介してイソチオシアネート表面に共有的に付着させることが可能である。

【0210】

(e. 炭水化物の捕捉)

複雑な炭水化物 (例えば、糖タンパク質、糖脂質およびプロテオグリカン) は、細胞表面上に位置する。多くの場合、これらの炭水化物は、抗原に対する宿主の受容体である。宿主の受容体 / 抗原相互作用を明らかにすることは、感染症メカニズムのより良い理解をもたらすだけでなく、そのような病気を予防し得る薬物製造の機会を作り出すことにもなる。例えば、Wang, D ら (Wang, D ら 2002, *Nature* 20, 275 - 281) は、表面固定化炭水化物含有抗原に対する抗体反応を研究するために、炭水化物マイクロアレイ製造の本発明の使用に適切な方法を記述する。これらのマイクロアレイは、ニトロセルロース被覆ガラススライド上に炭水化物抗原を点状滴下することによって形成される。炭水化物抗原は、非共有的相互作用を介してこのニトロセルローススライド上に固定化される。

【0211】

(4. 増幅)

核酸標的を検出、同定または特徴付けするように設計された反応を実施する前に、その拡散標的の少なくとも一部をまず増幅する必要がある場合もある。増幅は、例えば、PCR および / または LCR 等により、当該分野で公知の方法に従って実施され得る。

【0212】

(5. 多型の検出)

対立遺伝子改変体の有無を確定する方法は、センス鎖、または、アンチセンス鎖の同じ位置を利用し得る。一般に、これらの方法は、配列特異的ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、プローブおよびプライマーに基づく。当業者には周知の、ある核酸配列内の一つの特定のヌクレオチドを特定する任意の方法、または、ある核酸配列内の一つの特定のヌクレオチドの本体を確定する任意の方法が適用可能である。いくつかのそのような一般

的核酸検出アッセイが知られている（例えば、米国特許第6,030,778号を参照のこと）。

【0213】

一ヌクレオチド多型を検出する方法も提供される。一ヌクレオチド多型は、不变配列領域によって隣接される変動部位を構成するので、その分析は、変動部位に存在する單一ヌクレオチドの特定しか必要とせず、従って、各患者について全遺伝子配列を決定する必要はない。このような一ヌクレオチド多型の分析を促進するためにいくつかの方法が開発されてきた。

【0214】

（6. 反応生成物の分析）

（a. 質量分析）

核酸はまた、検出法およびプロトコル、特に、質量分析に依存するものによっても分析され得る（例えば、米国特許第5,605,798号、同第6,043,031号、同第6,197,498号および国際特許出願番号WO96/29431、同時係属米国出願番号08/617,256、同時係属米国出願番号08/744,481、米国出願番号08/990,851、国際PCT出願番号WO98/20019を参照のこと）。これらの方法は自動化され得る（例えば、同時係属米国出願番号09/285,481を参照のこと、これは自動化プロセスラインを記述する）。本発明において分析法の中で特有なものは、検出に質量分析法を備えたプライマーオリゴヌクレオチド塩基伸長反応（Mass EXTEND（登録商標））を含むもの（例えば、米国特許第6,043,031号および同6,197,498号、特許出願番号09/287,681、同09/287,682、および、同09/287,679、国際PCT出願番号PCT/US97/20444（WO98/20166）を参照のこと）であって、米国特許第5,900,481号、同6,024,925号、同6,074,823号、出願番号08/746,055号、同08/786,988号、同08/933,792号、同08/746,055号および同08/786,988号に基づく；米国出願番号09/074,936号および公開国際PCT出願番号PCT/US97/20195（WO98/20020）を参照のこと）。

【0215】

分析を質量分析、特にMALDI-TOF-MSを用いて行う場合、ナノリットル容量のサンプルを、得られるスポットが、レーザースポットのサイズとほぼ同じか、それよりも小さくなるようにロードする。このことが達成された場合、質量分析の結果は定量的になることが判明している。得られた質量スペクトルのピーク下面積は濃度に比例する（正規化され、かつ、背景に対して補正された場合）。このようなチップの調製および使用法が米国特許第6,024,925号、同時係属米国出願番号08/786,988号、同09/364,774号、同09/371,150号および同09/297,575号に記述されている；また、国際PCT出願番号PCT/US97/20195（WO98/20020）を参照のこと。これらの分析を実行するためのチップおよびキットは、SEQUENOM（San Diego, CA）からMassARRAY（登録商標）として市販されている。MassARRAY（登録商標）は、酵素性プライマー伸長反応の忠実性を、小型化アレイおよびMALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離飛行時間型）質量分析法と組み合わせて、結果を急速に送達するようにしている。この装置は、標識なしに、遺伝子改変体に関するDNAフラグメントサイズにおける一塩基変化を正確に識別する。

【0216】

（1. 反応サンプルの調整）

例えば、ハイブリダイズした核酸のMALDI-TOF-MS分析を実施するには、サンプルを脱塩し、最終的に、生体分子の分析に干渉する恐れのある他の成分を全て除去することが必要である。このような調整は、塩類、緩衝成分および試薬や、固相支持体に結合していない生成物を全て洗い去ることによって実施され得る。

10

20

30

40

50

【0217】

(2. マトリックス)

一旦表面への生体分子の捕捉が起こり、脱塩および調整が完了した場合、マトリックスを表面に加え、M A L D I - T O F 質量分析による分析を可能とする。代表的には、1 nLから100 nLのマトリックスを表面に添加する。オリゴヌクレオチドには、3 - ヒドロキシピコリン酸マトリックスが使用され得る。マトリックス組成物は、例えば、10 %アセトニトリル：水中の300 mM 3 - ヒドロキシピコリン酸、35 mM クエン酸ジアンモニウムである。タンパク質、ペプチドおよび小型分子には、シナピン酸（50 mM シナピン酸、1 : 2 アセトニトリル / 水に1.5 % トリフルオロ酢酸 v / v を添加したもの）、2,5 - デヒドロキシ安息香酸（2,5 - デヒドロキシ安息香酸 + 10 % 5' - メトキシサルチル酸）、および、 - シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸（約50 mM、1 : 2 アセトニトリル / 水に1.5 % トリフルオロ酢酸 v / v を添加したものに溶解）、のようなマトリックスが使用され得る。このマトリックスを、例えば、G e S i m ナノ分注器、C a r t e s i a n 分注器、微小滴下ナノ分注器およびR o b o d e s i g n ピンツールを用いてナノ投与し得る。

【0218】

(3. 多重化)

多重化法は、ある特定の遺伝子または数種の遺伝子における1個を越える多型領域について同時検出を可能とする。基板上の単一部位における多重化は、各組の特異的アッセイ反応の生成物として、異なる固定化捕捉オリゴヌクレオチドを使用することによって達成され得る。

【0219】

別の実施形態では、多重化は、それぞれが固定化された1つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドを有し、かつ、一つの共通の試薬チャネルを共有する、いくつかの部位を用いて実行が可能である。この捕捉オリゴヌクレオチドの組は各部位について異なる。ある特定の部位では同一の捕捉オリゴヌクレオチドが使用されてもよいし、あるいは、アッセイ生成物が共通の配列を共有しているか否かに依存して異なる捕捉ヌクレオチドがあってもよい。多数の種々のアッセイ反応が試薬チャネル内で実行が可能であり、かつ、その生成物は、捕捉オリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有しているので、基板上の特定の位置に仕分けされる。この多重化用配置の利点は、アッセイ生成物を検出するのに限られた数の質量値を使用することが可能であること、および、それらの値が、種々の部位のそれぞれに結合される生成物に対して同一であってもよいことである。

【0220】

(b. 蛍光依存分析法)

生体分子の蛍光依存検出のための多くのシステムが知られている。このようなシステムを、本明細書に提供される方法における反応生成物の分析・検出のために用いてもよい。

【0221】

以下の実施例は、例示の目的のためにのみ含まれており、本発明の範囲を限定することを意図しない。本明細書で提供される方法の実施・生成物の展開は、別様に表示しない限り、従来技術の範囲にある、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組み換えDNA、および、免疫学に関する従来の技法を用いる。例えば、S a m b r o o k , F r i t s c h , およびM a n i a t i s による「M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 」、第2版、C o l d Spring Harbor Laboratory Press、1989；「D N A C l o n i n g 」、IおよびII巻、D . N . C l o v e r 編、1985；「Oligonucleotide Synthesis」、(M . J . G a i t 編、1984)；M u l l i s ら、米国特許第4,683,195号；「N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n 」、(B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s 編、1984)；「T r a n s c r i p t i o n a n d T r a n s l a t i o n 」、B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s 編、1984；「C u l t u r e o

