

(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2005-530127

(P2005-530127A)

(43) 公表日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 M	2 G O 5 2
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00 Z N A A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34 F	4 B O 6 3
C 1 2 M 3/00	C 1 2 M 1/34 Z	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/06	C 1 2 M 3/00 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 132 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-547903 (P2003-547903)
 (86) (22) 出願日 平成14年11月27日 (2002.11.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年7月27日 (2004.7.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/038021
 (87) 国際公開番号 W02003/046511
 (87) 国際公開日 平成15年6月5日 (2003.6.5)
 (31) 優先権主張番号 09/997,741
 (32) 優先日 平成13年11月27日 (2001.11.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/355,644
 (32) 優先日 平成14年2月5日 (2002.2.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/356,982
 (32) 優先日 平成14年2月13日 (2002.2.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

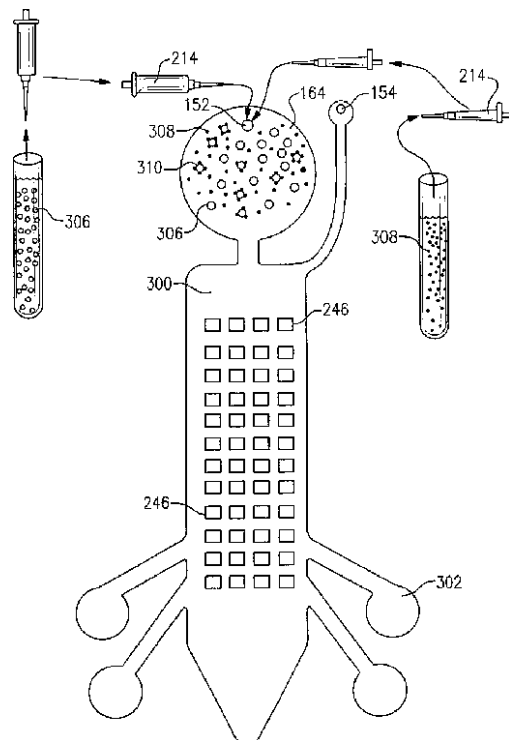
(71) 出願人 501074711
 パースタイン テクノロジーズ, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国 カルフォルニア 926
 92 ミッション ビエジョ スイート
 H471 アリシア パークウェイ 23
 O52
 (71) 出願人 591177749
 長岡実業株式会社
 兵庫県西宮市西宮浜4丁目7番18号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光磁気バイオディスクおよび関連の方法を含むシステム

(57) 【要約】

本発明は、包括的には、分子および細胞の生体磁氣的検定に関し、特に、光磁気バイオディスクで行われる分子および細胞の生体磁氣的検定に関する。本発明はさらに、光磁気バイオディスクおよびMOドライブを含む光磁気バイオディスクシステムに関する。より詳細には、本発明は、磁気粒子またはビーズを用いた、細胞集団および細胞集団の溶液中の特定の標的細胞を検出して選択的に操作するための生体磁氣的的方法（免疫磁氣的的方法を含む）と、磁氣的に誘導される神経突起成長および神経再生と、MOBDSを用いて磁氣的に形成された神経網とに関するが、最良の実施の形態により本明細書中以下に記載される特定の実施の形態に限定されない。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオ磁気検定を行うための光磁気バイオディスクであって、
中心および外縁を有する基板と、

該基板に関連した光磁気スタック、および、

前記基板上に設けられた一つまたは複数の磁区であって、生体磁気粒子を結合または解放する磁区

を含む、

光磁気バイオディスク

【請求項 2】

前記生体磁気粒子は常磁性ビーズであり、結合剤に付着している、請求項 1 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 3】

前記結合剤は、抗原、抗体、リガンド、受容体、ビオチン、ストレプトアビジン、DNA断片、およびRNA断片を含む群から選択される、

請求項 2 に記載の光磁気バイオディスク

【請求項 4】

前記一つまたは複数の磁区は、光磁気ディスクドライブを用いて、前記基板の前記中心および外縁の間に選択的に形成される、

請求項 1 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 5】

前記一つまたは複数の磁区は、前記光磁気ディスクドライブを用いて、選択的に消去される、

請求項 4 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 6】

前記一つまたは複数の磁区は、形成および消去され、それにより前記磁気粒子は選択的に結合および放出される、

請求項 4 または 5 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 7】

前記光磁気ディスクは、前記磁区にある特徴物を読み出しおよび検出するのに用いられる、

請求項 6 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 8】

前記基板に関連する流路層であって、該流路層は流体回路を形成する切り取り部位を有する、流路層をさらに含む、

請求項 7 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 9】

前記流路層と関連するキャップ部をさらに含む、

請求項 8 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 10】

前記流体回路は、注入ポート、混合チャンバ、分離チャンバ、一つまたは複数の試験チャンバ、および排出ポートを含み、これらはすべてがお互いに流体連通する、

請求項 9 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 11】

前記一つまたは複数の試験チャンバは、試験剤を含む試験溶液があらかじめロードされている、

請求項 10 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 12】

薬物感受性に関し、標的細胞を検出、定量、および試験する方法であって、

細胞のサンプルを用意し、

10

20

30

40

50

前記サンプルを前記注入ポートから前記混合チャンバにロードし、
サンプル中の標的細胞の表面の表面マーカーに特異的な結合剤に結合した、生体磁気粒子
を用意し、

前記生体磁気粒子を混合チャンバにロードし、
結合剤がサンプル中の標的細胞上の表面マーカーと結合し、標識細胞を形成するのに十分
な時間、前記サンプルおよび生体磁気粒子を培養し、

前記光磁気バイオディスクを前記光磁気ディスクドライブにロードし、

前記分離チャンバ内のあらかじめ決められた位置に磁区を形成し、

前記光磁気バイオディスクを回転させ、前記サンプルおよび生体磁気粒子を前記分離チャ
ンバに移動させ、

前記生体磁気粒子および標識細胞を、前記分離チャンバ内の前記磁気区に結合させ、そし
て

前記分離チャンバを電磁放射ビームで走査し、磁区は標識細胞を含むか決定する、

請求項 1 1 に記載の光磁気バイオディスクを用いる方法

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の方法であって、

前記磁区に結合した標識細胞の数を定量し、

標識細胞が結合した前記磁区を選択的に消去し、選択的に該標識細胞を放出し、

前記一つまたは複数の試験チャンバにあらかじめ決められた数の標識細胞を移動する
ために前記磁区を続けて消去および形成し、前記標識細胞を前記一つまたは複数の試験チ
ャンバに磁氣的に導き、

前記標識細胞を前記試験剤と共に培養し、そして、

前記試験チャンバを電磁放射ビームで走査し、生細胞およびアポトーシス細胞の数を決
定し、それにより前記試験剤に対する細胞の感受性を決定する

ステップをさらに含む、方法。

【請求項 1 4】

前記流体回路において、生物マトリックス中で神経回路網を形成するための、請求項 9
に記載の光磁気ディスクを用いる方法であって、

前記流体回路において前記生物マトリックスを形成し、

樹状突起および軸索を有する神経を前記生物マトリックスに用意し、前記神経は磁気
粒子を組み込まれ、

前記光磁気バイオディスクを前記光磁気ディスクドライブにロードし、

前記流体回路において磁区を書き込みおよび消去し、前記神経の前記樹状突起および
軸索をお互いに向かって成長させ、そして

前記樹状突起および軸索を介して前記神経の間で相互作用を可能にし、それにより前
記磁区により磁氣的に制御される前記神経回路網を形成する、

ステップを含む、用いる方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 1 に記載の光磁気バイオディスク。

【請求項 1 6】

光磁気バイオディスク検定に用いる光磁気バイオディスクシステムであって、

光磁気スタックを有する基板、および、

光磁気粒子を結合および放出するために採用され、前記基板に設けられた、一つまた
は複数の磁区

を含む、光磁気バイオディスク、および

光をディスクに向ける光源であって、前記一つまたは複数の磁区を形成または消去するの
にさらに用いられる前記光源、および

ディスクから反射した光またはディスクを通過した光を検出し、信号を発する、検出器
を含む、光磁気ディスクドライブ

を含む、システム。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記一つまたは複数の磁区に結合したものを計数するのに前記信号を利用するプロセスをさらに含む、請求項 16 に記載の光磁気バイオディスクシステム。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の光磁気バイオディスクシステム。

【請求項 19】

光磁気バイオディスクを製造する方法であって、

中心、外縁、および一つまたは複数の光磁気スタックを有する基板を用意し、

前記中心および外縁の間には、一つまたは複数の磁区を形成し、そして、

前記一つまたは複数の磁区と流体連通する分析チャンバを形成する

ステップ、を含む方法

10

【請求項 20】

混合チャンバと前記分析チャンバとの流体連通を形成するステップをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

生物マトリックスを前記分析チャンバに形成するステップをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記混合チャンバに複数のバイオ磁気粒子を堆積させ、前記バイオ磁気粒子の各々は結合剤を含む、

ステップをさらに含む、

請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記混合チャンバと関連する注入サイトを指定し、該注入サイトは、任意の標的細胞の存在を試験するための細胞のサンプルの受け入れを行う、

ステップをさらに含む、

請求項 22 に記載の方法

【請求項 24】

基板に関連した情報層に情報をコードし、このコードされた情報は、ディスクの回転を制御するのにディスクドライブアセンブリにより読み取り可能である、

ステップをさらに含む、請求項 21 または 23 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記分析チャンバと流体連通する試験チャンバを形成するステップをさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記試験チャンバを試験剤で満たすステップをさらに含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記流体回路の生物マトリックスに神経網を形成するために、

前記生物マトリックスに樹状突起および軸索を有する神経を用意し、

磁気粒子を前記神経に取り込み、

前記光磁気バイオディスクを光磁気ディスクドライブにロードし、

前記神経の前記樹状細胞および軸索をお互いに向かって成長させるために、前記分析チャンバ内に一つまたは複数の磁区を消去および形成し、そして

前記樹状細胞および軸索を介して前記神経間で相互作用を可能にし、それにより前記磁区により磁氣的に制御された前記神経回路網を形成する、

ステップを含む、

請求項 21 に記載の方法により製造された光磁気バイオディスクを用いる方法。

40

【請求項 28】

薬物感受性に関し、前記細胞のサンプル中の任意の標的細胞を検出、定量、および試験する方法であって、

50

前記サンプルを前記注入サイトから前記混合チャンバにロードし、
 結合剤がサンプル中の標的細胞上の表面マーカーと結合し、標識細胞を形成するのに
 十分な時間、前記サンプルおよび生体磁気粒子を培養し、
 前記光磁気バイオディスクを前記光磁気ディスクドライブにロードし、
 前記分析チャンバ内のあらかじめ決められた位置に磁区を形成し、
 前記光磁気バイオディスクを回転させ、前記サンプルおよび生体磁気粒子を前記分析チャンバに移動させ、
 前記生体磁気粒子および標識細胞を、前記分析チャンバ内の前記磁気区に結合させ、そして、
 前記分析チャンバを電磁放射ビームで走査し、磁区は標識細胞を含むか決定する、
 ステップを含む、
 請求項 26 記載の方法により製造された光磁気バイオディスクを用いる方法。

10

【請求項 29】

請求項 28 記載の方法であって、
 前記磁区が含む標識細胞の数を定量し、
 標識細胞が結合した前記磁区を選択的に消去し、選択的に該標識細胞を放出し、
 前記試験チャンバにあらかじめ決められた数の標識細胞を移動するために前記磁区を続けて消去および形成し、前記標識細胞を前記試験チャンバに磁氣的に導き、
 前記標識細胞を前記試験剤と培養し、そして、
 前記試験チャンバを電磁放射ビームで走査し、生細胞およびアポトーシス細胞の数を
 決定し、それにより前記試験剤に対する細胞の薬物感性を決定する、
 ステップをさらに含む、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[発明の背景]

1. 発明の分野

本発明は、包括的には、分子および細胞の生体磁氣的検定 (biomagnetic assays) に関し、特に、光バイオディスクで行われる分子および細胞の生体磁氣的検定に関する。本発明はさらに、光磁気 (MO) 分析ディスクおよび MO ドライブシステム (以下、光磁気バイオディスクシステム (MOBDS) と呼ぶ) に関する。より詳細には、本発明は、磁気粒子またはビーズを用いた、細胞集団および細胞集団の溶液中の特定の標的細胞を検出して選択的に操作するための生体磁氣的方法 (免疫磁氣的方法を含む) と、磁氣的に誘導される神経突起成長および神経再生とに関するが、最良の実施の形態により本明細書中以下に記載される特定の実施の形態に限定されない。

30

【0002】

[関連技術の相互参照]

本出願は、2000年11月27日に提出された米国仮出願第60/253,283号、2000年11月28日に提出された米国仮出願第60/253,958号、および2001年3月1日に提出された米国仮出願第60/272,525号の優先権の利益を主張する、2001年11月27日に提出された米国出願第09/997,741号の一部継続出願である、2002年3月14日に提出された米国出願第10/099,266号の一部継続出願である。

40

【0003】

また、本出願は、2002年2月5日に提出された米国仮出願第60/355,644号、2002年2月13日に提出された米国仮出願第60/356,982号、2002年2月19日に提出された米国仮出願第60/358,479号、2002年4月11日に提出された米国仮出願第60/372,007号、2002年6月12日に提出された米国仮出願第60/388,132号、および2002年9月4日に提出された米国仮出願第60/408,227号の優先権の利益を主張する。

50

【0004】

上記実用出願および仮出願はそれぞれ、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0005】

2. 関連技術の説明

あらゆる種類の診断検定および法医学検定をエンドユーザにとってより迅速でよりローカルなものにすることが大いに必要とされている。理想的には、臨床医、患者、検査官 (investigators)、軍隊、他の医療機関職員、および消費者は、自分の身体に特定の因子または指標が存在するかどうか、および犯罪現場または戦場に特定の生体物質が存在するかどうかを自ら試験することができるべきである。現在のところ、核酸および/またはタンパク質が結び付いたいくつものシリコンベースチップが市販されており、または開発中である。これらのチップは、エンドユーザが使用するためのものではなく、極めて専門的な知識および高価な設備を有さない人物や事業体が使用するためのものではない。

10

【0006】

[発明の概要]

本発明は、生体磁気学的検定および実験分析を行うことに関し、特に、磁性、常磁性、または超常磁性の粒子 (以下、生体磁気または磁気粒子またはビーズと呼ぶ) を、限定はされないが CD、CD-R、DVD、DVD-R、および MO ディスクを含む光バイオディスク上で用いることに関する。本発明の生体磁気学的検定は、例えば、免疫磁気学的検定、および非磁性および磁性プラットフォーム上で実施される DNA および RNA を用いた検定などの分子磁気的 (molecularmagnetic) 検定を含み得る。非磁性プラットフォームは、例えば、マイクロタイタープレートおよび非光磁気バイオディスクシステムを含む。磁性プラットフォームは、例えば、光磁気バイオディスクシステム (MOBDS) を含む。MOBDS を用いて行われる検定は、本明細書中では MO 生体磁気学的検定 (MOBMA) と呼び、非光磁気バイオディスクを用いる検定は、本明細書中では光ディスク生体磁気学的検定 (ODBMA) と呼ぶ。ODBMA は、例えば、制御可能な電磁石が関連付けられた、改良された光ディスクドライブを用いて実行されてもよい。本発明は、検定を準備する方法と、検定を実行する方法と、実験または臨床分析を行う方法と、検定または分析を行うディスクと、関連する検出システムとを含む。

20

【0007】

生体サンプルとしては、血液、血清、血漿、髄液、乳房吸引液 (breast aspirate)、滑液、胸膜液、腹水、囲心腔液、尿、唾液、羊水、精液、粘液、体毛、糞便、生体微粒子懸濁液、一本鎖または二本鎖核酸分子、細胞、器官、組織、または組織抽出物、あるいは化学的または生物学的プロセスにより磁気粒子に結合し得る標的を含む任意の他のサンプルが挙げられる。種々の標的の選択および検出に関連する他の態様に関するさらなる詳細は、例えば、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2001年3月26日に出版された「Dual Bead Assays for Detecting Medical Targets」と題する米国仮特許出願第60,278,697号に開示されており、当該出願はその内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

30

【0008】

対象となる標的は、腫瘍細胞、細菌、ウイルス、または疾患に特徴的な核酸などの標的作用物質分子、またはある人物に特異的なヌクレオチド配列、あるいはある生物または細胞型 (細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、植物、または動物であり得る) に特異的なヌクレオチド配列または抗原決定基を含むことができる。標的作用物質は、癌に関連する核酸分子または抗原決定基を含み得る。標的核酸分子は、HER2neu、p52、p53、p21、および bcl-2 からなる群から選択される遺伝子の少なくとも一部である核酸を含み得る。標的作用物質は、HIV-1 に感染した被験体にのみ存在する抗体、ウイルスタンパク質抗原、または被験体の疾患状態に特徴的なタンパク質であり得る。本発明の方法および装置は、被験体がウイルスに感染しているか否か、被験体から得られた核酸が対応する野生型核酸配列に関する単一ヌクレオチド変異 (SNM) を示しているか

40

50

否か、または被験体が対象となるタンパク質（細菌タンパク質、真菌タンパク質、ウイルスタンパク質、HIVタンパク質、C型肝炎タンパク質、B型肝炎タンパク質、またはある疾患に特異的に関連することが知られているタンパク質など）を発現しているか否かを判断するために用いることができる。核酸標的を検出する二重ビーズ実験の一例を、以下の実施例1に提示する。

【0009】

本発明の別の態様によると、複数の標的作用物質（例えば、数十、数百、さらには数千もの異なる標的作用物質）を1つの光分析ディスク上で識別することができる多重化法（multiplexing methods）が提供される。複数の捕捉剤が1つのチャンバの捕捉領域にまとめて、または別個の捕捉領域に別々に供給されてもよい。異なる波長で蛍光を発するビーズや異なるサイズのレポータービーズ（reporter beads）などの種々のレポータービーズを用いて、互いを区別可能にすることができる。多重化技法を用いて2つの異なる標的を識別するための実験を行った。そのような検定の1つの例を以下の実施例2で説明する。

10

【0010】

さらに別の態様では、本発明は、基板と、基板に関連する捕捉層と、捕捉層に結合した捕捉剤とを有し、捕捉剤が二重ビーズ複合体に結合するようになっている、光ディスクを含む。複数の異なる捕捉剤が、異なる型の二重ビーズ複合体に対して用いられる。ディスクは、適当なチャンバおよび流体構造でディスクに何らかの二重ビーズ処理を施すことを可能にするよう設計することができ、レポーターおよび捕捉ビーズがあらかじめロードされることにより、二重ビーズ複合体構造を形成するのに加える必要があるのはサンプルのみとすることができる。

20

【0011】

ODBMA細胞分析

本発明の一態様によると、ビーズまたはビーズ-細胞検定のためのディスクおよびディスクドライブシステムが提供される。ディスクドライブは、単離プロセスを行うための電磁石を含むことができ、適切な光源制御および用いられるレポータービーズの型の検出を含んでもよい。ディスクドライブは、光学式または光磁気式であり得る。

【0012】

ディスクに施される処理のために、ドライブは電磁石を含むことが有利であり、ディスクは、混合チャンバ、廃液チャンバ、および捕捉区域を有することが好ましい。この実施の形態では、サンプルは混合チャンバにおいてビーズと混合され、混合チャンバ付近に磁界が印加され、磁石により保持されていないサンプルは廃液チャンバに導かれ、それにより、二重ビーズ複合体に結合しているか未結合であるかにかかわらず、全ての磁気ビーズが混合チャンバに残る。続いて、磁気ビーズは捕捉区域に導かれる。いくつかの異なる弁機構のうちの1つを用いて流れを制御してもよい。

30

【0013】

光磁気バイオディスクシステム（MOBDS）

本発明の別の態様では、MOBMAは、生体サンプルと共に用いるために作成され、かつディスク上の磁区すなわち磁性領域を選択的に形成することができるディスクドライブ（光磁気（MO）ディスクドライブなど）と共に用いられる、MOディスクを用いて行われる。本発明のこのMOBMA態様では、磁区は、高度に制御可能かつ正確な方法でMOディスクに形成することができる。これらのドメインは、未結合磁気捕捉ビーズを含む磁気ビーズのような生体磁気粒子と、磁気捕捉ビーズとの二重ビーズ複合体を含む磁気複合体、磁気ビーズ-細胞複合体と、または少なくとも1つの磁気粒子または磁気特性が関連している任意の生物学的または化学的複合体とを結合し、これらの複合体を磁石または磁区を用いて結合できるようにすることができる。MOディスクドライブは、ディスク上の選択された場所に書き込むことができ、続いて、光学式読み取り装置を用いてそれらのドメインすなわち領域にある特徴物を検出することができる。ドメインを選択的に消去することにより、個々のビーズおよび複合体を選択的に解放することができる。分析にMOBDSを用いることに関する生物医学的用途を以下で説明する。

40

50

【0014】

本発明のさらに別の態様では、光バイオディスクまたは医療用CDの磁区すなわち磁性領域を形成することを含む、バイオディスクおよびドライブを用いる方法が提供される。この方法はさらに、ビーズが磁区において結合するようにディスクに磁気ビーズを供給することを含む。本発明は、好ましくは検出可能なレポータービーズを用いて、蛍光または光学的イベント検出などにより、磁気ビーズが生体サンプルに結合する場所において検出することを含むことが好ましい。本方法は、複数のチャンバを使用することにより、時間および場所に関して複数の段階で形成され得る。ドメインは、MOバイオディスクの所定の場所に選択的に書き込まれ、磁気ビーズまたは磁気複合体を捕捉するために、サンプルを磁区にわたって移動させる。続いて、この領域を選択的に消去することができ、磁気ビーズまたは磁気複合体は個別に解放され、所望の場合は再配置される。この方法により、一度に多くの異なる試験を行うことができ、ユーザとディスクドライブとの間の対話性のレベルが、試験プロセス中にさらなる試験を作成できるようなものにすることができる。光磁気記録、光磁気ディスク上の磁性領域の正確な作成、および光磁気検出方法に関するさらなる詳細は、例えば、Maeda, et al.に付与された米国特許第6,212,136号、Ohmori et al.に付与された米国特許第5,329,503号、Saito et al.に付与された米国特許第4,985,881号、Fujiwara et al.に付与された米国特許第4,843,604号、およびNaito et al.に付与された米国特許第4,784,606号に開示されている。これら特許の全ては、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

10

20

【0015】

MOバイオディスクは、例えばMOバイオディスクの光磁気スタックの光学的特性の最適化を含む種々のタイプのMOBMA用途に合わせて最適化することができ、それにより、入射追跡および検出電磁放射ビームが反射層を部分的に通過し、MOバイオディスクの作用層 (operative layer) の別個の検出器および構成要素を用いて検出される透過ビームは、MOバイオディスク上に生成された磁界および磁界の強度が、種々のタイプの磁気ビーズが結び付いている磁気複合体を捕捉してそれら磁気複合体間を区別するのに十分な大きさおよび強度となるように修正され得る。さらに、種々のタイプの電磁放射源を、限定はされないが、赤外線、赤色、青色、および蛍光型光源を含むMOBDSと共に用いることができる。磁気ビーズおよび磁気複合体は、例えば図28A、図28B、図29A、および図29Bに関連して以下で説明するように、例えば反射および/または透過ビームの特徴の分析により、または蛍光検出器および蛍光標識標的分子または細胞に関連して蛍光型光源を用いる蛍光により、光学的に検出することができる。

30

【0016】

本発明による生体磁気ビーズ検定は、本明細書中では分子磁氣的検定と呼ぶ遺伝的検定において、磁気捕捉ビーズおよび蛍光レポータービーズと共に実施してもよい。これらの生体磁気ビーズまたは粒子は、捕捉プローブおよびレポータープローブそれぞれで被覆される。捕捉プローブおよびレポータープローブは、標的配列と相補的であるが、互いには相補的ではない。捕捉ビーズは、様々な量の標的DNAと混合される。未結合の標的は、磁気ビーズの磁気濃縮 (magnetic concentration) により溶液から除去される。そのため、蛍光レポータービーズは、捕捉標的DNAに統合することができる。未結合レポータービーズは、磁気ビーズの磁気濃縮により除去される。したがって、標的配列の存在下でのみ、磁気捕捉ビーズは蛍光レポータービーズに結合し、二重ビーズ検定が行われる。

40

【0017】

捕捉プローブ結合

EDC結合 (conjugation) を介して捕捉またはレポータープローブをカルボキシ化された捕捉ビーズおよびレポータービーズそれぞれに共有結合させることを含む、プローブをビーズに結合させるいくつかの異なる表面化学的性質 (chemistries) および異なる方法が調査された。プローブをビーズに結び付けるEDC結合法を用いて観察された1つの結果は、プローブの非共有結合であった。この制限は、部分的二本鎖DNAプローブを用

50

いてプローブを結び付ける方法を開発すること、および結合効率の高い適切なビーズタイプを選択することにより克服された。共役プロセスにおいて二本鎖プローブを用いることにより、ビーズへのプローブの非共有結合が著しく減少した。適切なビーズタイプおよび結合条件を用いることにより、共有結合効率が95%もの高さになった。固体表面へのDNAプローブ結合に関する詳細は、例えば、本発明の譲受人に譲渡された、2002年2月28日に出願された「Methods for Decreasing Non-Specific Binding of Beads in Dual Bead Assays Including Related Optical Bio-discs and Disc Drive Systems」と題する米国特許出願第10/087,547号に開示されており、当該出願はその内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0018】

10

標的DNAの捕捉に磁気ビーズを用いることにより、洗浄ステップが迅速化され、結合したものと未結合のものとの分離ステップが極めて円滑になった。さらに、標的濃度が限られている場合、各標的分子は1つのレポータービーズとハイブリダイズすることができる。そのサイズにより、1つの標的分子はいかなる既存の技術によっても検出することができない。しかしながら、1 μ m以上のレポータービーズは様々な方法により容易に検出および定量することができる。したがって、ビーズ検定は、標的捕捉の感度を非常に高める。

【0019】

バイオディスクドライブおよび関連する信号処理システム

さらに別の主な態様では、本発明は、分析ディスク、修正光ディスク、MOBDS、またはバイオディスク上で上記の方法を実施することも含む。バイオディスクドライブアセンブリを用いて、ディスクを回転させ、ディスクに記憶された任意の符号化情報を読み出して処理し、バイオディスクのフロー流路において試験サンプルを分析することができる。したがって、バイオディスクドライブには、バイオディスクを回転させるモータと、ディスクの回転速度を制御するコントローラと、ディスクからの帰還信号および/または透過信号を処理するプロセッサと、処理された信号を分析する分析装置とが設けられる。モータの回転速度は、ディスクの所望の回転を得るために制御される。バイオディスクドライブアセンブリを利用して、フロー流路および標的領域の試験物質をドライブの読み取りビームにより呼びかけて分析装置により分析する前またはその後に、バイオディスクに情報を書き込んでもよい。バイオディスクは、ディスクの回転速度を制御し、行うべき試験のタイプに特有の処理情報を提供し、バイオドライブに関連するモニタに結果を表示するための、符号化情報を含んでもよい。

20

30

【0020】

本発明の装置および方法の種々の実施の形態は、専門知識および高価な設備を用いずに、エンドユーザによって安価に用いられるように設計することができる。システムはポータブルにすることができるため、従来の診断設備が一般に利用可能ではない可能性がある遠隔の場所で用いることができる。この検定システムの構成要素および信号取得方法に適用可能な他の関連する態様は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2002年1月4日に出願された「Dual Bead Assays Including Covalent Linkages For Improved Specificity And Related Optical Analysis Discs」と題する米国特許出願第10/038,297号、2001年3月1日に出願された「Biological Assays Using Dual Bead Multiplexing Including Optical Bio-Disc and Related Methods」と題する米国仮出願第60/272,525号、それぞれ2001年3月14日、2001年8月24日、および2002年1月30日に出願された、それぞれ「Surface Assembly for Immobilizing Capture Agents and Dual Bead Assays Including Optical Bio-Disc and Methods Relating Thereto」と題する米国仮出願第60/275,643号、第60/314,906号、および第60/352,270号に開示されている。これら出願の全ては、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

40

【0021】

他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、図面、および技術例から明らかとなるであ

50

らう。

【0022】

本発明のさらなる目的は、本発明に寄与するさらなる特徴および本発明から得られる利点と共に、以下の本発明の好ましい実施の形態の説明から明らかとなるであろう。本発明の好ましい実施の形態の説明は、全体を通して同様の参照符号が同様の構成要素を示す添付図面に示されている。

【0023】

[好ましい実施の形態の詳細な説明]

本発明の以下の説明は、光分析ディスク、ディスクドライブシステム、光ディスクによる生体磁氣的検定、ならびに検定化学物質 (chemistries) および検定技法に関する。本発明はさらに、代替の光磁気ドライブシステム、MOバイオディスク、MOバイオディスクシステム、MO生体磁氣的検定、および関連する処理方法に関する。

10

【0024】

ディスクドライブシステムおよび関連する光分析ディスク

まず図1を参照して、光ディスクドライブ112において用いる光分析ディスク、光バイオディスク、または医療CD110の斜視図を示す。ドライブ112は、ドライブ内のソフトウェアと共に、または別個のコンピュータと関連して、ディスプレイモニタ114に画像、グラフ、または出力データを表示させることができる。以下に示すように、限定はされないが光磁気ディスクおよび光磁気ディスクドライブを含む、種々のタイプのディスクおよびドライブが用いられ得る。ディスクドライブは、制御コンピュータとは別個のユニット内にあってもよく、またはコンピュータ内のベイに設けられてもよい。デバイスは、ラップトップコンピュータのようにポータブルなものにすることができるため、バッテリー電力を用いて、一般的に高度な診断設備が配備されていない遠隔の場所で使用可能である。ドライブは、最小限のハードウェア変更を行ったかまたはハードウェア変更のない従来のドライブであることが好ましいが、専用のバイオディスクまたは医療CDドライブであってもよい。これらのタイプのドライブシステムおよび関連する信号処理方法に関するさらなる詳細は、例えば、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、1999年8月23日に出願された「Methods and Apparatus for Analyzing Operational and Non-operational Data Acquired from Optical Discs」と題する米国特許出願第09/378,878号、1999年8月23日に出願された「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers」と題する米国仮特許出願第60/150,288号、1999年10月26日に出願された「Trackable Optical Discs with Concurrently Readable Analyte Material」と題する米国特許出願第09/421,870号、2000年8月21日に出願された「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical synchronization Markers」と題する米国仮出願第09/643,106号、および2002年1月10日に出願された「Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging」と題する米国特許出願第10/043,688号に開示されている。これらの出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

20

30

【0025】

本発明の実施の形態で用いる光バイオディスク110は、任意の適当な形状、直径、または厚さを有することができるが、コンパクトディスク(CD)、記録可能CD(CD-R)、CD-RW、デジタル多用途ディスク(DVD)、DVD-R、DVD-RW、光磁気ディスクまたは他の標準的な光ディスクフォーマットのものと同様の直径および厚さを有する円形ディスクで実施されることが好ましい。ディスクは、好ましくは既知のフォーマットの、試験または検定を実施、制御、および後処理するための符号化情報(ディスクの回転速度および方向、回転調節(timing for rotation)、停止および開始、遅延期間、サンプルの場所、光源の位置、および光源のパワーを制御する情報など)を含むことができる。このような符号化情報は、ここでは包括的に動作情報と呼ぶ。

40

【0026】

50

ディスクは、図3A～図3Cに示すような反射型ディスク、図4A～図4Cの透過型ディスク、または反射型および透過型の何らかの組み合わせであってよい。反射型ディスクでは、入射光ビームがディスク上に（通常は情報が符号化される反射表面に）合焦し、反射して、光学要素を通して光源と同じ側のディスク面にある検出器に戻る。透過型ディスクでは、光はディスク（またはその一部）を通過して、光源とは反対側のディスク面にある検出器に届く。ディスクの透過部分では、一部の光は反射されて反射光として検出される場合もある。

【0027】

図2は、光ディスク読み取り装置システム116を示す。このシステムは、CD、CD-R、DVD、MO、または他の既知の類似のフォーマット用の従来の読み取り装置、そのようなドライブの変更版、または全く異なる専用デバイスであってもよい。基本的な構成要素は、ディスクを回転させるモータと、光を供給する光システムと、光を検出する検出システムとである。

10

【0028】

次に、図2～図4Cの全体を参照して、光源118が光学構成要素120に光を供給して入射光ビーム122を生成する。図3A～図3Cの反射型ディスク144の場合、帰還ビーム124は図3Cおよび図4Cの反射表面156、174、または186から反射される。帰還ビーム124は、光学構成要素120に戻され、次に底部検出器126に供給される。このタイプのディスクでは、帰還ビームは、動作情報または他の符号化データ、ならびに調査中の検査特徴または試験サンプルに関する特徴情報を運ぶことができる。

20

【0029】

図4A～図4Cの透過型ディスク180の場合、入射ビーム122からのエネルギーの一部は検査特徴または試験サンプルとの光/物質相互作用を受け、次に透過ビーム128としてディスクを通過して進み、これが上部検出器130により検出される。作用層として半反射層186（図4C）を含む透過型ディスクの場合、入射ビーム122からのエネルギーの一部もまた、動作情報または記憶データを運ぶ帰還ビーム124として作用層から反射する。光学構成要素120は、レンズと、ビームスプリッタと、四分の一波長板とを含むことができ、四分の一波長板は、光ビームの偏光を変えて、ビームスプリッタがレンズを通る反射ビームを、反射ビームが検出器上に合焦するように導くようにする。円柱レンズなどの非点収差要素が、ビームスプリッタと検出器との間に設けられて、反射光ビームに非点収差を与える。光源は、ユーザにより導入されたかまたはディスクから読み取られたデータに応じた所望の範囲にわたる可変波長および電力レベルを提供するように制御可能であり得る。この制御性は、異なる波長で蛍光を発する複数の異なる構造を検出することが望ましい場合に特に有用である。

30

【0030】

図2を引き続き参照して、検出器126および/または検出器130からのデータが、プロセッサ134および分析装置136を含むコンピュータ132に供給される。次に、画像または出力結果がモニタ114に提供される。コンピュータ132は、デスクトップコンピュータ、プログラム可能ロジック、または他の何らかの処理デバイスとすることができ、他の処理および/または記憶デバイスへの（インターネットを介するなどした）接続部を含んでもよい。ドライブモータ140およびコントローラ142は、ディスク144または180の回転速度および方向または回転を制御するために設けられる。コントローラ142およびプロセッサ134を含むコンピュータ132は、同じコンピュータと遠隔通信するか、または同じコンピュータ内で実施することができる。このようなディスクを読み取る方法およびシステムは、Gordonによる米国特許第5,892,577号にも示されており、この特許は参照により本明細書に援用される。

40

【0031】

検出器は、その構造または外部フィルタを通して検出器に到達する全ての光、または特定の波長の光のみを検出するように設計されてもよい。検出器を検出可能な波長に関して制御可能にすることにより、異なる波長で蛍光を発するビーズまたは他の構造体を個別に

50

検出することができる。

【0032】

ハードウェアトリガセンサ138を、反射型ディスク144または透過型ディスク180と共に用いてもよい。トリガセンサ138は、入射ビーム122が標的領域または検査区域にある場合にのみプロセッサ134によるデータ収集を可能にする信号をコンピュータ132に（または他の何らかの電子回路に）に供給する。別法として、ディスクから読み取られたソフトウェアを用いて、ディスク上のいかなる物理的マークにも関係なくプロセッサ134によるデータ収集を制御することができる。このようなソフトウェアまたは論理トリガは、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2002年1月28日に出願された「Logical Triggering Methods And Apparatus For Use With Optical Analysis Discs And Related Disc Drive Systems」と題する米国仮出願第60/352,625号においてさらに詳細に説明されており、この出願はその内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

10

【0033】

光分析ディスクの基板層は、ディスクの最も内側の読み取り可能部分から開始して、ディスクの最も外側の読み取り可能部分に向かって螺旋状に出て行く螺旋状トラックが刻まれ得る。記録不可能なCDでは、このトラックは異なる長さを有する一連のエンボスピットから構成され、それぞれのエンボスピットは通常、ディスクを読み取るのに用いられる光の波長の約1/4の深さを有する。ピット間の異なる長さおよび間隔が、動作データを符号化する。記録可能CDのようなディスクの螺旋溝は、ピットではなく検出可能な染料を含む。さらに、MOディスクでは、データはMOディスク上に形成された磁区に記憶される。これは、回転速度などの動作情報が記録される場所である。試験、検定、または調査プロトコルに応じて、回転速度は、介在的または連続的な加速、定速、および減速期間を有して可変であってもよい。これらの期間は、例えば、薬剤、試薬、抗体、または他の物質との流体および懸濁液の混合、攪拌、または分離を行うように、回転速度および回転時間の双方に関して厳密に制御されることができる。本発明で利用され得る、または本発明に容易に適合され得る種々の光分析ディスク、医療CD、およびバイオディスクの設計は、例えば、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2001年11月15日に提出された「Optical Bio-discs with Reflective Layers」と題する米国特許出願第09/999,274号、2001年12月7日に提出された「Optical Discs for Measuring Analytes」と題する米国特許出願第10/005,313号、2001年12月10日に提出された「Methods for Detecting Analytes Using Optical Discs and Optical Disc Readers」と題する米国特許出願第10/006,371号、2001年12月10日に提出された「Multiple Data Layer Optical Discs for Detecting Analytes」と題する米国特許出願第10/006,620号、および2001年12月10日に提出された「Optical Disc Assemblies for Performing Assays」と題する米国特許出願第10/006,619号に開示されており、これらの全ては、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