10

20

30

40

50

f Animal Cells)」、(R. I. Freshney, Alan R. Liess, Inc., 1987); 「Immobilized Cells and Enzymes」(IRL Press, 1986); 「A Practical Guide To Molecular Cloning」(B. Perbal, 1984); 「The treatise, Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc., New York); 「Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells」(J. H. MillerおよびM. P. Calos編、1987、Cold Spring Harbor Laboratory); 「Methods in Enzymology」(Wuら編、1987と1988年卷、Cold Spring Harbor Laboratory); 「Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology」(MayererおよびWalker編、Academic Press, London, 1987); 「Handbook of Experimental Immunology」(D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、1986); 「Manipulating The Mouse Embryo」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照。10

【実施例】

【0222】

(実施例1)

(血液サンプルからのDNA単離)

血液からDNAを単離するための例示の方法を、必要に応じて採用してよい工程を含めて下記に詳述する。20

【0223】

(細胞溶解)

EDTA全血10mlを、2000×gで15分以下遠心した。1-2mlの軟膜を15mlチューブに移送した。9mlの溶解赤血球(RCL)をチューブに加え、チューブを、赤血球塊が無くなるまで激しくボルテックスし、室温で10分インキュベートした。インキュベーション中チューブを一度反転し、その後、2000×gで10分遠心した。上清を、バイオハザード容器に注入した。目に見える白血球ペレットと100-200μlの残留液が後に残された。チューブを試験管ラックに並べ、白血球をこの残留上清に再懸濁した。5mlのRCL洗浄体を白血球に加え、チューブを反転し白血球を再懸濁した。チューブを2000×gで10分遠心し、上清をバイオハザード容器に注入した。目に見える白血球ペレットと100-200μlの残留液が後に残された。チューブを試験管ラックに並べ、白血球をこの残留上清に再懸濁した。4.5mlの溶解白血球(WCL)をチューブに加え、完全に混合するまで上下にピペットイングした(移送ピペットにて)。典型的にはインキュベーションは必要ではなかった。30

【0224】

(タンパク質沈殿)

タンパク質を沈殿させるには、タンパク質沈殿溶液2mlを細胞溶解物に加え、高速で20秒間激しくボルテックスし、タンパク質沈殿溶液と細胞溶解物とを均等に混合した。この混合液を3000×gで10分遠心した。沈殿したタンパク質は、締まった、暗褐色のペレットを形成する。DNAを含む上清は透明でなければならない。40

【0225】

(DNA沈殿)

DNAを含む上清を、100%イソプロパノール6mlを含む、清潔な15mlチューブに注入した。このサンプルを、DNAの白い糸が見えるようになるまで、穏やかに反転して混合した。各サンプルを、DNAの有無に関して視覚的にチェックし、サンプルのサイズを推定した。比較的小さい場合には、DNA水添加の工程1においてTEバッファーをあまり要しなかった。サンプルを、2000×gで3分遠心した。DNAは、小さな白50

いペレットとして見えた。上清は、アルコール廃棄物容器に注ぎ、チューブはペーパータオルの上でたたいて余分のアルコールを除去した。70%エタノール：水5mLを加え、チューブを数回反転してDNAペレットを洗浄した。チューブを2000×gで1分遠心した。エタノールを注意深くアルコール廃棄物容器に注いで除いた。ペレットはこの段階ではゆるくなっているかも知れないので、ゆっくりと注ぎ、ペレットを見守る。チューブの液体を清潔な吸収紙で吸収し、DNAを、チューブを10分間反転させて乾燥させた。

【0226】

(DNA水和)

DNAを再度水和させるために、1×TE 1000μlを加え、室温で一晩放置して再度水和させた。次に、DNAを、サンプルグループ毎に適正な蓋のついたラベル付きチューブにピペットで移した。水和したDNAに凝固塊が見られる場合には、下記の精製工程を実施した。DNAサンプルは、2-8の冷蔵庫に、民族集団、性別、および、年齢で分けて保存した。

10

【0227】

(水和DNAの精製)

水和DNAの中に凝固塊がある場合には、再水和工程の後で、DNAを再度単離した。新たなWCL 5mLを加え、65で30分から1時間インキュベートした。このサンプルを室温に冷却し、タンパク質沈殿液1mLを、この溶解細胞に加えた。タンパク質沈殿プロトコルを繰り返した。

20

【0228】

(実施例2)

(表面の化学的誘導体化)

チップを下洗いするために、シリコーン面を、クロム酸溶液に12時間浸し、その後DI水で3度洗浄した。

【0229】

(チップのケイ素化)

1%APTMS / 95%アセトン：水v/vを調製するために、アミノプロピルトリメトキシラン1.6mLを、95%アセトン：水158.4mLと混ぜ、チップに加え、室温(RT)で攪拌しながら5分間反応させた。次に、この表面をメタノール(5×)で灌ぎ、その後アセトン(5×)で灌いだ。次に、表面を110で25分間真空オーブンに置いた。

30

【0230】

(57mM 1,4フェニレンジイソチオシアネートによる第1回活性化)

1,4フェニレンジイソチオシアネート1.76gを、10%ピリジン：DMF160mLに溶解し、その溶液を表面に与え、軌道回転攪拌しながらRTで2時間反応させた。表面を、手動で攪拌しながらRTで、メタノール(3×)で、次にアセトン(3×)で洗浄した。

40

【0231】

(アミンデンドリマー工程)

10%ピリジン：DMFに溶解させた1.25%v/vスターバーストデンドリマー世代4.0(64アミノ基)を、2mLのデンドリマーを10%ピリジン：DMF158mLと結合させて生成した。この溶液をチップに加え、RTで軌道回転攪拌しながら一晩(例えは、>5時間)反応させた。表面をエタノール(3×)と水(3×)で洗浄した。

40

【0232】

(100mM 1,4フェニレンジイソチオシアネートによる第2回活性化)

1,4フェニレンジイソチオシアネート3.2gを10%ピリジン：DMF160mLに溶解し、チップに加え、攪拌しながらRTで3時間反応させた。表面をメタノール(3×)で、次にアセトン(3×)で洗浄した。

【0233】

(0.1M 4-ニトロフェニルイソチオシアネートによるアミンキャッピング)

50

4.8 g の 4 - ニトロフェニルイソチオシアネートを、10% ピリジン : D M F 1 6 0 mL に溶解し、この溶液をチップに加え、軌道回転攪拌しながら R T で 1 時間反応させた。次に、表面をメタノール (3×) とアセトン (3×) で洗浄した。

【 0 2 3 4 】

(オリゴヌクレオチドスポット形成)

5' - アミノ修飾オリゴヌクレオチドの 25 μM ホルムアミド溶液を、ピンツールスポット形成具を用いて表面上にスポット形成した。点綴した容量は約 50 - 100 nL であった。96 オリゴヌクレオチドアレイから成るパターンが形成された。表面を二日間放置した。次に、未結合のオリゴヌクレオチドは、5 × S S C / 50% ホルムアミドバッファー液で 30 分 60 で洗い流し、脱イオン水で 60 で 30 分で容器へ、次いで R T でアセトンにより洗浄した。

【 0 2 3 5 】

(2%ヘキシラミンによるイソチオシアネートキャッピング)

未反応イソチオシアネートをブロックするために、3.2 mL ヘキシラミンを 10% ピリジン : D M F 1 5 6 . 8 mL と混合し、チップに加え、60 で 1 時間反応させた。次に、表面を R T で 5 × S S C / 50% ホルムアミドで洗浄し (2×) 、その後 R T で D I 水洗浄と 2 回、アセトンによる 1 回の短い濯ぎを行った。次に、チップを、その後使用するまで真空デシケータ中で真空下に保存した。

【 0 2 3 6 】

(実施例 3)

20

(4重 Mass Extend (登録商標) アッセイ)

(A. ハイブリダイゼーションチップ)

図 4 に関連して記述した方法により、背面金属箔シリコンチップ、20 × 30 mm で厚さ 700 μm を用意した。この基板に、4 種の異なる捕捉オリゴヌクレオチドを付着させた。すなわち、囊胞性線維症に関連するヒト遺伝子内多型部位の 4 種の伸長プライマーに対して相補的なオリゴヌクレオチドである。各チップは、12 レーンで、それぞれに 8 個の別々の標的部位のあるパターンを持つ。4 種の捕捉ヌクレオチドのそれぞれが、各レーンに 2 回重複として存在する。4 種の捕捉オリゴヌクレオチドの配列は下記の通り。C F 3 6 5 9 - 3 - c o m : 5' - c a a g t c a a c c a a c c - 3' - X - N H 2 (配列番号 1) 、 C F 5 0 8 d e l F - c o m : 5' - g g t g t t t c c t a t g a t g - 3' - X - N H 2 (配列番号 2) 、 C F 7 1 1 + 1 - c o m : 5' - t c a t c a a a t t g t t c a g - 3' - X - N H 2 (配列番号 3) 、および、 C F 6 2 1 - 2 - c o m : 5' - t t a t a a a t c a a a c t a a a c a - 3' - X - N H 2 (配列番号 4) 。各配列は、3' アミノ末端修飾 (N H 2 = 3' - アミノ - C 7 修飾因子、 G l e n R e s e a r c h , S t e r l i n g , V A) を介して、かつ、1 個のヘキサエチレングリコール単位 (X) を隔てて、シリコーン表面に付着される。チップ表面の各部位は、600 - 800 μm の直径と、15 から 100 f m o l e / m m² のオリゴヌクレオチドの表面密度を持つ。

30

【 0 2 3 7 】

(B. 多重化 P C R と脱リン酸化)

40

4 重 P C R を、実施例 1 に従って調製したゲノム D N A と下記の組のプライマーを用いて、標準サーマルサイクラーの上で標準プロトコルに従って実行した。エキソン 5 の 1 3 2 b p のアンプリコンに対して C F X 4 - F 3 c c a a a g c a g t a c a g c c t c t (配列番号 5) と C F X 4 - R c g a t a c a g a a t a t a t g t g c c a t g (配列番号 6) 、 C F X 5 - F 5 g c t g t c a a g c c g t g t t c t a (配列番号 7) と C F X 5 - R 5 g t a t a a t t t a t a a c a a t a g t g c c (配列番号 8) ; エキソン 10 の 2 2 5 b p のアンプリコンに対して C F X 1 0 - F 7 g a t t a t g g g a g a a c t g g a g (配列番号 9) と C F X 1 0 - R g t g t g a a g g g t t c a t a t g c (配列番号 10) ; および、エキソン 19 の 2 4 0 b p のアンプリコンに対し

50

て C F X 1 9 - F 2 c c a a g t g a c a a a t a g c a a g t g t (配列番号 11) と C F X 1 9 - R 2 a c g t g t g a a t t c t c a a t a a t c a t a (配列番号 12) のプライマー。 P C R 反応は、全体容量 5 μ l の 1 \times P C R バッファー (Q u i a g e n , V a l e n c i a , C A) に対して、各 P C R プライマー 5 0 n M 、各 d N T P 5 0 0 μ M の濃度で、 5 m M の M g C l₂ と 0 . 1 単位の H o t S t a r T a q ポリメラーゼで行った。 P C R 反応の後、 2 μ l のテルモセケナーゼバッファー (P h a r m a c i a , P e a p a c k , N J) 溶解液中で、エビアルカリフォスファターゼ (S A P) 0 . 3 単位で処理し、 3 7 度で 2 0 分、次いで 8 5 度で 5 分インキュベートした。

【 0 2 3 8 】

(C . M a s s E X T E N D 反応およびチップ基板上でのハイブリダイゼーション) 4 重 M a s s E X T E N D 混合液を、下記のプライマーの組み合わせを用い標準プロトコルに従って調製した。すなわち、 C F 3 6 5 9 - 3 g g t t t g g t g a c t t g (配列番号 13) 、 C F 5 0 8 d e l F c a t c a t a g g a a a c a c c a (配列番号 14) 、 C F 7 1 1 + 1 c t g a a c a a a t t t g a t g a a (配列番号 15) 、および、 C F 6 2 1 - 2 t g t t t a g t t t g a t t t a t a a g a a g (配列番号 16) である。最終濃度は、 1 \times テルモセケナーゼバッファー (P h a r m a c i a) において、 d d N T P および d N T P に対して 5 0 μ M 、各 M a s s E X T E N D プライマーに対して 6 0 0 n M 、および、テルモセケナーゼ 0 . 0 6 3 U / μ l であった。 M a s s E X T E N D 混合液を、実施例 3 B で得られた P C R / S A P 反応液と 2 : 7 の比で混合した。次に、この反応混合液をハイブリダイゼーションチップに塗布した。二つの方法のサーマルサイクル処理を実行した。一つの実施態様では、チップ全体を、全体容量 1 2 5 μ l の F r a m e S e a l (商標) セル (M J R e s e a r c h , W a l t h a m , M A) で被い、長いサイクル時間 (5 5 サイクル当たり約 1 5 0 分、 M J R e s e a r c h) を持つ標準的なインサイチュサーマルサイクルブロックを用いた。別の実施態様では、チップをポリジメチルシロキサンマスク (P D M S) で被い、カートリッジ (図 1 に描かれるものと同様の) に設置し、チップ表面の上に 6 個の 4 μ l および 6 個の 2 μ l チャネルを形成した。チャネルは入口と出口を備える。チップに反応混合液を満たした後、チャネルを封印し、本明細書に記載した高速サーマルサイクラーを用いてサーマルサイクル処理した。典型的サイクル条件は、最初 9 5 度で 2 0 秒、次に 9 5 度で 5 秒間、 5 6 度で 5 秒間、および、 7 2 度で 5 秒間から成る 4 0 - 5 5 サイクルである。冷却・加熱速度は、市販のサーマルサイクラーに比べると極端に高く、 4 5 サイクルに対して合計処理時間 1 5 分となった。両方のセットアップにおいて、チップは室温または 4 度に冷却し、マスクから外し、直接、室温で 5 \times S S C バッファー浴中に入れた。軌道回転攪拌器の上で 5 分間穩やかに振とうした後、 2 回目の 5 \times S S C バッファー洗浄、その後、 7 0 m M クエン酸アンモニウムによる 2 回の洗浄とナノ純粹水による短い 1 回の洗浄を実行した。

【 0 2 3 9 】

(D . マトリックス塗布および M A L D I - T O F M S 分析) 下準備の後、マトリックス液を、チップ上の、ハイブリダイズした標的核酸を備える 9 6 部位に塗布した。水または水 / アセトニトリル 9 : 1 v / v に溶解させた 3 - H P A (3 - ヒドロキシピコリン酸) の 3 0 0 m M 溶液で、 3 2 m M のクエン酸ジアンモニウムを添加させた溶液 2 \times 7 n l を、ミクロドロップ圧電ナノ分注器 (M i c r o d r o p G m b H , N o r d e r s t e d t , ドイツ) によって投与した。結晶化の後、チップを、 M A L D I - T O F M S 標的ホルダーに固定した。手動分析は、 V o y a g e r D E Instrument (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) で実行した。一方、自動化操作は、 B i f l e x M S 装置 (B r u k e r , B r e m e n , ドイツ) で S p e c t r o T Y P E R - R T ソフトウェア (S E Q U E N O M , S a n D i e g o , C A) を用いて行った。

【 0 2 4 0 】

10

20

30

40

50

(実施例4)

(A. 高速サーマルサイクルプロトコルを用いた96ウェルチップ基板におけるPCR)

PCR增幅反応を、本明細書で提供される高速サーマルサイクル処理チップおよび方法を用いて実行した。図4に関連して記述した方法に従って、背面金属化シリコンチップ(20×30mmで厚さ700μm)を調製した。チップの一つを、ジメチルジクロロシランを用いてシラン処理した。次に、チップおよびガスケットを、Triis緩衝液中の市販のプロッキング剤カゼイン(Pierce, Rockford, ILより入手)で、室温で1時間処理した。ガスケットはシリコーンゴム製であり、チップ表面に接着され、基板上に、最大3μl容量の、96個の反応ウェルを形成した。このチップをカートリッジに配置し、本明細書に記述される通りに高速サーマルサイクラーに接続した。PCR混合液を、下の表1に示される通りに調製した。

10

20

30

【0241】

(表1)

【0242】

【表1】

PCR反応混液		作業濃度:
46.72	μL H2O	
8.00	μL 10X PCR緩衝液 (15mM MgCl2)	
6.40	μL 10mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA)	→ 0.8 mg/mL
3.20	μL 25mM MgCl2	→ 2.5mM (緩衝液 MgCl2を含む)
3.20	μL 5mM dNTP's	→ 200μM
3.20	μL 5μM プライマー	→ 200nM
1.28	μL 5 U/μL DNAポリメラーゼ酵素	→ 0.08 U/μL
8.00	μL ゲノムDNA (5ng/μL)	→ 0.05ng/μL
72.0	μL 反応混液の全量	