20

30

【0034】

光ピックアップおよび関連する電子回路の多くの設計および構成を、本発明の実施の形態の状況で用いることができる。コンパクトディスクおよび読み取り装置のさらなる詳細および代替の設計は、Compact Disc Technology, by Nakajima and Ogawa, IOS Press, Inc. (1992); The Compact Disc Handbook, Digital Audio and Compact Disc Technology, by Baert et al. (eds.), Books Britain (1995); および CD-Rom Professional's CD-Recordable Handbook: The Complete Guide to Practical Desktop CD, Starrett et al. (eds.), ISBN:0910965188 (1996)に記載されており、これらの全ては、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

40

【0035】

したがって、ディスクドライブアセンブリは、ディスクを回転させ、ディスクに記憶された任意の符号化動作情報を読み取って処理し、ディスクの検定領域において液体、化学

50

的、生物学的、または生化学的検査特徴を分析するために用いられる。ディスクドライブアセンブリはさらに、検定領域にある物質がドライブの読み取りビームにより分析される前、その間、またはその後、ディスクに情報を書き込むために用いられ得る。代替の実施の形態では、ディスクドライブアセンブリは、イーサネットを介してユーザへ、インターネットを介して遠隔のデータベースへ、またはこのような情報が有利に利用され得る任意の場所へなど、種々の可能なインタフェースを介して検定情報を送るように実施される。このタイプのディスクドライブインタフェース接続に関するさらなる詳細は、本出願の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2001年11月7日出願された「Interactive System For Analyzing Biological Samples And Processing Related Information And The Use Thereof」と題する米国特許出願第09/986,078号に開示されており、当該出願はその内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

10

【0036】

次に、図3A、図3B、および図3Cを特に参照して、反射型ディスク144を、キャップ146、流路層148、および基板150を有して示す。流路層148は、薄膜接着部材により形成されてもよい。キャップ146は、サンプルを受け取る注入ポート152と排出ポート154とを有する。キャップ146は、主にポリカーボネートから形成することができ、その底部がキャップ反射層156で被覆され得る。反射層156は、アルミニウムまたは金といった金属からなることが好ましい。

【0037】

流路層148は、流路層148から所望の形状を切り抜くことにより、流体回路158を画定する。各流体回路158は、フロー流路160および帰還流路162を有することが好ましく、混合チャンバ164を有するものもある。混合チャンバ166はフロー流路160に対して対称に形成されることができ、オフセット混合チャンバ168はフロー流路160の片側に形成される。流体回路158はかなり単純な構成であるが、流体回路は、調製領域または廃液領域などの他の流路およびチャンバを含んでもよく、これは例えば、「Laboratory in a Disc」と題する米国特許第6,030,581号に示されており、当該特許は参照により本明細書に援用される。これらの流体回路は、本明細書中で代替的に用いられ、図33A~図33D、図34A~図34C、図35、および図36A~図36Cに関連してさらに詳細に説明するようなものなどの、弁および他の流体制御構造を含んでもよい。流路層148は基体および上部に結合するための接着剤を含んでもよい。

20

30

【0038】

基板150は、プラスチック層172を有し、層172の上部に体積した基板反射層174の開口として形成される標的領域170を有する。この実施の形態では、図3Cに最もよく示される反射層174は、動作情報を符号化するために用いられる。反射層174は、単一の相に限定されず、例えばMOディスク上の光学スタックなどの基板150上の反射層のいくつかのスタックであってもよい。プラスチック層172は、ポリカーボネートから形成されることが好ましい。標的領域170は、任意の所望の形状に基板反射層174の一部を除去することにより、または基板反射層174を塗布する前に標的領域の区域をマスクすることにより形成することができる。基板反射層174は、アルミニウム、金、または磁気合金といった金属から形成されることが好ましく、例えばウォブル溝を通したかまたはピットの配列を通した入射光で読み取られる動作情報を符号化するように、基板の残りの部分と共に構成してもよい。したがって、基板150の下から入射する光は、標的領域170を除いて層174により反射され、標的領域170を通った光は層156により反射される。標的領域は、検査特徴が検出される場所である。標的領域が、抗体、DNA鎖、または標的に結合し得る他の物質がある場所である場合、標的領域は捕捉領域と呼んでもよい。

40

【0039】

次に、図3Cを特に参照すると、光ディスク144は、部分断面斜視図を示すために破断している。活性層176が、基板反射層174上に形成される。活性層176は通常、

50

ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリカーボネート、金、活性ガラス、変性ガラス (modified glass)、または例えばポリスチレン無水マレイン酸 (polystyrene-co-maleic anhydride) などの変性ポリスチレンから形成され得る。この実施の形態では、流路層 148 は活性層 174 上に位置付けられる。

【0040】

動作の際には、サンプルはキャップ 146 の注入ポート 152 から導入され得る。回転すると、サンプルは活性層 176 に沿って注入ポート 152 から外側に移動する。いくつかの生物学的または化学的な反応またはプロセスの 1 つにより、検査特徴と呼ばれる検出可能な特徴物が、標的領域に存在し得る。このようなプロセスの例は、援用される米国特許第 6,030,581 号に、また本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2001年11月16日に出願された「Methods And Apparatus For Detecting And Quantifying Lymphocytes With Optical Biodiscs」と題する米国特許出願第 09/988,728 号、および 2001年12月21日に出願された「Surface Assembly For Immobilizing DNA Capture Probes And Bead-Based Assay Including Optical Bio-Discs And Methods Relating Thereto」と題する米国特許出願第 10/035,836 号に示されており、これら出願の双方は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

10

【0041】

捕捉剤を有する捕捉層により標的領域内で捕捉された検査特徴は、反射層 174 と同一平面上にある、通常は入射ビームが従来型の読み取り装置に合焦される焦点面に位置するように設計することができる。別法として、検査特徴は、焦点面から離間した平面に捕捉され得る。前者のような構成は「近位」型ディスクと呼ばれ、後者は「遠位」型ディスクと呼ばれる。

20

【0042】

図 4A、図 4B、および図 4C を参照して、透過型光ディスク 180 のある特定の実施の形態は、透明キャップ 182 と、流路層 148 と、基板 150 とを含むことが示されている。透明キャップ 182 は、注入ポート 152 および排出ポート 154 を含み、主にポリカーボネートから形成されることが好ましい。トリガマーク 184 は、キャップ 182 上に含まれ得る。流路層 148 は、図 3A、図 3B、および図 3C に関連して説明したものと同様の構造および用法を有し得る流体回路 158 を有する。基板 150 は、標的領域 170 を含んでいてもよく、ポリカーボネート層 172 を含むことが好ましい。基板 150 は、層 172 の上部に堆積された薄い半反射層 186 を有してもよいが、その必要はない。半反射層 186 は、反射型ディスク 144 (図 3A ~ 図 3C) の基板 150 上の基板反射層 174 よりも大幅に薄いことが好ましい。半反射層 186 は、単一層に限定はされず、例えば MO ディスク上の光学スタックなどの基板 150 上の半反射層のいくつかのスタックであってもよい。半反射層 186 は、アルミニウム、金、または磁気合金といった金属から形成されることが好ましいが、入射光ビームの一部が層 186 に貫通して層 186 を通過することができるほど十分に薄い一方、入射光の一部は反射し戻される。金薄膜層 186 は、たとえば、約 700 Å を越える厚さでは 95% の反射性を有するが、金薄膜を通る光の透過は、約 100 Å で約 50% の透過性を有する。

30

【0043】

図 4C は、透過型ディスク 180 の破断斜視図である。層 186 の半反射性により、その表面全体が、ディスク上のトリガマークまたは符号化データパターンにより画定される仮想領域を含む標的領域に潜在的に利用可能となる。標的領域 170 は、図示の形状または任意の所望の形状に指定領域をマーキングすることにより形成することもできる。標的領域 170 を示すマーキングは、半反射層 186 上になされてもよく、または基板 150 の底部 (ディスクの下) になされてもよい。標的領域 170 は、半反射層 186 上のシルクスクリーンインクにより作成することができる。

40

【0044】

半反射層 186 上には活性層 176 が施される。活性層 176 は、層 176 (図 3C) に関連して上述されたものと同じ材料から形成されてもよく、サンプルがディスク 180

50

の開口を通して供給され、ディスクが回転すると、ほぼ同じ目的を果たす。透過型ディスク 180 では、透明キャップ 182 上には、反射型ディスク 144 (図 3C) の反射層 156 に相当する反射層はない。

【0045】

次に図 5A を参照して、本発明によるバイオディスク 110 (図 1) の反射型ディスク実施の形態 144 (図 3A ~ 図 3C) のトラックを横切った断面図が示されている。図示のように、この図は、ディスクの半径およびフロー流路に沿って長手方向に取られている。図 5A は、プラスチック層 172 および基板反射層 174 からなる基板 150 を含む。この実施の形態では、基板 150 は一連の溝 188 を含む。溝 188 は、ディスクの中心付近から外縁に向かって延びる螺旋の形態である。溝 188 は、呼びかけまたは入射ビーム 122 がディスク上の螺旋溝 188 に沿って追従できるように実施される。このタイプの溝 188 は、「ウォブル溝」として知られている。溝 188 は、波状すなわち波形の側壁を有する底部により形成される。高くなった、すなわち立ち上がった部分は、隣接する溝 188 を螺旋状に分離する。この実施の形態で溝 188 上に施された反射層 174 は、図示するように、性質上等角である。また、図 5A は、反射層 174 上に施された活性層 176 も示している。図 5A に示すように、標的領域 170 は、所望の場所の反射層 174 の区域または一部を除去することによるか、あるいは、反射層 174 を施す前に所望の区域をマスクすることにより形成される。図 5A にさらに示すように、プラスチック接着部材または流路層 148 が活性層 176 上に施される。また、図 5A は、キャップ部 146、および、当該キャップ部 146 に関連した反射面 156 も示している。したがって、キャップ部 146 が、所望の切り取り形状を備えたプラスチック接着部材 148 に貼付されると、それによって、フロー流路 160 が形成される。

10

20

【0046】

図 5B は、図 5A で示したものと同様であり、本発明によるバイオディスク 110 (図 1) 透過型ディスク 180 (図 4A ~ 図 4C) の実施の形態のトラックを横切った断面図である。この図は、ディスクの半径およびフロー流路に沿って縦方向に描かれている。図 5B は、薄い半反射層 186 を含む基板 150 を示す。この薄い半反射層 186 は、光源 118 (図 2) からの入射または呼びかけビーム 122 がディスクを貫通して通過し、上部検出器 130 により検出されることを可能にする一方で、光の一部は帰還ビーム 124 の形態で反射し戻される。薄い半反射層 186 の厚さは、その追従能力を維持するためにディスク読み取り装置が必要とする反射光の最小量により確定される。この実施の形態の基板 150 は、図 5A で説明したものと同様に、一連の溝 188 を含む。また、この実施の形態の溝 188 は、ディスクの中心付近から外縁に向かって延びる螺旋の形態であることが好ましい。溝 188 は、呼びかけビーム 122 を螺旋に沿って追従できるように実施される。図 5B は、薄い半反射層 186 上に施された活性層 176 も示している。図 5B にさらに示すように、活性層 176 上にはプラスチック接着部材または流路層 148 が施される。図 5B は、透明キャップ 182 も示す。したがって、透明キャップ 182 が、所望の切り取り形状を備えたプラスチック接着部材 148 に貼付されると、それによって、フロー流路 160 が形成され、入射ビーム 122 の一部が実質的に反射されずにそこを通過することができる。次に、通過する光の量が上部検出器 130 により検出され得る。

30

40

【0047】

図 6A は、図 5A と同様ではあるが、フロー流路 160 を半径方向から観察した場合の、反射型ディスクとその初期屈折特性とを示す、ディスクの半径に垂直に取った図である。並列に比較して、図 6B は図 5B と同様ではあるが、フロー流路 160 を半径方向から観察した場合の、透過型ディスクとその初期屈折特性を表す、ディスクの半径に垂直に取った図である。溝 188 に沿って断面を切断してあるため、溝 188 は図 5A および図 5B では見えない。図 6A および図 6B は、これらの実施の形態では、溝 188 に垂直に位置する狭いフロー流路 160 の存在を示す。図 5A、図 5B、図 6A、および図 6B は、反射型ディスクおよび透過型ディスクそれぞれの全厚を示す。これらの図では、入射ビーム 122 は、基板 150 と最初に相互作用するように示されており、この基板 150 は、

50

図示のように入射ビームの経路を変化させる屈折特性を有し、反射層 174 または薄い半反射層 186 上にビーム 122 を合焦させるようになっている。

【0048】

流体回路 158 は、等半径すなわち「e-rad」フォーマットに構成されてもよく、これは、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2002年1月29日に出願された「Optical Discs Including Equi-Radial and/or Spiral Analysis Zones and Related Disc Drive Systems and Methods」と題する米国仮出願第60/353,014号に開示されており、当該出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0049】

検定化学物質および二重ビーズ形成

次に図7A～図10A、および図7B～図10Bを参照すると、捕捉ビーズ190と、レポータービーズ192と、二重ビーズ複合体194の形成とが示されている。捕捉ビーズ190は、免疫検定(図7B～図10B)などの生物学的検定、分子検定、およびより詳細には遺伝的検定(図7A～図10A)を含むさまざまな異なる検定と共に用いることができる。免疫検定の場合、抗体輸送プローブ196がビーズに結合する。抗体輸送プローブ196は、タンパク質標的を捕捉するように実施される抗原または抗体などのタンパク質を含む。分子検定の場合、オリゴヌクレオチド輸送プローブ198がビーズに結合し得る。オリゴヌクレオチド輸送プローブ198は、遺伝標的を捕捉するように実施されるDNAまたはRNAなどの核酸を含む。

【0050】

図7Aに示すように、試験サンプルから得られる標的DNAまたはRNA202などの標的剤を、オリゴヌクレオチド輸送プローブ198で被覆された捕捉ビーズ190に添加する。この実施態様では、輸送プローブ198は、所望の核酸配列から形成される。この検定系の固相へのDNAプローブの結合に関する態様は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2001年3月26日に出願された「Use of Double Stranded DNA for Attachment to Solid Phase to Reduce Non-Covalent Binding」と題する米国仮出願第60/278,685号においてさらに詳細に説明されている。この出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0051】

図7Bに示すように、試験サンプルからの標的抗原204などの標的剤は、抗体輸送プローブ196で被覆された捕捉ビーズ190に添加される。この代替の実施態様では、輸送プローブ196は、抗体などのタンパク質から形成される。

【0052】

捕捉ビーズ190は、捕捉ビーズ190を物質懸濁液または溶液から単離させる特性を有する。捕捉ビーズは、所望のサイズに基づいて選択することができ、捕捉ビーズを単離可能にするのに好ましい方法は、捕捉ビーズが磁性を有することである。

【0053】

図8Aは、本発明の遺伝的検定の実施態様における、捕捉ビーズ190上の相補的な輸送プローブ198への標的DNAまたはRNA202の結合を示す。図8Bは、図8Aの免疫検定バージョンを示し、輸送プローブ196は別法として、標的タンパク質204に結合するための抗体または抗原を含み得る。

【0054】

図9Aは、標的剤202(図8Aを参照)と相補的なオリゴヌクレオチドシグナルプローブ206で被覆されたレポータービーズ192を示す。レポータービーズ192は、検出および報告のための所望のサイズおよび物質特性に基づいて選択される。ある特定の実施の形態では、2.1μmのポリスチレンビーズが用いられる。シグナルプローブ206は、標的DNAまたはRNAを捕捉するDNAまたはRNA鎖であり得る。

【0055】

図9Bは、図8Bに示すように、標的剤204に結合する抗体シグナルプローブ208で被覆されたレポータービーズ192を示す。レポータービーズ192は、検出および報

10

20

30

40

50

告のための所望のサイズおよび物質特性に基づいて選択される。これもまた、 $2.1 \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを含むことが好ましい場合がある。シグナルプローブ208は、タンパク質または糖タンパク質標的を捕捉するように実施される抗原または抗体であり得る。

【0056】

図10Aは、プローブ198を有する捕捉ビーズ190、標的剤202、およびプローブ206を有するレポータービーズ192から形成することができる二重ビーズ複合体194のイラスト表現である。捕捉ビーズ190およびレポータービーズ192それぞれに結合したプローブ198および206は、標的剤202と相補的ではあるが互いに相補的ではない配列を有する。標的剤検出と、ビーズへの標的剤の非特異的結合を減らす方法と
10

【0057】

図10Bは、プローブ196を有する捕捉ビーズ190、標的剤204、およびプローブ208を有するレポータービーズ192から形成することができる二重ビーズ複合体194の免疫検定バージョンのイラスト表現である。捕捉ビーズ190およびレポータービーズ192それぞれに結合したプローブ196および208は、標的剤202にのみ結合し、互いには結合しない。
20

【0058】

本検定系の代替の実施の形態では、標的剤結合の効率および特異性は、レポータービーズ192と捕捉ビーズ190とを一時的に連結する切断可能スペーサまたは置換可能スペーサの使用により高めることができる。切断可能スペーサまたは置換可能スペーサにより形成される二重ビーズ複合体は、基本的に、輸送プローブとシグナルプローブとを互いに近接して配置するため、両プローブへのより効率的な標的結合が可能となる。標的剤がプローブに結合すると、次に、結合している標的剤が二重ビーズ構造を保持することを可能にしつつ、スペーサが切断され得る。切断可能スペーサの二重ビーズ検定系での使用は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2001年3月26日に出願された「Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers to Improve Specificity and Sensitivity」と題する米国仮出願第60/278,688号に開示されており、当該出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。切断可能スペーサおよび置換可能スペーサの使用は、図42A~図42Dおよび図43A~図43Cに関連して以下でも説明する。
30

【0059】

次に図11Aを参照して、本発明の一態様による、溶液中で二重ビーズ複合体構造を作成する「シングルステップハイブリダイゼーション」技法を用いて分子検定を準備する方法が示される。この方法は、ステップI、ステップII、ステップIII、ステップIV、およびステップVとして連続的に示す5つの主なステップを含む。
40

【0060】

この方法のステップIでは、オリゴヌクレオチド輸送プローブ198で被覆されたいくつかの捕捉ビーズ190を、緩衝溶液210を含む試験管212に入れる。この方法で用いられる捕捉ビーズ190の数は、例えば約 1.0×10^7 であり、それぞれの直径は約 $1 \mu\text{m}$ 以上であり得る。捕捉ビーズ190をハイブリダイゼーション溶液に懸濁し、ピペット214による注入により試験管212にロードする。好ましいハイブリダイゼーション溶液は、 0.2 M の NaCl 、 10 mM の MgCl_2 、 1 mM の EDTA 、 50 mM の Tris-HCl 、 $\text{pH } 7.5$ 、および $5 \times$ デンハルト混合物(Denhart's mix)からなる。所望のハイブリダイゼーション温度は 37°C である。この実施の形態の予備的ステップ
50

では、輸送プローブ198を、EDC結合により3 μ mの磁気捕捉ビーズ190に結合させる。結合法に関するさらなる詳細は、本発明の譲受人に譲渡された、2001年2月27日に出願された「Methods for Attaching Capture DNA and Reporter DNA to Solid Phase Including Selection of Bead Types as Solid Phase」と題する米国仮出願第60/271,922号、および2001年3月22日に出願された「Methods of Conjugation for Attaching Capture DNA and Reporter DNA to Solid Phase」と題する米国仮出願第60/277,854号に開示されており、これら出願の双方は、その全文が本明細書に援用される。

【0061】

ステップI Iに示すように、標的DNAまたはRNA202を溶液に添加する。オリゴヌクレオチド輸送プローブ198は、DNAまたはRNA標的剤202と相補的である。したがって、標的DNAまたはRNA202は、図8Aに示すように捕捉ビーズ190に結び付いた輸送プローブ198の相補配列に結合する。 10

【0062】

次にステップI I Iを参照して、オリゴヌクレオチドシグナルプローブ206で被覆されたレポータービーズ192を溶液210に添加する。図9Aおよび図10Aにも示すように、シグナルプローブ206は、標的DNAまたはRNA202と相補的である。一実施の形態では、標的DNAまたはRNA202の一部と相補的なシグナルプローブ206は、2.1 μ mの蛍光レポータービーズ192に接合する。シグナルプローブ206および輸送プローブ198はそれぞれ、標的DNA202と相補的ではあるが互いに相補的ではない配列を有する。レポータービーズ192を加えた後、標的DNA202が捕捉ビーズ190とレポータービーズ192とを連結するように、二重ビーズ複合体194が形成される。特定の完全な洗浄により、レポータービーズ192と捕捉ビーズ190との間の非特異的結合は最小限に抑えられるはずである。標的剤202およびシグナルプローブ206は、37で3~4時間ハイブリダイズされることが好ましい。 20

【0063】

この実施の形態および他の実施の形態では、ハイブリダイゼーション中の断続的混合(すなわち、周期的混合とそれに続く停止)により、連続的混合よりも二重ビーズ複合体の収量が高まることが見出された。したがって、このステップをディスク上で行う場合、図2のディスクドライブモータ140およびコントローラ142を用いて、ディスクを周期的に回転させ、所望の断続的混合を行うことが有利であり得る。これは、回転および停止セッションの好ましいデュティサイクルを用いた規定の方法で、ディスクを一方向に回転させ、次にディスクを停止させ、その後ディスクを同じ方向に再び回転させるという、ディスクに符号化された混合プロトコルで実施され得る。別法として、符号化された混合プロトコルは、回転、停止、および逆回転セッションの好ましいデュティサイクルを用いて、第1の方向にディスクを回転させ、次にディスクを停止させ、その後ディスクを逆方向に再び回転させることができる。本発明のこれらの特徴は、図33Aおよび図35に関連してさらに詳細に説明する。 30

【0064】

次に、図11AのステップI Vに示すように、ハイブリダイゼーション後、二重ビーズ複合体194を溶液中の未結合レポータービーズから分離する。捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液を磁界に曝露して二重ビーズ複合体構造194を捕捉することができる。磁界は、内蔵磁石218を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、内蔵磁石218は、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。レポータービーズに結合していない捕捉ビーズも単離されることに留意されたい。別法として、この磁気による除去ステップは、図33A、図35、および図36A~図36Cに示すようにオンディスクで行ってもよい。 40

【0065】

ステップI Vに示す精製プロセスは、浮遊粒子を含む上清の除去を含む。洗浄緩衝液を 50

試験管に添加し、ビーズ溶液を十分に混合する。1ステップ検定に好ましい洗浄緩衝液は、145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDm、および10 mM EDTAからなる。未結合レポータービーズ182、浮遊DNA、および非特異的結合粒子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的配列、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、ここで、重なり合った二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。捕捉ビーズへのレポータービーズの非特異的結合を低減する方法に関連する他の態様に関するさらなる詳細は、例えば、本発明の譲受人に譲渡された、2001年2月28日に出願された「Reduction of Non-Specific Binding in Dual Bead Assays by Selection of Bead Type and Bead Treatment」と題する米国仮出願第60/272,134号、および2001年3月12日に出願された「Reduction of Non-Specific Binding in Dual Bead Assays by Selection of Buffer Conditions and Wash Conditions」と題する米国仮出願第60/275,006号に開示されている。これら出願の双方は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

10

【0066】

図11Aに示す最後の主なステップはステップVである。このステップでは、二重ビーズ複合体を洗浄緩衝溶液で約3~5分間洗浄してから、検定混合物をディスクにロードして分析に備えることができる。

【0067】

図11Bは、図11Aの方法と同様の「シングルステップ抗原結合」法を用いて、溶液中の二重ビーズ複合体構造を形成する免疫検定を示す。この方法も同様に、5つの主なステップを含む。これらのステップは、図11AのステップI、ステップII、ステップIII、ステップIV、およびステップVそれぞれを指す。

20

【0068】

ステップIに示すように、例えば、数が約 10×10^7 でそれぞれの直径が約 $1 \mu\text{m}$ 以上であり、抗体輸送プローブ196で被覆された捕捉ビーズ190を、緩衝溶液210に添加する。この溶液は、図11Aに示す方法で用いられるものと同じであってよく、または免疫化学的検定で用いるように特別に調製してもよい。抗体輸送プローブ196は、標的抗原204に対して特異的親和性を有する。輸送プローブ196は、図8Bにも示すように、標的抗原204内のエピトープに特異的に結合する。一実施の形態では、標的抗原の一部に対する親和性を有する抗体輸送プローブ196は、EDC結合を介して $3 \mu\text{m}$ の磁気捕捉ビーズ190に結合することができる。別法として、捕捉ビーズ190への輸送プローブ196の結合は、受動的な吸着により達成することができる。

30

【0069】

次に図11Bに示すステップIIを参照して、標的抗原204を溶液に添加する。標的抗原204は、図8Bにも示すように、捕捉ビーズ190に結び付いた抗体輸送プローブ196に結合する。

【0070】

ステップIIIに示すように、抗体シグナルプローブ208で被覆されたレポータービーズ192を溶液に添加する。抗体シグナルプローブ208は、図9Bおよび図10Bにも提示するように、標的抗原204のエピトープに特異的に結合する。一実施の形態では、シグナルプローブ208は $2.1 \mu\text{m}$ の蛍光レポータービーズ192に結合する。シグナルプローブ208および輸送プローブ196はそれぞれ、標的抗原の特異的エピトープに結合するが、互いには結合しない。レポータービーズ192を添加した後、標的抗原204が捕捉ビーズ190とレポータービーズ192とを連結するように、二重ビーズ複合体194が形成される。特定の完全な洗浄により、レポータービーズ192と捕捉ビーズ190との間の非特異的結合は最小限に抑えられるはずである。

40

【0071】

ステップIVでは、ステップIIIでの結合後に、二重ビーズ複合体194を溶液中の

50

未結合レポータービーズから分離する。捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液に磁界を印加して二重ビーズ複合体構造194を捕捉することができる。磁界は、内蔵磁石218を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、内蔵磁石218は、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。レポータービーズに結合していない捕捉ビーズも単離されることに留意されたい。別法として、上記で示したように、この磁気による除去ステップは、図33A、図35、および図36A～図36Cに示すようにオンディスクで行ってもよい。

【0072】

ステップIVの精製プロセスは、浮遊粒子を含む上清の除去を含む。洗浄緩衝液を試験管に添加し、ビーズ溶液を十分に混合する。未結合レポータービーズ182、浮遊タンパク質サンプル、および非特異的結合粒子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的抗原、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、ここで、重なり合った二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。

【0073】

図11Bに示す最後の主なステップはステップVである。このステップでは、二重ビーズ複合体を洗浄緩衝溶液で約3～5分間洗浄してから、検定混合物をディスクにロードすることにより、分析される状態にする。

【0074】

図12Aは、6つの主なステップを有する二重ビーズ複合体を作成する、本明細書では「2ステップハイブリダイゼーション」と呼ぶ代替的な遺伝的検定法を示す。概して、捕捉ビーズを、DNAまたはRNA標的剤と相補的なオリゴヌクレオチド輸送プローブ198で被覆し、緩衝溶液中加入する。この実施の形態では、標的剤の一部と相補的な輸送プローブは、EDC結合を介して3μmの磁気捕捉ビーズに結合する。固相へのオリゴヌクレオチド輸送プローブの他のタイプの結合を利用してもよい。これらは、例えば、ストレプトアビジン-ビオチンの受動的な吸着またはストレプトアビジン-ビオチン相互作用の使用を含む。本発明のこの方法によるこれら6つの主なステップは、連続して図12AのステップI、ステップII、ステップIII、ステップIV、ステップV、およびステップVIを指す。

【0075】

次に、図12Aに示すステップIをより詳細に参照して、ハイブリダイゼーション溶液に懸濁された捕捉ビーズ190を、ピペット214から試験管212にロードする。好ましいハイブリダイゼーション溶液は、0.2M NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、50mM Tris-HCl、pH7.5、および5×デンハルト混合物である。望ましいハイブリダイゼーション温度は37である。

【0076】

ステップIIでは、標的DNAまたはRNA202が溶液に添加され、捕捉ビーズ190に結び付いた輸送プローブ198の相補配列に結合する。この方法の1つの特定の実施の形態では、標的剤202および輸送プローブ198を、37で2～3時間ハイブリダイズさせる。しかしながら、十分なハイブリダイゼーションは室温で30分間以内で行うことができる。高温では、ハイブリダイゼーションはほぼ瞬時に行うことができる。

【0077】

次にステップIIIに示すように、捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液を磁界に曝露して結合している標的配列を単離することにより、捕捉ビーズに結合している標的剤202を溶液中の未結合種から分離する。磁界は、内蔵の永久磁石218または電磁石を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、永久磁石218または電磁石は、溶液のピペット抽出によって、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中に浮遊するいかなる未結合標的DNA202も除去する。上記の方法に関して、この方法のオンディスクの方法では、この磁気による除去ステップは、図33A、図35、図36A～図36Cに示す

10

20

30

40

50

ように行ってもよい。洗浄緩衝液を添加し、分離プロセスを繰り返すことができる。輸送プローブ198および標的DNA202のハイブリダイズ後の好ましい洗浄緩衝液は、145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、および0.05% Tweenからなる。ビーズへの標的剤の非特異的結合を低減するためのハイブリダイゼーション法および技法は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2001年3月26日に出願された「Reduction of Non-Specific Binding of Dual Bead Assays by Use of Blocking Agents」と題する米国仮出願第60/278,691号にさらに開示されている。この出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0078】

次に図12Aに示すステップIVを参照して、図11Aに示す方法に関連して説明したように、レポータービーズ192を溶液に添加する。レポータービーズ192は、標的剤202と相補的なシグナルプローブ206で被覆される。この方法の1つの特定の実施の形態では、標的剤202の一部と相補的なシグナルプローブ206は、2.1 μ mの蛍光レポータービーズ192と結合する。シグナルプローブ206および輸送プローブ198はそれぞれ、標的剤202と相補的ではあるが互いに相補的ではない配列を有する。レポータービーズ192の添加後、二重ビーズ複合体構造190が形成される。当業者には容易に明らかとなるように、二重ビーズ複合体構造は、対象となる標的剤が存在する場合にのみ形成される。この形成では、標的剤202は、磁気捕捉ビーズ190とレポータービーズ192とを連結する。好ましい緩衝溶液を用いて、特定の完全な洗浄により、レポータービーズと捕捉ビーズとの間の非特異的結合は最小限に抑えられる。標的剤202およびシグナルプローブ206は、37 $^{\circ}$ Cで2~3時間ハイブリダイズされることが好ましい。上述のステップIIのように、十分なハイブリダイゼーションは室温で30分以内で行うことができる。より高温では、このステップにおけるハイブリダイゼーションはほぼ瞬時に行うこともできる。

【0079】

次に図12Aに示すステップVを参照して、ステップIVのハイブリダイゼーション後、二重ビーズ複合体194を溶液中の未結合種から分離する。捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液に再び磁界を印加して二重ビーズ複合体194を単離する。なお、ここでも同様に、単離物はレポータービーズに結合しない捕捉ビーズを含むであろう。この方法のオンディスクの方法での上記のステップIIIのように、この磁気による分離ステップは、図33A、図35、および図36A~図36Cに示すように行ってもよい。

【0080】

浮遊粒子を含む上清を除去する精製プロセスは、緩衝液を試験管に添加すること、およびビーズ溶液を十分に混合することを含む。2ステップ検定に好ましい洗浄緩衝液は、145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDM、および10mM EDTAからなる。未結合レポータービーズ、浮遊DNA、および非特異的結合粒子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的配列、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、ここで、重なり合った二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。レポータービーズ、標的剤、および捕捉ビーズの間の非特異的な結合の低減を対象とする他の関連する態様は、例えば、本発明の譲受人に譲渡された、2001年2月28日に出願された「Mixing Methods to Reduce Non-Specific Binding in Dual Bead Assays」と題する米国仮出願第60/272,243号、および2001年3月1日に出願された「Dual Bead Assays Including Linkers to Reduce Non-Specific Binding」と題する米国仮出願第60/272/485号に開示されており、これらはその内容のすべてが本明細書に援用される。

【0081】

図12Aに示す最後の主なステップはステップVIである。このステップでは、二重ビーズ複合体194を洗浄緩衝溶液で約3~5回洗浄してから、検定混合物をディスクにロードして分析する。別法として、このステップの間、オリゴヌクレオチドシグナルおよび

輸送プローブをライゲーションして、ディスク分析および信号検出プロセス中の二重ビーズ複合体の分解を防止することができる。プローブライゲーション法に関するさらなる詳細は、本発明の譲受人に譲渡された、2001年3月26日に出願された「Improved Dual Bead Assays Using Ligation」と題する米国仮出願第60/278,694号に開示されており、当該出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0082】

本発明の別の態様によると、図12Bは、図11Bの免疫検定法に関連して説明し、図12Aの遺伝的検定のステップに従うものと同様の免疫検定法を示す。この方法は、ここでは免疫化学的検定の二重ビーズ複合体を作成する「2ステップ結合」とも呼ばれる。図12Aに示す方法のように、この方法は、6つの主なステップを含む。概して、標的抗原のエピトープに特異的に結合する抗体輸送プローブで被覆された捕捉ビーズを、緩衝溶液中に入れる。1つの特定な実施の形態では、抗体輸送プローブを、3 μ mの磁気捕捉ビーズに結合させる。検定を行うために利用されるディスクドライブおよびディスクアセンブリのタイプに応じて、異なるサイズの磁気捕捉ビーズを用いることができる。本発明のこの代替法によるこれら6つの主なステップは、図12BのステップI、ステップII、ステップIII、ステップIV、ステップV、およびステップVIそれぞれを指す。

10

【0083】

次に図12Bに示すステップIを特に参照して、緩衝溶液210中に懸濁した捕捉ビーズ190を、ピペット214からの注入によって試験管212にロードする。

【0084】

ステップIIでは、標的抗原204が溶液に添加され、捕捉ビーズ190に結び付いた抗体輸送プローブ196に結合する。標的抗原204および輸送プローブ196は、37で2~3時間結合させることが好ましい。結合時間をさらに短くすることもできる。

20

【0085】

ステップIIIに示すように、捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液に磁界を印加して、結合している標的タンパク質または糖タンパク質を単離することにより、捕捉ビーズ190に結合した標的抗原204を溶液中の未結合種から分離する。磁界は、内蔵の永久磁石218または電磁石を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、永久磁石218または電磁石は、溶液のピペット抽出によって、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中に浮遊するいかなる未結合標的DNA204も除去する。洗浄緩衝液を添加して、分離プロセスを繰り返すことができる。

30

【0086】

次にステップIVに示すように、図11Bに示す方法に関連して説明したように、レポータービーズ192を溶液に添加する。レポータービーズ192は、標的抗原204に対する親和性を有するシグナルプローブ208で被覆される。2ステップの免疫化学的検定の1つの特定の実施の形態では、標的剤204の一部に特異的に結合するシグナルプローブ208を、2.1 μ mの蛍光レポータービーズ192に結合させる。シグナルプローブ208および輸送プローブ196はそれぞれ、標的剤204の特異的エピトープに結合するが、互いには結合しない。レポータービーズ192の添加後、二重ビーズ複合体構造190が形成される。当業者には容易に明らかとなるように、これらの二重ビーズ複合体構造は、対象となる標的抗原が存在する場合にのみ形成される。この形成では、標的抗原204は、磁気捕捉ビーズ190とレポータービーズ192とを連結する。好ましい緩衝溶液を用いて、特定の完全な洗浄により、レポータービーズと捕捉ビーズとの間の非特異的結合は最小限に抑えられる。標的抗原204およびシグナルプローブ208は、37で2~3時間ハイブリダイズされることが好ましい。上述のステップIIのように、十分な結合は室温で30分以内で行うことができる。免疫検定の場合、37を超える温度は、タンパク質が変性するため好ましくない。

40

【0087】

次に図12Bに示したステップVに移り、ステップIVに示す結合後、二重ビーズ複合体194を溶液中の未結合種から分離する。これは、図示のように捕捉ビーズ190の磁

50

気特性を用いて、溶液を磁界に曝露し二重ビーズ複合体 194 を単離することにより行われる。単離物はレポータービーズに結合していない捕捉ビーズを含むことに、再び留意されたい。

【0088】

浮遊粒子を含む上清を除去する精製プロセスは、洗浄緩衝液を試験管に添加すること、およびビーズ溶液を十分に混合することを含む。未結合レポータービーズ、浮遊タンパク質、および非特異的結合粒子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的剤、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、そこで、重なり合う二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。

10

【0089】

図 12 B に示す最後の主なステップはステップ VI である。このステップでは、二重ビーズ複合体 194 を洗浄緩衝溶液で約 3 ~ 5 回洗浄してから、検定混合物をディスクにロードして分析する。

【0090】

上述の他のいかなる方法とも同様に、図 12 B に示す方法の磁気による除去または分離ステップは、別法として、図 33 A ~ 図 33 D、図 34 A ~ 図 34 C、図 35、および図 36 A ~ 図 36 C に示すディスク、流体回路、および装置を用いて、オンディスクで行ってもよい。

【0091】

次に図 13 を参照して、混合またはロードチャンバ (loading chamber) 164 のディスク層を示す断面図 (図 6 と同様) が示されている。ロードチャンバ 164 へのアクセスは、二重ビーズ検定調製液がディスクシステムにロードされる注入ポート 152 により得られる。

20

【0092】

図 14 は、ピペット 214 で二重ビーズ複合体 194 がディスクに注入されている、混合またはロードチャンバ 164 を示す図 13 と同様の図である。この例では、複合体は、標的 DNA または RNA 202 により互いに連結されたレポータービーズ 192 および捕捉ビーズ 190 を含む。シグナル DNA 206 は、捕捉剤と相補的な一本鎖 DNA として示される。図 13 および図 14 に示すディスクは、上述の免疫検定および一般的な分子検定を含む他の検定に容易に適合させることができ、これらの検定は、代替的に、それぞれに応じて輸送プローブ、標的剤、およびシグナルプローブとして実施される抗原または抗体などのタンパク質を用いる。

30

【0093】

図 15 A は、二重ビーズ複合体 194 が捕捉剤 220 に固定された後の、フロー流路 160 および標的または捕捉領域 170 を示す。この実施の形態の捕捉剤 220 は、少量の捕捉剤溶液を活性層 176 に施して、標的領域 170 の区域内に捕捉剤のクラスタを形成することにより、活性層 176 に結び付ける。この実施の形態では、捕捉剤は、ビオチンまたは BSA ビオチンを含む。図 15 A は、本発明で用いられる二重ビーズ複合体 194 の成分としてのレポータービーズ 192 および捕捉ビーズ 190 も示す。この実施の形態では、アンカー剤 (anchor agent) 222 をレポータービーズ 192 に結び付ける。この実施の形態では、アンカー剤 222 は、ストレプトアビジンまたはニュートラビジン (Neutravidin) を含んでよい。したがって、レポータービーズ 192 が捕捉剤 220 に接近すると、ビオチン - ストレプトアビジン相互作用によってアンカープローブ 222 / 206 と捕捉剤 220 との間に結合が起こり、それにより、標的領域 170 内に二重ビーズ複合体 194 が保持される。この時点で、標的領域 170 内の二重ビーズ複合体 194 を検出するのに、標的領域 170 に送られる呼びかけビーム 224 を用いることができる。

40

【0094】

図 15 A および図 15 B に示す本発明の実施の形態は、図 4 A ~ 図 4 C、図 5 B、および図 6 B に示す透過型ディスクで代替的に実施してもよい。

50

【0095】

図15Bは、その後にディスク回転速度を変えた後の、標的領域170内のレポータービーズ192の取り込み(entrapment)を示す、図15Aと同様の断面図である。回転速度の変化により、捕捉ビーズ190が二重ビーズ複合体194から除去され、最終的に、標的領域170のレポータービーズ192を単離して、呼びかけまたは読み取りビーム224で検出する。

【0096】

図16Aは、図15Aと同様の断面図であり、図15Aの代替の実施の形態を示し、レポータービーズ192上のシグナルプローブ206またはアンカー剤222が、捕捉剤220に直接ハイブリダイズする。図16Aは、捕捉剤220での二重ビーズ複合体194の固体後のフロー流路160および標的または捕捉領域170を示す。この実施の形態の捕捉剤220は、少量の捕捉剤溶液を活性層176に施して、標的領域170の区域内に捕捉剤のクラスタを形成することにより、活性層176に結び付ける。別法として、捕捉剤220を、活性層176に共有結合するアミノ基を用いて、活性層に付着させてもよい。この実施の形態では、捕捉剤はDNAを含む。図16Aは、本発明で用いられるような二重ビーズ複合体194として、レポーター192および捕捉ビーズ190も示す。この実施の形態では、アンカー剤222は、レポータービーズ192に付着する。この実施の形態のアンカー剤222は、捕捉剤220またはオリゴヌクレオチドシグナルプローブ206自体と相補的な核酸の特異的配列であり得る。したがって、レポータービーズ192が捕捉剤220に接近すると、アンカー剤222と捕捉剤220とのハイブリダイゼーションが起こり、それにより、標的領域170内に二重ビーズ複合体194が保持される。代替の実施の形態では、シグナルプローブ206が、アンカー剤222の機能を果たす。この時点で、標的領域170内の二重ビーズ複合体194を検出するのに、標的領域170に送られる呼びかけビーム224を用いることができる。

【0097】

図16Bは、その後にディスク回転速度を変えた後の、図16Aの実施の形態を示す。回転速度の変化により、捕捉ビーズ190が二重ビーズ複合体194から除去され、最終的に、標的領域170のレポータービーズ192および標的DNA配列202を単離して、呼びかけビーム224で検出する。

【0098】

図16Aおよび図6Bに示す本発明の実施の形態は、別法として、図4A～図4C、図5B、および図6Bに示す透過型ディスクで実施してもよい。

【0099】

次に図17を参照して、図15Aに示す実施の形態の代替例が示されている。この実施の形態では、アンカー剤222は、レポータービーズの代わりに捕捉ビーズ190に付着する。この実施の形態のアンカー剤222は、ストレプトアビジンまたはニュートラビジンを含んでよい。図15Aにおけるように、標的領域170は、捕捉剤220で被覆されている。捕捉剤は、ピオチンまたはBSAピオチンを含んでよい。図17は、本発明で用いられるような二重ビーズ複合体194の成分としてのレポータービーズ192および捕捉ビーズ190も示す。捕捉ビーズ190が捕捉剤220に接近すると、ピオチン-ストレプトアビジン相互作用によってアンカープローブ222と捕捉剤220との間に結合が起こり、それにより、標的領域170内に二重ビーズ複合体194が保持される。この時点で、標的領域170内の二重ビーズ複合体194を検出するのに、標的領域170に送られる呼びかけビーム224を用いることができる。図17に示す本発明の実施の形態は、別法として、図4A～図4C、図5B、および図6Bに示す透過型ディスクで実施してもよい。

【0100】

図18は、図16Aに示す実施の形態の代替例である。この実施の形態では、アンカー剤222は、レポータービーズの代わりに捕捉ビーズ190に付着する。この実施の形態では、捕捉ビーズ190上の輸送プローブ198またはアンカー剤222は、捕捉剤22

0に直接ハイブリダイズする。この実施の形態では、捕捉剤220は核酸の特異的配列を含む。この実施の形態のアンカー剤222は、捕捉剤220またはオリゴヌクレオチドシグナル輸送プローブ198自体と相補的な核酸の特異的配列であり得る。したがって、捕捉ビーズ190が捕捉剤220に接近すると、アンカー剤222と捕捉剤220とのハイブリダイゼーションが起こり、それにより、標的領域170内に二重ビーズ複合体194が保持される。この時点で、標的領域170内の二重ビーズ複合体194を検出するのに、標的領域170に送られる呼びかけビーム224を用いることができる。図18に示す本発明の実施の形態は、別法として、図4A~図4C、図5B、および図6Bに示す透過型ディスクで実施してもよい。

【0101】

図19A~図19Cは、本明細書で説明する遺伝的検定に関連して実施される本バイオディスク110の活性層176および基板174を示す詳細な部分断面図である。図19A~図19Cは、少量の捕捉剤溶液を活性層176に施して、標的領域の区域内に捕捉剤のクラスタを形成することにより、活性層176に結び付いた捕捉剤220を示す。捕捉剤220と活性層176との間の結合は、ディスクの回転時に捕捉剤220が標的領域内で活性層176に付着したままであるのに十分である。図19Aおよび図19Bは、捕捉領域において捕捉剤220に結合している二重ビーズ複合体194からの捕捉ビーズ190も示している。これらの二重ビーズ複合体は、図11Aおよび図12Aで説明した方法などに従って調製される。捕捉剤220は、ビオチンおよびBSAビオチンを含む。この実施の形態では、レポータービーズ192は、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用によって、標的領域に二重ビーズ複合体194を固定する。別法として、標的領域は、ストレプトアビジンで被覆してもよく、ビオチン化レポータービーズと結合してもよい。図19Cは、図19Aおよび図19Bに関連して説明したものにさらなるステップを含む代替の実施の形態を示す。この好ましい実施の形態では、1分間あたりのディスク回転の分散(variance)により、ビーズのサイズおよび/または質量の差に基づいて、二重ビーズ複合体194から捕捉ビーズ190を切り離すのに十分な遠心力が生成される。ディスクの回転速度には変化があるが、レポータービーズ192は標的領域に固定されたままである。したがって、レポータービーズ192は、標的領域内に維持され、光バイオディスクまたは医療CD読み取り装置を用いて検出される。

【0102】

図19A~図19Cに関連して説明する本発明の実施の形態は、図3A~図3C、図5A、および図6Aに示す反射型ディスクで実施してもよく、または図4A~図4C、図5Bおよび図6Bに示す透過型ディスクで実施してもよい。

【0103】

図20A、図20B、および図20Cは、図19A~図19Cで説明した実施の形態の代替の実施の形態を示す。図20A~図20Cは、免疫化学的検定に関連して実施される標的領域の詳細な部分断面図を示す。図20Aおよび図20Bは、捕捉領域において捕捉剤220に結合している二重ビーズ複合体194からの捕捉ビーズ190も示している。捕捉剤220は、ビオチンおよびBSAビオチンを含む。これらの二重ビーズ複合体は、図11Bおよび図12Bで説明した方法などに従って調製することができる。この実施の形態では、レポータービーズ192は、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用によって、標的領域に二重ビーズ複合体194を固定する。図20A~図20Cを参照して説明する本発明の実施の形態は、図3A~図3C、図5A、および図6Aに示す反射型ディスクで実施してもよく、または図4A~図4C、図5B、および図6Bに示す透過型ディスクで実施してもよい。

【0104】

次に図21A、図21B、および図21Cを参照して、本明細書で説明する遺伝的検定に関連して実施される本バイオディスク110の活性層176および基板174を含む、標的領域の詳細な部分断面図が示されている。図21A~図21Cは、捕捉剤220の一体部分であるアミノ基226の使用によって活性層176に結び付いた捕捉剤220を示

10

20

30

40

50

す。図示のように、捕捉剤 220 は標的領域内に位置する。アミノ基 226 と捕捉剤 220 との間の結合、およびアミノ基 226 と活性層 176 との間の結合は、ディスクの回転時に捕捉剤 220 が標的領域内で活性層 176 に付着したままであるのに十分である。好ましいアミノ基 226 は NH_2 である。別法として、アミノ基 226 の代わりにチオール基を用いてもよい。本発明のこの実施の形態では、捕捉剤 220 は、レポータービーズ 192 と結び付いたアンカー剤 222 またはオリゴヌクレオチドシグナルプローブ 206 と相補的なアミノ酸の特異的配列を含む。

【0105】

図 21B は、図 11A および図 12A で説明した方法などに従って調製された、標的領域において捕捉剤 220 に結合する二重ビーズ複合体 194 のレポータービーズ 192 を示す。二重ビーズ複合体 194 が捕捉剤 220 に向かって流れ、捕捉剤 220 に十分に近づくと、アンカー剤 222 またはオリゴヌクレオチドシグナルプローブ 206 と捕捉剤 220 との間でハイブリダイゼーションが起こる。したがって、レポータービーズ 192 は標的領域内に二重ビーズ複合体 192 を固定する。

【0106】

図 21C は、図 21A ~ 図 21B に関連して説明したもののさらなるステップを含む代替の実施の形態を示す。この好ましい実施の形態では、1分間あたりのディスク回転の分散により、ビーズのサイズおよび/または質量の差に基づいて、二重ビーズ複合体 194 から捕捉ビーズ 190 を切り離すのに十分な遠心力が生成される。ディスクの回転速度には変化があるが、標的 DNA 配列 202 を有するレポータービーズ 192 は標的領域に固定されたままである。いずれの場合も、レポータービーズ 192 は所望のとおり標的領域内に維持される。

【0107】

図 21A ~ 図 21C を参照して説明する本発明の実施の形態は、図 3A ~ 図 3C、図 5A、および図 6A に示す反射型ディスクで実施してもよく、または図 4A ~ 図 4C、図 5B、および図 6B に示す透過型ディスクで実施してもよい。

【0108】

図 22A、図 22B、および図 22C は、図 21A ~ 図 21C で説明した実施の形態の代替の実施の形態を示す。図 22A ~ 図 22C は、免疫化学的検定に関連して実施される標的領域の詳細な部分断面図を示す。図 22A および図 22B は、図 11B および図 12B で説明した方法などに従って調製された、標的領域において捕捉剤 220 に結合する二重ビーズ複合体 194 からのレポータービーズ 192 を示す。この実施の形態では、捕捉剤 220 は、捕捉剤 220 の一体部分をなすアミノ基 226 の使用によって標的領域に結合された抗体を示す。別法として、捕捉剤 220 は、受動的な吸着および疎水性またはイオン性相互作用によって活性層 176 に結合してもよい。この実施の形態では、レポータービーズ 192 は、特異的抗体結合によって標的領域に二重ビーズ複合体 194 を固定する。図 21C に示す実施の形態のように、図 22C は、図 22A および図 22B に関連して説明したもののさらなるステップを含む代替の実施の形態を示す。この代替の実施の形態では、1分間あたりのディスク回転の分散により、ビーズのサイズおよび/または質量の差に基づいて、二重ビーズ複合体 194 から捕捉ビーズ 190 を切り離すのに十分な遠心力が生成される。ディスクの回転速度には変化があるが、標的抗原 204 を有するレポータービーズ 192 は標的領域に固定されたままである。いずれの場合も、レポータービーズ 192 は所望のとおり標的領域内に維持される。図 22A ~ 図 22C に関連して説明する本発明の実施の形態は、図 3A ~ 図 3C、図 5A、および図 6A に示す反射型ディスクで実施してもよく、または図 4A ~ 図 4C、図 5B、および図 6B に示す透過型ディスクで実施してもよい。

【0109】

図 23A および図 23B は、遺伝的検定に関連して実施される本バイオディスク 110 の活性層 176 および基板 174 を示す詳細な部分断面図である。図 23A および図 23B は、上記の図 19A および図 19B で説明したものの代替の実施の形態を示す。図 19

10

20

30

40

50

Aおよび図19Bの実施の形態とは対照的に、本実施の形態では、アンカー剤222がレポータービーズ192の代わりに捕捉ビーズ190に結び付く。図23Bは、二重ビーズ複合体194からの、捕捉領域において捕捉剤220に結合する捕捉ビーズ190を示す。捕捉剤220は、ピオチンおよびBSAピオチンを含む。この実施の形態では、捕捉ビーズ190は、ピオチン/ストレプトアビジン相互作用によって、標的領域に二重ビーズ複合体194を固定する。

【0110】

図23Aおよび図23Bを参照して説明する本発明の実施の形態は、図3A~図3C、図5A、および図6Aに示す反射型ディスクで実施してもよく、または図4A~図4C、図5B、および図6Bに示す透過型ディスクで実施してもよい。

10

【0111】

次に図24Aおよび図24Bを参照して、遺伝的検定に関連して実施される本発明のバイオディスク110の活性層176および基板174を示す詳細な部分断面図が提示されている。図23Aおよび図23Bは、上記の図21Aおよび図22Bで説明したものの代替の実施の形態を示す。図21Aおよび図21Bの実施の形態とは対照的に、本実施の形態では、アンカー剤222がレポータービーズ192の代わりに捕捉ビーズ190に結び付けられる。図23Bは、二重ビーズ複合体194からの、捕捉領域において捕捉剤220に結合する捕捉ビーズ190を示す。捕捉剤220は、捕捉剤220の一体部分をなすアミノ基226の使用によって活性層176に結び付けられる。図示のように、捕捉剤220は標的領域内に位置する。アミノ基226と捕捉剤220との間の結合、およびアミノ基220と活性層176との間の結合は、ディスクの回転時に捕捉剤220が標的領域内で活性層176に付着したままであるのに十分である。本発明のこの実施の形態では、捕捉剤220は、捕捉ビーズ190に結び付いたアンカー剤222またはオリゴヌクレオチド輸送プローブ198と相補的なアミノ酸の特異的配列を含む。この実施の形態では、捕捉ビーズ190は、捕捉剤220とアンカー剤または輸送プローブ198との間のハイブリダイゼーションによって、標的領域に二重ビーズ複合体194を固定する。

20

【0112】

図24Aおよび図24Bに示す本発明の実施の形態は、図3A~図3C、図5A、および図6Aに示す反射型ディスクで実施してもよく、または図4A~図4C、図5B、および図6Bに示す透過型ディスクで実施してもよい。

30

【0113】

ディスク処理法

次に図25A~図25Dに移り、ディスクのコンテキストにおいて図21A~図21Cおよび図24A~図24Bに記載される標的領域170が示されており、これは図11Aおよび図12Aに示す方法などに従って作成される溶液を注入物(input)として用いる。

【0114】

図25Aは、注入ポート152を通してアクセス可能であり、かつフロー流路160につながっている混合/ロードチャンバ164を示す。フロー流路160には、クラスタ状に位置する捕捉剤220があらかじめロードされている。捕捉剤220のクラスタのそれぞれは、各標的領域170内に位置する。各標的領域170は、1つのタイプの捕捉剤または複数のタイプの捕捉剤を有することができ、個別の標的領域は、複数の捕捉フィールドに、全く同一のタイプの捕捉剤または複数の異なる捕捉剤を有することができる。本実施の形態では、捕捉剤は、レポータービーズ192または捕捉ビーズ190上のアンカー剤222と相補的な核酸の特異的配列を含み得る。

40

【0115】

図25Bでは、二重ビーズ複合体194に封鎖されている(sequestered)DNAまたはRNAの試験サンプルを、ピペット214にロードする。二重ビーズ複合体を、注入ポート152を通してフロー流路160に注入する。フロー流路160がピペット214からの二重ビーズ複合体でさらにロードされると、ディスクが回転するにつれて二重ビーズ

50

複合体 194 はフロー流路 160 を進み始める。ロードチャンバ 164 は、切り離し保持壁 (break-away retaining wall) 228 を含むため、複合体 194 はフロー流路を一度に進むことができる。

【0116】

この実施の形態では、図 25C に示すように、レポータービーズ 192 に結び付いたアンカー剤 222 は、ハイブリダイゼーションにより捕捉剤 220 に結合する。このようにして、レポータービーズ 192 は標的領域 170 内に保持される。二重ビーズ複合体 194 がフロー流路をゆっくりと進む、すなわち転がる (tumble down) ことができるようにディスクを回転させることにより、結合をさらに促進することができる。遅い移動により、さらなるハイブリダイゼーションに十分な時間を得ることができる。ハイブリダイゼーション後、ディスクを同じ速度で、またはそれよりも速くさらに回転させて、図 25D に示すように、いかなる未結合の二重ビーズ複合体 194 をも標的領域 170 から取り除くことができる。

10

【0117】

次に、図 25D に示すように、呼びかけビーム 224 を標的領域 170 に送り、レポーター、捕捉ビーズ、および二重ビーズ複合体の存在を判定することができる。標的 DNA または RNA が試験サンプル中にない場合、標的領域 170 に結合している二重ビーズ複合体構造、レポーター、または捕捉ビーズはないが、少量の背景信号が、標的領域において非特異的結合から検出される可能性がある。この場合、呼びかけビーム 224 を標的領域 170 に送ると、ゼロまたは低い読みが生じ、それにより、標的 DNA または RNA がサンプル中に存在しなかったことが示される。

20

【0118】

回転速度、回転方向、および、ある期間にはある速度で、続く別の期間には別の速度などの回転の段階は、すべてディスク上の動作情報に符号化され得る。図 25A ~ 図 25D に関連して説明する方法は、上部検出器 130 を有するシステムを用いて、図 4A ~ 図 4C、図 5B、および図 6B に示す透過型ディスクで行ってもよい。

【0119】

図 26A ~ 図 26D は、図 19A ~ 図 19C および図 23A ~ 図 23B で説明した補足化学物質を含む標的領域 170 を示す。この方法は、図 11A および図 12A に示す方法に従って作成される溶液を注入物として用いる。図 26A ~ 図 26D は、図 25A ~ 図 25D で説明したものの代替の実施の形態を示し、以下でさらに詳細に説明する異なるビーズ捕捉法を示す。

30

【0120】

図 26A は、注入ポート 152 を通してアクセス可能であり、かつフロー流路 160 につながっている混合/ロードチャンバ 164 を示す。フロー流路 160 には、クラスタ状に位置する捕捉剤 220 があらかじめロードされている。捕捉剤 220 のクラスタのそれぞれは、各標的領域 170 内に位置する。各標的領域 170 は、1つのタイプの捕捉剤または複数のタイプの捕捉剤を有することができる。個別の標的領域は、複数の捕捉フィールドに、全く同一のタイプの捕捉剤または複数の異なる捕捉剤を有することができる。本実施の形態では、捕捉剤は、レポータービーズ 192 または捕捉ビーズ 190 上のアンカー剤 222 に対する親和性を有する特異的なビオチンおよび BSA ビオチンを含み得る。アンカー剤は、ストレプトアビジンおよびニュートラビジンを含んでいてもよい。

40

【0121】

図 26B では、二重ビーズ複合体 194 に封鎖されている DNA または RNA の試験サンプルを、ピペット 214 にロードする。二重ビーズ複合体を、注入ポート 152 を通してフロー流路 160 に注入する。フロー流路 160 がピペット 214 からの二重ビーズ複合体でさらにロードされると、ディスクが回転するにつれて二重ビーズ複合体 194 はフロー流路 160 を進み始める。ロードチャンバ 164 は、切り離し保持壁 228 を含むため、複合体 194 はフロー流路を一度に進むことができる。

【0122】

50

この実施の形態では、図26Cに示すように、レポータービーズ192に結び付いたアンカー剤222は、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用により捕捉剤220に結合する。このようにして、レポータービーズ192は標的領域170内に保持される。二重ビーズ複合体194がフロー流路をゆっくりと進む、すなわち転がることのできるようにディスクを回転させることにより、結合をさらに促進することができる。遅い移動により、捕捉剤220とアンカー剤222との間のさらなる結合に十分な時間を得ることができる。結合後、ディスクを同じ速度で、またはそれよりも速くさらに回転させて、図26Dに示すように、いかなる未結合の二重ビーズ複合体194をも標的領域170から取り除くことができる。

【0123】

次に、図26Dに示すように、呼びかけビーム224を標的領域170に送り、レポーター、捕捉ビーズ、および二重ビーズ複合体の存在を判定することができる。標的DNAが試験サンプル中に存在しない場合、標的領域170に結合している二重ビーズ複合体構造はない。少量の背景シグナルが、標的領域において非特異的結合から検出される可能性がある。この場合、呼びかけビーム224を標的領域170に送ると、ゼロまたは低い読みが生じ、それにより、標的DNAまたはRNAがサンプル中に存在しなかったことが示される。

【0124】

回転速度、回転方向、およびある期間にはある速度で、続く別の期間には別の速度でなどの回転の段階は、すべてディスク上の動作情報に符号化され得る。

【0125】

図26A~図26Dに関連して説明する方法は、図3A~図3C、図5A、および図6Aに示すディスクなどの反射型ディスクに関して説明された。この方法は、上部検出器130を有するシステムを用いて、図4A~図4C、図5B、および図6Bに示す透過型ディスクで行ってもよい。

【0126】

次に図27A~図27Dを参照して、本発明によるさらに別の代替の方法のステップを示す一連の側断面図が示されている。図27A~図27Dは、図22A~図22Cに関連して説明した捕捉機構を含む標的領域170を示す。この方法は、図11Bおよび図12Bに示す調製法に従って作成される溶液を注入物として用いる。図27A~図27Dは、免疫化学的検定および代替的なビーズ捕捉法を示す。

【0127】

図27Aは、注入ポート152を通してアクセス可能であり、かつフロー流路160につながっている混合/ロードチャンバ164を示す。フロー流路160には、クラスタ状に位置する捕捉剤220があらかじめロードされている。捕捉剤220のクラスタのそれぞれは、各標的領域170内に位置する。各標的領域170は、1つのタイプの捕捉剤または複数のタイプの捕捉剤を有することができる。個別の標的領域は、複数の捕捉フィールドに、全く同一のタイプの捕捉剤または複数の異なる捕捉剤を有することができる。本実施の形態では、捕捉剤は、レポータービーズ192または捕捉ビーズ190上のアンカー剤222のエピトープに特異的に結合する抗体を含み得る。別法として、捕捉剤は、二重ビーズ複合体194内の標的抗原204のエピトープに直接結合してもよい。アンカー剤222は、標的抗原、抗体輸送プローブ196、抗体シグナルプローブ208、またはレポータービーズ192または捕捉ビーズ190に結合しており、かつ捕捉剤220に特異的に結合し得るエピトープを有する任意の抗体を含むことができる。

【0128】

図27Bでは、二重ビーズ複合体194に封鎖されている標的抗原の試験サンプルを、ピペット214にロードする。二重ビーズ複合体を、注入ポート152を通してフロー流路160に注入する。フロー流路160がピペット214からの二重ビーズ複合体でさらにロードされると、ディスクが回転するにつれて二重ビーズ複合体194はフロー流路160を進み始める。ロードチャンバ164は、切り離し保持壁228を含み得るため、複

10

20

30

40

50

合体 194 はフロー流路を一度に進むことができる。

【0129】

この実施の形態では、図 27C に示すように、レポータービーズ 192 に結び付いたアンカー剤 222 は、抗体 - 抗原相互作用により捕捉剤 220 に結合する。このようにして、レポータービーズ 192 は標的領域 170 内に保持される。二重ビーズ複合体 194 がフロー流路をゆっくりと進む、すなわち転がることができるようにディスクを回転させることにより、結合をさらに促進することができる。遅い移動により、捕捉剤 220 とアンカー剤 222 とのさらなる結合に十分な時間を得ることができる。結合後、ディスクを同じ速度で、またはそれよりも速くさらに回転させて、図 27D に示すように、いかなる未結合の二重ビーズ複合体 194 をも標的領域 170 から取り除くことができる。

10

【0130】

次に、図 27D に示すように、呼びかけビーム 224 を標的領域 170 に送り、レポーター、捕捉ビーズ、および二重ビーズ複合体の存在を判定することができる。標的抗原が試験サンプル中にない場合、標的領域 170 に結合している二重ビーズ複合体構造、レポーター、または捕捉ビーズはないが、少量の背景シグナルが、標的領域において非特異的結合から検出される可能性がある。この場合、呼びかけビーム 224 を標的領域 170 に送ると、ゼロまたは低い読みが生じ、それにより、標的がサンプル中に存在しなかったことが示される。

【0131】

回転速度、回転方向、およびある期間にはある速度で、続く別の期間には別の速度でなどの回転の段階は、すべてディスク上の動作情報に符号化され得る。

20

【0132】

図 25A ~ 図 25D、図 26A ~ 図 26D、および図 27A ~ 図 27D に記載した方法は、反射型ディスクシステム 144 を用いて実施される。上記のように、これらの方法および他のビーズまたは球体検出は、図 4A ~ 図 4C、図 5B、および図 6B に記載するように、透過型ディスクの実施の形態 180 を用いて実行してもよいことは理解するべきである。また、図 11A および図 11B、図 12A および図 12B、図 25A ~ 図 25D、図 26A ~ 図 26D、ならびに図 27A ~ 図 27D に記載した方法は、光バイオディスク外での二重ビーズ複合体の作成に限定されず、二重ビーズ複合体の「インディスク」または「オンディスク」での形成を用いる実施の形態を含むことができることも理解するべきである。これらのオンディスクの実施態様では、二重ビーズ複合体は、光バイオディスク 110 の流体回路内に形成される。例えば、二重ビーズの形成は、ロードまたは混合チャンバ 164 において実行することができる。一実施の形態では、ビーズおよびサンプルを、同時に、またはほぼ同時にディスクに添加する。別法として、サンプルだけを添加すればよいように、プローブを有するビーズを、サンプルと共に将来使用するためにディスクにあらかじめロードしておいてもよい。

30

【0133】

ビーズは通常、長期の保存寿命を有するが、プローブの保存寿命はそれよりも短い。プローブは、プローブがディスク内に残り得る期間を延長させるために、乾燥または凍結乾燥（フリーズドライ）され得る。プローブが乾燥している場合、サンプルは基本的にプローブを再構成し、次にビーズと混ざり合って二重ビーズ複合体構造が生成され得る。

40

【0134】

いずれの場合も、オンディスク処理の基本的なプロセスは、(1) サンプルを、プローブを有するビーズを含んだディスクに挿入すること、(2) ディスク上でサンプルとビーズとを混合させること、(3) 磁界の印加などにより、二重ビーズ複合体を保持して未結合ビーズをここでは廃液チャンバと呼ぶ領域などに移動させるように単離すること、(4) 二重ビーズ複合体（および廃液チャンバに移動しなかった任意の他の材料）を捕捉フィールドに導くこと、を含む。検出プロセスは、イベント検出または蛍光分析法などによる、上述のプロセスのうちの 1 つと同じであってよい。

【0135】

50

上記に加えて、図 25 A ~ 図 25 D、図 26 A ~ 図 26 D、および図 27 A ~ 図 27 D に示すディスク表面捕捉技法および二重ビーズ複合体を形成するための連結技法を、その代替の変形形態を作成するために交換可能であり得ることは、当業者には明らかであろう。例えば、本発明者らは、核酸の特異的配列を含むように実施される捕捉剤 220 を用いて、図 10 A に示す DNA ハイブリダイゼーションまたは図 10 B に示す抗体 - 抗原相互作用により形成される二重ビーズ複合体を捕捉できることを意図している。同様に、抗体を含むように実施される捕捉剤 220 を用いて、図 10 A に示す DNA ハイブリダイゼーション法または図 10 B に示す抗体 - 抗原相互作用により形成される二重ビーズ複合体を捕捉することができる。また、ピオチンまたは BSA ピオチンを含むように実施される捕捉剤 220 を同様に利用して、図 10 A に示す DNA ハイブリダイゼーション技法または

10

【0136】

検出および関連する信号処理法および装置

捕捉フィールドまたは領域に結合されているレポータービーズ、標的細胞、または粒子の数は、定性的に検出することができ、光ディスク読み取り装置により定量することもできる。

【0137】

上述の試験法のいずれかの試験結果は、モニタ 114 (図 1) に即座に表示され得る。本発明によるディスクは、図 2 に示すようなコントローラ、プロセッサ、および分析装置を制御するために読み取られる符号化ソフトウェアを含むことが好ましい。この対話型ソフトウェアは、本明細書で説明する方法および結果の表示を容易にするために実施される。

20

【0138】

図 28 A は、本発明による光バイオディスクまたは医療 CD のトラック A、B、C、D、および E に対して位置付けられる、1つの $2.1 \mu\text{m}$ のレポータービーズ 192 と $3 \mu\text{m}$ の捕捉ビーズ 190 とのグラフィカル表現である。

【0139】

図 28 B は、本発明による光ドライブからの検出信号を利用して、図 28 A のビーズから得られるトラック A、B、C、D、および E からの一連のシグネチャトレースである。これらのグラフは、例えば図 5 A および図 6 A に示す反射型ディスクの検出された帰還ビーム 124、または図 5 B および図 6 B に示す透過型ディスクの透過ビーム 128 を表す。図示のように、 $2.1 \mu\text{m}$ のレポータービーズ 190 のシグネチャは、 $3 \mu\text{m}$ の捕捉ビーズ 192 のシグネチャとは十分に異なり、2つの異なるタイプのビーズを検出および区別することができる。この検出法は、ビーズまたはビーズ複合体に限定されず、細胞またはビーズ - 細胞複合体などの他の物体を検出するために用いてもよい。当業者には明らかであるように、MO バイオディスク内の $1 \mu\text{m}$ の磁気ビーズからのシグネチャトレースと $8 \mu\text{m}$ の細胞のシグネチャトレースとは、例えば、これらの粒子を互いに区別するのに十分に異なっている。ビーズを通過する際に検出される帰還ビームからのトレース信号の十分なゆがみは、イベントと呼ばれる。

30

40

【0140】

図 29 A は、本発明による光バイオディスクまたは医療 CD のトラック A、B、C、D、および E に対して位置付けられる二重ビーズ複合体に共に連結された、 $2.1 \mu\text{m}$ のレポータービーズと $3 \mu\text{m}$ の捕捉ビーズとのグラフィカル表現である。

【0141】

図 29 B は、本発明による光ドライブからの検出信号を利用して、図 29 A のビーズから得られるトラック A、B、C、D、および E からの一連のシグネチャトレースである。これらのグラフは、検出された、反射型ディスク 144 の帰還ビーム 124、または透過型ディスク 180 の透過ビーム 128 を表す。図示のように、 $2.1 \mu\text{m}$ のレポータービ

50

ーズ190のシグネチャは、3 μ mの捕捉ビーズ192のシグネチャとは十分に異なり、2つの異なるタイプのビーズを検出および区別することができる。検出される帰還ビームからのまたはビーズを通過する際に送出されるトレース信号の十分なゆがみは、イベントと呼ばれる。レポーターおよび捕捉ビーズからのイベントの相対的な近さは、二重ビーズ複合体の存非を示す。図示のように、レポーターおよび捕捉ビーズのトレースは、互いにすぐ隣にあり、これらビーズが接合して二重ビーズ複合体になっていることを示す。

【0142】

別法として、他の検出法を用いてもよい。例えば、レポータービーズは蛍光または燐光であってもよい。これらのレポーターの検出は、蛍光または燐光型の光ディスク読み取り装置で実行することができる。他の信号検出法は、例えば、本発明の譲受人に譲渡されて 10
同時係属中の、2001年11月9日に出願された「Disc Drive System and Methods for Use with Bio-Discs」と題する米国特許出願第10/008,156号(参照により明示的に援用される)、2001年2月20日に出願された米国仮出願第60/270,095号および2001年5月18日に出願された米国仮出願第60/292,108号、ならびに上記で参照された2002年1月10日に出願された「Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging」と題する米国特許出願第10/043,688号に記載されている。

【0143】

図30Aは、蛍光レポータービーズを用いた濃度依存標的検出を示す蛍光測定器を用いて生成されるデータの棒グラフである。このグラフは、標的DNAのモル濃度対検出されたビーズの数を示す。グラフに示される標的検出のダイナミックレンジは、 $10E-16$ ~ $10E-10$ モル濃度(モル/リットル)である。図示の特定のグラフは蛍光測定器からのデータを用いて生成されたが、蛍光型光ディスクドライブを用いて結果を生成してもよい。 20

【0144】

図30Bは、蛍光二重ビーズ検定における蛍光測定器の感度が約1000ビーズであることを説明する、標準曲線を提示している。いかなる検定の感度も、検定自体および検出システムの感度に依存する。図30A~図30Cを参照して、種々の検出法、例えば、蛍光測定器および本発明によるバイオディスクまたは医療CD検出を用いた二重ビーズ検定の感度を検査するために、さまざまな研究を行った。 30

【0145】

上述し、かつ図30Bに示すように、蛍光二重ビーズ検定における蛍光測定器の感度は約1000ビーズである。対照的に、図30Aは、 $10E-16$ モル濃度(モル/リットル)でも、ゼロ濃度を越える十分な数のビーズを検出して、標的の存在を検知することができることを示す。 $10E-16$ モル濃度の感度では、二重ビーズ検定は非常に高感度のDNA検出法となり、これはDNA増幅(PCRなどによる)を必要とせず、これを用いて単一ビーズでさえも検出することができる。

【0146】

従来の検出法とは対照的に、CD読み取り装置または光バイオディスクドライブ(図1)に接続された医療CDまたはバイオディスクの使用により、検出の感度が向上する。例えば、蛍光測定器での検出は、約1000ビーズに制限されるが(図30B)、図29A、図29B、および図30Cに示すように、CD読み取り装置に接続されたバイオディスクの使用により、ユーザは呼びかけビームによって1つのビーズを検出することができる。したがって、本明細書において提供する生物検定システムにより、二重ビーズ検定の感度が著しく向上する。 40

【0147】

光バイオディスクまたは医療CDを用いた単一ビーズの検出は、図28Aおよび図28Bに関連して詳細に説明されている。図28Bは、医療CDまたはバイオディスク読み取り装置により検出された各ビーズのシグナルトレースを示す。二重ビーズ複合体は、図29Aおよび図29Bに示すように、二重ビーズ複合体の検出から収集された特有のシグネ 50