【0243】

次に、PCR混合液0.5から1.5μlを、チップの各反応ウェル中にロードした。チップを密閉し、80～95℃に加熱した蓋を装着し、以下のようにサイクル処理した。

【0244】

1) ゲノムDNA溶解(1×): 95℃、2分間

2) 配列増幅(40×): 95℃、2秒間

56℃、5秒間

72℃、5秒間

40

高速サイクルPCRに使用した酵素は、Hot Master Taq DNAポリメラーゼ(Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany)であった。使用したPCR緩衝液は、Hot Star Taq緩衝液(Qiagen, Valencia, CA)であった。結果は、PCR反応が、所望の増幅生成物を生成したことを示した。

【0245】

(B. 高速サーマルサイクル処理による12チャネルチップ基板上のPCR)

別の実施形態では、PCR増幅反応を、本明細書に記述される高速サーマルサイクル処理多数チャネルチップを用いて、実施例4Aに記述される通りに行った。図4に関連して記述した方法を用いて、背面金属化シリコンチップ(20×30mmで厚さ700μm)を調製した。チップの一つを、ジメチルジクロロシランを用いてシラン処理した。次に、

50

チップおよびガスケットを、Triis緩衝液中の市販のプロッキング剤カゼイン(Prince, Rockford, ILより入手)で、室温で1時間処理した。PCR反応を、チップのチャネルにロードし、45回のサーマルサイクルを下記のように運転した。

【0246】

- 1) ゲノムDNA溶解(1×) : 95'、2分間
- 2) 配列増幅(45×) : 95'、5秒間
56'、5秒間
72'、5秒間

95' 保持の終了時に、あらかじめ準備した空気(Pecca Products, Janeville, WIから入手したVariAir)のパルスを手動でチップの下面に噴霧した。冷却が、95'から56'まで約1から2秒で起こることが観察された。これは、1秒当たり18.5と39'の範囲の冷却速度に相当する。結果から、PCR反応は、所望の増幅生成物を生成したことが示された。
10

【0247】

(実施例5)

(リボ切断部位を有するジップコードオリゴヌクレオチドのチップに基づいた切断)

本明細書に記述した通り、一般的捕捉配列、すなわち、ジップコードオリゴヌクレオチドの使用は、基本概念の有利な改変であり得る。本実施例は、さらなるジップコード配列を基板上に用いて伸長プライマーを効果的に精製し、かつ、MALDI-MS分析の前に表面上にRNase誘発切断を実行する方法を記述する。
20

【0248】

(ハイブリダイゼーションチップの調製)

背面金属化シリコンチップ(20×30mmで厚さ700mm)を、実施例2に記述した方法を用いて調製した。4種類の異なる捕捉オリゴヌクレオチドを基板に付着させた。配列は、4種類のアドレスまたはジップコード配列に対する相補体であった。各チップは、12レーンで、それぞれ8部位、合計96スポットに相当するパターンを有する。4種の捕捉オリゴヌクレオチドはそれぞれ、各レーンにおいて、2個の反復配列として存在した。4種の捕捉オリゴヌクレオチドの配列は下記の通りである：

```
Seq#6NH2: 5' - tta gct ggt gtg tgg - 3' - X - NH2
(配列番号17);  

Seq#14NH2: 5' - tgc agc agc cat tc - 3' - X - NH
2(配列番号18);  

Seq#15NH2: 5' - ctg gct agt gga tt - 3' - X - NH
2(配列番号No.19); および  

Seq#19NH2: 5' - cgg aga cgc ata ta - 3' - X - NH
2(配列番号No.20)。
```

【0249】

各配列は、3' - 末端アミノ修飾によってシリコーン表面に付着させ(NH2 = 3' - アミノ-C7修飾因子、Glen Research, Sterling, VA)、1個のヘキサエチレングリコール単位(X)のスペースを挿入した。チップ表面の各部位は、直径が600~800μm、オリゴヌクレオチドの表面密度が15~100fmole/mm²であった。
40

【0250】

(ジップコードオリゴヌクレオチドの設計)

以下の3種の配列を、標準的オリゴヌクレオチド合成法を用いて合成し、また、二つの異なる製造元(Fidelity Systems, Inc., Gaithersburg, MDまたは、IDT Inc., Coraville, IA)から購入した。

【0251】

```
1) ribo2(seq6)rU: 5' - cac aca cca gct aaa
(rU)ccc caa tag gct tat cca ag (分子量 = 10624D)  
50
```

a、配列番号21) ;

2) Hyb15: 5' - aat cca cta gcg ag (分子量 = 4257D)

a、配列番号22)、および

3) CF621 (seq19) rU: 5' - tat atg cgt ct c cgt
gtt tag (rU) tt tga tt ata aga ag (分子量 = 1721Da、配列番号23)。

配列Hyb15は、14マーのデソキシリボオリゴヌクレオチド(desoxyribonucleotide)であり、基板の捕捉配列Seq#15NH₂にハイブリダイズするように設計されている。その他の2種のオリゴヌクレオチドもそれぞれ、デソキシチミジンがリボヌクレオシドアログウリジン(rU)によって置換される単一部位を有する。溶液中では、これらのDNA/RNAキメラは、酵素RNaseA(Sigma/Aldrich, St. Louis, MO)で処理すると、そのリボヌクレオチドの所で速やかに切断される。rib02(seq6)rUにおける切断生成物は、以下：

フラグメント1: 5' - cac aca cca gct aa (rU) - 3' リン酸 (配列番号24) 分子量 = 4885.2Da、および、

フラグメント2: 5' - ccc aat agg ctt atc caa g (配列番号25) 分子量 = 5756.8Da

CF621 (seq19) rUにおける切断生成物は：

フラグメント1: 5' - tat atg cgt ct c cgt gtt tag (rU) - 3' リン酸 (配列番号26) 分子量 = 6804Da および、

フラグメント2: 5' - ttt gat tta taa gaa g、分子量 = 4934Da (配列番号No.27)

完全長オリゴヌクレオチド、rib02(seq6)rUおよびCF621(seq19)rUの5'末端、および、対応するフラグメント1を、基板上において、捕捉オリゴヌクレオチドSeq#6NH₂またはSeq#19NH₂を持つ部位とハイブリダイズするように設計した。

【0252】

(ハイブリダイゼーション)

4種の異なる捕捉配列を有する基板をFrameSealTMセル(MJ Research, Waltham, MA)で覆った。オリゴヌクレオチド、Hyb15、CF621(seq19)rUおよびrib02(seq6)rUの1μM混合液を、0.1%SDSと25μg/mL BSAを含む5×SSC緩衝液中に調製した。125μl溶液を、基板上のFrameSealセルに加え、蓋で覆った。基板を95℃で5分間、35℃で20分間、95℃で2分間、そして再び35℃で30分間インキュベートした。チップを4℃まで冷却し、室温で5×SSC緩衝液浴中に直接配置した。軌道回転攪拌器の上で5分間穏やかに攪拌した後、2番目の5×SSC緩衝液洗浄を実施し、その後、70mMクエン酸アンモニウムによる2回の洗浄とナノ純粹水による短い1回の洗浄を実行した。

【0253】

(RNaseAによる切断およびMALDI-MS分析)

捕捉配列Seq#14NH₂を基板上に有する全部で24個のスポットに、オリゴヌクレオチドrib02(seq6)rUの1μM溶液を投与した(100nL、または、水に溶解した100fmole、Geminiナノ分注器でスポット投与)。この2種のオリゴヌクレオチドはハイブリダイズしないので、RNaseAによる効果的な切断に対する内部コントロールとして使用した。チップをカートリッジ内に配置し、本明細書に記述する通りの、チップ用高速サーマルサイクラーに接続した。基板の背面金属層に制御電流を流すために、チップ表面を約50℃に加熱した。ナノ純水中の0.001U/μlのRNaseA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)溶液を調製し、チップを50℃に維持しながら投与した。このサーマルサイクラーをソレノイドナノ分注器(Cartesian Technologies, Irvine, CA)に接続した。装置は、基板の、60個の中央スポットそれぞれに3×30nLを投与した。溶液は急速に