チャートレースを用いて、バイオディスク読み取り装置により識別されることができる。限定はされないが、それぞれ図3Cおよび図4Cに示す反射型ディスクフォーマットおよび透過型ディスクフォーマットを含む、種々の光バイオディスクプラットフォームを、ビーズの検出のための読み取りデバイスと共に用いることができる。

【0148】

図30Cは、遺伝的検定において、標的の存在により共に連結される二重ビーズ複合体の形成を説明するイラスト表現である。上記の図1および図2に示すバイオCD読み取り装置を用いて定量される本二重ビーズ検定では、1レポーター分子以内までの感度が可能である。同様に、二重ビーズ複合体の形成は、図7B、図8B、図9B、図10B、図11B、および図12Bで上述したような免疫化学的検定フォーマットで実施してもよい。

10

【0149】

図31は、2つの異なる標的の濃度依存検出を示す、蛍光測定器を用いて生成されるデータを示す。標的検出を、2つの異なる方法（一重（single）および二重（duplex）検定）を用いて実行した。一重検定では、捕捉ビーズは1つの標的に特異的な輸送プローブを含み、同じ標的に特異的なシグナルプローブで被覆されたレポータープローブが、溶液中でその標的と混合される。二重検定では、捕捉ビーズは2つの異なる標的に特異的な2つの異なる輸送プローブを含む。二重標的検出法の使用に関する実験的な詳細は、表2においてさらに詳細に説明する。2つの標的のうちの1つに特異的なシグナルプローブを含む異なるレポータービーズ（例えば、赤色および緑色蛍光またはシリカおよびポリスチレンビーズ）の混合により、2つの異なる標的を同時に検出できる。

20

【0150】

二重ビーズ二重検定の検出は、以下で説明する光磁気ディスクシステムを用いて実行してもよい。図32および図37は、光バイオディスクドライブ（図2）、光磁気ディスクシステム、蛍光ディスクシステム、または任意の同様のデバイスにより検出され得る光ディスク上での種々の二重ビーズ複合体の形成および結合を示す。光ディスク読み取り装置から収集された二重ビーズ複合体の特有のシグネチャートレースは、上記の図29Bに示されている。図29Bからのトレースは、光ディスク読み取り装置により異なるビーズタイプが検出され得ることをさらに示しているが、それは、異なるビーズは異なるシグネチャプロフィールを示すからである。

【0151】

多重化、光磁気、および磁気ディスクシステム
標的の捕捉における二重ビーズ検定の使用は、多重検定での使用も可能である。このタイプの多重化は、異なるサイズの磁気ビーズを異なるタイプおよびサイズのレポータービーズと組み合わせることにより行われる。したがって、異なる標的剤を同時に検出することができる。図32に示すように、4つのサイズの磁気捕捉ビーズと4つのサイズの3つのタイプのレポータービーズとにより、最大48の異なるタイプの二重ビーズ複合体がもたらされる。したがって、多重化検定では、異なる標的に特異的なプローブは、捕捉ビーズにこのように結合される。異なる波長の蛍光などの異なる物理的および/または光学的特性を有するレポータービーズは、同じ生体サンプルからの異なる標的剤の同時検出を可能にする。図28A、図28B、図29A、および図29Bに示すように、反射光または透過光を検出することにより、サイズのわずかな差を検出することができる。

30

40

【0152】

異なる標的剤を捕捉するための複数の二重ビーズ複合体構造は、ディスク上またはディスク外で実行することができる。二重ビーズ懸濁液を、ディスクのポートにロードする。ポートをシールし、ディスクをディスク読み取り装置で回転させる。スピニング中、遊離（未結合）レポータービーズはディスクの周縁に向かってスピニング除去され、磁気捕捉ビーズおよび磁気ビーズ複合体または二重ビーズは、磁気フィールドに、例えばMOディスクの磁区に捕捉される。したがって、さまざまな標的剤を検出するレポータービーズは、捕捉領域に局在化される。このように、ディスク読み取り装置によって、特異的標的剤の存在を検出することができ、特異的標的剤の量を定量することができる。

50

【0153】

図33Aは、本発明の別の態様による光ディスクの概略的表現である。図33Aに示すディスク110を用いて、上記の図11Aおよび図11Bのシングルステップ法、または図65Aおよび図65B、ならびに図66Aおよび図66Bに関連して以下で説明する関連のシングルステップ法にほぼ対応する方法を実施することができる。サンプルおよびビーズは、一度に、または順次にではあるが近い時間に添加され得る。別法として、ディスクの一部にビーズをあらかじめロードしてもよい。これらの物質は、混合チャンバ164内に溶液を保持する切り離し壁228（図25Aを参照）を有し得る混合チャンバ164に供給され得る。ディスク上でのサンプルとビーズとの混合は、壁が壊れない、または毛管力に打ち勝たない程度の速度での回転により行われることになる。

10

【0154】

ディスクは一方向に回転してもよく、または逆方向に交互に回転して、混合チャンバ内の物質を攪拌してもよい。混合チャンバは、循環および混合が可能なほど十分に大きいことが好ましい。混合は連続的であっても断続的であってもよい。

【0155】

図33Bは、弁として可動構成要素を用いる回転・方向依存弁機構の一実施の形態を示す。混合チャンバは、ボール246などの可動構成要素を有する中間チャンバ244につながっている。非回転状態では、ボール246はわずかに凹んだ部分に保持されていてよく、またはチャンバ244は、周方向にテーパ状となった緩やかな（gradual）V字形を有して、回転していない時にボールを中心に保持してもよい。

20

【0156】

図33Aおよび図33Bに加えて図33Cおよび図33Dを参照して、ディスクが時計回りに回転している場合（図33C）、ボール246は第1の弁座248に移動して、検出チャンバ234への通路を遮断し、図33Aに示す廃液チャンバ232への流れを可能にする。ディスクが反時計回りに回転している場合（図33D）、ボール246は第2の弁座250に移動して、廃液チャンバ232への通路を遮断し、検出チャンバ234への流れを可能にする。

【0157】

図34A～図34Cは、ディスクの加速に応じて一方向または他方向に移動するウェッジ252でボールが置き換えられた、上記実施の形態の変形形態を示す。ウェッジ252は、中間チャンバ244の形状に一致する円形の外形を有し得る。ウェッジは、張り付きを回避するために、チャンバ244に比して高密度の（heavy dense）材料からできていることが好ましい。チャンバに対するウェッジの滑動を促進するために、コーティングを用いてもよい。

30

【0158】

ディスクが最初に図34に示すように時計回りに回転すると、角加速度により、ウェッジ252が検出チャンバ234への通路を遮断して廃液チャンバ232への流れを可能にするように移動する。ディスクが最初に反時計回りに回転すると（図34C）、角加速度により、ウェッジ252が廃液チャンバ232への通路を遮断して検出チャンバ234への流れを可能にする。加速後の一定の回転中、ウェッジ252は適当な通路を遮断して所

40

【0159】

捕捉ビーズが磁性を有する本発明の別の実施の形態では、磁界発生器または界磁コイル230からの磁界を混合チャンバ164にわたって印加して、二重ビーズ複合体および未結合の磁気ビーズを所定位置に保持しつつ、磁気ビーズを有さない物質を廃液チャンバ232に流すことができる。この技法は、不要な物質が洗い流される前に流体回路または回路内の検定溶液の混合を補助するためにも用いることができる。この段階で、未結合の、または二重ビーズ複合体の一部としての磁気捕捉ビーズのみが残る。磁界が解かれると、磁気ビーズを有する二重ビーズ複合体が捕捉および検出チャンバ234に導かれる。

【0160】

50

非磁気ビーズを廃液チャンバ232に導き、続いて磁気ビーズを捕捉チャンバ234に導くプロセスは、マイクロ流体構成物 (construction) および/または流体構成要素により達成することができる。流れ制御弁236または他の何らかの誘導機構を用いて、サンプルおよび非磁気ビーズを廃液チャンバ232へ、続いて捕捉チャンバ234へ導いてもよい。回転依存流に関するいくつかの実施の形態を用いることができる。流れ制御機構の使用に関するさらなる詳細は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2001年11月27日に出願された「Dual Bead Assays Including Optical Biodiscs and Methods Relating Thereto」と題する米国仮出願第09/997,741号に開示されており、この出願は、その内容すべてが参照により本明細書に援用される。

【0161】

図35は、本発明による磁気ビーズおよび磁界発生器230と共に用いられる流体回路の一実施の形態を含むディスクの斜視図である。図35は、混合チャンバ164、廃液チャンバ232、および捕捉チャンバ234も示している。磁界発生器230は、ディスク110の上方に位置付けられ、ディスク110の回転の際に磁界発生器230が混合チャンバ164の上方に留まるような半径を有し、チャンバ232および234から半径方向に離間している。上述した先の実施形態のように、磁界発生器230からの磁界を混合チャンバ164にわたって印加して、さらなる物質を混合チャンバ164に入れつつ二重ビーズ複合体および/または未結合磁気ビーズを所定位置に保持することができる。磁界発生器230を用いて磁気ビーズを所定位置に保持しながらディスクを回転させるこの方法を用いて、混合チャンバ164内に含まれる検定溶液が他の場所に導かれる前に、混合チャンバ164内の溶液を混合するのを補助することもできる。

【0162】

図36A~図36Cは、図35に示す流体回路を用いた二重ビーズ検定のための分離および検出の方法を示す平面図である。図36Aは、二重ビーズ複合体194および種々の未結合レポータービーズ192を含むサンプルを保持する環状扇形 (annular sector) の形状をした混合チャンバ164を有する回転していない光ディスクを示す。電磁石が作動され、ディスクが反時計回りに回転し (図36B)、または1Xまたは3Xなどの低いrpmで攪拌され得る。磁気捕捉ビーズを有する二重ビーズ複合体194は混合チャンバ164に残るが、液体サンプルおよび未結合レポータービーズ192は、角加速度に応じて混合チャンバ164の回転方向後端に移動する。ディスクは、毛管力に打ち勝つのに十分な速度で図36Bに示す反時計方向に回転し、サンプル中の未結合レポータービーズを廃液流体回路238を通して廃液チャンバ232に移動させることができる。プロセスのこの時点で、図示のような流体回路の物理的な遠心分離のため、液体は捕捉流体回路240を進まないであろう。

【0163】

次に図36Cに示すように、磁石が無効にされ、ディスクが時計回りに回転する。二重ビーズ複合体194は、角加速度に応じて混合チャンバ164の反対側の後端に移動し、次に捕捉流体回路240を通して捕捉チャンバ234に移動する。プロセスのこの後者の段階で、図示のような流体回路の物理的レイアウトにより、二重ビーズ溶液は廃液流体回路238を進まないであろう。このように、図36A~図36Cに示す実施の形態は、回転依存流および回転速度依存流を示す。

【0164】

この実施の形態および流体回路がディスクのある領域に形成される他の実施の形態では、複数の領域をディスクの周りに、例えば均衡を保つための通常の方法で形成し分布させることができる。さらに、上述のように、回転を制御する命令をディスクに供給してもよい。したがって、ディスクを読み取ることにより、ディスクドライブは特定の速度で特定の期間の間回転させ、ある期間の間停止させ、別の期間の間逆方向に回転させる命令を有してよい。さらに、符号化情報は、例えば光源の電力および波長に関するものなどの、制御命令を含んでよい。このようなシステムパラメータを制御することは、検出法として蛍光を用いる場合に特に関連がある。

10

20

30

40

50

【0165】

さらに別の実施の形態では、通路は、ディスクドライブのレーザの影響下で、またはディスクにあらかじめロードされた触媒または試験サンプル中に供給された触媒などによって、シールまたは溶解される物質または構成を有していてもよい。例えば、ゲルはある物質の存在下では時間を経て凝固し、この場合、閉じる時間は、廃液チャンバへの通路が閉じる前に未結合捕捉ビーズを廃液チャンバに流すのに十分な長さに設定することができる。別法として、廃液チャンバへの通路は、検出チャンバへの通路が閉じている間は開いていてもよい。未結合ビーズが廃液チャンバへ送られた後、検出チャンバへの通路がレーザから導入されたエネルギーにより開かれて、検出チャンバへの流れを可能にする。

【0166】

次に図37を全体的に参照して、光磁気記録が、外部磁界の存在下で合焦されたビームにより薄膜を加熱することにより磁区すなわち磁性領域が薄膜に書き込まれる、光記憶技法であることが理解される。次に、これらの磁区の存在が、同じレーザにより、層の異なる磁区間の反射光の偏光(カー回転)の差から検出される。一定の高レーザーパワーの磁界の切り替え、または一定の磁界でのレーザーパワーの変調により、データパターンを層に書き込むことができる。コンピュータデータ記憶システムおよびオーディオシステム(最も顕著なものはMiniDisc)を含む、多くの光磁気記憶システムが市場に導入されている。この分野の現状の説明は、「The Principles of Optical Disc Systems」、Bouwhuis et. al. 1985 (ISBN 0-85274-785-3); 「Optical Recording, A Technical Overview」 A.B. Marchant 1990 (ISBN 0-201-76247-1); および「The Physical Principles of Magneto-Optical Recording」、M. Mansuripur 1995 (ISBN 0521461243)において見ることができる。これら文献のすべては、それぞれの内容がすべて、参照により本明細書に援用される。

【0167】

次に図37を特に参照して、多重化二重ビーズ検定で用いるための光ディスク110のさらに別の実施の形態が示されている。この場合、光磁気ドライブと共に用いるディスクは、磁気ヘッドで選択的に書き込みおよび削除ができる磁区すなわち磁性領域242を有する。本明細書中以下では、このタイプのディスクを「光磁気バイオディスク」または「MOバイオディスク」と総称する。例えば、光磁気ディスクドライブは、1平方マイクロメートルもの小さい磁区242を作成することができる。磁区242の接近断面では、隣接する領域に関する磁界の方向が示されている。

【0168】

制御性の高い方法で小さい区域に選択的に書き込んでその領域に磁性を与えることができることにより、所望の場所に捕捉区域を作成することができる。これらの磁気捕捉区域またはドメインは、1つの流体チャンバまたは複数の流体チャンバに任意の所望の構成で、または任意の所望の場所に形成することができる。これらの区域は、ディスクに施されると、磁気ビーズを捕捉して保持する。ドメインは、所望であれば選択的に消去することができるため、非磁性になってビーズを解放することができる。

【0169】

本発明のこの態様による磁気ビーズ検定の1つの構成では、例として、1組の半径方向に向いた3つの磁気捕捉領域243が示されており、図示ではこれらの列の磁気捕捉領域にはビーズが結び付いていない。引き続き図37を参照して、磁気捕捉領域の磁性区域に個々の磁気ビーズが磁氣的に結び付いている、セクションAの1組の4つの列が示されている。セクションBに配列された別の組の4つの列は、レポータービーズが結合して特定の磁区すなわち磁性区域に結び付いた二重ビーズ複合体を形成した後の様子が示され、異なる列が異なるタイプのレポータービーズを有している。セクションBに示すように、利用されるレポータービーズのいくつかはサイズが異なっており、それにより、光磁気バイオディスクまたはMO医療ディスクで実施される本発明の多重化態様を達成する。セクションCでは、種々の二重ビーズ複合体の1つの列が、別個の磁性区域に個別に結び付いた種々のビーズサイズを用いた多重化検定の別の例として示されている。

10

20

30

40

50

【0170】

このような光磁気バイオディスクを用いる方法では、M Oドライブの書き込みヘッドを用いて磁区を作成し、次にサンプルをそのドメインにわたって導いて、サンプル中に供給された磁気ビーズを捕捉する。第1のサンプルセットの導入後、他の磁区も作成することもでき、検出のために、新たに作成された磁気捕捉領域に別のサンプルセットを供給することができる。したがって、複数のサンプルセットの検出を、1つのディスク上で異なる期間に行うことができる。光磁気ドライブは、磁区すなわち捕捉領域を消磁して、所望であれば磁気ビーズを解放および単離することもできる。このように、このシステムは、さまざまな異なる生化学的、化学的、または生物学的サンプルからの1つまたは複数の特異的標的分子の制御可能な捕捉、検出、単離、および解放を可能にする。

10

【0171】

上述のように、サンプルはディスクの流体チャンバに供給することができる。別法として、サンプルは、異なるビーズの組を有する複数のチャンバに供給することができる。さらに、サンプルが回転運動により1つのチャンバから次のチャンバに移動することができるように、次に各チャンバで別個に試験を行うことができるように、一連のチャンバを作成してもよい。

【0172】

このようなM Oバイオディスクでは、多数の試験を一度に行うことができ、かつ対話式に行うことができる。このように、試験が行われて結果が得られると、システムは、新たな組の磁性領域を二重ビーズ複合体の捕捉のために作成するよう指示される。領域は一度に1つ、または多数の群で作成することができ、異なるビーズがあらかじめロードされた一連のチャンバで行うことができる。書き込み可能磁性領域を有するM Oバイオディスクでは、他の処理上の利点を得ることができる。例えば、「捕捉剤」は基本的に、ディスク上の磁性領域により作成された磁界であるため、さらなる生物学的または化学的捕捉剤を加える必要がない。

20

【0173】

M Oバイオディスクで書き込まれるかまたは消去される磁性領域の場所を制御する命令、および回転速度、回転の段階、待機期間、光源の波長、および他のパラメータなどの他の情報を、ディスク自体に符号化して、その後ディスク自体から読み取ることができる。本明細書に記載される開示を読んだ当業者には容易に理解されるように、図37に示すM Oバイオディスクは、上述の反射型および透過型ディスクの流体回路、混合チャンバ、フロー流路、検出チャンバ、注入ポート、または排出ポートの任意のものを含むことができる。本発明のこの態様によるM Oバイオディスクの使用の説明例は、以下の実施例5および6で提供する。

30

【0174】

したがって、要するに、本発明の光磁気態様の以下の実施の形態は、本発明者らが意図したものであり、本明細書で詳細に説明する。まず、光磁気バイオディスクに関連して遺伝的二重ビーズ検定を行う方法を提供する。この方法は、輸送プローブが共有結合した複数の磁気捕捉ビーズを提供するステップと、DNAの特異的配列が共有結合した複数のレポータービーズを提供するステップと、特異的DNA配列と相補的なDNA配列に関して試験すべき標的DNA分子を含むサンプルを調製するステップと、光磁気バイオディスクに設けられた注入ポートを介して、光磁気バイオディスクに捕捉ビーズをロードするステップと、を含む。光磁気バイオディスクは磁気捕捉層を有する。この方法はさらに、サンプルおよび複数のレポータービーズをバイオディスクにロードすること、バイオディスクを回転させることであって、それにより、サンプル中に存在する任意の標的DNAの、レポータービーズのDNAの特異的配列との、および輸送プローブとのハイブリダイゼーションを促進して、二重ビーズ複合体を形成する、回転させること、放射エネルギー入射ビームにより、いくつかの磁気捕捉ビーズに呼びかけることであって、それにより、いくつかの磁気捕捉ビーズそれぞれが二重ビーズ複合体を形成したか否かを判定すること、呼びかけること、磁気捕捉層の特定の領域を磁化することであって、それにより、複数の二重ビ

40

50

ズ複合体をそこに結合させる、磁化すること、および複数の二重ビーズ複合体を定量すること、を含む。

【0175】

本方法は、ディスクを回転させるさらなるステップであって、それによりいかなる未結合ビーズも廃液チャンバへ導き、次に磁気捕捉層の特定の領域を消磁して、それにより複数の二重ビーズ複合体のいくつかを解放する、回転させるさらなるステップを含んでもよい。その後、ディスクを回転させて、解放されたいくつかの二重ビーズ複合体をさらなる処理のために分析区域へ導き、それにより解放されたいくつかの二重ビーズ複合体が分析区域に封鎖されるようにすることができる。分析区域は、封鎖された二重ビーズ複合体と反応する薬剤を有する分析チャンバであってもよい。

10

【0176】

本発明の光磁気態様の第2の実施の形態によると、光磁気バイオディスクに関連して二重ビーズ検定を行う別の方法が提供される。この他の方法は、輸送プローブが結び付いた複数の磁気捕捉ビーズを提供するステップと、シグナルプローブが結び付いた複数のレポータービーズを提供するステップと、光磁気バイオディスクに設けられた注入ポートを介して、光磁気バイオディスクに捕捉ビーズをロードするステップと、を含む。光磁気バイオディスクは磁気捕捉層を有する。この第2の方法はさらに、標的を含むサンプルおよび複数のレポータービーズをバイオディスクにロードすること、バイオディスクを回転させることであって、それにより、標的ビーズおよびレポータービーズと磁気捕捉ビーズとの結合を促進して、二重ビーズ複合体を形成する、回転させること、放射エネルギー入射ビームにより、いくつかの磁気捕捉ビーズに呼びかけることであって、それにより、いくつかの磁気捕捉ビーズそれぞれが二重ビーズ複合体を形成したか否かを判定する、呼びかけること、磁気捕捉層の特定の領域を磁化することであって、それにより、複数の二重ビーズ複合体をそこに結合させる、磁化すること、および複数の二重ビーズ複合体を定量すること、を含む。

20

【0177】

この方法は、ディスクを回転させるさらなるステップであって、それによりいかなる未結合ビーズも廃液チャンバへ導き、次に磁気捕捉層の特定の領域を消磁して、それにより複数の二重ビーズ複合体のいくつかを解放する、回転させるさらなるステップを同様に含んでもよい。その後、ディスクを回転させて、解放されたいくつかの二重ビーズ複合体をさらなる処理のために分析区域へ導き、それにより解放されたいくつかの二重ビーズ複合体が分析区域に封鎖されるようにすることも、この方法の一態様である。分析区域は、封鎖された二重ビーズ複合体と反応する薬剤を有する反応チャンバを含んでもよい。

30

【0178】

本発明の光磁気態様の第3の実施の形態によると、光磁気バイオディスクに関連して多重化された二重ビーズ検定を行う方法が提供される。この多重化方法は、(1)少なくとも2つの群の異なるサイズの磁気捕捉ビーズを提供するステップであって、各群は、同じサイズの磁気ビーズを有し、各群に関連する異なる特異的タイプの輸送プローブを有する、磁気捕捉ビーズを提供するステップと、(2)少なくとも2つの異なるタイプのシグナルプローブが結び付いた複数のレポータービーズを提供するステップと、(3)光磁気バイオディスクに設けられた注入ポートを介して、光磁気バイオディスクに捕捉ビーズをロードするステップと、を含む。上記のMOバイオディスク法におけるように、この光磁気バイオディスクは磁気捕捉層を有する。本方法は、(4)少なくとも1つの標的を含むサンプルおよび複数のレポータービーズをバイオディスクにロードすること、(5)バイオディスクを回転させることであって、それにより、標的およびレポータービーズと磁気捕捉ビーズとの結合を促進して、二重ビーズ複合体を形成する、回転させること、(6)放射エネルギー入射ビームにより、いくつかの磁気捕捉ビーズに呼びかけることであって、それにより、いくつかの磁気捕捉ビーズそれぞれが二重ビーズ複合体を形成したか否かを判定する、呼びかけること、および(7)二重ビーズ複合体の磁気ビーズのサイズを判定すること、も含む。この特定の方法は、(8)磁気捕捉層の特定の領域を磁化すること

40

50

あって、それにより、複数の二重ビーズ複合体をそこに結合させる、磁化すること、および(9)複数の二重ビーズ複合体を定量すること、で終了する。

【0179】

この特定の方法の一態様によると、定量するステップは、磁気捕捉ビーズのサイズに従って複数の二重ビーズ複合体を定量することを含むことが有利であり得る。本方法は、ディスクを回転させるさらなるステップであって、それによりいかなる未結合ビーズも廃液チャンバへ導き、次に磁気捕捉層の特定の領域を消磁して、それにより、同じサイズの磁気捕捉ビーズを含む複数の二重ビーズ複合体のいくつかを解放する、回転させるさらなるステップを含んでもよい。本方法はさらに、ディスクを回転させることであって、それにより、解放されたいくつかの同じサイズの二重ビーズ複合体をさらなる処理のために分析区域へ導き、それにより解放されたいくつかの同じサイズの二重ビーズ複合体が分析区域に封鎖されるようにする、回転させることを含んでもよい。分析区域は、封鎖された同じサイズの二重ビーズ複合体と反応する薬剤を有する反応チャンバを含んでいてもよい。本発明の特定の実施の形態では、シグナルプローブはDNAの特異的配列である。

10

【0180】

さらに本発明の光磁気態様の第4の実施の形態によると、光磁気バイオディスクに関連して多重化された二重ビーズ検定を行う別の主な方法が提供される。このさらなる二重ビーズ多重化方法は、(1)少なくとも2つの群の異なるタイプのレポータービーズを提供するステップであって、各群は、同じタイプのレポータービーズを有し、各群に関連する異なる特異的タイプのシグナルプローブを有する、レポータービーズを提供するステップと、(2)異なるタイプの輸送プローブが結び付いた複数の磁気捕捉ビーズを提供するステップと、(3)光磁気バイオディスクに設けられた注入ポートを介して、光磁気バイオディスクに捕捉ビーズをロードするステップと、を含む。上記のMOバイオディスク法におけるように、この特定の光磁気バイオディスクは磁気捕捉層を有する。本方法は、(4)少なくとも1つの標的および複数のレポータービーズに関して試験すべきサンプルをバイオディスクにロードするさらなるステップと、(5)バイオディスクを回転させるさらなるステップであって、それにより、サンプル中に存在する任意の標的のレポータービーズへの、および磁気捕捉ビーズへの結合を促進して、二重ビーズ複合体を形成する、回転させるさらなるステップと、(6)放射エネルギー入射ビームにより、いくつかのレポータービーズに呼びかけるさらなるステップであって、それにより、いくつかのレポータービーズそれぞれが二重ビーズ複合体を形成したか否かを判定する、呼びかけるさらなるステップと、を含む。次に、本方法のこの特定の実施の形態は、(7)二重ビーズ複合体中のレポータービーズのタイプを判定すること、(8)磁気捕捉層の特定の領域を磁化することであって、それにより、複数の二重ビーズ複合体をそこに結合させる、磁化すること、および(9)複数の二重ビーズ複合体を定量すること、で終了する。

20

30

【0181】

本発明の光磁気態様の1つの特定の実施の形態では、定量するステップは、レポータービーズのタイプに従って複数の二重ビーズ複合体を定量することを含む。本方法はさらに、ディスクを回転させるさらなるステップであって、それによりいかなる未結合ビーズも廃液チャンバへ導き、所望であれば次に磁気捕捉層の特定の領域を消磁して、それにより、同じタイプのレポータービーズを含む複数の二重ビーズ複合体のいくつかを解放する、回転させるさらなるステップを含んでもよい。ディスクを回転させるさらなるステップであって、それにより、同じタイプの二重ビーズ複合体をさらなる処理のために分析区域へ導き、それにより解放されたいくつかの同じタイプの二重ビーズ複合体が分析区域に封鎖されるようにする、回転させるさらなるステップを行ってもよい。

40

【0182】

上記の方法のように、分析区域は、封鎖された同じタイプの二重ビーズ複合体と反応する薬剤を有する反応チャンバを含んでいてもよい。本発明はさらに、上記の方法のいずれかを行うために用いられる光バイオディスクと、図11A、図11B、図12A、図12Bに関連して上述した方法、または図65Aおよび図65B、図66Aおよび図66B、

50

図67Aおよび図67B、ならびに図68Aおよび図68Bに関連して以下で詳細に説明する方法に従って調製される任意の二重ビーズ複合体を分析するために用いられる光バイオディスクとを意図している。さらに、MOバイオディスクは、以下で説明するMOバイオディスクを用いた細胞捕捉および分析法などの、免疫磁気的および分子磁気的検定を含む他の生体磁気的検定で実施してもよい。

【0183】

検定感度を高めるためにライゲーションを用いる遺伝的検定

図38を参照して、捕捉ビーズ190およびレポータービーズ192それぞれに共有結合した輸送プローブ198およびシグナルプローブ206を介して標的DNA202により結合された(held together)二重ビーズ複合体194が示されている。この図に示すように、シグナルプローブ206の5'末端は、輸送プローブ198の3'末端のすぐ隣に保持される。この構成により、リガーゼを加えるとプローブの3'および5'末端がライゲーションされる。両プローブのライゲーションは、標的の存在下でのみ起こり、レポータービーズと捕捉ビーズとの間の結合強度を増加させることにより検定の感度を高め、二重ビーズ複合体の解離を防止する。

10

【0184】

次に図39を参照して、酵素検定により検出される遺伝試験からの結果を示す棒グラフがある。輸送プローブに結合した3 μ mの捕捉ビーズを用いて、この試験で標的を捕捉した。標的が捕捉されると、ビオチン化レポータープローブを導入して、標的に結合させた。次に、捕捉ビーズを洗浄して、未結合レポータープローブを除去した。次に、溶液にリガーゼを添加して、図38に示すように、レポータープローブの末端と輸送プローブの末端とをライゲーションする。一連の洗浄ステップ後、ストレプトアビジン化アルカリホスファターゼをビーズ溶液に添加し、レポータープローブ上でビオチンと結合させる。ビーズを再び洗浄し、色原体(chromagen)としてアルカリホスファターゼ基質をビーズ溶液に添加する。次に、アルカリホスファターゼおよび基質反応により形成される色の強度を、分光光度計を用いて定量する。この定量の結果を図39に示す。この図に提示するデータは、プローブがライゲーションされた場合にシグナルが約50%増加することを示す。このように、この実験のライゲーションステップにより、検定感度は著しく高まる。実施例3および4では、同様の実験を実行する際に従う手順を詳細に説明する。

20

【0185】

図40は、酵素検定の代わりに二重ビーズ検定で実施するライゲーションステップを用いた遺伝試験からの棒グラフを示す。図39で説明した酵素検定を用いて、非二重ビーズフォーマットでのリガーゼの活性を確認し、これは二重ビーズ実験の対照としての役割を果たす。酵素検定のように、輸送プローブに結合した同じ3 μ mの捕捉ビーズを二重ビーズ検定で用いた。二重ビーズ検定で用いるレポータービーズは2.1 μ mの蛍光ビーズであった。二重ビーズは、図11Aまたは図12Aで説明したように形成した。ライゲーションステップは、図11AのステップVまたは図12AのステップVIで実施し、ここで、リガーゼを二重ビーズ複合体溶液に添加し、輸送プローブをシグナルプローブにライゲーションさせた。図40に示すデータは、ライゲーションが、セット1では非ライゲーション対照処理に比して検定の信号および感度を著しく高めるが、セット2ではそうではないことを示す。

30

40

【0186】

同様に、図41は、図40で説明したものと同一ライゲーションステップを用いて、39量体ブリッジを用いて二重ビーズ複合体に結合したレポータービーズの数を示す棒グラフである。図40におけるように、図41のデータは、ライゲーションがステップ1およびステップ2の双方で二重ビーズ検定の感度を著しく高めることを示す。このデータは、39量体ブリッジの使用がライゲーションプロセスに役立ち、したがって二重ビーズ検定で実施される両セットからのシグナルを高めることを説明している。

【0187】

切断可能スパーサまたは置換プローブを用いた二重ビーズ検定

50

二重ビーズ検定における切断可能スペーサの使用は、検定の特異性を高める。実際、標的DNAと相補的な配列に加えて、捕捉プローブおよびレポータープローブは、互いに相補的な配列を含む。この付加的な要件により、標的捕捉に対する特異性が高まる。さらに、捕捉プローブとレポータープローブとの水素結合を介した捕捉ビーズとレポータービーズとのさらなる結合は、二重ビーズ間の相互作用を強化する。

【0188】

本発明のこの実施の形態では、標的の非存在下で、捕捉プローブはレポータープローブとハイブリダイズし、それにより図42Bおよび図43Aに示すような二重ビーズ複合体が形成される。図42Bおよび図42Cに示すように、二重ビーズ複合体は、標的捕捉後に選択的な制限酵素消化に付される。配列特異的な消化は、図42Dに示すような捕捉プローブとレポータープローブとの水素結合を選択的に切断するであろう。標的の非存在下では、捕捉プローブおよびレポータープローブを保持する水素結合の切断により、二重ビーズは互いに解離する。標的の存在下では、捕捉ビーズおよびレポータービーズは、標的媒介水素結合を介して結合されたままである(図42D)。したがって、捕捉された標的の量は、酵素消化後に残っている二重ビーズの数と相関する。

10

【0189】

別法として、制限酵素消化の代わりに、捕捉プローブおよびレポータープローブを保持する結合は、置換可能なリンカーの使用により解くことができる。リンカーは置換プローブを用いて分離される。この場合、レポータープローブは、捕捉プローブと部分的に相補配列を含み、図43Aに示すようなミスマッチ突起(mismatch overhang)が生じる。捕捉プローブとレポータープローブを互いに解離するために、複合体は、捕捉プローブからのレポータープローブの溶解を開始させる熱処理に付され、続いて過剰な置換プローブが加えられる。高濃度の置換プローブおよび置換プローブとミスマッチ突起との間の密接な相互作用により、図43Bおよび図43Cに示すように、捕捉プローブからレポータープローブが解かれる。これにより、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズからのレポータービーズの解離が生じるであろう。

20

【0190】

より詳細には、本発明による二重ビーズ検定は、3 μ mの磁気捕捉ビーズおよび2.1 μ mの蛍光レポータービーズを用いて実施され得る。これらのビーズは、輸送プローブおよびシグナルプローブそれぞれで被覆される。輸送プローブおよびシグナルプローブは、標的配列、例えばpUC19と相補的であることに加えて、図42A、図42B、図42C、および図43Dに示すように、互いに相補的な配列を含む。輸送プローブとシグナルプローブを結合する配列は、Not1を含む非常に稀な制限酵素の切断を受けやすいように設計される。稀な制限酵素および制限部位の使用は、標的DNAの偶発的な切断を防止する。捕捉ビーズおよびレポータービーズは、さまざまな量の標的DNAと混合される。標的捕捉後、DNA複合体は、Not1を含む稀な制限酵素による制限消化を受ける。この酵素による制限消化により、レポータービーズを捕捉ビーズに接続しているDNA配列が切断される。標的DNAの非存在下では、レポータービーズは捕捉ビーズから解離され、磁気ビーズの磁気濃縮により除去される。したがって、標的配列の存在下でのみ、磁気捕捉ビーズは蛍光レポータービーズに結合し、二重ビーズ検定が行われる。捕捉プローブおよびレポータープローブへの切断可能スペーサの導入により、二重ビーズの特異性および感度が著しく向上する。

30

40

【0191】

本発明の別の実施の形態では、置換可能リンカーの形成をもたらす、レポータービーズおよび捕捉ビーズのプローブ(プローブ1およびプローブ2B)の相補配列間の短い重複およびミスマッチ突起が、図43Aおよび図43Bに示す置換プローブに関連して用いられる。プローブ2Bのミスマッチ突起は、図42Bに示す置換プローブが最初に結合する部位である。置換プローブが突起に結合すると、置換プローブは、プローブ1とプローブ2Bとの重複配列の置換を進める。これを図43Cに示す。標的DNAの非存在下では、レポータービーズは、置換プローブの作用により捕捉ビーズから解離され、結果として磁

50

気ビーズの磁気濃縮により除去される。したがって、標的配列の存在下でのみ、磁気捕捉ビーズは蛍光レポータービーズに結合し、二重ビーズ複合体の非解離が生じる。

【0192】

本発明による切断可能スペーサの一般的な動作は、図44、図45、図46A～図46C、図47、図48A、図48B、および図49A～図49Cを参照することにより、より詳細に理解することができ、これらの図は、本発明の2つの実施の形態を図式化したものである。図44を参照して、捕捉ビーズに、複数の切断可能スペーサ分子256が結び付いた誘導体化表面が設けられる。各スペーサ256は、切断部位258、シグナルプローブ206、および輸送プローブ198を含む。図44に示すように、輸送プローブは、図45に関連して説明するように、金属元素と共有結合を形成するように反応するチオール基を含む。捕捉ビーズは、多孔質であっても中実であってもよく、プラスチック、ガラス、マイカ、シリコンなどのようなさまざまな材料から選択することができる。

10

【0193】

捕捉ビーズ190またはレポータービーズ192の表面は、切断可能スペーサ分子256を含むプローブそれぞれに共有結合を提供するように誘導体化されることが好都合であり得る。次に図45を参照して、標的の存在を検出するための便利な反射型シグナル発生手段を提供する金属レポータービーズが示されている。金属ビーズの作成に用いられる通常の材料は、金、銀、ニッケル、クロム、白金、銅などであり、ここでは金が好ましいが、それは金が、例えば切断可能スペーサのシグナル応答性末端における遊離SH基の配位結合を介して、容易かつ緊密に結合することができるからである。金属ビーズは、金属固体であってもよく、あるいは金属コーティングが施されたプラスチックまたはガラスビーズなどから形成されてもよい。また、金属の代わりに他の反射材料を用いてもよい。ここで好ましい金球体は、シグナルプローブ206のチオ基に直接結合する。

20

【0194】

図44および図45に示すように、輸送プローブ198は、アミド結合を介してアミノ末端に共有結合する。切断可能スペーサ分子は、その切断部位の性質に応じて化学的または酵素的手段、熱、光などにより、検定手順中に切断されやすい切断部位258を含む。化学的手段は、シロキサン切断基(cleavage group)、および例示的にそれぞれ、化学的切断部位および化学的切断剤のフッ化ナトリウムおよびフッ化アンモニウム溶液を用いることがここでは好ましい。また、エステル基やジチオ基のような切断されやすい他の基も用いられ得る。金球体がスペーサの切断後に加えられる場合、ジチオ基が特に有利である。別法として、切断部位は、制限酵素を用いた切断の制限部位であってもよい。制限切断は、遺伝的または免疫化学的検定を行う場合に好ましい方法である。スペーサは、全スペーサの完全な切断を最適化するために、2つ以上の切断部位を含み得る。

30

【0195】

切断可能スペーサを用いた核酸検定

本発明の一態様では、輸送プローブおよびシグナルプローブは、試験サンプル中に存在し得る核酸の相補鎖と結合するようになっている。相補的なオリゴヌクレオチドは、特異的結合対の成員を含み、すなわち、1つのオリゴヌクレオチドが、第2の相補的オリゴヌクレオチドに結合する。

40

【0196】

本発明の一実施の形態を図式化した図46A～図46Cにより詳細に示すように、輸送プローブ198およびシグナルプローブ206を含む切断可能スペーサ分子256は、捕捉ビーズ190およびレポータービーズ192の表面上の異なる部位に位置付けられる。図46Aに示すように、オリゴヌクレオチド標的剤202は、輸送プローブ198およびシグナルプローブ206に近接して位置付けられる。これらの標的剤が両プローブと相補的である場合、標的剤202、輸送プローブ198、およびレポータープローブ206の間にハイブリダイゼーションが起こり、図46Bに示すように二重螺旋が形成される。標的剤202とプローブとの間に相補性がない場合、図46Bにさらに示すようにこれらの基の間には結合がなく、この場合、二重螺旋は形成されない。

50

【0197】

切断部位258が切断され、二重螺旋結合オリゴヌクレオチドによる結合がない場合、レポータービーズ192は捕捉ビーズ190から解放されて解離する。これは、図46Cにより詳細に示される。次に、入射光、特に入射レーザー光によって二重ビーズ複合体194の存非を検出することができる。

【0198】

切断可能スペーサおよびライゲーションを用いた核酸検定

次に図47Aを参照すると、架橋剤260を用いる代替の実施の形態の概略表現が示されている。架橋剤260は、標的が輸送プローブ198およびシグナルプローブ206に結合すると、架橋剤260が輸送プローブ198およびシグナルプローブ206の末端間のブリッジとして働くように標的の一部に結合するための、比較的短いオリゴヌクレオチド配列を含み得る。これにより、図47Bに示すような2つの切断箇所(breaks)を有する二重螺旋が形成される。

10

【0199】

図47Cに示す次のステップに移り、本発明の核酸検出の実施の形態のさらなる実施の形態における、切断可能スペーサに関連したDNAリガーゼの使用の概略表現が示されている。ライゲーション手順により、二重螺旋の切断箇所が共有結合される。この共有結合は、検体特異的な結合が二重ビーズ複合体を接着させる強度を高め、それにより、この実施の形態では検出の特異性を高めつつ高いストリンジェンシーの洗浄が可能となる。

【0200】

本発明の切断可能な反射シグナル要素が、規定サイズの増幅核酸、特に、種々の形態のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、T7およびSP6 RNAポリメラーゼを用いた増幅法などを用いて増幅された核酸を検出することに特に適していることは、核酸の検出に熟練した者により理解されるであろう。

20

【0201】

切断可能スペーサを用いた免疫検定

図48A~図48Cに示す本発明のさらなる実施の形態では、切断可能スペーサ258は、免疫検定を可能にするように修飾された抗体を含む。修飾抗体は、抗体に共有結合されたオリゴヌクレオチドにより媒介される切断可能スペーサ258に非共有結合され得る。超分子構造の非共有的な組み合わせ構築を達成するための相補的核酸分子の使用は、共有特許であり同時係属中の、1994年10月31日に出願された米国特許出願第08/332,514号、1995年4月19日に出願された第08/424,874号、および1996年3月29日に出願された第08/627,695号にさらに詳細に記載されており、これらは参照により本明細書に援用される。別の実施の形態では、抗体は、従来のクロスリンク剤を用いて、直接またはリンカーを介して切断可能スペーサに共有結合することができる。

30

【0202】

抗体プローブは、捕捉ビーズ190に結合した抗体輸送プローブ196と、レポータービーズ192に結合した抗体シグナルプローブ208とを含む。ビーズおよびプローブはいずれも、切断可能スペーサ258により結合される。抗体輸送プローブ196および抗体シグナルプローブ208は、対象となる抗原の異なるエピトープ部位に対する親和性を有する。

40

【0203】

図48A~図48Cに図式化される免疫検定をさらに参照して、図48Aに示すように、標的抗原204または非特異的標的剤200を含む試験溶液を二重ビーズ複合体194のコレクションに加えると、標的抗原204は、図48Bに示すように、抗体輸送プローブ196および抗体シグナルプローブ208に結合する。この結合は、切断部位258が例えば化学切断剤との接触などにより切断された場合の二重ビーズ複合体194のデカップリングを防止する。対照的に、標的剤200に対する抗体の結合親和性の欠如により、非特異的標的剤200により結合されていない第2の切断可能シグナル要素は、図48C

50

に示すように、二重ビーズ複合体を解離させる。

【0204】

次に、二重ビーズ複合体194の存非を、入射光、特に入射レーザー光の反射率または反射率の非存在として検出することができる。

【0205】

明らかであるように、図示のような抗体のカップリングは、本発明の二重ビーズ検定における切断可能スペーサとの使用のための、標準的な免疫検定化学特性(chemistries)および免疫検定幾何学特性 geometries)の適合を可能にする。これらの従来の免疫検定幾何学特性のいくつかは、1992年12月1日に発行された米国特許第5,168,057号にさらに記載されており当該特許は参照により本明細書に援用される。本発明に効果的に適合され得る他の免疫検定幾何学特性および技法は、Diamandis et al. (eds.), *Immunoassay*, AACCC Press (July 1997); Gosling et al. (eds.), *Immunoassay: Laboratory Analysis and Clinical Applications*, Butterworth-Heinemann (June 1994); and Law (ed.), *Immunoassay: A Practical Guide*, Taylor & Francis (October 1996)に開示されており、これらの開示は参照により本明細書に援用される。したがって、図48A~図48Cに図式化されている検体の直接検出は、本発明の切断可能スペーサ型二重ビーズ検定および検定デバイスに適合可能な免疫検定幾何学特性の1つにすぎない。

【0206】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、およびヒトヘルペスウイルスをスクリーニングする免疫検定において特に有益であることがわかる。

【0207】

抗体は特異的結合対の広い概念を例示するものであり得、抗体は特異的結合対の第1の成員であり得、それが結合する抗原は特異的結合対の第2の成員であるとみなすことができることが、さらに理解されるであろう。概して、特異的結合対は、2つの分子として規定することができ、その相互親和性は、本発明の実施を可能にするのに十分な結合力および特異性を有する。したがって、本発明の切断可能スペーサは、副次的成員(side members)として他の特異的結合対成員を含み得る。このような実施の形態では、切断可能シグナル要素の第1の副次的成員は第1の特異的結合対の第1の成員を含み、切断可能スペーサの第2の副次的成員は第2の特異的結合対の第1の成員を含み、上記第1の特異的結合対の上記第2の成員および上記第2の特異的結合対の上記第2の成員は、互いに接続可能に結び付いており、以下の一般式の連結ループ(tethering loop)の形成を可能にする：第1の特異的結合対の第1の第1の成員 - 第1の特異的結合対の第2の成員 - 第2の特異的結合対の第2の成員 - 第2の特異的結合対の第1の成員。

【0208】

当該技術分野において既知の特異的結合対としては、生物学的受容体およびその天然のアンタゴニストおよびアンタゴニストリガンド、タンパク質および補助因子、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、スペクトリンおよびスペクトリンモノマー、および抗体のFcタンパク質およびFc受容体が挙げられる。

【0209】

固相へのDNA結合の方法

ビーズまたはバイオディスクなどの固相へのプローブの結合の成功は、本発明の二重ビーズ検定の重要なステップである。本発明のいくつかの実施の形態では、プローブはビーズに共有結合する。共有結合の効率は、利用するビーズのタイプおよび用いられる特定の共役法に依存する。

【0210】

図49に示すように、プローブ結合のための固相の使用を評価する体系的な方法が提示される。この方法は、二重ビーズ検定の特異性を改善する共有結合を特定する。この手法を用いて、固相の処理(すなわち、ビーズの表面またはバイオディスクの表面などの固相の被覆)を評価し、その処理が固相結合効率を改善するか否かを調べ得る。第1のステップ

10

20

30

40

50

として、その後結合したプローブを検出してその量を測定するために、プローブに適当な分子でタグを付ける。非限定的な例として、ビオチン部分(B)を、DNAプローブの3'末端に結合させることができる。次に、クロスリンク剤、例えばEDC(1-エチル3-(3ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド-HCl)の存在下または非存在下で、プローブを結合させる。クロスリンク剤の存在下では、プローブは共有結合および非共有結合する。あるいは、クロスリンク剤の非存在下では、プローブはビーズに非共有的に吸収される。適当な洗浄ステップがなされた後、プローブであらかじめ標識されたビオチン分子の特異的結合に検出剤が加えられる。例えば、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ(S-AP)をプローブ結合ビーズに添加すると、S-APはビオチン化プローブに特異的に結合する。次に、アルカリホスファターゼ基質をサンプルに添加する。この基質はリン酸基を失うと発色し、色の強度はビーズに結合したプローブの量に相関する。適当な培養期間後、溶液が単離され、適当な波長の溶液の光学濃度を、分光光度計またはマイクロタイタープレート読み取り装置で測定する。

10

【0211】

図50を参照して、カルボキシル化ビーズ上へのオリゴヌクレオチドプローブの結合が示されている。プローブの結合は、共有的または非共有的に実行され得る。図51A、図51B、図53A、および図53Bに関連してさらに詳細に説明するように、二重ビーズ検定では、プローブの共有結合が非共有結合よりも好ましい。この共役プロセスは、図11A、図11B、図12A、および図12Bに提示するように、二重ビーズ検定のステップIの前に行われる。固体表面に共有結合したプローブの量は、固相に共有結合または非共有結合する、すなわちクロスリンク剤(例えばEDC)の存在下または非存在下で非特異的に結合する、プローブの量を判定することにより評価することができる。非共有結合プローブの割合は、式 $100\% \cdot N/T$ に従って求めることができ、共有結合プローブの割合は、式 $100\% \cdot (T-N)/T$ により求めることができ、ここで、「T」は、クロスリンク剤の存在下で得られるシグナルの総量(すなわち、共有結合および非共有結合したプローブの総量)を表し、「N」は、クロスリンク剤を使用しない場合に得られるシグナルの総量を表す。別法として、共有結合したプローブの量は、すべての非共有結合プローブがS-APの添加前に除去される場合に直接得ることができる。これは、S-APを添加するステップの前に70℃までビーズを過熱することにより好都合に行うことができる。非共有結合ビーズの割合が20%未満である場合、試験されているビーズは共有結合のための固相として用いることができる。この方法を適用した結果を、図51A、図51B、および図55に提示する(詳細は実施例7を参照)。

20

30

【0212】

図51Aおよび図51Bに示すように、1.8μm、2.1μm、および3μmのビーズは、少なくとも75%の結合効率を有し、プローブ共有結合に適した固相を提供する。しかしながら、1~2μmのビーズは、21%未満という低い共有結合効率のため、プローブの共有結合には適していない可能性がある。

【0213】

本発明の種々の実施の形態は、核酸分子をプローブとして利用する。図52Aは、一本鎖DNAと二本鎖DNAとの構造差を示すことにより、一本鎖DNAの方がより容易に固相に非共有結合する仕組みを示す。一本鎖DNAは、容易に固相に非共有的に吸収され得る疎水性塩基側鎖を有する。対照的に、二本鎖DNAでは、固相との疎水性塩基相互作用は通常は起こらず、非共有すなわち非特異的結合は一本鎖DNA分子と比較して制限される。したがって、本発明の種々の実施の形態では、二本鎖DNAを一本鎖DNAの代わりに利用することにより、共有結合によるDNAの固相への結合を促進することができる(図52B)。二本鎖DNAプローブの鎖の1つが固相に共有結合した後、非共有結合している鎖は、適当な緩衝液中で70℃でサンプルを加熱することにより除去することができる。これらの条件下で、二本鎖DNAは分離され、ビーズに共有結合している一本鎖DNAプローブのみが残って標的の捕捉に用いられる。プローブ共有結合のための二本鎖DNAの使用に関する実験の詳細は、以下の実施例8でさらに詳細に説明する。

40

50

【0214】

本発明の種々の実施の形態では、熱処理を用いて、非共有結合プローブ（複数可）を固相から選択的に除去することができる。この方法は、例えば、固相のタイプ、固相の処理、および二本鎖DNAの使用をすべて最適化したにもかかわらず、固相への非共有結合が依然として問題である場合に、有用である。熱処理の条件は最適化されている。最適な緩衝液は、2% BSA、50 mM Tris-HCl、145 mM NaCl、1 mM MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂である。高温では磁気ビーズがその磁性を失う可能性があるため、処理は約70以下の温度で行われる。

【0215】

本発明の他の実施の形態では、二重ビーズ検定の特異性を高める共有結合を得るために最適な条件を決定する、本明細書に提示する方法は、固相として用いられるディスク表面に適用してもよい。同様に、本発明は、タンパク質結合のための固体表面を評価するための本明細書中で上述した実施の形態に類似の、他の実施の形態を提供する。例えば、このような用途は、利用するプローブが抗原または抗体である場合に有用であろう。

【0216】

次に図53Aを参照して、二重ビーズ検定で用いるための2つの異なる捕捉ビーズ上のプローブに結合された標的を検出する酵素検定から収集した結果の棒グラフが示されている。図51Aで上述したように、1~2 μmのビーズは最高20%の共有結合効率を有し、残りのプローブは非共有結合し、3 μmのビーズの共有結合効率は75~85%である。図53Aに示すデータは、試験されたビーズの双方が、プローブが共有結合しているか非共有結合しているかに関係なく、同様の量の標的と結合することを示す。これは、共有結合が酵素検定フォーマットに必要なではないことを示す。

【0217】

図53Aとは対照的に、図53Bは、図53Aで用いた同じ捕捉ビーズにより捕捉されたレポータービーズの数を調べるように設計された二重ビーズ検定の結果を提示している。図53Bに示す結果は、検定の感度を高めるために、捕捉ビーズへのプローブの共有結合が必要であることを示す。本発明のこの特定の実施の形態では、上述のように、3 μmの捕捉ビーズは、1~2 μmのビーズよりも多くの共有結合を含む。これは、捕捉ビーズ上の共有的に連結されたプローブが非共有結合プローブよりも高い結合強度を有するため、二重ビーズ複合体におけるレポータービーズの保持を可能にする。

【0218】

上記の本発明の概要で述べたように、ビーズの表面すなわち固相は平坦ではなく、これが溶液中の標的へのプローブの可触性を制限する。図52Aを参照して説明したように、プローブリンカーを用いてプローブの長さを延長し、プローブの標的への可触性を高めることができる。

【0219】

次に図54を参照して、PEGをリンカーとして用いて改善された標的結合を示す、二重ビーズ検定から収集した結果のデータが提示されている。リンカーは、検定感度を約50%以上高めることができる。リンカーの使用により、捕捉ビーズへのレポータービーズの非特異的結合も低減する。本発明のこの実施の形態では、プローブは、リンカー分子により固相に結合される。リンカー分子の使用により、プローブの長さおよび剛性が増す。これらの2つの特性は、プローブ（複数可）の可触性を高め、したがって、標的捕捉の効率および二重ビーズ検定の感度を最大にする。当業者には既知であるように、本明細書に記載する基準を満たすさまざまなリンカー分子を用いることができる。非限定的な例として、ウシ血清アルブミン（BSA）またはポリエチレングリコール（PEG）をリンカー分子として用いることができる。本発明のいくつかの実施の形態では、リンカーは、DNAプローブの5'末端に共有結合する一連の3~10 PEG分子であり得る。リンカー分子としてのPEGの使用に関する詳細は、以下の実施例9で説明する。

【0220】

次に図55を参照して、3 μmのSpherotech製ビーズに関する共有的なプローブ濃度の

割合の測定を示す棒グラフが示されている。これらのグラフは、ビオチン化プローブおよびストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼ酵素反応を用いた酵素検定から生成されるシグナルを表す。図50を参照して説明したように、共有結合効率は、非熱処理ビーズに結合したプローブの総量を測定することにより計算することができる。次に、ビーズの別個のアリコートを加熱して、非共有結合プローブを除去し、次に、共有結合プローブの量を、以下の実施例7で説明するように酵素検定を用いて測定する。次に、これらのデータにより、プローブの共有結合の割合を、以下の式： $H / T * 100$ を用いて求めることができる。ここで、Hは熱処理ビーズからのシグナルを表し、Tは非熱処理ビーズからの全シグナルを表す。

【0221】

図56は、界面活性剤を含む種々の遮断剤でのビーズの前処理を説明する棒グラフ表現である。検定感度は、捕捉ビーズへのレポータービーズの非特異的結合であるベースラインシグナルと逆相関するため、ビーズの非特異的結合を低減させることは二重ビーズ検定において重要である。したがって、ベースラインが低いほど、検定の感度はより高まる。図示のように、サケ精子DNAの使用は、この実験で試験された他の遮断剤に比して、非特異的結合を低減するのに最も効果があった。サケ精子DNAによる遮断は、非特異的結合を約10分の1に低減した。したがって、サケ精子DNAは、本発明の一態様ではビーズの非特異的結合を遮断する好ましい方法である。BSA、デンハルト溶液、およびスクロースを含む他の遮断材を用いてもよい。好ましくは、ビーズは、図50に示すような結合および熱処理の後に、または上記の図11A、図11B、図12A、および図12BのステップIの前に、適当な遮断剤により遮断して、二重ビーズ検定の感度を高めるべきである。

【0222】

ビーズの非特異的結合を低減する方法

上述のように、図56は、ビーズの非特異的結合を低減するための、界面活性剤を含む種々の遮断剤でのビーズの前処理を説明する棒グラフ表示である。検定感度は、捕捉ビーズへのレポータービーズの非特異的結合であるベースラインシグナルと逆相関するため、ビーズの非特異的結合を低減させることは二重ビーズ検定において重要である。したがって、ベースラインが低いほど、検定の感度はより高まる。図示のように、サケ精子DNAの使用は、この実験で試験された他の遮断剤に比して、非特異的結合を低減するのに最も効果があった。サケ精子DNAによる遮断は、非特異的結合を約10倍低減した。したがって、サケ精子DNAは、本発明の一態様ではビーズの非特異的結合を遮断する好ましい方法である。BSA、デンハルト溶液、およびスクロースを含む他の遮断材を用いてもよい。好ましくは、ビーズは、上記の図11A、図11B、図12A、および図12BのステップIの前に、適当な遮断剤により遮断して、二重ビーズ検定の感度を高めるべきである。

【0223】

図57は、二重ビーズ検定において蛍光レポータービーズを用いた濃度依存標的検出を示す、蛍光測定器を用いて生成されたデータの棒グラフである。このグラフは、標的DNAのピコモル濃度対二重ビーズ複合体に結合したビーズの数を示す。このグラフに示す標的検出のダイナミックレンジは、 $0.25 \text{ pM} \sim 2500 \text{ pM}$ (ピコモル/リットル)である。この特定のグラフは、蛍光測定器からのデータを用いて生成したが、蛍光型光ディスクドライブを用いて結果を生成してもよい。標的濃度の範囲の検出に関する実験からの実験の詳細は、実施例10で詳細に説明する。

【0224】

次に図58、図59、図60、図61A、および図61Bを参照して、ハイブリダイゼーション緩衝液または検定緩衝液中の種々の塩の最適濃度またはイオン強度を判定するために行われる実験からのデータが示されている。検定緩衝液中の塩濃度は、ハイブリダイゼーション効率または結合効率を高め、かつ捕捉ビーズとレポータービーズとのビーズの非特異的結合を低減して、それにより検定の感度を高める信号対雑音比の低下をもたらす

10

20

30

40

50

ように最適化する必要がある。概して、これらの図に提示されているデータは、40 mM EDTA、300 mM NaCl、30 mM MgCl₂ が、二重ビーズ検定の一実施の形態での使用に最適な塩濃度であることを示す。

【0225】

図58を特に参照して、ビーズ緩衝液中の種々のNaCl濃度と、緩衝液のイオン強度の変化の結果としての関連する非特異的結合とを用いた実験から収集したデータを示す棒グラフ表現がある。図58に提示される結果に基づいて、二重ビーズ検定で用いるのに最適なビーズ緩衝液の塩化ナトリウム濃度は0.2 Mであり、これはビーズの非特異的結合がこのNaCl濃度で最小になるからである。

【0226】

次に図59を参照して、種々の標的濃度を用いた二重ビーズ検定感度に対するEDTA濃度上昇の影響を示す棒グラフが示されている。図59は、検定緩衝液中のEDTAの濃度の影響を受けた、関連する非特異的結合も示す。提示されているデータに基づいて、ハイブリダイゼーション緩衝液で用いるのに最適なEDTA緩衝液濃度は40 mMであり、これは二重ビーズ検定から生成されるシグナルがこの濃度で最高になるからである。

【0227】

同様に、図60は、種々の標的濃度を用いた二重ビーズ検定感度に対するNaCl濃度上昇の影響を示す棒グラフ表示を提示している。緩衝液のNaCl濃度の最適化に関するビーズの非特異的結合データは、図58に提示されている。図60に示すように、二重ビーズ検定で実施されるハイブリダイゼーションに最適なNaCl濃度は0.3 M NaClである。このデータを生成するために用いられた実験手順の詳細な説明は、以下の実施例11で説明する。

【0228】

次に図61Aおよび図61Bに移り、二重ビーズ検定感度および酵素検定感度それぞれに対する、検定緩衝液中のMgCl₂濃度上昇の影響を示す棒グラフ表現が示されている。これらの図からのデータは、ハイブリダイゼーション緩衝液中の30 mM MgCl₂の濃度が、生成されるシグナルを増加させ、かつ検定感度を高めるのに最適であることを示す。図61Aおよび図61Bに示すデータによると、30 mM MgCl₂処理では、酵素検定の方が二重ビーズ検定よりも高感度であると思われる。この結論は、種々の標的濃度からの処理群内のシグナルの差に基づく。したがって、図示のように、図61Bの酵素検定の30 mM MgCl₂群の濃度曲線の傾きは、図61Aの対応する曲線よりも急である。実施例12では、図61Aに関する実験を実行する手順を詳細に説明する。

【0229】

次に図62に移り、ビーズ検定の感度を高めるためのプローブ遮断剤の使用のイラスト表現が示されている。この特定の実施例で用いられるプローブ遮断剤は、ビーズのプローブと相補的なビオチン化DNAである。ビーズの過剰なプローブを遮断するために用いられるプローブ遮断剤の量は、プローブの所定部分が遮断剤により遮断されるような量である。二重ビーズ検定でのプローブ遮断剤の使用は、二重ビーズ検定での1つの捕捉およびレポータービーズへの標的結合の確率を高めるという点で、検定の感度を高める。これにより、二重ビーズ複合体ごとに1つの標的まで、二重ビーズ検定の感度を高めることができる。ビオチン化プローブ遮断剤の使用は、検定の最適化のためのプローブ遮断剤の遮断効率の定量を可能にする。ビーズに結合したビオチン化プローブの量は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ(S-AP)を含むストレプトアビジン化またはニュートラビジン化(neutravidinated)酵素およびその適切な基質を用いた酵素検定により定量することができる。この試験に用いる酵素および基質の選択は、所望のタイプの検出により決まる。一般的に、酵素-基質反応により分光光度計で定量される色を生成する比色試験を実施する。別法として、蛍光測定器またはFluorimeterを用いて定量される得るストレプトアビジン化またはニュートラビジン化蛍光タグを用いてもよい。比色定量および蛍光定量はいずれも、図1および図2に示す適当な光ディスク読み取り装置を用いて実行してもよい。

10

20

30

40

50

【0230】

図63は、二重ビーズ検定でのハイブリダイゼーション反応中に種々の標的濃度を用いた、生成されるシグナルおよび検定感度に対する培養時間の影響を示すデータの棒グラフ表示を示す。データは、二重ビーズ検定で最高のシグナルおよび感度を得るのに必要な最短培養時間が2時間であり、4時間または一晩のハイブリダイゼーションは必要ないことを示す。

【0231】

同様に、図64は、二重ビーズ検定で実施されるハイブリダイゼーション反応において種々の標的濃度を用いた、ハイブリダイゼーション効率および検定感度に対する培養時間および混合の影響を示す、収集されたデータの棒グラフを示す。図63におけるように、図64もまた、2時間がハイブリダイゼーションの最適時間であり、ハイブリダイゼーション時間の延長によりシグナル生成が増加しないことを示す。さらに、混合により、対照に比して、2時間のハイブリダイゼーション後のハイブリダイゼーション効率が著しく高まった。以下に提示する実施例14では、図63および図64に示すデータを生成するために行われる実験に関する詳細を説明する。

【0232】

非特異的結合複合体の除去を含む二重ビーズ調製法

以下の調製法は、図11A、図11B、図12A、および図12Bに関連して上述した対応する方法のより具体的な代替の実施の形態である。

【0233】

次に図65Aおよび図65Bを参照して、本発明の一態様による溶液中の二重ビーズ複合体構造を作成する「シングルステップハイブリダイゼーション」技法を用いた分子検定の準備法が示されている。この方法は、図11Aに関連して上述した方法と同様である。本方法は、ステップI、ステップII、ステップIII、ステップVI、ステップV、ステップVII、ステップVIII、およびステップIXとして連続的に示す8つの主なステップを含む。

【0234】

この方法のステップIでは、オリゴヌクレオチド輸送プロープ198で被覆されたいくつかの捕捉ビーズ190を、緩衝溶液210を含む試験管212に入れる。この方法で用いる捕捉ビーズ190の数は、例えば約 1.0×10^7 であり、それぞれの直径は約 $1 \mu\text{m}$ 以上であり得る。捕捉ビーズ190をハイブリダイゼーション溶液に懸濁し、ピペット214による注入により試験管212にロードする。好ましいハイブリダイゼーション溶液は、 0.2 M NaCl 、 10 mM MgCl_2 、 1 mM EDTA 、 50 mM Tris-HCl 、 $\text{pH } 7.5$ 、および $5 \times$ デンハルト混合物からなる。所望のハイブリダイゼーション温度は 37°C である。この実施の形態の予備的ステップでは、輸送プロープ198を、EDC結合により $3 \mu\text{m}$ の磁気捕捉ビーズ190に結合させる。結合法に関するさらなる詳細は、本発明の譲受人に譲渡された、2001年2月27日に出願された「Methods for Attaching Capture DNA and Reporter DNA to Solid Phase Including Selection of Bead Types as Solid Phase」と題する米国仮出願第60/271,922号、および2001年3月22日に出願された「Methods of Conjugation for Attaching Capture DNA and Reporter DNA to Solid Phase」と題する米国仮出願第60/277,854号に開示されており、これら出願の双方は、その内容がすべて参照により本明細書に援用される。

【0235】

ステップIIに示すように、標的DNAまたはRNA202を溶液に添加する。オリゴヌクレオチド輸送プロープ198は、DNAまたはRNA標的剤202と相補的である。したがって、標的DNAまたはRNA202は、図8Aに示すように捕捉ビーズ190に結び付いた輸送プロープ198の相補配列に結合する。

【0236】

次にステップIIIを参照して、オリゴヌクレオチドシグナルプロープ206で被覆さ

10

20

30

40

50

れたレポータービーズ192を溶液210に添加する。図9Aおよび図10Aにも示すように、シグナルプローブ206は、標的DNAまたはRNA202と相補的である。一実施の形態では、標的DNAまたはRNA202の一部と相補的なシグナルプローブ206は、2.1 μ mの蛍光レポータービーズ192に結合する。シグナルプローブ206および輸送プローブ198はそれぞれ、標的DNA202と相補的ではあるが互いに相補的ではない配列を有する。レポータービーズ192を加えた後、標的DNA202が捕捉ビーズ190とレポータービーズ192とを連結するように、二重ビーズ複合体194が形成される。特定の完全な洗浄により、レポータービーズ192と捕捉ビーズ190との間の非特異的結合は最小限に抑えられるはずである。標的剤202およびシグナルプローブ206は、37で3~4時間ハイブリダイズされることが好ましい。

10

【0237】

この実施の形態および他の実施の形態では、ハイブリダイゼーション中の断続的混合(すなわち、周期的混合とそれに続く停止)により、連続的混合よりも二重ビーズ複合体の収量が高まることが見出された。したがって、このステップをディスク上で行う場合、図2のディスクドライブモータ140およびコントローラ142を用いて、ディスクを周期的に回転させ、所望の断続的混合を行うことが有利であり得る。これは、回転および停止セッションの好ましいデューティサイクルを用いた規定の方法で、ディスクを一方向に回転させ、次にディスクを停止させ、その後ディスクを同じ方向に再び回転させるという、ディスクに符号化された混合プロトコルで実施され得る。別法として、符号化された混合プロトコルは、回転、停止、および逆回転セッションの好ましいデューティサイクルを用いて、第1の方向にディスクを回転させ、次にディスクを停止させ、その後ディスクを逆方向に再び回転させることができる。本発明のこれらの特徴は、図33Aおよび図35に関連してさらに詳細に説明されている。

20

【0238】

次に、図65AのステップIVに示すように、ハイブリダイゼーション後、二重ビーズ複合体194を溶液中の未結合レポータービーズから分離する。捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液に磁界を印加して二重ビーズ複合体構造194を捕捉することができる。磁界は、内蔵磁石218を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、内蔵磁石218は、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。レポータービーズに結合していない捕捉ビーズも単離されることに留意されたい。別法として、この磁気による除去ステップは、図33A、図35、および図36A~図36Cに示すようにオンディスクで行ってもよい。

30

【0239】

ステップIVに示す精製プロセスは、浮遊粒子を含む上清の除去を含む。洗浄緩衝液を試験管に添加し、ビーズ溶液を十分に混合する。1ステップ検定に好ましい洗浄緩衝液は、145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M、および10mM EDTAからなる。未結合レポータービーズ182、浮遊DNA、および非特異的結合粒子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的配列、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、ここで、重なり合った二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。捕捉ビーズへのレポータービーズの非特異的結合を低減する方法に関連する他の態様に関するさらなる詳細は、例えば、本発明の譲受人に譲渡された、2001年2月28日に出願された「Reduction of Non-Specific Binding in Dual Bead Assays by Selection of Bead Type and Bead Treatment」と題する米国仮出願第60/272,134号、および2001年3月12日に出願された「Reduction of Non-Specific Binding in Dual Bead Assays by Selection of Buffer Conditions and Wash Conditions」と題する米国仮出願第60/275,006号に開示されており、これら出願の双方は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

40

50

【0240】

図65Aにおける次のステップはステップVである。このステップでは、図示のように、二重ビーズ複合体を洗浄緩衝溶液で約3~5分間洗浄してから、制限酵素、尿素、酸（好ましくは強酸）、または塩基（好ましくは強塩基）を二重ビーズ溶液に添加することができる。このようにして、二重ビーズ複合体は、これらの解離剤の作用により解離され、それにより、65BのステップVIに示すように、捕捉ビーズ190からレポータービーズ192を解放する。

【0241】

二重ビーズ構造の解離後、ステップVIIに示すように、溶液中の、未結合となったレポータービーズ192から捕捉ビーズ190を分離する。溶液に磁界を印加して、磁気捕捉ビーズ190を捕捉することができる。磁界は、内蔵磁石218を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、内蔵磁石218は、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。ステップVIの間、分離されなかった非解離二重ビーズ複合体も溶液から除去されることに留意されたい。ステップVIIの間、解放されたレポータービーズを含む上清を、ピペット214を用いて回収する。次に、検定混合物を、ディスク144または180にロードして、ステップVIIIに示すように、光バイオディスクまたは医療CD読み取り装置を用いて分析することができる。レポータービーズの分析には、透過型バイオディスク180を用いてもよく、または反射型バイオディスク144を用いてもよい。反射型および透過型光バイオディスクに関する詳細は、それぞれ図3A~図3Cおよび図4A~図4Cに関連して上述されている。光バイオディスクを分析するために用いることができる光バイオディスク読み取り装置および他の代替のディスク読み取り装置は、図1および図2に関連して詳細に上述されている。レポータービーズが蛍光である場合、ステップVIIで単離されたレポータービーズもまた、蛍光測定器または蛍光光ディスク読み取り装置を含む任意の同様の蛍光型分析装置を用いて定量することができる。

【0242】

図66Aおよび図66Bは合わせて、図65Aおよび図65Bの方法と同様に、溶液中で二重ビーズ複合体構造を作成する「シングルステップ抗原結合」法を用いた免疫検定を示す。この方法も同様に、8つの主なステップを含み、図11Bに関連して上述した方法に関する。この方法の8つのステップは、図66Aおよび図66Bにおいて、それぞれステップI、ステップII、ステップIII、ステップIV、ステップV、ステップVI、ステップVII、およびステップVIIIとして示す。

【0243】

図66AのステップIに示すように、例えば、数が約 $10E+07$ でそれぞれの直径が約 $1\mu m$ 以上であり、抗体輸送プローブ196で被覆された捕捉ビーズ190を、緩衝溶液210に添加する。この溶液は、図65Aおよび図65Bに示す方法で用いられるものと同じであってよく、または免疫化学的検定で用いるように特別に調製してもよい。抗体輸送プローブ196は、標的抗原204に対して特異的親和性を有する。輸送プローブ196は、図8Bにも示すように、標的抗原204内のエピトープに特異的に結合する。一実施の形態では、標的抗原の一部に対する親和性を有する抗体輸送プローブ196は、EDC結合を介して $3\mu m$ の磁気捕捉ビーズ190に結合することができる。別法として、捕捉ビーズ190への輸送プローブ196の結合は、受動的な吸着により達成することができる。

【0244】

次に図66Aに示すステップIIを参照して、標的抗原204を溶液に添加する。標的抗原204は、図8Bにも示すように、捕捉ビーズ190に結び付いた抗体輸送プローブ196に結合する。

【0245】

ステップIIIに示すように、抗体シグナルプローブ208で被覆されたレポータービーズ192を溶液に添加する。抗体シグナルプローブ208は、図9Aおよび図10Bに

10

20

30

40

50

も提示するように、標的抗原 204 のエピトープに特異的に結合する。一実施の形態では、シグナルプローブ 208 は 2.1 μm の蛍光レポータービーズ 192 に結合する。シグナルプローブ 208 および輸送プローブ 196 はそれぞれ、標的抗原の特異的エピトープに結合するが、互いには結合しない。レポータービーズ 192 を添加した後、標的抗原 204 が捕捉ビーズ 190 とレポータービーズ 192 とを連結するように、二重ビーズ複合体 194 が形成される。特定の完全な洗浄により、レポータービーズ 192 と捕捉ビーズ 190 との間の非特異的結合は最小限に抑えられるはずである。

【0246】

ステップ IV では、ステップ III での結合後に、二重ビーズ複合体 194 を溶液中の未結合レポータービーズから分離する。捕捉ビーズ 190 の磁気特性を用いて、溶液に磁界を印加して二重ビーズ複合体構造 194 を捕捉することができる。磁界は、内蔵磁石 218 を有する磁気試験管ラック 216 に封入することができ、内蔵磁石 218 は、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。レポータービーズに結合していない捕捉ビーズも単離されることに留意されたい。別法として、上記で示したように、この磁気による除去ステップは、図 33A、図 35、および図 36A ~ 図 36C に示すようにオンディスクで行ってもよい。

10

【0247】

ステップ IV の精製プロセスは、浮遊粒子を含む上清の除去を含む。洗浄緩衝液を試験管に添加し、ビーズ溶液を十分に混合する。未結合レポータービーズ 182、浮遊タンパク質サンプル、および非特異的結合分子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的抗原、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、ここで、重なり合った二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。

20

【0248】

図 66A における次のステップはステップ V である。このステップでは、図示のように、二重ビーズ複合体を洗浄緩衝溶液で約 3 ~ 5 回洗浄してから、尿素、酸、または塩基を解離剤として、図示のようにピペット 214 を用いて二重ビーズ溶液に添加することができる。本明細書で用いられる酸または塩基は、それぞれ強酸または強塩基であることが好ましい。このようにして、二重ビーズ複合体は、これらの解離剤の作用により解離され、それにより、66B のステップ VI に示すように、捕捉ビーズ 190 からレポータービーズ 192 を解放する。