10

20

30

40

50

、約10秒間で蒸発するので、従って、RNase Aによる切断のための全反応時間は30秒であった。基板をRTに冷却し、カートリッジから外した。マトリックス液を、チップ上のハイブリダイズした標的核酸を有する96部位に投与した。32mMクエン酸ジアンモニウムの添加物を含む、3-HPA(3-ヒドロキシピコリン酸)の300mM水溶液 $2 \times 7 nL$ を、ミクロドロップ圧電分注器(Microdrop GmbH, Nordertstedt, Germany)を用いて投与した。結晶化の後、チップをMALDI-TOF MS標的ホルダーに固定し、Biflex MS装置(Bruker, Bremen, Germany)上で、SpectroTYPER-RTソフトウェア(SEQUNOM, Inc., San Diego, CA)を用いて、完全自動化運転によって分析した。

10

【0254】

代表的には、その方法は、強烈なMALDI-MS信号および内部対照(捕捉配列Seq #14NH2上のrib o 2(seq 6)rU、未切断の完全長オリゴヌクレオチドに対する主要信号は4885.2m/zおよび5756.8m/z、小信号は10624m/z)に対して推定70%の切断をもたらした。捕捉配列Seq #15NH2上に14マーのHyb 15を有するスポットは、4257m/zで強力な単一ピークを示し、効果的なハイブリダイゼーションおよびサンプル調製を示した。捕捉配列Seq #6NH2またはSeq #19NH2を有するスポット由来の信号は、非効果的なハイブリダイゼーションのために弱かった。しかし、この信号は依然としてリボヌクレオチドにおける効果的な切断を示す。完全長オリゴヌクレオチドは通常検出されない。信号は、配列rib o 2(seq 6)rUの切断においては、4885.2でフラグメント1に、5756.8m/zでフラグメント2に一致する。または、配列CF621(seq 19)rUの切断においては、6804m/zでフラグメント1に、4934m/zでフラグメント2に一致する。

20

【0255】

当業者には改変は明白であるので、本発明は、添付した特許請求の範囲によってのみ限定されることが意図される。従って、添付した特許請求の範囲内に含まれる、全ての改変、変更、または、等価的配置および導入は、本発明の範囲内であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0256】

30

【図1】図1は、本発明の基板アセンブリの分解斜視図である。

【図2】図2は、部分的に組み立てられた基板アセンブリの斜視図である。

【図3】図3は、基板アセンブリを用いてサンプル物質を受容する標的位置を備えた基板の平面図である。

【図4】図4は、図3に示した基板の側面図であり、基板の底面における抵抗性コーティングを示す。

【図5】図5は、図1に示した基板アセンブリのカートリッジ基盤の斜視図である。

【図6】図6は、図5の直線6-6に沿って得られたカートリッジ基盤の断面模式図であり、カートリッジ基盤に取り付けた基板を示す。

【図7】図7は、図1に示した基板アセンブリのカートリッジカバーの斜視図である。

40

【図8】図8は、図1に示した基板アセンブリの反応封入部材を表す第1実施態様の斜視図である。

【図9A】図9Aは、図8の直線9-9に沿って得られた、図8の反応封入部材の断面図であり、流入ポートおよび流出ポートをつなぐフローチャネルを示す。

【図9B】図9Bは、図9Aの直線10-10に含まれる、反応封入部材の一部の拡大図である。

【図10】図10は、図8および9Aに示した、反応封入部材のフローチャネルの断面図である。

【図11】図11は、図8に示した反応封入部材の平面図である。

【図12A】図12Aは、対応基板の各標的位置に対する流入ポートを含む、反応封入部

50

材の第2実施態様の平面図である。

【図12B】図12Bは、流入ポートおよび流出ポートを備えるフローチャネルを含む、反応封入部材の別態様の平面図である。

【図13】図13は、図12Aに示した反応封入部材の側面図である。

【図14】図14は、図1に示した基板アセンブリにおいて配置される、基板と並列された反応封入部材の側面図である。

【図15】図15は、図1に示した基板アセンブリ中の反応封入部材を支持する、反応封入部材背面プレートの斜視図である。

【図16】図16は、図15の直線16-16に沿って得られた反応封入部材背面プレートの断面図である。

【図17】図17は、基板アセンブリの断面模式図であり、同図において、流入ポートを流出ポートに接続するフローチャネル内に基板の一列の標的部位が配置されているフローチャネルが示される。

【図18】図18は、基板アセンブリの断面模式図であり、それぞれ、基板の対応する標的部位に整列される複数の流入ポートを示す。

【図19】図19は、図1の基板アセンブリを用いて生物学的サンプルを処理するのに使用される基板処理機を示す。

【図20】図20は、基板アセンブリの断面模式図であり、中空密閉ペンを用いて、反応封入部材の流入ポートおよび流出ポートを密閉する第1密閉法を示す。

【図21】図21は、基板アセンブリの断面模式図であり、ウェルを締め付け封鎖する力を用いて反応封入部材の流入・流出ポートを密閉する、別の密閉法を示す。

【図22】図22は、基板アセンブリの断面模式図であり、ウェル開口部を被うプレートを用いて反応封入部材の流入・流出ポートを密閉する、別の密閉法を示す。

【図23】図23は、例えば、PCR過程の間に、基板にサーマルサイクルを施すのに使用される、サーマルサイクラーの模式図である。

【図24】図24は、基板を加熱するのに使用される電気接点の模式図である。この接点は、基板と接触する上先端部を有するポゴピンを含む。

【図25A】図25Aは、図23のサーマルサイクラーの熱プローブの第1実施態様を示し、ここで、この熱プローブは基板の温度を測定する。

【図25B】図25Bは、図23のサーマルサイクラーの温度プローブの第2実施態様を示す。

【図26】図26は、サーマルサイクラーの各種要素の斜視図である。

【図27】図27は、サーマルサイクラーの、電気接点インターフェースの模式図である。

【図28】図28は、基板上の標的部位を試薬に暴露するために、基板アセンブリの一つの流入ポート中に配置された試薬を示す。

【図29】図29は、基板上の標的部位を試薬に暴露するために、基板アセンブリの複数の流入ポート中に配置された試薬を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Lin, Chao
Opalskey, David
Heaney, Paul
Bruce, Phillip
Griswold, Charlie
Maczuszenko, Andrzej
Walker, Sheila
Wörl, Ralf

<120> METHODS AND DEVICES FOR PERFORMING
CHEMICAL REACTIONS ON A SOLID SUPPORT

10
<130> 24736-2064PC
<140> Not yet assigned
<141> Herewith
<150> 60/372,711
<151> 2002-04-11
<150> Not yet assigned
<151> 2003-03-24

<160> 27
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

20
<210> 1
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Capture oligonucleotide CF3659-3-com

<221> misc_feature
<222> 16
<223> n = hexaethyleneglycol

<221> misc_feature
<222> 17
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 1
caagtcaacc aaacccnn

17

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Capture oligonucleotide CF508delf-com

<221> misc_feature
<222> 17

30

<223> n = hexaethyleneglycol
<221> misc_feature
<222> 18
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 2
ggtgtttcct atgatgnn 18

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Capture oligonucleotide CF711 + 1-com 10

<221> misc_feature
<222> 18
<223> n = hexaethyleneglycol

<221> misc_feature
<222> 19
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 3
tcatcaaatt tgttcagnn 19

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Capture oligonucleotide CF621-2-com

<221> misc_feature
<222> 20
<223> n = hexaethyleneglycol

<221> misc_feature
<222> 21
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 4
ttataaaatca aactaaacan n 21

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Primer CFX 4-F3

<400> 5
ccaaaggagt acagcctct 19

<210> 6
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer CFX 4-R

<400> 6
cgatacagaa tataatgtgcc atg 23

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer CFX 5-F5 10

<400> 7
gctgtcaagc cgtgttcta 19

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer CFX 5-R5

<400> 8
gtataattta taacaatagt gcc 23

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Primer CFX 10-F7

<400> 9
gattatggga gaactggag 19

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer CFX 10-R

<400> 10
gtgtgaaggg ttcatatgc 19 30

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer CFX 19-F2

<400> 11

ccaagtgaca aatagcaagt gt	22
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer CFX 19-R2	
<400> 12	24
acgtgtgaat tctcaataat cata	
<210> 13	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer CF3659-3	
<400> 13	15
ggtttggtg acttg	
<210> 14	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer CF508delf	
<400> 14	17
catcatagga aacacca	
<210> 15	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer CF711 + 1	
<400> 15	18
ctgaacaat ttgatgaa	
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer CF621-2	
<400> 16	23
tgttagttt gatttataag aag	
<210> 17	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

```

<220>
<223> Capture oligonucleotide Seq#6NH2

<221> misc_feature
<222> 15
<223> n = hexaethyleneglycol

<221> misc_feature
<222> 16
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 17
ttagctggtg tgtgnn                                16

<210> 18
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Capture oligonucleotide Seq#14NH2

<221> misc_feature
<222> 15
<223> n = hexaethyleneglycol

<221> misc_feature
<222> 16
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 18
tgcagcagcc attcnn                                16

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Capture oligonucleotide Seq#15NH2

<221> misc_feature
<222> 15
<223> n = hexaethyleneglycol

<221> misc_feature
<222> 16
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 19
ctcgcttagtg gattnn                                16      30

<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Capture oligonucleotide Seq#19NH2

<221> misc_feature

```

```

<222> 15
<223> n = hexaethyleneglycol

<221> misc_feature
<222> 16
<223> n = 3'-Amino-C7 modifier

<400> 20
cggagacgcataatann                                16

<210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 21
<223> Synthetic oligonucleotide ribo2(seq6)rU          10

<221> misc_feature
<222> 16
<223> n = uridine

<400> 21
cacacaccaggatcaaancccaataggcttatccaaag           35

<210> 22
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 22
<223> Synthetic oligonucleotide Hyb15                20

<400> 22
aatccacttagcgag                                    14

<210> 23
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide CF621(seq19)rU          30

<221> misc_feature
<222> 22
<223> n = uridine

<400> 23
tatatgcgttc tccgtgttta gntttgatttataagaag           38

<210> 24
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ribo2(seq6)rU cleavage fragment 1

<221> misc_feature
<223> 15

```

<223> n = uridine
<400> 24
cacacaccag ctaan 15

<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ribo2(seq6)rU cleavage fragment 2

<400> 25
cccaataggc ttatccaag 19
10

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CF621(seq19)rU cleavage fragment 1

<221> misc_feature
<222> 22
<223> n = uridine

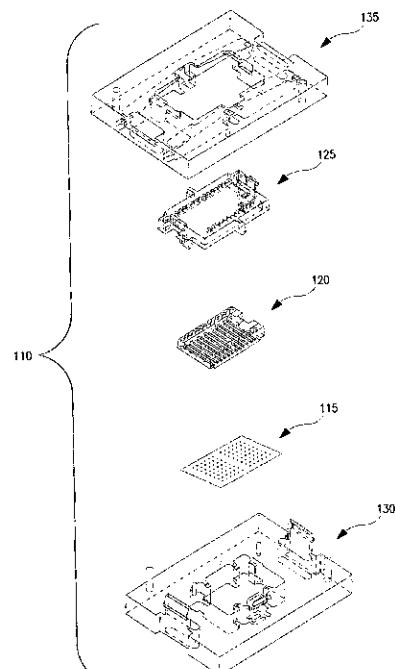
<400> 26
tatatgcgtc tccgtgttta gn 22

<210> 27
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

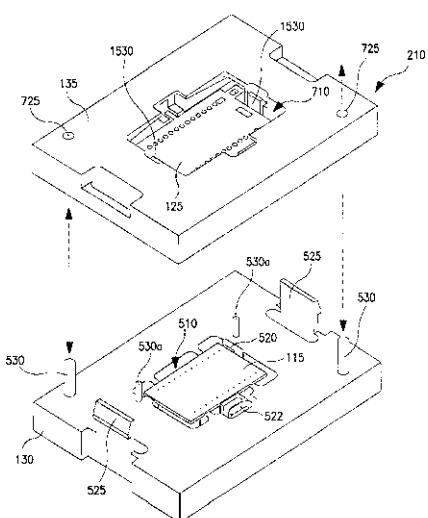
<220>
<223> CF621(seq19)rU cleavage fragment 2

<400> 27
tttgatttat aagaag 16

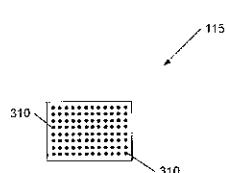
【図1】



【図2】



【図3】

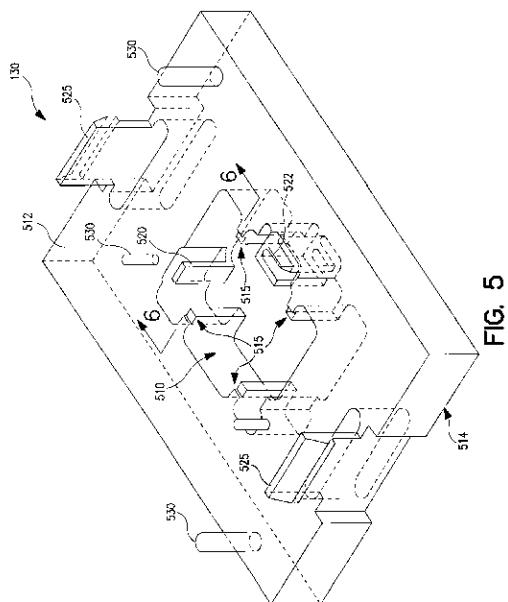


【図4】

基板 115
コーティング 410

Figure 4

【図5】



【図6】

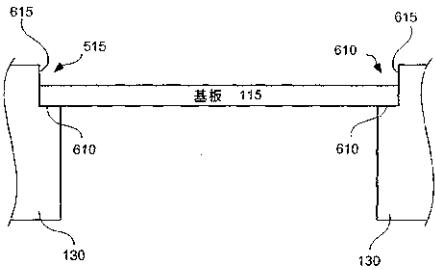
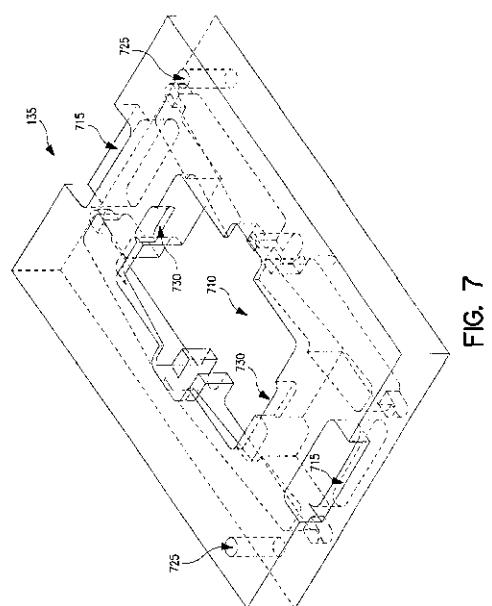