30

【0249】

二重ビーズ構造の解離後、ステップ VII に示すように、溶液中の、未結合となったレポータービーズ 192 から捕捉ビーズ 190 を分離する。オンディスクまたはオフディスクで溶液に磁界を印加して、磁気捕捉ビーズ 190 を捕捉することができる。ここで示す予備的なオフディスク方法では、磁界は、内蔵磁石 218 を有する磁気試験管ラック 216 に封入することができ、内蔵磁石 218 は、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。ステップ VI の間に分離されなかった非解離二重ビーズ複合体も溶液から除去されることに留意されたい。ステップ VII では、解放されたレポータービーズを含む上清を、ピペット 214 を用いて回収する。次に、検定混合物を、ディスクに直接ロードして、ステップ VIII に示すように、光バイオディスク読み取り装置を用いて分析することができる。レポータービーズの分析には、透過型バイオディスク 180 を用いてもよく、または反射型バイオディスク 144 を用いてもよい。反射型および透過型光バイオディスクに関する詳細は、それぞれ図 3A ~ 図 3C および図 4A ~ 図 4C に関連して詳細に説明されている。光バイオディスクを分析するために用いることができる光バイオディスク読み取り装置および他の代替のディスク読み取り装置は、図 1 および図 2 を参照して詳細に上述されている。レポータービーズが蛍光である場合、ステップ VII で単離されたレポータービーズもまた、蛍光測定器または蛍光光ディスク読み取り装置を含む任意の同様の蛍光

40

50

型分析装置を用いて定量することができる。

【0250】

図67Aおよび図67Bは合わせて、ここでは「2ステップハイブリダイゼーション」と呼ばれる代替の遺伝的検定法を示す。この方法は、図12Aに関連して上述した方法を変更した実施の形態である。本方法は、二重ビーズ複合体を作成することを対象とする9つの主なステップを有する。概して、捕捉ビーズを、DNAまたはRNA標的剤と相補的なオリゴヌクレオチド輸送プローブ198で被覆し、緩衝溶液に入れる。この実施の形態では、標的剤の一部と相補的な輸送プローブを、EDC結合によって3 μ mの磁気捕捉ビーズに結合させる。固相へのオリゴヌクレオチド輸送プローブの他のタイプの結合を利用してもよい。これらは、例えば、受動的な吸着またはストレプトアビジン-ビオチン相互作用の使用を含む。本発明のこの方法による9つの主なステップは、図67AにおけるステップI、ステップII、ステップIII、ステップIV、ステップV、およびステップVIとして、また図67BにおけるステップVII、ステップVIII、およびステップIXとして連続的に示される。

10

【0251】

次に図67Aに示すステップIをより詳細に参照して、ハイブリダイゼーション溶液に懸濁した捕捉ビーズ190を、ピペット214から試験管212にロードする。好ましいハイブリダイゼーション溶液は、0.2M NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、50mM Tris-HCl、pH7.5、および5 \times デンハルト混合物である。望ましいハイブリダイゼーション温度は37である。

20

【0252】

ステップIIでは、標的DNAまたはRNA202が溶液に添加され、捕捉ビーズ190に結び付いた輸送プローブ198の相補配列に結合する。この方法の1つの特定の実施の形態では、標的剤202および輸送プローブ198を、37で2~3時間ハイブリダイズさせる。しかしながら、十分なハイブリダイゼーションは室温で30分間以内で行うことができる。高温では、ハイブリダイゼーションはほぼ瞬時に行うことができる。

【0253】

次にステップIIIに示すように、捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液に磁界を印加して結合している標的配列を単離することにより、捕捉ビーズに結合している標的剤202を溶液中の未結合種から分離する。磁界は、内蔵の永久磁石218または電磁石を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、永久磁石218または電磁石は、磁気ビーズを引き出して、溶液のピペット抽出によって懸濁液中に浮遊するいかなる未結合標的DNA202も除去する。上記の方法に関して、この方法のオンディスクの方法では、この磁気による除去ステップは、図33A、図35、図36A~図36Cに示すように行ってもよい。洗浄緩衝液を添加し、分離プロセスを繰り返すことができる。輸送プローブ198および標的DNA202のハイブリダイズ後の好ましい洗浄緩衝液は、145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、および0.05% Tweenからなる。ビーズへの標的剤の非特異的結合を低減するためのハイブリダイゼーション法および技法は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2001年3月26日に出願された「Reduction of Non-Specific Binding of Dual Bead Assays by Use of Blocking Agents」と題する米国仮出願第60/278,691号にさらに開示されている。この出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

30

40

【0254】

次に図67Aに示すステップIVを参照して、図65Aに示す方法に関連して説明したように、レポータービーズ192を溶液に添加する。レポータービーズ192は、標的剤202と相補的なシグナルプローブ206で被覆される。この方法の1つの特定の実施の形態では、標的剤202の一部と相補的なシグナルプローブ206は、2.1 μ mの蛍光レポータービーズ192に結合する。シグナルプローブ206および輸送プローブ198はそれぞれ、標的剤202と相補的ではあるが互いに相補的ではない配列を有する。レポータービーズ192の添加後、二重ビーズ複合体構造190が形成される。当業者には容

50

易に明らかとなるように、二重ビーズ複合体構造は、対象となる標的剤が存在する場合にのみ形成される。この形成では、標的剤 202 は、磁気捕捉ビーズ 190 とレポータービーズ 192 とを連結する。好ましい緩衝溶液を用いて、特定の完全な洗浄により、レポータービーズと捕捉ビーズとの間の非特異的結合は最小限に抑えられる。標的剤 202 およびシグナルプローブ 206 は、37 で 2 ~ 3 時間ハイブリダイズされることが好ましい。上述のステップ I I のように、十分なハイブリダイゼーションは室温で 30 分以内で行うことができる。より高温では、このステップにおけるハイブリダイゼーションはほぼ瞬時に行うこともできる。

【0255】

次に図 67A に示すステップ V を参照して、ステップ I V のハイブリダイゼーション後、二重ビーズ複合体 194 を溶液中の未結合種から分離する。捕捉ビーズ 190 の磁気特性を用いて、溶液に再び磁界を印加して二重ビーズ複合体 194 を単離する。また、単離物がレポータービーズに結合していない捕捉ビーズを含むことに留意されたい。この方法のオンディスクの方法での上記のステップ I I I のように、この磁気による分離ステップは、図 33A、図 35、および図 36A ~ 図 36C に示すように行ってもよい。

10

【0256】

浮遊粒子を含む上清を除去する精製プロセスは、洗浄緩衝液を試験管に添加すること、およびビーズ溶液を十分に混合することを含む。2ステップ検定に好ましい洗浄緩衝液は、145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M、および 10 mM EDTA からなる。未結合レポータービーズ、浮遊 DNA、および非特異的結合粒子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的剤、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、ここで、重なり合った二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。レポータービーズ、標的剤、および捕捉ビーズの間の非特異的な結合の低減を対象とする他の関連する態様は、例えば、本発明の譲受人に譲渡された、2001年2月28日に出願された「Mixing Methods to Reduce Non-Specific Binding in Dual Bead Assays」と題する米国仮出願第 60 / 272, 243 号、および 2001年3月1日に出願された「Dual Bead Assays Including Linkers to Reduce Non-Specific Binding」と題する米国仮出願第 60 / 272, 485 号に開示されており、これらはその内容のすべてが本明細書に援用される。

20

30

【0257】

図 67A に示す次のステップはステップ V I である。このステップでは、二重ビーズ複合体 194 を洗浄緩衝溶液で約 3 ~ 5 回洗浄してから、検定混合物をディスクにロードして分析する。別法として、このステップの間、オリゴヌクレオチドシグナルおよび輸送プローブをライゲーションして、ディスク分析およびシグナル検出プロセス中の二重ビーズ複合体の分解を防止することができる。プローブライゲーション法に関するさらなる詳細は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2001年3月26日に出願された「Improved Dual Bead Assays Using Ligation」と題する米国仮出願第 60 / 278, 694 号に開示されており、当該出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。本発明のさらに別の実施の形態では、図 67A のステップ V I に示すように、制限酵素、尿素、酸、または塩基を、ピベット 214 を用いて二重ビーズ溶液に添加してもよい。二重ビーズ複合体は、図 67B のステップ V I に示すように、これらの解離材の作用により解離され、それにより、捕捉ビーズ 190 からレポータービーズ 192 を解放する。本明細書で用いられる酸または塩基は、それぞれ強酸または強塩基であることが好ましい。

40

【0258】

二重ビーズ構造の解離後、ステップ V I I I に示すように、溶液中の、未結合となったレポータービーズ 192 から捕捉ビーズ 190 を分離する。溶液に磁界を印加して、磁気捕捉ビーズ 190 を捕捉することができる。磁界は、内蔵磁石 218 を有する磁気試験管ラック 216 に封入することができ、内蔵磁石 218 は、磁気ビーズを引き出して、懸濁

50

液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。ステップV I I Iの間、分離されなかった非解離二重ビーズ複合体も溶液から除去されることに留意されたい。ステップV I I Iの間、解放されたレポータービーズを含む上清を、ピペット214を用いて回収する。次に、検定混合物を、ディスクにロードして、ステップIXに示すように、光バイオディスク読み取り装置を用いて分析することができる。レポータービーズの分析には、透過型バイオディスク180を用いてもよく、または反射型バイオディスク144を用いてもよい。反射型および透過型光バイオディスクに関する詳細は、それぞれ図3A~図3Cおよび図4A~図4Cに関連して詳述されている。光バイオディスクを分析するために用いることができる光バイオディスク読み取り装置および他の代替のディスク読み取り装置は、図1および図2に関連して詳細に上述されている。レポータービーズが蛍光である場合、ステップV I I Iで単離されたレポータービーズもまた、蛍光測定器または蛍光光ディスク読み取り装置を含む任意の同様の蛍光型分析装置を用いて定量することができる。二重ビーズ複合体からレポータービーズを解放するために解離剤を用いて行われる実験は、以下の実施例15および16で詳細に説明する。

10

【0259】

この発明の別の態様によると、図68Aおよび図68Bは合わせて、図66Aおよび図66Bに関連して説明し、かつ図67Aおよび図67Bの遺伝的検定の技法に従ったものと同様の免疫検定法を示す。この方法は、ここでは免疫化学的検定の二重ビーズ複合体を作成する「2ステップ結合」とも呼ばれる。この方法は、図12Bで上述した方法に関連するより具体的な実施の形態である。図67Aおよび図67Bに示す方法のように、この方法は9つの主なステップを含む。概して、標的抗原のエピトープに特異的に結合する抗体輸送プローブで被覆された捕捉ビーズを、緩衝溶液に入れる。1つの特定の実施の形態では、抗体輸送プローブを3 μ mの磁気捕捉ビーズに結合させる。検定を行うために利用されるディスクドライブおよびディスクアセンブリのタイプに応じて、異なるサイズの磁気捕捉ビーズを用いてもよい。本発明のこの代替の方法による9つの主なステップは、それぞれ図68AのステップI、ステップII、ステップIII、ステップIV、ステップV、およびステップVI、ならびに図68BのステップVII、ステップVIII、およびステップIXとして示される。

20

【0260】

次に図68Aに示すステップIを特に参照して、緩衝溶液210に懸濁した捕捉ビーズ190を、ピペット214からの注入によって試験管212にロードする。

30

【0261】

ステップIIでは、標的抗原204を溶液に添加して、捕捉ビーズ190に結び付いた抗体輸送プローブ196に結合させる。標的抗原204および輸送プローブ196は、37で2~3時間結合させることが好ましい。より短い結合時間も可能である。

【0262】

ステップIIIに示すように、捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液に磁界を印加して結合している標的タンパク質または糖タンパク質を単離することにより、捕捉ビーズ190に結合している標的抗原204を溶液中の未結合種から分離する。磁界は、内蔵の永久磁石218または電磁石を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、永久磁石218または電磁石は、磁気ビーズを引き出して、溶液のピペット抽出によって懸濁液中に浮遊するいかなる未結合標的抗原204も除去する。洗浄緩衝液を添加して、分離プロセスを繰り返すことができる。

40

【0263】

次にステップIVに示すように、図66Aに示す方法に関連して説明したように、レポータービーズ192を溶液に添加する。レポータービーズ192は、標的抗原204に親和性のあるシグナルプローブ208で被覆される。この2ステップ免疫化学的検定の1つの特定の実施の形態では、標的抗原204の一部に特異的に結合するシグナルプローブ208は、2.1 μ mの蛍光レポータービーズ192に結合する。シグナルプローブ208

50

および輸送プローブ198はそれぞれ、標的抗原204のエピトープに特異的に結合するが、互いには結合しない。レポータービーズ192の添加後、二重ビーズ複合体構造190が形成される。当業者には容易に明らかとなるように、これらの二重ビーズ複合体構造は、対象となる標的抗原が存在する場合にのみ形成される。この形成では、標的抗原204は、磁気捕捉ビーズ190とレポータービーズ192とを連結する。好ましい緩衝溶液を用いて、特定の完全な洗浄により、レポータービーズと捕捉ビーズとの間の非特異的結合は最小限に抑えられる。標的抗原204およびシグナルプローブ208は、37で2~3時間ハイブリダイズされることが好ましい。上述のステップIIのように、十分な結合は室温で30分以内で行うことができる。免疫検定の場合、37を超える温度は、タンパク質が変性するため好ましくない。

10

【0264】

次に図68Aに示すステップVに移り、ステップIVに示す結合後に、二重ビーズ複合体194を溶液中の未結合種から分離する。これは、図示のように捕捉ビーズ190の磁気特性を用いて、溶液に磁界を印加して二重ビーズ複合体194を単離することにより行われる。単離物はレポータービーズに結合していない捕捉ビーズを含むことに、再び留意されたい。

【0265】

浮遊粒子を含む上清を除去する精製プロセスは、洗浄緩衝液を試験管に添加すること、およびビーズ溶液を十分に混合することを含む。未結合レポータービーズ、浮遊タンパク質、および非特異的結合粒子のほとんどは、攪拌されて、上清から除去される。二重ビーズ複合体は、捕捉ビーズ、標的剤、およびレポータービーズのマトリックスを形成することができ、ここで、重なり合った二重ビーズ粒子の格子構造に捕獲された浮遊粒子の抽出の際に、洗浄プロセスがさらに役立ち得る。

20

【0266】

図68Aにおける最後のステップはステップVIである。このステップでは、図68AのステップVIに示すように、二重ビーズ複合体194を洗浄緩衝溶液で約3~5回洗浄してから、ピペット214を用いて尿素、酸（好ましくは強酸）、または塩基（好ましくは強塩基）を二重ビーズ溶液に添加することができる。二重ビーズ複合体は、これらの解離剤の作用により解離され、それにより、次に図68BのステップVIIに示すように、捕捉ビーズ190からレポータービーズ192を解放する。

30

【0267】

二重ビーズ構造の解離後、図68BのステップVIIに示すように、溶液中の、未結合となったレポータービーズ192から捕捉ビーズ190を分離する。溶液に磁界を印加して、磁気捕捉ビーズ190を捕捉することができる。磁界は、内蔵磁石218を有する磁気試験管ラック216に封入することができ、内蔵磁石218は、磁気ビーズを引き出して、懸濁液中のいかなる未結合レポータービーズも除去するように、永久磁石であっても電磁石であってもよい。ステップVIIの間に分離されなかった非解離二重ビーズ複合体も溶液から除去されることに留意されたい。この方法のステップVIIの間、解放されたレポータービーズ192を含む上清を、ピペット214を用いて回収する。次に、検定混合物を、ディスクにロードして、ステップIXに示すように、光バイオディスク読み取り装置を用いて分析することができる。レポータービーズの分析には、透過型バイオディスク180を用いてもよく、または反射型バイオディスク144を用いてもよい。反射型および透過型光バイオディスクに関する詳細は、それぞれ図3A~図3Cおよび図4A~図4Cを参照して詳細に説明されている。光バイオディスクまたは医療CDを分析するために用いることができる光バイオディスク読み取り装置および他の代替のディスク読み取り装置は、図1および図2に関連して詳細に上述されている。ステップVIIで単離されたレポータービーズもまた、蛍光測定器または蛍光光ディスク読み取り装置を含む任意の同様の蛍光型分析装置を用いて定量することができる。

40

【0268】

上記の別の方法のいずれについても、図68Aおよび図68Bに示す方法における磁気

50

的な除去または分離ステップは、別法として図33A～図33D、図34A～図34C、図35、図36A～図36C、および図37に示されるディスク、流体回路、および装置を用いてオンディスクで行ってもよい。

【0269】

検定感度を高め、かつビーズの非特異的結合を低減するための解離剤の使用

次に図69に進み、レポータービーズの非存在下でのDNAse I消化効率を説明する棒グラフ表示が示されている。この実験では、図8Aで上述したように、ビオチン化標的DNA202を磁気捕捉ビーズ190の輸送プローブ198とハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン化アルカリホスファターゼ(S-AP)を検定混合物に添加し、標的DNAのビオチンと結合させた。一連の洗浄ステップ後、S-AP色原体基質を検定溶液のアリコートに添加し、結合した標的の量を分光光度計を用いて比色定量した。同時に、上記で取ったものと等量のアリコートを、DNAse Iを含む緩衝液中で培養した。培養後、検定混合物を洗浄し、S-APを溶液に添加し、DNAアーゼにより消化されなかった標的残渣に結合させた。観察により、対照とDNAse I消化処理群とのシグナルの差に顕著に現れる高いDNAse I消化活性が示された。ここで説明したものと同様の実験に関する詳細は、以下の実施例15で詳細に説明する。

10

【0270】

次に図70を参照して、図69で説明したものと同様の実験から収集したデータの棒グラフ図が示されている。この実験では、図69で説明したような磁気捕捉ビーズ単独の代わりに二重ビーズ複合体を用いた。この場合、標的202を、図10Aで上述したように、捕捉ビーズ190とレポータービーズ192との間に位置付ける。図65AのステップI～ステップVで説明した二重ビーズ複合体の形成後に、ステップIV(図65A)で回収した上清中のレポータービーズの量と、ステップV(図65A)に示す検定混合物中の捕捉ビーズに結合したレポータービーズの量とを、蛍光測定器を用いて定量した。次に、DNAse Iを検定混合物に添加し、図65BのステップVIに提示したように、二重ビーズ複合体のプローブに結合した標的を切断させ、それにより磁気捕捉ビーズからレポータービーズを解放した。次のステップは、図65BのステップVIに示すような、捕捉ビーズの単離および新たに解放された蛍光レポータービーズを含む上清の回収を伴う。上清中のレポータービーズからのシグナルを、蛍光測定器を用いて定量した。非解離レポータービーズも、蛍光測定器を用いて定量した。この実験から収集したデータは、DNAse I酵素消化が、二重ビーズ複合体では図69で説明した単一ビーズ設定でのDNAse I酵素消化ほど効率的ではなかったことを示す。DNAse I消化活性の低下は、標的へのDNAアーゼのアクセスを妨げる二重ビーズ複合体のビーズからの立体障害による可能性がある。二重ビーズ検定で実施される制限酵素消化の使用に関する実験の詳細は、以下の実施例15でさらに詳細に説明する。この検定で回収された蛍光レポータービーズは、蛍光型光ディスク読み取り装置または上述の任意の同様のデバイスと共に光バイオディスクまたは医療CDを用いて定量してもよい。

20

30

【0271】

いかなる検定の感度も、雑音に対する信号の比に依存する。二重ビーズ検定の感度は、捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合の最小化に依拠する。標的の非存在下での二重ビーズ間の非特異的相互作用は安定しているため、ストリンジェントな条件下での洗浄によってなくすことはできない。しかしながら、非特異的二重ビーズの寄与は、標的媒介二重ビーズのみの検出および定量によりなくすることができる。図71に示すように、二重ビーズ複合体は、酵素消化(DNAse、制限酵素)により、または化学的および物理的処理(熱処理、尿素処理、塩基処理、または酸処理)により分離することができる。さらに、過剰な未結合捕捉ビーズの存在下でのレポータービーズの定量は、検出検定の感度を低下させる可能性がある。したがって、捕捉ビーズからレポータービーズを分離することにより、バイオディスク読み取り装置によるレポータービーズの定量が容易になり、したがって検定の感度が高まる。

40

【0272】

50

次に図71をより詳細に参照して、酵素消化および物理的または化学的処理による、二重ビーズ複合体の捕捉ビーズからのレポータービーズの分離の概略表現がある。図71は、図65A、図65B、図67A、および図67Bに関連して説明した種々の解離剤を用いた二重ビーズ形成および解離の概要を示す。解放されたレポータービーズを回収した後、蛍光測定器、フルオリメージャ（fluorimager：蛍光イメージアナライザ）、蛍光型光ディスク読み取りシステム、CD-R型光ディスクシステム、あるいは微小球または蛍光を検出することができる任意のデバイスを含む、いくつかの方法のうちの任意の1つによって、ビーズを定量する。目下好ましい検出の方法は、図1、図2、図3A、図3B、図3C、図4A、図4B、および図4Cに関連して詳細に説明したような光バイオディスクまたは医療CDシステムの使用である。

10

【0273】

次に図72を参照して、図70で説明したものと同様の種々の標的濃度での高pH洗浄を用いた、捕捉ビーズからのレポータービーズの分離を示す棒グラフ表現がある。二重ビーズ複合体は、図67AのステップI～ステップVIで説明したように形成される。二重ビーズが形成されて単離されると、ステップVI（図67A）に示すように、強酸を二重ビーズ溶液に添加する。短時間の培養後、標的とプローブとの水素結合を妨害する塩基の作用により二重ビーズが解離し、それにより、ステップVII（図67B）に示すように、二重ビーズ複合体から蛍光レポータービーズおよび磁気捕捉ビーズが解放される。次のステップは、図67BのステップVIIIで説明したような捕捉ビーズの単離である。単離された捕捉ビーズは、非解離二重ビーズ複合体も含む。この単離物を、この特定の実施の形態において蛍光測定器により定量した。図72に示すデータは、 $1 \times 10^{-16} \text{ M}$ ~ $1 \times 10^{-14} \text{ M}$ の標的濃度で二重ビーズ複合体の解離が100%であることを示す。塩基を解離剤として用いて行われる実験の詳細は、以下の実施例16で詳細に説明する。レポータービーズは、フルオリメージャ、蛍光型光ディスク読み取りシステム、CD-R型光ディスクシステム、あるいは微小球または蛍光を検出することができる任意のデバイスを含む、いくつかの方法のうちの任意の1つによって定量することもできる。好ましい検出の方法は、図1、図2、図3A、図3B、図3C、図4A、図4B、および図4Cに関連して詳細に説明したような光バイオディスクまたは医療CDシステムの使用である。

20

【0274】

次に図73Aを参照して、尿素を変性剤または解離剤として用いた実験から収集されたデータの棒グラフ図がある。この実験の詳細は、図69に関連して説明したものと同様である。図69におけるように、図8で上述したように、ピオチン化標的DNA202を磁気捕捉ビーズ190の輸送プローブ198とハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン化アルカリホスファターゼ（S-AP）を検定混合物に添加し、標的DNA202のピオチンと結合させた。一連の洗浄ステップ後、S-AP色原体基質を検定溶液のアリコートに添加し、結合した標的の量を分光光度計を用いて比色定量した。同時に、上記で取ったものと等量のアリコートを、7M尿素を含む緩衝液中で培養した。培養後、検定混合物を洗浄し、S-APを溶液に添加し、7M尿素により変性されなかった、捕捉ビーズの輸送プローブに結合したままの標的残渣に結合させた。この結果は、対照と7M尿素処理群とのシグナルの差により明らかであるように、比較的効率のよい変性活性を示した。ここで説明したものと同様の実験に関する詳細は、以下の実施例16で詳細に説明する。

30

40

【0275】

次に図73Bを参照して、二重ビーズ検定において尿素を解離剤として用いた実験から収集したデータを示す棒グラフがある。この実験の詳細は、図70に関連して説明したものと同様である。図70におけるように、図73Aで説明したような磁気捕捉ビーズ単独の代わりに二重ビーズ複合体を用いた。この場合、標的を、図10Aで上述したように、捕捉ビーズとレポータービーズとの間に位置付ける。図67AのステップI～ステップVIで説明した二重ビーズ複合体の形成後に、ステップV（図67A）で回収した上清中のレポータービーズ192の量と、ステップVI（図67A）に示す検定混合物中の捕捉

50

ビーズ190に結合したレポータービーズ192の量とを、蛍光測定器を用いて定量した。次に、所定量の尿素を検添加し、検定溶液の最終尿素濃度を7Mにした。これにより、図67BのステップVIIに提示したように、二重ビーズ複合体のプロープに結合した標的の変性が生じ、それにより磁気捕捉ビーズからレポータービーズが解放された。次のステップは、図67BのステップVIIIに示すような、捕捉ビーズ190の単離および新たに解放された蛍光レポータービーズ192を含む上清の回収を伴う。上清中のレポータービーズからのシグナルを、蛍光測定器を用いて定量した。非解離レポータービーズも、蛍光測定器を用いて定量した。この実験から収集したデータは、二重ビーズ複合体検定において、図70で説明したようにDNAseIを解離剤として使用した場合よりも7M尿素変性の方が効率的であったことを示す。解離の増加は、二重ビーズ複合体のビーズからの立体障害がないためである可能性があり、これは尿素がDNAseよりも著しく小さい分子であるからである。二重ビーズ検定で実施される7M尿素変性の使用に関する実験の詳細は、以下の実施例16でさらに詳細に説明する。この検定で回収された蛍光レポータービーズは、蛍光型光ディスク読み取り装置または上述の任意の同様のデバイスと共に光バイオディスクまたは医療CDを用いて定量してもよい。

10

【0276】

DNA標的検出の向上のためのDNA変性剤の使用

医学的標的を検出するために二重ビーズ検定をさらに変更することが、本発明の主な態様である。実際のサンプルでは、DNA標的は二本鎖であり、非常に長い。二重ビーズ検定、および任意の他のDNA診断検定の、全ゲノム内の臨床上的対象となる配列を検出する能力は、第1に、対象となる配列に対するプロープの特異性に、第2に、DNA標的を変性された一本鎖の形態に保って捕捉するための非常に強い界面活性剤の使用に依存する。

20

【0277】

臨床上的対象となる配列を検出する際の二重ビーズ検定の成功は、プロープの設計に主に依存する。ヒトゲノムの複雑性および退化(degeneracy)を考慮すれば、臨床上的対象となる配列を検出するように設計されたプロープは、診断される配列に特有のものであり、かつ配列の変異体を認識するのに十分なほど一般的なものでなければならない。コンピュータソフトウェアを用いたプロープの設計により、配列をBlasT検索などのデータベースにおける既存の配列と比較することができる。対象となる配列に特異的なプロープが設計されると、二重ビーズ検定に導入される主な変更は、ハイブリダイゼーション緩衝液中の変性剤を用いて、標的DNAの相補配列の再アニーリングを防止することを含む。これにより、標的とプロープとのハイブリダイゼーションが可能になる。

30

【0278】

本発明は、分析ディスク、改良型光ディスク、医療CD、またはバイオディスクに対して上記の方法を実施することにも向けられ得る。図1および図2を参照して上述したものなどのバイオディスクまたは医療CDドライブアセンブリを用いて、ディスクを回転させ、ディスクに記憶されたいかなる符号化情報をも読み取って処理し、バイオディスクまたは医療CDのフロー流路においてDNAサンプルを分析することができる。したがって、バイオディスクドライブには、バイオディスクを回転させるモータと、ディスクの回転速度を制御するコントローラと、ディスクからの帰還信号を処理するプロセッサと、処理された信号を分析する分析装置とが設けられる。モータの回転速度は、ディスクの所望の回転を得るために制御される。バイオディスクドライブアセンブリを利用して、フロー流路および標的領域にある医療試験物質にドライブの読み取りビームによって呼びかけて、分析装置によって医学的に診断する前、その間、またはその後、バイオディスクに情報を書き込むこともできる。本発明のこの実施の形態では、分析装置は、専用の診断ソフトウェアを含むことにより、医療エキスパートシステムを提供することが有利であり得る。バイオディスクも同様に、ディスクの回転速度を制御し、行うべきDNA試験のタイプに特定の処理情報を提供し、かつバイオドライブに関連するモニタに結果を表示するための、対応する医療エキスパートシステムソフトウェアおよび符号化情報を含むことができる。

40

50

【0279】

この発明の好ましい実施の形態では、グアニジンイソチオシアネートを典型的な変性剤として用いる。1.5 M グアニジンイソチオシアネートを変性剤として用いた実験から収集したデータを図74に示す。この実験で従う実験手順は、以下の実施例17で詳細に説明する。図74はさらに、適切な量の変性剤をハイブリダイゼーション実験で用いた場合に検定感度が著しく高まることを示す。この特定の検定では、図8Aにおいて上述したように磁気捕捉ビーズ190上で、ビオチン化標的DNA202を、1.5 M グアニジンイソチオシアネートの存在下で輸送プローブ198にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン化アルカリホスファターゼ(S-AP)を検定混合物に添加し、標的DNA202のビオチンと結合させた。一連の洗浄ステップ後、S-AP色原体基質を検定溶液に添加し、発色に十分な時間を与えて、結合した標的の量を分光光度計を用いて比色定量した。

10

【0280】

標的とプローブとのハイブリダイゼーションを可能にしつつ、標的DNAの相補配列の再アニーリングを防止するには、適切な量のグアニジンイソチオシアネートが必要である。しかしながら、高濃度では、グアニジンイソチオシアネートはいかなるハイブリダイゼーションも防止する。二重ビーズ検定で用いるためのグアニジンイソチオシアネートの適切な緩衝液濃度を決定するために、グアニジンイソチオシアネートの滴定を行った。この滴定実験からのデータを図75に示す。図75に示すように、グアニジンイソチオシアネートの最適なハイブリダイゼーション緩衝液濃度は、1.5 Mであり、これは、1.5 M グアニジンイソチオシアネートを添加した場合に、0.0 Mの標的濃度と 1.0×10^{-10} Mの標的濃度とのシグナル差が最も大きいことが示されたからである。

20

【0281】

MOバイオディスクシステム(MOBDS)を用いた特異的細胞集団の選択、検出、および操作のためのMO生体磁気検定(MOBMA)

本発明のさらなる態様は、磁気粒子またはビーズを用いて細胞集団および細胞集団の溶液中の特定の標的細胞を検出する、上述のMOBMAと呼ばれる磁気的方法に関する。本発明のMOBMA態様の一実施の形態では、磁気ビーズは、1つまたは複数の結合剤または捕捉プローブで被覆され、それにより生体磁気粒子またはビーズが形成される。磁気粒子を含む固体支持体への結合剤の結合に関するさらなる詳細は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の、2002年7月12日に出願された「Multi-Purpose Optical Analysis Disc For Conducting Assays and Various Reporting Agents for use Therewith」と題する米国特許出願第10/194,396号に開示されており、当該出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。結合剤は、例えば、細胞膜の特定の抗原決定基を対象とする標的細胞関連抗体のFc部分を認識する抗体を含んでもよい。標的細胞の捕捉、検出、操作、および定量は、本発明のMOBDSを用いて実行される。捕捉された細胞は、細胞試験を容易にするために、磁気的に操作して、MOバイオディスクのある分析、分離、または試験チャンバから別のチャンバに移動させることもできる。例えば、捕捉された標的癌細胞を等しい細胞数で磁気的に分取して癌治療剤を含む異なる分析チャンバに入れ、細胞レベルに対するこれら薬剤の影響を判定することができる。この方法の用途の具体的な例は以下で説明する。

30

40

【0282】

マイルドな界面活性剤および/または第2の組の抗体または抗体断片(蛍光剤、金属コロイド(metallo colloids)、生体磁気粒子、放射性同位元素、ビオチン複合体または可視化を可能にする特定の酵素であらかじめ標識されているかまたはされていない)を用いた細胞懸濁液の培養により、上記方法の特異性および感度を劇的に高めることができる。本方法はさらに、MOバイオディスクの磁気捕捉領域で磁気的に捕捉された標的細胞を、動的に単離、精製、操作、および定量するために用いてもよい。特殊なまたは混合された細胞集団および混合細胞集団を含む溶液中の特定の標的細胞を検出する方法に関するさらなる詳細は、例えば、Fodstad and Kvalheimに付与された米国特許第6,184,043

50

号に開示されており、当該特許は、その内容がすべて参照により本明細書に援用される。

【0283】

結合剤は、1つまたは複数の化学的/生化学的エンティティを親和性によって結合することができる。親和性結合では、例えば連結されるべき物質に結び付いている一对の結合相手が、接触させられると互いに結合する。細胞表面の分子は、このような連結の結合相手の一方を表し得る。例えば、細胞上の抗原-抗体相互作用、酵素-受容体相互作用、リガンド-受容体相互作用、ビオチン-アビジン結合、ハプテン/抗ハプテン結合対、およびオリゴヌクレオチド相補配列結合などのいくつかのそのような結合相手システムが既知であり、その中でも抗原-抗体結合が最も頻繁に用いられる。

【0284】

結合相手の一方が磁気粒子またはビーズなどの不溶性支持体に結び付けられる方法、および混合細胞集団中の標的細胞の単離がネガティブセレクションによる単離(negative isolation)またはポジティブセレクションによる単離(positive isolation)として行われる方法が既知である。ネガティブセレクションによる単離の手順では、不要な細胞に特異的な抗体で被覆された磁気ビーズ(生体磁気ビーズまたは粒子)と共に細胞を培養することにより、不要な細胞を細胞調製物から除去することができる。培養後、得られる細胞ビーズ複合体を、磁氣的に除去すなわち単離し、必要な標的細胞を残すことができる。一方、ポジティブセレクションによる単離の手順では、対象となる細胞に対する抗体で被覆された磁気ビーズ(生体磁気ビーズ)を用いて、必要な標的細胞を混合細胞集団から除去する。

【0285】

本発明のMOBMA態様の目的は、診断のために特定の標的細胞を検出および研究することである。試験サンプルは、血液、骨髄、腹水、および種々の組織または腫瘍からの細胞を含み得る。本発明は、MOBDSを用いて多数の細胞を容易にスクリーニングでき、手順が迅速かつ簡単である、さまざまな細胞型を検出する高感度の検出システムおよび方法を提示する。さらに、本MOBDSは、生化学的、生物学的、および免疫学的検査のための、およびヌクレオチドまたはタンパク質レベルでの特定の遺伝子の研究のための、細胞の単離に用いることができる。さらに、単離または捕捉された細胞-ビーズ複合体は、細胞-ビーズ複合体の切断を必要とせず、関連するMOドライブおよび*in vitro*の細胞傷害性研究のために培養または使用される細胞を用いて、対象となる細胞が配置されるMOバイオディスクの磁気捕捉領域内の磁界を遮断または除去することにより、解放することができる。

【0286】

本発明のMOBMA態様の別の実施の形態は、混合細胞集団または生理溶液中の健常または病原性の標的細胞の免疫磁氣的なポジティブセレクションによる単離を含む。本発明のこの実施の形態では、特定の標的細胞と磁気ビーズまたは粒子などの不溶性支持体との間に結合が生じる。粒子は、標的細胞の膜の特定の抗原決定基に対する抗細胞抗体で被覆されるか、または粒子は、標的細胞の膜の抗原決定基に対する特異的な抗細胞抗体(一次抗体)のFc部分に結合することができるポリクローナル抗マウスまたは抗ヒト抗体で被覆される。粒子の被覆にポリクローナル抗マウス/抗ヒト抗体を用いる代わりに、モノクローナルラット抗マウス/抗ヒト抗体を用いてもよい。モノクローナル抗体の使用により、溶液中の非標的細胞との起こり得る交差反応の危険性を低減することができる。さらに、マイルドな界面活性剤および/または第2の組の抗体または抗体断片(蛍光剤、磁気粒子、金属コロイド、生体磁気粒子、放射性同位元素、ビオチン複合体または可視化を可能にする特定の酵素であらかじめ標識されている、混合細胞捕捉物内の捕捉細胞のうちの1つまたは複数の細胞型の特定の決定基に結合する)を用いた細胞懸濁液の培養により、この実施の形態の方法の特異性を劇的に高めることができる。

【0287】

上述の免疫磁氣的なポジティブセレクションによる単離の実施の形態の詳細な用途は、検出および単離される標的細胞として癌細胞を用いて以下で提示される。しかしながら、

10

20

30

40

50

この実施の形態は癌細胞に限定されず、本開示は、方法をこの特定の使用分野に限定するものではない。それは、この方法が、例えば免疫系の細胞（ナチュラルキラー細胞、単球、T細胞、B細胞、およびCD4+およびCD8+を含むその亜型など）、細菌細胞（Chandler, et al., *Int. J. of Food Micro.*, 70:143-154, 2001, and Yu, *J. of Immuno. Methods.*, 218: 108, 1998）、およびペルオキシソーム（Luers, et al., *Electrophoresis*, 19: 1205-1210, 1998）を対象とした検定を含む細胞学的応用範囲で用いるのに適しているからである。