Figure 6

【図7】



【図8】

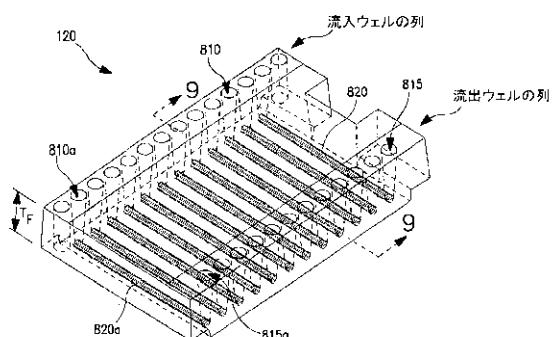


FIG. 8

【図9A】

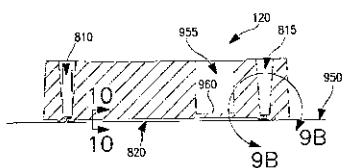


FIG. 9A

【図 9 B】

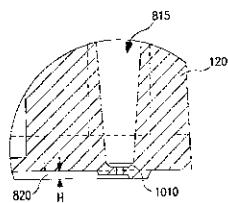


FIG. 9B

【図 11】

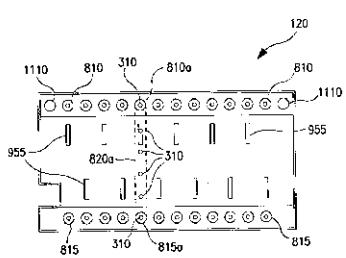


FIG. 11

【図 10】

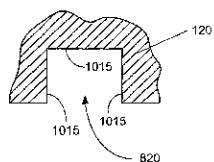


Figure 10

【図 12 A】

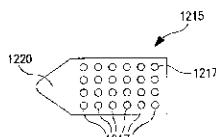


FIG. 12A

【図 12 B】

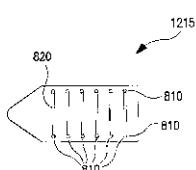


FIG. 12B

【図 14】

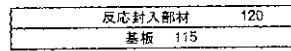


Figure 14

【図 15】

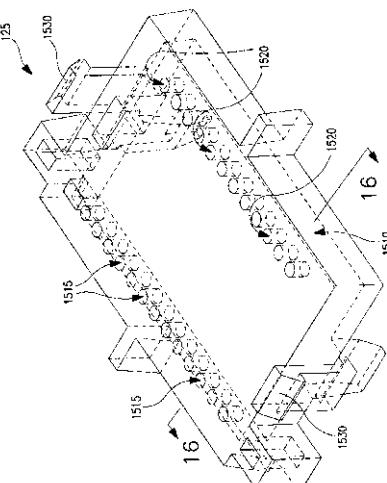


FIG. 15

【図 13】

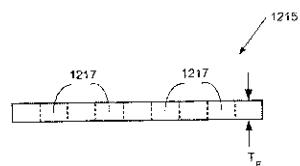


Figure 13

【図16】

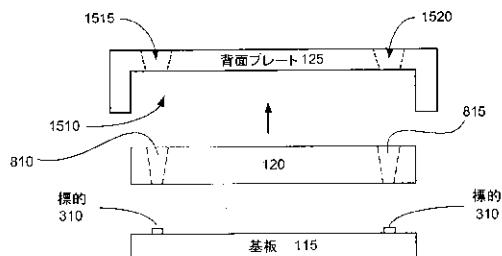


Figure 16

【図17】

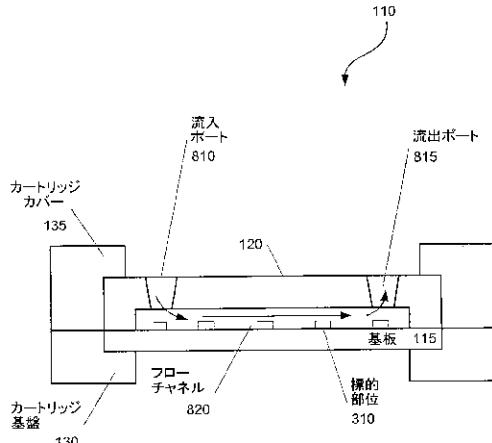


Figure 17

【図18】

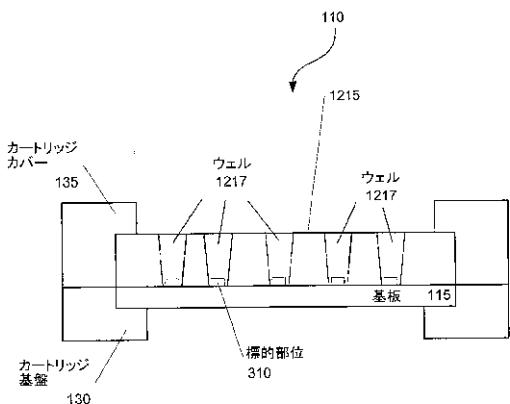


Figure 18

【図19】

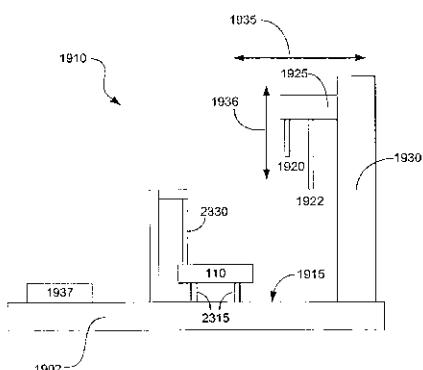


Figure 19

【図20】

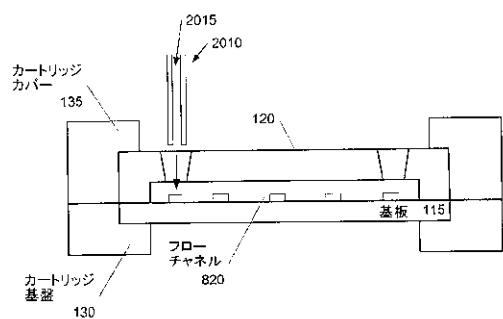


Figure 20

【図22】

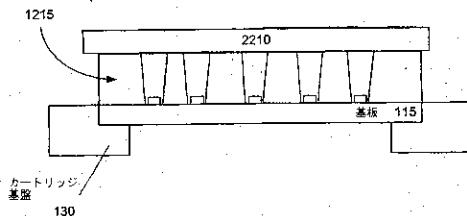


Figure 22

【図21】

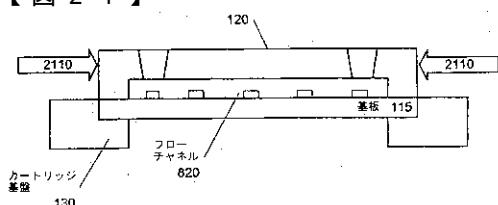


Figure 21

【図23】

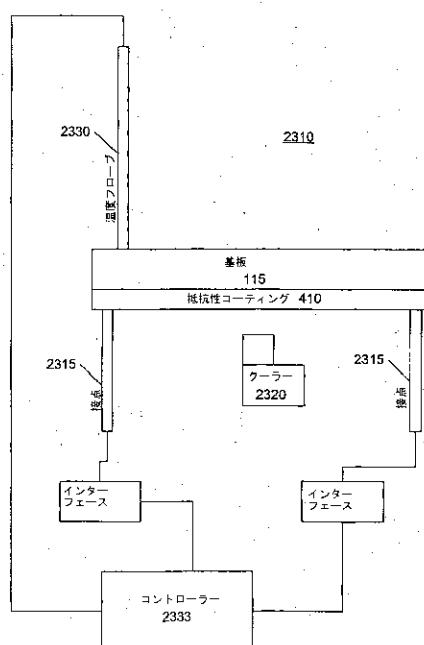


Figure 23

【図24】

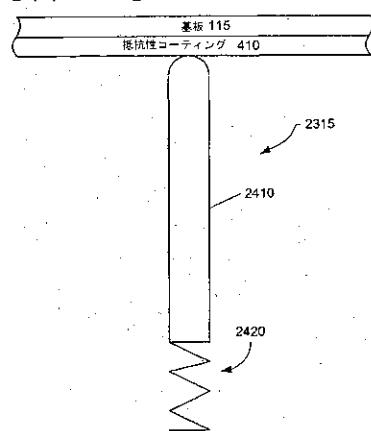


Figure 24

【図 25A】

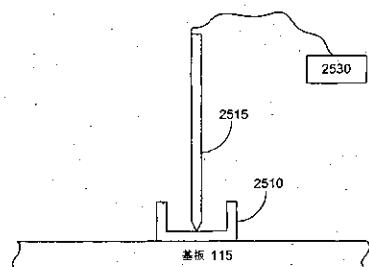


Figure 25A

【図 25B】

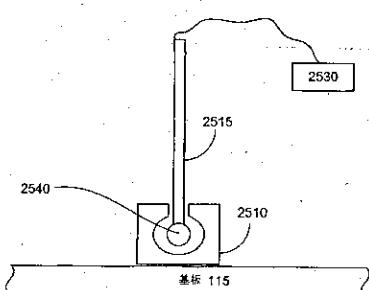


Figure 25B

【図 26】

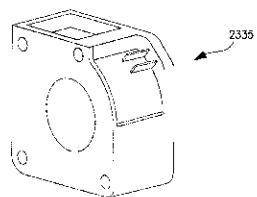
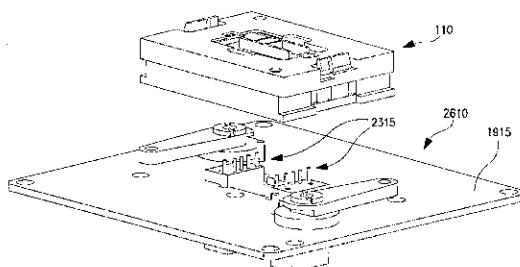