【0288】

癌患者の管理において、疾患が局所的か他の組織への転移が起きているかに関する疾患のステージングは、患者個人の治療レジメンの選択に最も重要である。悪性細胞は、周囲組織への直接的な侵襲により、またはリンパ管から、あるいは血液中の腫瘍細胞が骨髄、中枢神経系、および髄液を含む遠隔の器官に分布することにより広がる。転移性腫瘍細胞の検出は、最近まで、生検した腫瘍試料、骨髄および抹消血の塗布標本、および種々の体液の細胞遠心分離後に調製したスライドに対する光および電子顕微鏡法を用いる形態学的方法に依存してきた。抗原を認識するモノクローナル抗体の出現は、種々の型の悪性細胞の表面に主に発現するため、転移性細胞の同定は、免疫細胞化学および免疫蛍光にもかなり関係している。したがって、生検した腫瘍または細胞遠心分離から調製されたスライドは、モノクローナル抗体で処理され、腫瘍細胞へのこれらの結合が比色法または蛍光により可視化される。後者の方法は、蛍光顕微鏡の使用、別法として細胞懸濁液の調製およびフローサイトメータの使用を必要とする。

【0289】

上記の方法は、感度および/または特異性が制限され、通常は面倒で時間がかかり、また高度の専門知識を必要とする。フローサイトメトリ検査も高価な機器を必要とする。

【0290】

血液および骨髄中の腫瘍細胞の検出の形態学的方法は、免疫細胞化学および免疫蛍光を伴う方法よりもはるかに感度が低い（Beiske, et al., *Am. J. Pathology* 141 (3), September 1992）。しかしながら、後者の方法はまた、腫瘍細胞が試験サンプル中の細胞の総数の1%未満しかない場合には不適切である。フローサイトメトリは、顕微鏡の使用を伴う方法よりも高い感度を提供することができるが、多数の細胞が利用可能であることが必要であり、またいくつかの技術的困難も伴う。さらに、細胞の凝集がフローサイトメトリに関する問題を引き起こす可能性があり、この方法では、標識された腫瘍細胞と非特異的に蛍光を発している正常細胞とを区別できる可能性がない。

【0291】

本発明は、多数の細胞を即座にスクリーニングすることができ、細胞-ビーズ複合体をMOBDSにより容易に検出および定量することができるため、例えば転移性腫瘍細胞の非常に高感度な検出を可能にする。本発明の標的細胞の検出に用いられるモノクローナル抗体は、これらの抗体が、例えば腫瘍細胞に対して十分な特異性を有して結合し、混合細胞懸濁液または試験サンプル中に存在する非標的細胞には結合しないように選択される。試験サンプルは、ビーズが結び付いている全細胞が標的細胞を表すような、例えば、血液、骨髄、および腫瘍が発現している他の溶液を含むことができる。次に、標的細胞を、光磁気(MO)バイオディスクの特定の磁化区域すなわち磁区で捕捉し、関連する光磁気ドライブおよびソフトウェアを用いて定量する。さらに、手順は迅速かつ簡単であり、フローサイトメータなどの高価で複雑な機器を必要とせず、調査者により行われることができる。MOBDSに関するさらなる詳細は、例えば、本発明の譲受人に譲渡された同時係属中の、2002年3月14日出願された「Dual Bead Assays Using Cleavable Space rs and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus」と題する米国特許出願第10/099,256号、および2002年3月14日出願された「Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets」と題する上記で参照され

10

20

30

40

50

た米国特許出願第 10 / 099 , 266 号に開示されている。光磁気記録、光磁気ディスクの磁性領域の正確な作成、および光磁気検出法に関する詳細は、図 37 に関連して上述されており、また例えば、Tsunashima, Magneto Optical Recording, J. Phys. D: Appl. Phys. 34, R87-R102, 2001、および Coombs, Differential Phase Contrast and Magneto-optic Edge Detection, Applied Optics, 34(29), 6723-6729, 1995 に記載されており、これら双方は、その全体が繰り返されるのと同様にその内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0292】

上述のように、本発明の M O B M A 態様の免疫磁気的な実施の形態は、腫瘍細胞に存在する抗原を特異的に認識するが正常細胞の抗原は認識しない、または他の目的で正常細胞の指定された垂集団の抗原を特異的に認識する、例えばマウスまたはヒト由来のモノクローナル抗体を含む捕捉抗体を、磁気粒子またはビーズに結合させて、それにより生体磁気粒子を形成することに関する。捕捉抗体は、標的細胞の抗原、または腫瘍細胞に結合する一次抗体または細胞結合抗体の F c 部分に直接結合することができる。細胞結合抗体は、I g G 型または I g M 型、あるいは I g G または I g M 抗体の断片であってよい。捕捉または一次抗体は、例えば、腫瘍関連糖タンパク質 72 (T A G 72) 抗原 (C C 49 抗体) (Barjer et al., Gynec. Onco. 82: 57-63, 2001)、C D 56 / N C A M 抗原 (M O C - 1 抗体) (Speirs et al., J. Histochem. Cytochem., 41 (9):1303-10, 1993)、上皮細胞表面抗原 (B E R - E P 4 抗体) (Borgen et al., J. Hematother., 6(2):103-114, 1997, and Ziggeuner et al. J. Urol., 164: 1834-1837, 2000)、クラスタ 2 上皮抗原 (M O C - 3 1 抗体) (Rye et al., Am J. Pathol., 150(1): 99-106, 1997, and Ree et al., Int. J. Cancer, 97: 28-33, 2002)、クラスタ 2 (M W 40 k D) 抗原 (N r L u 10 抗体) (Myklebust et al., Br. J. Cancer Suppl. 14: 49-53, 1991)、H M W メラノーマ関連抗原 (225 . 28 S 抗体) (Dell'Erba et al., Anticancer Res., 21(2A):925-930, 2001)、80 k D、肉腫関連抗原 (T P - 1 および T P - 3 抗体) (Bruland, et al., Cancer Res., 48:5302-5309, 1988)、サイトケラチン抗原 (全抗 C K 抗体 (pan-anti-CK antibody)) (Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577-582, 2001)、ムチン抗原 T A G 12 (2 E 1 1) (Diel et al., J. Natl. Cancer Inst., 88(22): 1652-8, 1996)、および E G F 受容体抗原 (425 . 3 抗体) (Merck) を含む抗原決定基の群に対する抗体であり得る。425 . 3 抗体は、正常細胞および腫瘍細胞の双方の抗原に対するものである。捕捉抗体はさらに、正常細胞および悪性細胞の膜に発現する、および悪性細胞のみに発現する発癌産物、例えば N e u / e r b B 2 / H E R 2 に加えて、正常細胞および異常細胞の双方の成長因子受容体、例えば E G F 受容体、P D G F (A および B) 受容体、インスリン受容体、インスリン様受容体、トランスフェリン受容体、N G F および F G F 受容体、インテグリンの群、および他の接着膜分子および M D R タンパク質、ならびに正常細胞の垂集団に存在する抗原に対するものであってもよい。悪性細胞に関しては、これらは、乳癌細胞、卵巣癌細胞、および肺癌細胞、消化管および細網内皮系のメラノーマ癌細胞、肉腫癌細胞、神経膠芽細胞腫癌細胞であってよく、または標的細胞は、心臓血管障害、神経障害、肺障害、自己免疫障害、消化管障害、尿生殖器障害、細網内皮障害、および他の障害などの非腫瘍性疾患に関連し得る。さらに、悪性細胞集団は、骨髄、抹消血にあってもよく、胸水および腹水、ならびに他の体液区画 (尿、髄液、精液、リンパ液など) からのものであってもよく、正常組織および器官の固形腫瘍、例えば、肝臓、リンパ節、脾臓、肺、膵臓、骨組織、中枢神経系、前立腺、皮膚および粘膜からのものであってもよい。改良された本発明に関連して用いることができる抗原決定基および対応する抗体または抗体断片の部分的なリストは、以下の表 1 に提示する。

【0293】

標的細胞の密度が低い場合、例えば、悪性細胞すなわち標的細胞が細胞の総数のうちの非常に低い割合を占める (1 % 以下) 場合、M O B D S での分析前に、磁石を用いて、標的細胞を非標的細胞から確実に分離して予備濃縮することができる。次に、単離した標的細胞を、M O B D S を用いて計数することができ、最初の細胞懸濁液の細胞の総数に対す

る標的細胞の割合を計算することができる。

【0294】

MOBDSでの薬物感受性検定

上述のように、MOBDSを用いて、*in vitro*で標的細胞の単離、操作、および研究を行うことができる。標的細胞に対して行うことができる1つの検定は、薬物への曝露に続く薬物誘導性細胞死を測定するための細胞傷害性、化学的感受性、薬物感受性、または薬物耐性検定である。この方法では、標的細胞は、例えば、悪性腫瘍生検材料、細菌、植物、ウイルス、および単細胞生物から回収されてもよい。標的細胞は、上述のようにMOバイオディスクの1つまたは複数のチャンバにおいて免疫磁氣的に単離され、それにより単離物を構成する。標的細胞が単離されると、単離物からの所定数の細胞を、試験チャンバを含むMOバイオディスク内の種々のチャンバに向けて磁氣的に移動または操作する。これらのチャンバは、限定はされないが、化学療法剤、抗生物質、または抗ウイルス剤を個別にまたは組み合わせて含む薬物を、種々の所定の投与量で含み得る。化学療法剤は、例えば、乳癌、肺癌、脳腫瘍、肝臓癌、および卵巣癌の制癌剤を含むことができ、これらとしては、シスプラチン、トポテカン、タキソール、ゲムシタピン(1)、マイトマイシン-C、ナベルピン、ナイトロジェンマスタード、5-フルオロウラシル、ドキシルピシン、エトポシド、トリメトレキセート、および限定はされないが、シスプラチンおよびトポテカン、シスプラチンおよびタキソール、シスプラチンおよびゲムシタピン(1)、シスプラチンおよびナイトロジェンマスタード、ならびにシスプラチンおよび5-フルオロウラシルを含むそれらの種々の組み合わせなどが挙げられる。次に、単離細胞を所定の条件で、種々の濃度および薬物の組み合わせで培養する。培養後、生細胞の数を、MOBDSを用いて計数し、全薬物からのIC50(薬物または薬物の組み合わせへの曝露の結果として細胞の50%が死滅する薬物濃度)を計算し、患者にとって最良の治療レジメンを決定する。*in vitro*で活性であると判明した薬物は、*in vitro*で不活性であると判明した薬物に比して約10倍も臨床的に効果的である可能性が高いため、この試験は非常に重要である。*in vivo*の薬物感受性検定は、当該技術分野において既知である。(Bosanquet et al., *Leukemia* 16(6): 1035-44, 2002; Nagourney et al., *J. Clin. Onco.* 18:11, 2245-49, 2000; Bosanquet et al., *Br. J. Haem.*, 106:71-77, 1999; and Cortazar et al., *J. Clin. Onco.*, 17:5, 1625-31, 1999)。従来技術の検定は、ほとんどがマイクロタイプレートを用いて行われており、細胞の計数および分析は、生細胞または死細胞の選択染色によって、顕微鏡を用いて、またはマイクロタイプレート読み取り装置を用いて比色法により行われて、生細胞の数が判定される。本発明は、顕微鏡またはマイクロタイプレート読み取り装置などの別個の分析デバイスを必要とせず、細胞の選択、操作、培養、分析、およびIC50の判定がMOBDSを用いて行われるプロセスを自動化する。自動プロセスは、これらの薬物感受性検定の効率および精度を高める。

【0295】

サンプル調製

上述した本発明の免疫磁氣的な実施の形態を行うステップは、検査される組織のタイプに応じて異なる。例えば、

a) 固形組織または腫瘍針生検材料からの細胞を、機械的に、またはマイルドな酵素処理により分離して単細胞の懸濁液を生成し、これに特異的な一次抗体または抗体断片を、直接添加するか、またはウシ胎児血清、ウシ血清、ウマ血清、ブタ血清、ヤギ血清、またはヒト血清などを含むかまたは含まないリン酸緩衝生理食塩水または培養培地で細胞懸濁液を洗浄した後に添加する。

b) 胸水または腹水、髄液、尿、リンパ液、または種々の形態の関節炎に罹患している患者の関節の浸出液などの体液中の細胞、特異的な捕捉抗体または抗体断片を、サンプルに直接添加するか、または洗浄したかまたはせずに遠心分離の後に添加するか、サンプル中の細胞を遠心沈降させて懸濁液中に戻す前またはその後に添加する。

c) 血液または骨髓吸引液からの単核細胞を勾配遠心分離により単離し、洗浄および再

10

20

30

40

50

懸濁時またはその前に、捕捉抗体を単離した単核細胞に加える。

【 0 2 9 6 】

[表 1]

関連抗原および関連抗原結合抗体の例のリスト

抗原 接着分子	モノクローナル抗体	
フィブロネクチン受容体 (5 インテグリン)	P i e r c e 3 6 1 1 4、 B T C 2 1 / 2 2 C a l b i o c h e m 3 4 1 6 4 9 M - K i o l 2	10
インテグリン 3 1 ビトロネクチン受容体 (3 インテグリン)	T P 3 6 . 1、 B T C 4 1 / 4 2 C a l b i o c h e m 4 0 7 2 7 7 C a l b i o c h e m 4 0 7 2 7 8 C a l b i o c h e m 4 0 7 2 7 9 C a l b i o c h e m 4 0 7 2 8 0 C a l b i o c h e m 4 0 7 2 8 1 C a l b i o c h e m 4 0 7 2 8 3 C a l b i o c h e m 4 0 7 2 8 4	20
G p I I I I I I C A M - 1 (C D 5 4)	8 2 2 1 C 5 7 - 6 0、 C L 2 0 3 . 4、 R R 1 / 1	20
V C A M - 1 E L A M - 1 E - セレクチン P - セレクチン / G M P - 1 4 0 L F A - 3 (C D 5 8) C D 4 4 C D 4 4 変異体 N - C A M (C D 5 6) H - C A M L - C A M N - C A M M A C A M - 1 E - カドヘリン P - カドヘリン テネイシン	G e n z y m e 2 1 3 7 - 0 1 G e n z y m e 2 1 3 8 - 0 1 B B A 8 B T C 7 1 / 7 2 T S 2 / 9 B M 1 4 4 1 2 7 2、 2 5 . 3 2 1 1 . 2 4、 1 1 . 3 1、 1 1 . 1 0 M O C - 1 B C A 9 B M 1 4 4 1 8 9 2 T U R A - 2 7 N R I - M 9 B T C 1 1 1、 H E C D - 1、 6 F 9 N C C - C A D - 2 9 9 B M 1 4 5 2 1 9 3、 C a l b i o c h e m 5 8 0 6 6 4	30
トロンボスポンジン受容体 (C D 3 6) V L A - 2	B M 1 4 4 1 2 6 4 A 1 . 4 3	40
<u>ラミニン受容体</u> H N K - 1 エピトープ	H N K - 1	
<u>炭水化物抗原</u> T - 抗原 T n - 抗原 シアリル T n 消化器癌関連抗原 (M W 2 0 0 k D) 癌腫関連抗原 L e ^y ジ - L e ^z 、トリ - L e ¹	H H 8、 H T - 8 T K H 6、 B a G s 2 T K H - 2 C A 1 9 - 9 C - 5 0 M L u C 1、 B R 9 6、 B R 6 4 B 3	50

ダイメリック L e ¹ エピトープ	N C C - S T - 4 2 1	
H - 2 型	B 1	
C A 1 5 - 3 エピトープ	C A 1 5 - 3	
C E A	I - 9、I - 1 4、I - 2 7、 I I - 1 0、I - 4 6、 C a l b i o c h e m 2 5 0 7 2 9	
G a l b 1 - 4 G l c N a c		
(n L 4 , 6 , 8)	1 B 2	
H - I I	B E 2	
A - 3 型	H H 8	10
ラクト - N - フコペンタノース I I I		
(C D 1 5)	P M - 8 1	
<u>糖脂質</u>		
G D ₃	M E 3 6 . 1、R 2 4	
G D ₂	M E 3 6 . 1、3 F 8、1 4 . 1 8	
G b ₃	3 8 - 1 3	
G M ₃	M 2 5 9 0	
G M ₂	M K I - 8、M K I - 1 6	
F u c G M ₁	1 D 7、F 1 2	
<u>成長因子受容体</u>		20
E G F 受容体	4 2 5 . 3、2 . E 9、2 2 5	
c - e r b B - 2 (H E R 2)	B M 1 3 7 8 9 8 8、8 0 0 E 6	
P D G F 受容体	G e n z y m e 1 2 6 4 - 0 0	
P D G F 受容体	S i g m a P 7 6 7 9	
トランスフェリン受容体	O K T 9、D 6 5 . 3 0	
N G F 受容体	B M 1 1 9 8 6 3 7	
I L - 2 受容体 (C D 2 5)	B M 1 2 9 5 8 0 2、 B M 1 3 6 1 9 3 7	
c - キット	B M 4 2 8 6 1 6、1 4 A 3、 I D 9 . 3 D 6	30
T N F 受容体	G E n z y m e 1 9 9 5 - 0 1、 P A L - M 1	
N G F 受容体		
<u>メラノーマ抗原</u>		
高分子量抗原 (H M W 2 5 0 . 0 0 0)	9 . 2 . 2 7、N r M L 5、 2 2 5 . 2 8、7 6 3 . 7 4、 T P 4 1 . 2、I N D 1	
M W 1 0 5 メラノーマ関連糖タンパク質	M E 2 0	
1 0 0 k D a 抗原 (メラノーマ / 癌腫)	3 7 6 . 9 6	
g p 1 1 3	M U C 1 8	40
p 9 5 - 1 0 0	P A L - M 2	
S p 7 5	1 5 . 7 5	
g r 1 0 0 - 1 0 7	N K I - b e r e b	
M A A	K 9 . 2	
M Q 1 2 5 k D (g p 1 2 5)	M a b 4 3 6	
<u>肉腫抗原</u>		
T P - 1 および T P - 3 エピトープ	T P - 1、T P - 3	
M W 2 0 0 k D	2 9 - 1 3、2 9 . 2	
M W 1 6 0 k D	3 5 - 1 6、3 0 - 4 0	
<u>癌腫マーカー</u>		50

M O C - 3 1 エピトープ			
(クラスタ 2 上皮抗原)		M O C - 3 1、 N r L u 1 0	
M U C - 1 抗原			
(D F 3 エピトープ (g p 2 9 0 k D) など)		M U C - 1、 D F 3、	
		B C P - 7 ~ - 1 0	
M U C - 2 および M U C 0 3		P M H 1	
L U B C R U - G 7 エピトープ			
(g p 2 3 0 k D)		L U B C R U - G 7	
前立腺特異的抗原		B M 1 2 7 6 9 7 2	
前立腺癌抗原		E 4 - S F	10
前立腺高分子抗原 M W > 4 0 0 k D		P D 4 1	
多形性上皮性ムチン		B M - 2、 B M - 7、 1 2 - H - 1 2	
前立腺特異的膜抗原 (C y t - 3 5 6)		7 E 1 1 - C 5	
ヒト乳脂グロブリン		I m m u n o t e c h H M F G - 1、	
		2 7 . 1	
4 2 k D 乳癌エピトープ		B / 9 1 8 9	
M W > 1 0 ⁶ ムチン		T A G - 7 2、 C C - 4 9、 C C - 8 3	
卵巣がん O C 1 2 5 エピトープ			
(M W 7 5 0 k D)		O C 1 2 5	
膵臓 H M W 糖タンパク質		D U - P A N - 2	20
結腸抗原 C o 1 7 - 1 A (M W 3 7 0 0 0)		1 7 - 1 A	
G 9 エピトープ (結腸癌)		G 9	
ヒト結腸スルホムチン		9 1 . 9 H	
M W 3 0 0 k D 膵臓抗原		M U S E 1 1	
G A 7 3 3 . 2		G A 7 3 3、 K S 1 . 4	
T A G 7 2		B 7 2 . 3、 C C 4 9、 C C 8 3	
未定義		O a t 1、 S M 1	
膵臓癌関連		M U S E 1 1	
全癌 (Pancarcinoma)		C C 4 9	
前立腺癌抗原		P D 4 1	30
M W 1 5 0 - 1 3 0 k D 肺腺癌		A F - 1 0	
g p 1 6 0 肺癌抗原			
(Cancer Res. 48, 2768, 1988)		抗 g p 1 6 0	
M W 9 2 k D 膀胱癌抗原		3 G 2 - C 6	
M W 6 0 0 k D 膀胱癌抗原		C 3	
膀胱癌抗原 (Cancer Res. 49, 6720, 1989)		A N 4 3、 B B 3 6 9	
C A R - 3 エピトープ M W > 4 0 0 k D		A R - 3	
M A M - 6 エピトープ (C 1 5 . 3)		1 1 5 D 8	
高分子卵巣癌抗原		O V X 1、 O V X 2	
ムチンエピトープ l a 3		l a 3	40
肝細胞癌抗原 M W 9 0 0 k D		K M - 2	
H e p e r n a l エピトープ (g p 4 3)			
肝細胞癌 a g		H e p e m a - 1	
O 結合ムチン含有			
N - グリコリルノイラミン酸		3 E 1 . 2	
M W 4 8 k D 結腸直腸癌抗原		D 6 1 2	
M W 7 1 k D 乳癌抗原		B C A 2 2 7	
1 6 . 8 8 エピトープ (結腸直腸癌抗原)		1 6 . 8 8	
C A K 1 (卵巣癌)		K 1	
結腸特異的抗原 p		M u - 1、 M u - 2	50

肺癌抗原 MW 350 - 420 kD	DF - L 1、DF - L 2	
gp 54 膀胱癌抗原	T 1 6	
gp 85 膀胱癌抗原	T 4 3	
gp 25 膀胱癌抗原	T 1 3 8	
<u>神経芽細胞腫抗原</u>		
神経芽細胞腫関連		
(UJ 13 A エピトープなど)	UJ 13 A	
<u>膠腫抗原</u>		
Me 1 - 14 エピトープ	Me 1 - 14	
<u>頭頸部癌抗原</u>		10
MW 18 - 22 kD 抗原	E 4 8	
<u>H L A 抗原</u>		
H L A クラス 1	TP 2 5 . 9 9	
H L A - A	VF 1 9 L L 6 7	
H L A - B	H 2 - 1 4 9 _ 1	
H L A - A 2	KS 1	
H L A - A B C	W 6 . 3 2	
H L A - D R、D Q、D P	Q 5 / 1 3、B 8 . 1 1 . 2	
2 - ミクログロブリン	N A M B -	
<u>アポトーシス受容体</u>		20
Apo - 1 エピトープ	Apo 1	
<u>その他</u>		
プラスミノゲンアクチベータ抗原および		
受容体	ウサギポリクローナル	
p - 糖タンパク質	C 2 1 9、MRK 1 6、JSB - 1、	
	2 6 5 / F 4	
カテプシン D	C I S - D i a g n o s t i c i	
	(Italy)	
胆管上皮抗原	HEA 1 2 5	
神経腺抗原 (CD 63)	ME 4 9 1、NKI - C 3、LS 6 2	30
CD 9	TAPA - 1、R 2、SM 2 3	
全ヒト細胞抗原	pan - H	

【0297】

本発明の M O B D S 態様の別の実施の形態では、標的細胞は、二次元または二重パラメータ免疫磁氣的細胞分離法により分離することができ、この方法は、例えば、Partington, et al., A Novel Method of Cell Separation Based on Dual Parameter Immunomagnetic Cell Selection, J. of Immuno. Mthds., 223: 195-205, 1999に記載されており、当該文献は、その内容がすべて参照により本明細書に援用される。この実施の形態では、生体磁気粒子を用いた標的細胞のタグ付けおよび分離を、MO バイオディスクの流体回路内で行うことができる。この手法は、市販の免疫磁気ビーズおよび/または粒子間のサイズの差と、種々の強度の磁界への吸引に関するそれらの異なる特性とを利用する。例えば、分離の第1のステップは、50 nmのビーズを利用した細胞のポジティブセレクションであり得る。次に、第1のステップで単離され、50 nmのビーズでロゼット化されたままの細胞を、前もってビーズを除去する必要なく、より大きいビーズ、例えば M 2 8 0 または M 4 5 0 のダイナビーズ (Dynabeads) を用いてさらにポジティブセレクションまたはネガティブセレクションに付すことができる。第2の分離ステップの間の磁界の強度は、MO ディスクの磁区に発生した磁力がより大きいダイナビーズのみを吸引するには十分であるが50 nmのビーズは吸引しない程度であるように変調される。したがって、この二重パラメータの実施の形態は、対象となる細胞を単離および精製するよりよい方法を提供する。

【0298】

本発明のMOBDS態様のさらに別の実施の形態では、標的細胞は、弾動移入 (ballistic transfer) により磁気粒子で標識またはタグ付けすることができる。弾動移入技術は、機械力により物質を細胞内に運ぶ微粒子を加速させるために冷ガス衝撃波を用いる。本発明のこの実施の形態は、感磁性にされたことにより強磁界でそれらを保持することで分離され得る標的細胞の分離を可能にする方法に関する。次に、タグ付けされた細胞を、MOBDSを用いて捕捉、分析、操作、および定量することができる。磁気粒子での細胞の弾動的タグ付けに関するさらなる詳細は、例えばWittigに付与された米国特許第6,348,338号に開示されており、当該特許は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

10

【0299】

本発明のさらなる実施の形態は、上述のように、MOBDSを用いて、免疫磁気的な細胞選択により細胞の分析、操作、および定量を行うこと、およびMOバイオディスクのトラック上の細胞の整列など、MOバイオディスク上に標的細胞を種々の所定の構成に整列させることである。この実施の形態では、細胞をMOバイオディスク上で磁気的に選別して整列させ、MOディスクドライブおよび関連のソフトウェアを用いて分析する。関連する免疫磁気的細胞分析の方法およびシステムは、例えば、Tibbe et al., Cytometry, 43:31-37, 2001、およびTibbe et al., Cytometry, 47:163-172, 2002に記載されており、これらはいずれも、その内容がすべて参照により本明細書に援用される。従来技術のこれらの方法は、蛍光検出を含む専用デバイスおよびシステムを必要とする。本発明は、標準的なMOディスクドライブを用いて上述の免疫磁気的な細胞の選択、操作、検出、定量、および分析を行うことができるという点で、これらの専用デバイスの必要を回避する。

20

【0300】

MOBDS生体磁気的検定の分子の応用

単離された標的細胞は、特定の生化学的および生物学的特徴の存在に関して特徴付けられ得る。特に重要なのは、分子生物学の研究のためのこのような細胞の使用である。従来技術の上記の方法とは対照的に、本方法は、磁気粒子-標的細胞結合の切断を行う必要なく、標的細胞の研究および成長を可能にする。いくつかの目的のために、血液、骨髄、および他の体液 (例えば、尿、髄液、精液、リンパ液) に存在する、またはそれ以外の正常組織および器官 (例えば、肝臓、リンパ節、脾臓、肺、膵臓、骨組織、中枢神経系、前立腺、皮膚および粘膜) からの腫瘍生検材料および腫瘍細胞との両方で、また細胞学的検定の他の区域で、DNA、mRNA、およびタンパク質レベルで、純粋な標的細胞集団における特定の遺伝子を検査することが重要である場合がある。

30

【0301】

従来技術の方法では、サザンブロット、ノーザンブロット、およびウェスタンブロットで得られたシグナルは、生検材料中の正常細胞および腫瘍細胞を表す。1つの細胞懸濁液を最初に腫瘍材料から調製し、次に本発明のMOBDSを用いて腫瘍細胞をポジティブセレクションにより免疫磁気的に検出および分離すると、この材料に対して行われたいかなる遺伝子研究も、標的細胞のみを表す。これは、例えば、骨髄、抹消血、胸水および腹水、ならびに他の体液 (例えば、尿、髄液、精液、およびリンパ液) を含む哺乳類組織に存在する悪性細胞にも関連する。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) およびマイクロアレイ法を伴う研究もまた、本発明の方法および装置を用いて得られる純粋な標的細胞集団に対して行った場合、特異性および信頼性の向上を得ることができる。

40

【0302】

MOバイオディスクシステム (MOBDS) での神経生物学的検定

本発明のMOBDS態様のさらに別の実施の形態では、MOバイオディスクにおいて、ニューロンを単離して刺激し、生物マトリックスまたは溶液中で成長および再生させることができる。生物マトリックスは、細胞の固体支持体を提供しつつ、細胞の生存を可能にするように必須栄養素および気体を通す、ゲルまたは任意の生体適合性材料から形成することができる。生物マトリックスは、マトリックス内での細胞およびその構成要素の成長

50

および移動（軸索突起および樹状突起の移動など）も可能にする。軸索突起および樹状突起、および細胞の成長の方向および速度は、MOドライブにより生成されるMOバイオディスクの磁界により制御することができる。この実施の形態では、神経突起（neurites）には、例えば、ニューロンおよびその軸索突起に吸収されるかまたは積極的に組み込まれる磁気ナノ粒子またはビーズが設けられ得る。次に、これらのニューロンのアレイは、MOバイオディスク上の生物マトリックス内の所定の場所に整列される。次に、整列したニューロンまたは神経突起に、所望の軸に沿って磁気粒子負荷（magnetic-particle-loaded）ニューロンおよびその軸索突起を移動させてアレイのニューロン間の1つまたは複数のギャップを埋めるように変位された磁界が印加される。MOディスクに発生した磁性領域は比較的小さく、厳密に制御できるため、本発明の磁気誘導性神経突起成長の実施の形態の使用により、従来技術の方法に比して神経突起成長のより厳密な制御が可能になる。in vitroでの磁気誘導性神経突起成長およびin vivoでの神経再生は、当該技術分野では既知である（Moorman et al., Brain Res. Bulletin, 35(5-6):419-422, 1994, Dubey et al., Exp. Neuro., 158:333-350, 1999, Macias et al., Bioelectromagnetics, 21:272-286, 2000, Shah et al., Bioelectromagnetics, 22:267-271, 2001、およびHalpernに付与された米国特許第6,132,360号（これらはすべて、その内容がすべて参照により本明細書に援用される））。本発明のこの実施の形態は、in vitroでの神経突起成長の厳密な磁氣的制御の研究のためのMOBDSの使用、およびin vitroでの神経回路網の作成を対象としている。

10

【0303】

20

次に図76を参照して、注入ポート152、混合チャンバ164、分離または分析チャンバ300、および試験チャンバ302を含む流体回路を有する光磁気バイオディスクの一部の平面図が示されている。光磁気バイオディスクは、図3A～図3C、図4A～図4C、図33A～図33C、図35、図36A～図36C、および図37に関連して上述したバイオディスクの1つまたは複数の構成要素を含み得る。

【0304】

次に図77A～図77Eを参照して、図76に示す流体回路での細胞の分離および試験の方法を示す平面図が示されている。本発明のこの特定の方法では、試験細胞306を、ピペット214を用いて注入ポート152を通して混合チャンバ164にロードする（図77A）。次に、生体磁気粒子308を、ピペット214を用いて混合チャンバ164にロードする。生体磁気粒子は、サンプル中の対象となる細胞の表面マーカーに特異的な結合剤で被覆される。結合剤は、例えば、表1に上記した抗体を含むことができる。次に、細胞306および生体磁気粒子308を、結合剤と細胞表面マーカーとの結合により、対象となる細胞に生体磁気粒子308を結合させるのに十分な時間の間培養する。培養後、対象となる細胞すなわち標的細胞はそれにより生体磁気粒子で標識され、標識細胞310となる。これにより、標識細胞310が磁気操作を受けやすくなる。磁区すなわち磁性領域246は、培養前または培養後に光磁気ドライブを用いて分離チャンバ300に形成することもできる。光磁気バイオディスクの磁区246の形成に関する詳細は、図37に関連して上述されている。培養が終了すると、光磁気ドライブを用いてディスクを所定の速度で所定の持続時間の間回転させ、非標識細胞306、生体磁気粒子308、および標識細胞310を含む懸濁液を、分離チャンバ300に移動させる（図77B）。懸濁液が分離チャンバ内を移動すると、標識細胞310および自由なすなわち未結合の生体磁気粒子308が、分離チャンバ300内の磁区243に磁氣的に結合する。次に、ディスクを別の所定の速度で別の所定の時間の間回転させ、懸濁液中の未結合および非標識細胞306を分離チャンバ300の底部に移動させる（図77C）。次に、磁区246を順次消去および形成し、磁氣的に結合した標識細胞310を選択的に解放する（図77D）。次に、磁区246を順次消去および形成することにより、標識細胞310を1つまたは複数の試験チャンバ302に磁氣的に導く（図77E）。試験チャンバ302には、限定はされないが、化学療法剤、抗生物質、および抗ウイルス薬を含む試験剤を含む試験溶液があらかじめロードされていてもよい。次に、標識細胞310を試験剤と共に培養することができ

30

40

50

る。次に、電磁放射ビームを試験チャンバ302にわたって走査させて、生細胞およびアポトーシス細胞を定量し、それにより、試験剤に曝露した場合の細胞の感受性を判定することができる。アポトーシス細胞は、膜泡、細胞収縮、タンパク質断片化、クロマチン凝縮、およびDNA分解を特徴とし、これらすべては細胞の光学的特性を変化させ、光ディスク読み取り装置を用いて非アポトーシス細胞から区別することを可能にする。

【0305】

本発明の他の実施態様

この発明またはその種々の態様は、以下の本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中の特許出願に開示されているディスク、検定、およびシステムの多くで容易に実施することができるか、または適合させることができる。1999年8月23日に出願された「Methods and Apparatus for Analyzing Operational and Non-operational Data Acquired from Optical Discs」と題する米国特許出願第09/378,878号、1999年8月23日に出願された「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers」と題する米国仮特許出願第60/150,288号、1999年10月26日に出願された「Trackable Optical Discs with Concurrently Readable Analyte Material」と題する米国特許出願第09/421,870号、2000年8月21日に出願された「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers」と題する米国特許出願第09/643,106号、2001年11月15日に出願された「Optical Bio-discs with Reflective Layers」と題する米国特許出願第09/999,274号、2001年11月20日に出願された「Methods And Apparatus For Detecting And Quantifying Lymphocytes With Optical Biodiscs」と題する米国特許出願第09/988,728号、2001年11月19日に出願された「Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-discs」と題する米国特許出願第09/988,850号、2001年11月20日に出願された「Apparatus and Methods for Separating Agglutinants and Disperse Particles」と題する米国特許出願第09/989,684号、2001年11月27日に出願された「Dual Bead Assays Including Optical Biodiscs and Methods Relating Thereto」と題する米国特許出願第09/997,741号、2001年11月30日に出願された「Apparatus and Methods for Separating Components of Particulate Suspension」と題する米国特許出願第09/997,895号、2001年12月7日に出願された「Optical Discs for Measuring Analytes」と題する米国特許出願第10/005,313号、2001年12月10日に出願された「Methods for Detecting Analytes Using Optical Discs and Optical Disc Readers」と題する米国特許出願第10/006,371号、2001年12月10日に出願された「Multiple Data Layer Optical Discs for Detecting Analytes」と題する米国特許出願第10/006,620号、2001年12月10日に出願された「Optical Disc Assemblies for Performing Assays」と題する米国特許出願第10/006,619号、2001年12月14日に出願された「Detection System For Disc-Based Laboratory And Improved Optical Bio-Disc Including Same」と題する米国特許出願第10/020,140号、2001年12月21日に出願された「Surface Assembly For Immobilizing DNA Capture Probes And Bead-Based Assay Including Optical Bio-Discs And Methods Relating Thereto」と題する米国特許出願第10/035,836号、2002年1月4日に出願された「Dual Bead Assays Including Covalent Linkages For Improved Specificity And Related Optical Analysis Discs」と題する米国特許出願第10/038,297号、2002年1月10日に出願された「Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging」と題する米国特許出願第10/043,688号、2002年1月14日に出願された「Optical Disc Analysis System Including Related Signal Processing Methods and Software」と題する米国仮出願第60/348,767号、2002年2月26日に出願された「Methods For DNA Conjugation Onto Solid Phase Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems」と題する米国特許出願第10/086,941号、2

002年3月12日に出願された「Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」と題する米国仮出願第60/363,949号、2002年5月24日に出願された「Methods and Apparatus for Use in Detection and Quantitation of Cell Populations and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」と題する米国仮出願第60/382,944号、2002年5月30日に出願された「Optical Disc Systems For Determining The Concentration Of Cells Or Particles In A Sample And Methods Relating thereto」と題する米国仮出願第60/384,205号。これらの出願はすべて、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。したがって、これらの出願は、その全体が本明細書において繰返されるのと同様に、本明細書を支持するものとして背景および関連の開示を提供する。

10

【0306】

実験の詳細

本発明を図面を参照して詳細に説明してきたが、本発明の一定の例およびさらなる例示を以下に提供する。

【実施例1】

【0307】

図12Aで説明した2ステップハイブリダイゼーション法を、この実施例の二重ビーズ検定を行う際に用いた。

【0308】

A. 二重ビーズ検定

この実施例では、男性に存在するが女性には存在しない遺伝子配列DYSを検出するために二重検定を実行した。検定物は、共有結合した捕捉プローブで被覆された3 μ の磁気捕捉ビーズ、共有結合したDYS遺伝子に特異的な配列で被覆された2.1 μ の蛍光レポータービーズ、およびDYS配列を含む標的DNA分子から構成する。標的DNAは、合成の80オリゴヌクレオチド配列である。捕捉プローブおよびレポータープローブは、40ヌクレオチド長であり、DYS配列と相補的であるが互いには相補的ではない。