FIG. 26

【図 27】

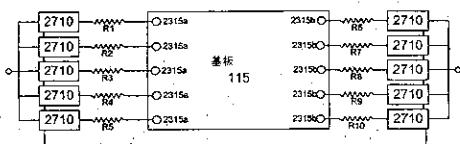


Figure 27

【図 28】

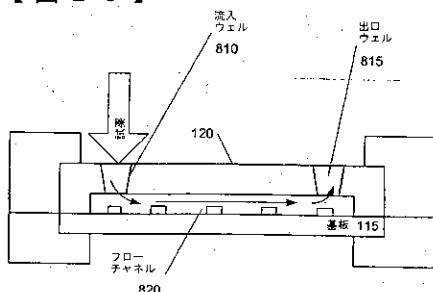


Figure 28

【図 29】

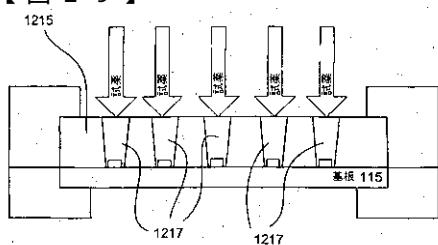


Figure 29

【手続補正書】

【提出日】平成17年7月13日(2005.7.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

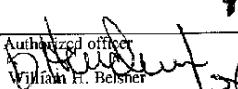
【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2005532043000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/11384																																							
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C12M 1/34 US CL : 435/6,287.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																																									
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Continuation Sheet																																									
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																																									
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)																																									
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category *</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 6,287,850 B1 (BESEMER et al.) 11 September 2001 (11.09.2001), see entire document.</td> <td>1, 3-5</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td>---</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2, 6-11, 14, 15, 23-26, 30-33, 35, 37-76</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,650,274 A (KAMBARA et al.) 22 July 1997 (22.07.1997), see entire document, especially column 8, lines 29-63.</td> <td>47-76</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5,789,168 A (LEUSHNER et al.) 04 August 1998 (04.08.1998), see entire document, especially Figure 5.</td> <td>34, 36</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>35, 37-39</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 6,258,593 B1 (SCHEMBRI et al.) 10 July 2001 (10.07.2001), see entire document.</td> <td>1, 2, 3, 5-9, 12, 15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 6,093,370 A (YASUDA et al.) 25 July 2000 (25.07.2000), see entire document.</td> <td>23-26</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>30-76</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 6,192,168 B1 (FELDSTEIN et al.) 20 February 2001 (20.02.2001), see entire document, especially Figure 9.</td> <td>1, 5-11, 15, 40</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 6,287,850 B1 (BESEMER et al.) 11 September 2001 (11.09.2001), see entire document.	1, 3-5	---	---	-----	Y		2, 6-11, 14, 15, 23-26, 30-33, 35, 37-76	Y	US 5,650,274 A (KAMBARA et al.) 22 July 1997 (22.07.1997), see entire document, especially column 8, lines 29-63.	47-76	X	US 5,789,168 A (LEUSHNER et al.) 04 August 1998 (04.08.1998), see entire document, especially Figure 5.	34, 36	---		-----	Y		35, 37-39	X	US 6,258,593 B1 (SCHEMBRI et al.) 10 July 2001 (10.07.2001), see entire document.	1, 2, 3, 5-9, 12, 15	X	US 6,093,370 A (YASUDA et al.) 25 July 2000 (25.07.2000), see entire document.	23-26	---		-----	Y		30-76	X	US 6,192,168 B1 (FELDSTEIN et al.) 20 February 2001 (20.02.2001), see entire document, especially Figure 9.	1, 5-11, 15, 40
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																																							
X	US 6,287,850 B1 (BESEMER et al.) 11 September 2001 (11.09.2001), see entire document.	1, 3-5																																							
---	---	-----																																							
Y		2, 6-11, 14, 15, 23-26, 30-33, 35, 37-76																																							
Y	US 5,650,274 A (KAMBARA et al.) 22 July 1997 (22.07.1997), see entire document, especially column 8, lines 29-63.	47-76																																							
X	US 5,789,168 A (LEUSHNER et al.) 04 August 1998 (04.08.1998), see entire document, especially Figure 5.	34, 36																																							
---		-----																																							
Y		35, 37-39																																							
X	US 6,258,593 B1 (SCHEMBRI et al.) 10 July 2001 (10.07.2001), see entire document.	1, 2, 3, 5-9, 12, 15																																							
X	US 6,093,370 A (YASUDA et al.) 25 July 2000 (25.07.2000), see entire document.	23-26																																							
---		-----																																							
Y		30-76																																							
X	US 6,192,168 B1 (FELDSTEIN et al.) 20 February 2001 (20.02.2001), see entire document, especially Figure 9.	1, 5-11, 15, 40																																							
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																																									
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																																									
Date of the actual completion of the international search 04 September 2003 (04.09.2003)	Date of mailing of the international search report 17 SEP 2003																																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Telephone No. 703-308-0661																																								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US03/11384
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,225,109 B1 (JUNCOSA et al.) 01 May 2001 (01.05.2001), see entire document.	1-76
A	US 5,716,825 A (HANCOCK et al.) 10 February 1998 (10.02.1998), see entire document.	1-76

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/11384

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:
435/4, 6, 91.2, 286.5, 287.2, 287.3, 287.9, 288.3-288.5, 288.7, 293.1, 303.1, 305.1-305.4; 436/524, 527, 528, 531, 807, 809;
422/68.1, 63, 65, 58, 102, 104

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 12 N 15/09	C 12 M 1/38	Z
G 01 N 27/62	G 01 N 27/62	V
G 01 N 27/64	G 01 N 27/64	B
G 01 N 33/53	G 01 N 33/53	M
G 01 N 33/566	G 01 N 33/566	
	C 12 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オパルスキー, デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サンディエゴ, コートジャーディン デルマー 10552

(72)発明者 ヒニー, ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92075, ソラナビーチ, プンタバジャ ドライブ 325

(72)発明者 ブルース, フィリップ ザ サード

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92128, サンディエゴ, サマーブリーズ ウェイ 14834

(72)発明者 グリスワルド, チャールズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92103, サンディエゴ, 7ティーエイチ アベニュー 3744 ナンバー

(72)発明者 マクズスゼンコ, アンドーゼジュ

カナダ国 エム9ピー 3エル5 オンタリオ, トロント, ロウズ クレセント 20

(72)発明者 ウォーカー, シエイラ エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92116, サンディエゴ, テラス コート 4060

(72)発明者 ヴァール, ラルフ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92109, サンディエゴ, ファニュエル ストリート 4277

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 HA08 HA12

HA14 HA19

4B029 AA07 AA09 AA12 AA21 AA23 BB20 CC03 CC08 FA12 FA15

HA05 HA09

4B063 QA01 QA18 QQ42 QR08 QR14 QR20 QR32 QR42 QR55 QR62

QR82 QS12 QS25 QS34 QS36 QS39 QX04 QX10

专利名称(译)	用于在固体载体上进行化学反应的方法和设备		
公开(公告)号	JP2005532043A	公开(公告)日	2005-10-27
申请号	JP2003584348	申请日	2003-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	海阙喃公司		
申请(专利权)人(译)	Shikuenomu公司		
[标]发明人	リンチャオ オパルスキーデイビッド ヒニー・ポール ブルース・フィリップ・ザ・サード グリスワルド・チャールズ マクズスゼンコ・アンドー・ゼジュ ウォーカー・シェイラ・エー ヴァールラルフ		
发明人	リン, チャオ オパルスキー, デイビッド ヒニー, ポール ブルース, フィリップ・ザ・サード グリスワルド, チャールズ マクズスゼンコ, アンドー・ゼジュ ウォーカー, シェイラ・エー. ヴァール, ラルフ		
IPC分类号	G01N27/62 B01L3/00 B01L7/00 B01L9/00 C12M1/00 C12M1/26 C12M1/34 C12M1/38 C12N15/09 C12Q1/68 G01N27/64 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	B01L9/527 B01L3/5025 B01L3/502707 B01L3/502715 B01L3/50851 B01L7/52 B01L9/523 B01L2200/025 B01L2200/0689 B01L2300/0636 B01L2300/0877 B01L2300/1827 B01L2300/1844 C12Q1/6827		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12M1/00.A C12M1/26 C12M1/34.Z C12M1/38.A C12M1/38.Z G01N27/62.V G01N27/64.B G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA09 4B029/AA12 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B029/HA05 4B029/HA09 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX04 4B063/QX10		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/372711 2002-04-11 US 60/457847 2003-03-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种用于直接在基板(115)上进行生化反应的装置和方法。板组件(110)包括盒用于支撑衬底(115)以可移除地固定的位置(130),并且包括反应包封构件可拆卸地设置基板表面(120)。反应封闭构件(120)包括一个或多个凹槽,所述凹槽在基板表面上的一个或多个目标位置的正上方形成腔室。这些腔室,同时被用于执行只在基板(115),包含在所述腔室的物质的热循

环上述生化反应，来执行使用被直接设置在基板上的加热元件也用过。基板组件（110）优选地被配置成将材料下落到腔室中并且在该过程期间将基板组件从一个位置移动到另一个位置的同时执行腔室中包含的物质的生化反应。它与不需要的加工机器结合使用。