20

【0309】

検定物の調製に用いられる特定の方法は、100マイクログラム/ミリリットルのサケ精子DNA中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを含む。この前処理により、図38に示すように、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非共有結合が低減する。捕捉ビーズを、上清を除去して磁氣的に濃縮した。100ミリリットル容量のハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl₂、50mM Tris HCl、pH7.5、および5 \times デンハルト混合物、10マイクログラム/ミリリットルの変性サケ精子DNA)を捕捉ビーズに添加し、ビーズを再懸濁した。1、10、100、1000フェムトモルの範囲の種々の濃度の標的DNAを、37 $^{\circ}$ Cで2時間混合しながら添加した。ビーズを磁氣的に濃縮し、標的DNAを含む上清を除去した。100ミリリットル容量の洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDm、10mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

30

40

【0310】

次に、100ミリリットルのハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl₂、50mM Tris HCl、pH7.5、および5 \times デンハルト混合物、10マイクログラム/ミリリットルの変性サケ精子DNA)中 2×10^7 の量のレポータービーズを添加して、捕捉ビーズを洗浄した。ビーズを再懸濁し、37 $^{\circ}$ Cでさらに2時間混合しながら培養した。培養後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合レポータービーズを含む上清を除去した。100ミリリットル容量の洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDm、10mM EDTA)を添加し、

50

ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

【0311】

最後の洗浄後、20マイクロリットルの結合緩衝液(50mM Tris、200mM NaCl、10mM MgCl₂、0.05% Tween20、1% BSA)中にビーズを再懸濁した。この実施例の以下のパートBで説明するように調製したディスクに、10マイクロリットル容量をロードした。

【0312】

B. ディスクの調製

金ディスクを無水マレイン酸ポリスチレン(maleic anhydride polystyrene)で被覆した。レポータープローブ(または捕捉剤)と相補的なアミンDNA配列を、ディスクの個別の反応領域に固定した。サンプル注入の前に、流路を遮断緩衝液(50mM Tris、200mM NaCl、10mM MgCl₂、0.05% Tween20、1% BSA、1%スクロース)で遮断して、ディスク表面への二重ビーズ複合体の非共有結合を防止した。本発明で用いられる捕捉剤220、捕捉領域170、および流体回路を示すディスクアセンブリの斜視図は、図25A~図25Dに詳細に示されている。別法として、レポータービーズをストレプトアビジンで被覆する場合、捕捉ゾーンは、受動吸着によりディスク(ポリスチレンで前処理されている)に固定され得るBSAビオチンなどの捕捉剤で作成してもよい。ビオチン捕捉剤の使用を示すディスクアセンブリの斜視図は、図26A~図26Dに提示されている。ディスクへのビーズのこのタイプの固定で用いる種々の方法も、図15Aおよび図15B、図17、図19A~図19C、および図23Aおよび図23Bに示されている。

【0313】

C. ディスク上の二重ビーズ複合体構造の捕捉

上記のパートAで説明したように調製した10マイクロリットル容量の二重ビーズ混合物をディスクチャンバにロードし、注入ポートを密閉した。レポータービーズのレポータープローブと捕捉剤とのハイブリダイゼーションを促進させるために、ディスクを低速(800rpm未満)で15分まで遠心分離した。ディスクを、速度4倍速(約1600rpm)で5分間、CD読み取り装置で読み取った。これらの条件下で、未結合磁気捕捉ビーズを遠心分離して捕捉領域から除去した。二重ビーズ複合体にある磁気捕捉ビーズは、捕捉領域のレポータービーズに結合したままであった。ディスクを用いて二重ビーズ複合体を捕捉および分析することに関するステップは、図25A~図25D、図26A~図26D、および図27A~図27Dに詳細に提示されている。

【0314】

D. 二重ビーズ複合体構造の定量

捕捉された標的DNAの量は、捕捉磁気ビーズの数およびレポータービーズの数を定量することにより確定(enumerate)することができる。これは、各タイプのビーズが別個のシグネチャを有するからである。

【実施例2】

【0315】

以下の実施例は、例えば図32を参照して上述されたような二重ビーズ多重化および関連する検定を対象とする。

【0316】

A. 二重ビーズ検定多重化

この実施例では、2つのDNA標的を同時に検出するために二重ビーズ検定を実行した。検定物は、3μmの磁気捕捉ビーズから構成される。磁気捕捉ビーズの1つの集団をDNA標的1と相補的な捕捉プローブ1で被覆し、磁気捕捉ビーズの別の集団をDNA標的2と相補的な捕捉プローブ2で被覆する。別法として、2つの異なるタイプの磁気捕捉ビーズを用いてもよい。検定では2つの別個のタイプのレポータービーズがある。これら2つのタイプは、化学組成物(例えばシリカおよびポリスチレン)および/またはサイズが

異なる。多重二重ビーズ検定フォーマットで用いることができるビーズの種々の組み合わせは、図32に示されている。1つのタイプのレポータービーズを、DNA標的1と相補的なレポータープローブ1で被覆する。他のレポータービーズは、DNA標的2と相補的なレポータープローブ2で被覆する。この場合も、捕捉プローブおよびレポータープローブは、各標的とは相補的であるが、互いには相補的ではない。

【0317】

二重ビーズ検定多重化の調製に用いられる特定の方法は、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサケ精子DNA中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを含む。この前処理により、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非共有結合が低減する。捕捉ビーズを、上清を除去して磁氣的に濃縮した。100マイクロリットル容量のハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl_2 、50mM Tris HCl、pH7.5、および5xデンハルト混合物、10マイクログラム/ミリリットルの変性サケ精子DNA)を添加し、ビーズを再懸濁した。1、10、100、1000フェムトモルの範囲の種々の濃度の標的DNAを、捕捉ビーズ懸濁液に添加した。懸濁液を37で2時間混合しながら培養した。ビーズを磁氣的に濃縮し、標的DNAを含む上清を除去した。100マイクロリットル容量の洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDM、10mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

10

20

【0318】

次に、100マイクロリットルのハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl_2 、50mM Tris HCl、pH7.5、および5xデンハルト混合物、10マイクログラム/ミリリットルの変性サケ精子DNA)中 2×10^7 の量のレポータービーズを添加して、捕捉ビーズを洗浄した。ビーズを再懸濁し、37でさらに2時間混合しながら培養した。培養後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合レポータービーズを含む上清を除去した。100マイクロリットル容量の洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDM、10mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

30

【0319】

最後の洗浄後、20マイクロリットルの結合緩衝液(50mM Tris、200mM NaCl、10mM MgCl_2 、0.05% Tween 20、1% BSA)中にビーズを再懸濁した。この実施例の以下のパートBで説明するように調製したディスクに、10マイクロリットル容量のこの溶液をロードした。

【0320】

B. ディスク調製

金ディスクを無水マレイン酸ポリスチレンで上記のように被覆した。2つのタイプのレポータービーズ用に個別の反応領域を作成した。各反応領域は、各レポータープローブ(または捕捉剤)と相補的なアミンDNA配列からなる。サンプル注入の前に、流路を遮断緩衝液(50mM Tris、200mM NaCl、10mM MgCl_2 、0.05% Tween 20、1% BSA、1%スクロース)で遮断して、ディスク表面への二重ビーズ複合体の非共有結合を防止した。別法として、多重化二重ビーズ検定フォーマットで用いられる磁気ビーズは、光磁気ディスクおよびドライブを用いて検出してもよい。磁気ディスクフォーマットの化学反応領域は、図37に関連して説明したような明確に離間した磁気捕捉領域で置き換えられる。以下の実施例5および6を参照されたい。

40

【0321】

C. ディスク上の二重ビーズ複合体構造の捕捉

上記のこの実施例のパートAで説明したように調製した10マイクロリットル容量の二

50

重ビーズ混合物をディスクチャンバにロードし、注入ポートを密閉した。レポータービーズのレポータープローブと捕捉剤とのハイブリダイゼーションを促進させるために、ディスクを低速(800rpm未満)で15分まで遠心分離した。ディスクを、速度4倍速(約1600rpm)で5分間、CD読み取り装置で読み取った。これらの条件下で、未結合磁気捕捉ビーズを遠心分離して流路から除去した。レポータービーズは、レポータープローブとその相補的な薬剤とのハイブリダイゼーションにより、捕捉領域に結合した。

【0322】

D. 二重ビーズ複合体構造の定量

捕捉された標的DNA 1および2の量は、各反応領域における各レポータービーズの数を定量することにより確定することができる。

【実施例3】

【0323】

二重ビーズ検定の感度は、二重ビーズをつなぎ合わせる標的媒介結合の強度に依存する。二重ビーズは水素結合によりつなぎ合わせられる。結合の強度は、二重ビーズをつなぎ合わせる結合が共有結合である場合に著しく高まる。このために、標的の捕捉後に、ライゲーション反応を実行して、図38で上述したような捕捉プローブとレポータープローブとの共有結合を形成する。レポータープローブの5'末端は、ライゲーション反応で必要とされるリン酸基を保持する。

【0324】

ライゲーション実験：検定物は、共有結合した捕捉プローブで被覆された3μmの磁気捕捉ビーズ(Spherotech, Libertyville, IL)、共有結合したDYS遺伝子に特異的な配列で被覆された2.1μmの蛍光レポータービーズ(Molecular Probes, Eugene, OR)、およびDYS配列を含む標的DNA分子から構成される。標的DNAは、合成80オリゴヌクレオチド長である。捕捉プローブおよびレポータープローブは、40ヌクレオチド長であり、DYS配列と相補的であるが互いには相補的ではない。

【0325】

検定物の調製に用いられる特定の方法は、100μg/mlのサケ精子DNA中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを含む。この前処理により、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減する。捕捉ビーズを、上清を除去して磁氣的に濃縮した。次に、100μlのハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl₂、50mM Tris HCl、pH7.5、および5×デンハルト混合物、10μg/mlの変性サケ精子DNA)を添加し、ビーズを再懸濁した。1、10、100、1000フェムトモルの範囲の種々の濃度の標的DNAを、捕捉ビーズ懸濁液に添加した。ビーズ懸濁液を、37°Cで2時間混合しながら培養した。ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合標的DNAを含む上清を除去した。100マイクロリットルの洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDM(脱脂粉乳)、10mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

【0326】

次に、100μlのハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl₂、50mM Tris HCl、pH7.5および5×デンハルト混合物、10μg/mlの変性サケ精子DNA)中 2×10^7 の量のレポータービーズを添加して、捕捉ビーズを洗浄した。ビーズを再懸濁し、37°Cでさらに2時間混合しながら培養した。培養後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合レポータービーズを含む上清を除去した。100マイクロリットルの洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDM(脱脂粉乳)、10mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

10

20

30

40

50

【0327】

最後の洗浄後、20 μ l の結合緩衝液 (50 mM Tris、200 mM NaCl、10 mM MgCl₂、0.05% T-20、1% BSA) 中にビーズを再懸濁した。次に、実施例2のパートBで説明するように調製したバイオディスクに、10 μ l をロードした。

【0328】

A. 捕捉ビーズの調製

上記検定物の調製に用いられる特定の方法は、100 μ g/ml のサケ精子DNA中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを含む。この前処理により、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減する。捕捉ビーズを、上清を除去して磁氣的に濃縮した。次に、100 μ l のハイブリダイゼーション緩衝液 (0.2 M NaCl、1 mM EDTA、10 mM MgCl₂、50 mM Tris HCl、pH 7.5、および5 \times デンハルト混合物、10 μ g/ml の変性サケ精子DNA) を添加し、ビーズを再懸濁した。1、10、100、1000フェムトモルの範囲の種々の濃度の標的DNAを、捕捉ビーズ懸濁液に添加した。ビーズ懸濁液を、37 で2時間混合しながら培養した。ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合標的DNAを含む上清を除去した。100マイクロリットルの洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M (脱脂粉乳)、10 mM EDTA) を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

【0329】

B. 標的DNAまたは架橋配列 (Bridging Sequence) へのハイブリダイゼーション

0モル、1E-14モル、1E-13モル、1E-12モル、および1E-11モルという濃度での種々の濃度の標的DNAを、捕捉ビーズ懸濁液に添加した。ビーズ懸濁液を、37 で2時間混合しながら培養した。ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合標的DNAを含む上清を除去した。100マイクロリットルの洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M (脱脂粉乳)、10 mM EDTA) を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。捕捉ビーズを、50 μ l の40 mM NaCl溶液に再懸濁した。

【0330】

C. レポータープローブまたはレポータービーズへのハイブリダイゼーション

次に、100 μ l のハイブリダイゼーション緩衝液 (0.2 M NaCl、1 mM EDTA、10 mM MgCl₂、50 mM Tris HCl、pH 7.5、および5 \times デンハルト混合物、10 μ g/ml の変性サケ精子DNA) 中 2×10^7 の量のレポータービーズまたは100 pモルのレポータープローブを添加して、捕捉ビーズを洗浄した。ビーズを再懸濁し、37 でさらに2時間混合しながら培養した。培養後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合レポータービーズまたは未結合レポータープローブを含む上清を除去した。100マイクロリットルの洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M (脱脂粉乳)、10 mM EDTA) を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

【0331】

D. ライゲーション反応

10 μ l 容量の10 \times ライゲーション緩衝液 (最終濃度66 mM Tris、pH 7.6、6.6 mM MgCl₂、100 mM DTT、66 μ M ATP) および4ユニットのリガーゼ (濃度10ユニット/ μ l) を、ビーズ懸濁液に添加した。ライゲーション反応を室温で2時間実行した。ビーズ懸濁液を、洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.2% SDS、0.05% Tween 20、0.2

10

20

30

40

50

5% NFD M) で3回洗浄した。対照用試験管にはリガーゼを添加しなかった。

【0332】

E. 酵素検定

レポータープローブの量を、捕捉された標的DNAの量と直接関連させた。したがって、捕捉された標的を定量する1つの方法は、レポータープローブの量を定量することである。この検定の原理は、レポータープローブがビオチン化されたことである。したがって、レポータープローブの濃度は、酵素であるストレプトアビジンアルカリホスファターゼがビオチン部分に結合する酵素検定により求めることができる。アルカリホスファターゼの色原体基質であるp-ニトロフェニルリン酸をレポーターとして用いた。この無色基質は、アルカリホスファターゼにより加水分解され、405nmの吸光度を有する黄色の生成物となる。ビーズを100 μ lのCDB(2% BSA、50mM Tris-HCl、pH7.5、145mM NaCl、1.0mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂、0.05% NaN₃)で洗浄し、250ng/mlのストレプトアビジンホスファターゼ100 μ lと共に37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。ビーズを洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.05% Tween)で3回洗浄し、未結合S-APを除去した。ビーズを100 μ lのS-AP基質であるp-ニトロリン酸塩と共に、0.1M Tris、pH10、2mM MgCl₂中3.7mg/mlで、室温で5~15分間培養した。上清の発色を405nmで監視した。色の強度は、ビオチン化レポータープローブの量、したがって捕捉された標的の量と直接関連する。

10

【0333】

20

F. 二重ビーズ検定

レポータービーズの量は、捕捉された標的の量と直接関連した。したがって、捕捉された標的を定量する1つの方法は、レポータービーズの量を定量することであった。ハイブリダイゼーションおよびライゲーション後、ビーズを200 μ lのPBSに再懸濁し、レポータービーズの量を、蛍光測定器Fluoromax-2によって、Ex=500nm、スリット=2.0、Em=530nm、スリット=2.0で定量した。別法として、上述のように、蛍光レポータービーズの数をバイオCD読み取り装置により定量してもよい。

【実施例4】

【0334】

30

二重ビーズ検定での切断可能スペーサの使用により、検定の感度が高まる。以下の実施例は、切断可能スペーサを用いた二重ビーズ検定を対象とする。

【0335】

A. 捕捉プローブおよびレポータープローブの設計

捕捉プローブおよびレポータープローブの設計は、切断可能スペーサを用いた二重ビーズ検定の成功に重要である。捕捉プローブおよびレポータープローブは、図で上述されるような3つの枝を含む。レポータープローブまたは捕捉プローブの1つの枝は、標的捕捉に参与する。いくつかのリンカー(PEG基)を、捕捉プローブまたはレポータープローブに導入して、プローブの螺旋化を最小にし、標的捕捉効率を高める。捕捉プローブまたはレポータープローブの第2の枝は、末端にビオチンが続く3つのリンカーを含む。カルボキシルまたはアミンなどの他の官能基を用いることもできる。ビオチンは、固相への捕捉プローブまたはレポータープローブの結合に参与する。捕捉プローブの第3の枝は、レポータープローブとハイブリダイズする。

40

【0336】

制限酵素消化が捕捉プローブまたはレポータープローブの切断を選択する方法である場合、制限部位をプローブの配列に導入する。制限部位の選択は、捕捉プローブおよびレポータープローブを保持する(そして標的DNAを保持しない)配列のみを切断するように特有である(共通ではない)必要があるという点で重要である。標的の存在下での捕捉プローブおよびレポータープローブの形成は、上記の図42Cに示されている。

【0337】

50

レポータープローブの置換が捕捉プローブおよびレポータープローブの切断を選択する方法である場合、捕捉プローブとのハイブリダイゼーションに關与するレポータープローブの配列は比較的短い(約10ヌクレオチド)。残りの配列は捕捉プローブと相補的ではないため、置換プローブがハイブリダイズするのに利用可能である。これは、レポータープローブ(プローブ2B)への捕捉プローブ(プローブ1)のハイブリダイゼーションを示すために、図43Aおよび図43Bに包括的に上述されている。この実施例では、用いられるプローブはBiosource(Camarillo, CA)で合成された。

【0338】**B. ストレプトアビジンビーズへの捕捉プローブの固定**

1. 捕捉ビーズの調製: この検定の第1のステップは、固相への捕捉プローブの結合である。この実施例では、Dyna1製のストレプトアビジンで被覆された $2.8 \mu\text{m}$ の磁気ビーズを固相として用いた。通常、 6.7×10^7 のDyna1ビーズを結合ごとに用いた。ビーズを $200 \mu\text{l}$ の結合および洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl、 $\text{pH} 7.5$ 、 1mM EDTA、 2M NaCl)に再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

10

【0339】

2. 捕捉ビーズへの捕捉プローブの結合: 磁気ビーズを、 $400 \mu\text{l}$ の結合および洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl、 $\text{pH} 7.5$ 、 1mM EDTA、 2M NaCl)に再懸濁し、最終濃度を $5 \mu\text{g}$ ビーズ/ μl にした。次に、水中 600 ピコモルの捕捉プローブをビーズ懸濁液に添加した。混合物の最終塩濃度は 1M NaClである。効率的な結合には高塩濃度が必要であることに留意すべきである。混合物を 37°C で2~4時間、時々混合しながら培養した。次に、ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を除去した。ビーズを結合および洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl、 $\text{pH} 7.5$ 、 1mM EDTA、 2M NaCl)で3回洗浄した。

20

【0340】

3. 結合効率の決定: 結合前および結合後の上清の光強度を、 260nm で測定し、結合された捕捉プローブの量を定量した。通常、 50% を超える捕捉プローブがストレプトアビジンビーズに結合した。プローブの密度は、 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ プローブ/ビーズであった。以下の表2では、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズへのビオチン化プローブの結合効率の決定の例のリストを提示している。

30

【0341】

4. ビーズ上の残りのストレプトアビジン部位の遮断: ビーズを、 2mg/ml のビオチンを含む $400 \mu\text{l}$ のPBS中で、回転混合機において1時間培養し、Dyna1磁気ビーズの残りのストレプトアビジン部位すべてを遮断した。磁気ビーズを、結合および洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl、 $\text{pH} 7.5$ 、 1mM EDTA、 2M NaCl)で3回洗浄し、 $1000 \mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、 10mM MgCl₂、 1mM EDTA、 50mM Tris、 $\text{pH} 7.5$)に再懸濁した。

【0342】

【表 2】

ストレプトアビジン被覆磁気ビーズへのビオチン化捕捉プローブの結合

1	用いるビーズの数： 1.2×10^8 ビーズ
2	ビーズごとのストレプトアビジン分子の数： 7×10^5 分子/ビーズ
3	ビーズ 1 mg に結合したビオチン化捕捉プローブ 1 の量： 127 pモルまたは 8×10^{13} 分子
4	ビオチンプローブ/ビーズの数： 8×10^6 分子/ビーズ
5	遊離ストレプトアビジン結合部位すべてがビオチンで飽和した

10

【0343】

C. レポータープローブへの捕捉プローブのハイブリダイゼーション

1. ハイブリダイゼーション：1000 μ l のビーズ懸濁液のうち、400 μ l を 1 ナノモルのレポータープローブ 2 A を含む 400 μ l の TE 緩衝液と混合し、400 μ l を 1 ナノモルのレポータープローブ 2 B を含む 400 μ l の TE 緩衝液と混合し、200 μ l を陰性対照として 200 μ l の TE (Tris - EDTA) と混合した。ハイブリダイゼーションを 37 で 2 時間実行した。

【0344】

2. 洗浄：ハイブリダイゼーションに続き、磁気ビーズを洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.05% Tween) で 3 回洗浄した。

20

【0345】

3. ハイブリダイゼーション効率の決定：ここで、800 μ l のうちの 50 μ l をハイブリダイゼーション効率について検定した。この検定の原理は、レポータープローブ 2 A および 2 B がビオチン化されたことである。したがって、これらのプローブの濃度は、酵素であるストレプトアビジンアルカリホスファターゼがビオチン部分に結合する酵素検定により求めることができる。アルカリホスファターゼの色原体基質である p - ニトロフェニルリン酸をレポーターとして用いた。この無色基質は、アルカリホスファターゼにより加水分解され、405 nm の吸光度を有する黄色の生成物となった。ビーズを 100 μ l の CDB (2% BSA、50 mM Tris - HCl、pH 7.5、145 mM NaCl、1.0 mM MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂、0.05% NaN₃) で洗浄し、250 ng/ml のストレプトアビジンホスファターゼ 100 μ l と共に 37 で 1 時間培養した。ビーズを洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.05% Tween) で 3 回洗浄し、未結合 S - AP を除去した。ビーズを 100 μ l の S - AP 基質である p - ニトロリン酸塩と共に、0.1 M Tris、pH 10、2 mM MgCl₂ 中 3.7 mg/ml で、室温で 5 ~ 15 分間培養した。上清の発色を 405 nm で監視した。色の強度は、ハイブリダイズしたビオチン化レポータープローブ 2 A または 2 B の量と直接相関する。

30

【0346】

この時点で、レポータープローブはそのビオチン部分を介して別の固相に結び付けることができる。この代替の二重ビーズ検定の場合、異なるタイプのストレプトアビジン被覆ビーズ、すなわちポリスチレンまたは蛍光を、ビーズ懸濁液に添加し、二重ビーズ複合体を形成させる。固相がバイオディスクの表面である場合、捕捉ビーズおよびレポータービーズの混合物は、ストレプトアビジン被覆ディスク表面上で培養する。

40

【0347】

D. 標的 DNA へのプローブのハイブリダイゼーション

1. ハイブリダイゼーション：この実施例では、標的 DNA は一本鎖の 80 量体オリゴヌクレオチドであった。0、1、および 1000 ピコモルの範囲の種々の濃度の標的 DNA を、ビーズ懸濁液に添加した。ビーズ懸濁液を、37 で 2 時間混合しながら培養した

50

。

【0348】

2. 洗浄：ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合標的DNAを含む上清を除去した。100マイクロリットルの洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD(脱脂粉乳)、10mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。洗浄手順を2回繰り返した。

【0349】

E. 制限酵素消化またはプローブ置換による標的媒介捕捉の識別

1. 制限酵素消化：捕捉プローブおよびレポータープローブに導入した制限酵素部位はNOT1であった。この制限酵素部位は稀であり、このモデル系では他のどの部位にも見られない。ビーズを400 μ lのCDB(2% BSA、50mM Tris-HCl、pH7.5、145mM NaCl、1.0mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂、0.05% NaN₃)に再懸濁した。ビーズ懸濁液を、7つの試験管、すなわち1つの対照用試験管および6つの消化用試験管に分取した。酵素NOT1を、製造業者の取扱説明書に従って調製した。次に、5ユニットの酵素を各消化用試験管に100 μ lの総容量で添加した。対照用試験管には水を添加した。消化を37 $^{\circ}$ Cで3~4時間実行した。

【0350】

2. 置換プローブによるレポータープローブの置換：ビーズを400 μ lのCDB(2% BSA、50mM Tris-HCl、pH7.5、145mM NaCl、1.0mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂、0.05% NaN₃)に再懸濁した。ビーズ懸濁液を、2つの試験管、すなわち1つの対照用試験管および1つの置換用試験管に分取した。ビーズを、200 μ lの6xSSC、1mM EDTAで55 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。熱処理を用いて、捕捉プローブからのレポータープローブ2Bの溶解を誘導した。この時点で、10倍過剰な置換プローブをビーズ懸濁液に添加し、混合物を37 $^{\circ}$ Cで数時間培養した。対照用試験管には水を添加した。

【0351】

F. 酵素検定による捕捉された標的の定量

制限酵素消化またはプローブ置換後の残っているレポータープローブの量は、捕捉された標的DNAの量と直接相関した。したがって、捕捉された標的を定量する1つの方法は、残りのレポータープローブの量を定量することであった。この検定の原理は、レポータープローブ2Aおよび2Bがビオチン化されたことである。したがって、これらのプローブの濃度は、酵素であるストレプトアビジンアルカリホスファターゼがビオチン部分に結合する酵素検定により求めることができる。

【0352】

アルカリホスファターゼの色原体基質であるp-ニトロフェニルリン酸をレポーターとして用いた。この無色基質は、アルカリホスファターゼにより加水分解され、405nmの吸光度を有する黄色の生成物となった。ビーズを100 μ lのCDB(2% BSA、50mM Tris-HCl、pH7.5、145mM NaCl、1.0mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂、0.05% NaN₃)で洗浄し、250ng/mlのストレプトアビジンホスファターゼ100 μ lと共に37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。ビーズを洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.05% Tween)で3回洗浄し、未結合S-APを除去した。ビーズを100 μ lのS-AP基質であるp-ニトロリン酸塩と共に、0.1M Tris、pH10、2mM MgCl₂中3.7mg/mlで、室温で5~15分間培養した。上清の発色を405nmで監視した。色の強度は、ハイブリダイズしたビオチン化レポータープローブ2Aまたは2Bの量と直接相関する。

【0353】

G. 二重ビーズ検定による捕捉された標的の定量

レポータープローブを蛍光またはポリスチレンストレプトアビジン被覆ビーズなどの別

の固相に固定する場合、捕捉される標的の量は、二重ビーズ検定により定量することができる。制限酵素消化またはプローブ置換後に残っているレポータービーズの数は、蛍光測定器（蛍光ビーズの場合）またはバイオCD読み取り装置により計数することができる。これは、各タイプのビーズが別個のシグネチャを有するからである。

【実施例 5】

【0354】

以下の実施例は、図37に関連して説明した光磁気バイオディスク110などの磁気的に書き込み可能かつ消去可能な分析ディスクで実行される二重ビーズ検定を説明する。

【0355】

この実施例では、男性に存在するが女性には存在しない遺伝子配列DYSを検出するために二重ビーズ検定を実行した。検定物は、共有結合した輸送プローブで被覆された3 μ mの磁気捕捉ビーズ（Spherotech, Libertyville, IL）、共有結合したDYS遺伝子に特異的な配列で被覆された2.1 μ mの蛍光レポータービーズ（Molecular Probes, Eugene, OR）、およびDYS配列を含む標的DNA分子から構成される。標的DNAは、合成の80オリゴヌクレオチド長である。輸送プローブおよびレポータープローブは、40ヌクレオチド長であり、DYS配列と相補的であるが互いには相補的ではない。

【0356】

検定物の調製に用いられる特定の方法は、100 μ g/mlのサケ精子DNA中で1 \times 10⁷の捕捉ビーズおよび2 \times 10⁷のレポータービーズを室温で1時間処理することを伴った。この前処理により、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減する。

【0357】

サケ精子DNAでの前処理後、捕捉ビーズを、注入ポートを介してMOバイオディスク内にロードした。MOバイオディスクは、光磁気ドライブにより生成された磁性領域を含む。これにより、捕捉ビーズはMOバイオディスクの特定の磁性領域内に保持される。

【0358】

次に、200 μ lのハイブリダイゼーション緩衝液（0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl₂、50mM Tris-HCl、pH7.5、および5 \times デンハルト混合物、10 μ g/mlの変性サケ精子DNA）中の標的DNAおよびレポータービーズを含むサンプルを、注入ポートを介してMOバイオディスクに添加する。次に注入ポートを密閉する。磁界を解放する。ディスクをドライブにおいて非常に低速（800rpm未満）で回転させて、捕捉ビーズへの標的DNAおよびレポータービーズのハイブリダイゼーションを促進させる。ドライブの温度は常に33 $^{\circ}$ Cに保つ。2時間のハイブリダイゼーション後、光磁気ドライブにより磁界を生成する。この段階で、未結合であるかまたは二重ビーズ複合体の一部としての磁気捕捉ビーズのみがMOバイオディスクに残る。未結合の標的およびレポータービーズを、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。次に、200マイクロリットルの洗浄緩衝液（145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M（脱脂粉乳）、10mM EDTA）を添加する。磁界を解放し、ディスクを低速（800rpm未満）で5分間回転させて、捕捉ビーズとレポータービーズとのいかなる非特異的結合も除去する。次に磁界を再印加する。洗浄緩衝液を、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。この洗浄手順を2回繰り返す。

【0359】

この段階で、未結合であるかまたは二重ビーズ複合体の一部としての磁気捕捉ビーズのみが残る。磁界を解放し、二重ビーズ複合体を検出チャンバに導く。次に、捕捉された標的DNAの量を、捕捉磁気ビーズの数およびレポータービーズの数を定量することにより確定する。これは、図28A、図28B、図29A、および図29Bで上述したように、各タイプのビーズが別個のシグネチャを有するからである。

【実施例 6】

【0360】

この実施例では、図32および図37に関連して上述した多重化技法を用いた二重ビーズ検定を、図37を参照して説明したMOバイオディスク110などの磁気的に書き込み可能かつ消去可能な分析ディスクで実行する。

【0361】

2つ以上のDNA標的を同時に検出するために二重ビーズ検定を実行する。検定物は、3 μ mの磁気捕捉ビーズ(Spherotech, Libertyville, IL)から構成される。磁気捕捉ビーズの1つの集団をDNA標的1と相補的な輸送プローブ1で被覆する。磁気捕捉ビーズの別の集団をDNA標的2と相補的な輸送プローブ2で被覆する。別法として、2つ以上の異なるタイプの磁気捕捉ビーズを用いてもよい。検定では2つ以上の別個のタイプのレポータービーズがある。これらのレポータービーズは、化学組成物(例えばシリカおよびポリスチレン)および/またはサイズが異なる。1つのタイプのレポータービーズを、DNA標的1と相補的なレポータープローブ1で被覆する。他のレポータービーズは、DNA標的2と相補的なレポータープローブ2で被覆する。この場合も、輸送プローブおよびレポータープローブは、各標的とは相補的であるが、互いには相補的ではない。

10

【0362】

二重ビーズ検定多重化の調製に用いられる特定の方法は、100 μ g/mlのサケ精子DNA中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを伴った。この前処理により、図38に示すように、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減する。

【0363】

サケ精子DNAでの前処理後、捕捉ビーズをMOバイオディスクにロードする。特定の捕捉ビーズに対して異なる磁気領域を生成するために磁界を印加する。捕捉ビーズは、10 μ m²あたり1つの捕捉ビーズの密度で、MOバイオディスク上に保持することができる。MOバイオディスクにビーズが堆積するのに使用可能な表面積は、約 3×10^9 μ m²である。所与の密度の3 μ mのビーズに対するMOバイオディスクの容量は、約 3×10^8 ビーズである。

20

【0364】

対象となる標的DNAを含むサンプルを、200 μ lのハイブリダイゼーション緩衝液(0.2M NaCl、1mM EDTA、10mM MgCl₂、50mM Tris-HCl、pH7.5、および5 \times デンハルト混合物、10 μ g/mlの変性サケ精子DNA)中で種々のタイプのレポータービーズと混合し、注入ポートを介してMOバイオディスクに添加する。次に注入ポートを密閉する。磁界を解放する。ディスクをドライブにおいて非常に低速(800rpm未満)で回転させて、種々のタイプの捕捉ビーズへの標的DNAおよびレポータービーズのハイブリダイゼーションを促進させる。ドライブの温度は常に33 $^{\circ}$ Cに保つ。2~3時間のハイブリダイゼーション後、光磁気ドライブにより磁界を再生成する。この段階で、未結合であるかまたは二重ビーズ複合体の一部としての磁気捕捉ビーズのみがMOバイオディスクに残る。未結合の標的およびレポータービーズを、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。次に、200マイクロリットルの洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M(脱脂粉乳)、10mM EDTA)を添加する。磁界を解放し、ディスクを低速(800rpm未満)で5分間回転させて、捕捉ビーズとレポータービーズとのいかなる非特異的結合も除去する。次に磁界を再印加する。洗浄緩衝液を、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。この洗浄手順を2回繰り返す。

30

40

【0365】

この段階で、磁界を解放し、二重ビーズ複合体を検出チャンバに導く。種々のタイプの標的DNAの量は、対応する捕捉磁気ビーズおよびレポータービーズの数を定量することにより確定することができる。これは、上記の図28A、図28B、図29A、および図29Bに示したように、各タイプのビーズが別個のシグネチャを有するからである。

【実施例7】

50

【0366】

この実験は、種々のビーズ上の共有結合プローブの量を求めて、どのビーズタイプがプローブの共有結合に最適であるかを決定するために行った。

【0367】

A. 共役

Polysciences製の磁気ビーズ(1~2 μm)、Spherotech製の磁気ビーズ(3 μm)、Polysciences製の蛍光ビーズ(1.8 μm)、およびMolecular Probes製の蛍光ビーズ(2.1 μm)を、この実施例で評価した。約 5×10^8 のビーズを共役反応ごとに用いた。ビーズを洗浄し、0.05 M MES緩衝液(2-N-モルホレノ(morpholino)-エタンスルホン酸)、pH 6.0に再懸濁し、0.1 M EDC(1-エチル-3-(3ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド-HCl)の添加により15分間活性化した。活性化後、ビーズ溶液のpHをNaOHを用いておよそ7.5に調節した。次に、0.5ナノモルのビオチン化プローブを溶液に添加した。プローブを、回転混合機において室温で2~3時間結合させた。次に、ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を回収した。ビーズに結合しているビオチン化プローブの量を推定するために、結合前および結合後に上清の光学濃度(260 nm)を測定した。

【0368】

B. 共有結合効率の決定

上述のようにビオチン化プローブと結合した、通常は $1 \sim 5 \times 10^7$ のビーズを、プローブの共有結合効率の決定に用いた。これらのビーズを、洗浄緩衝液で3回洗浄し、200 μlのCDB(145 mM NaCl、50 mM Tris HCl、2% BSA、1 mg/ml MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂、0.05% NaN₂)に再懸濁した。次に、ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を除去した。ビーズを、550 ng/mlのストレプトアビジンアルカリホスファターゼ(S-AP)を含む100 μlのCDBに再懸濁し、37 °Cで1時間培養して、ストレプトアビジンがプローブのビオチンに結合するのに十分な時間を与えた。S-APとの培養後、ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合のS-APを含む上清を除去した。ビーズを洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、アルカリホスファターゼの基質として100 μlのp-ニトロフェニルリン酸(pNPP)を、0.1 M Tris-HCl、pH 10中3.7 mg/mlの濃度で一定の時間間隔でビーズに添加し、培養時間の差による変動を最小にした。基質との培養時間は、405 nmの信頼性の高いODを得るために必要とされるように(2分~30分)変化させた。これは、発色の時間がプローブの濃度に応じて変わるからである。405 nm波長で分光光度計から得られた光学濃度は、ビーズに結合したプローブの量に比例した。

【0369】

実験の結果を図5.1Aおよび図5.1Bに示す。図示のように、3 μmのSpherotech製ビーズの非共有結合プローブが15%であるのと比較して、Polysciences製の1~2 μmの磁気ビーズに結合したプローブの87%が非共有結合であった。

【0370】

図5.3Aおよび図5.3Bを参照して、共有結合効率と二重ビーズ検定の感度との相関を示すデータが提示されている。これらの結果は、共有結合効率が高いほど、二重ビーズ検定の感度および特異性が高いことを示す。共有結合プローブの量は、以下のパートCのステップを行った後に、このパートBのステップを繰り返すことにより計算できる。共有結合の量の計算は図5.5に提示されている。

【0371】

C. 非共有結合プローブの除去における熱処理

どのビーズタイプが所望の共有結合効率を有するかを判定した後、非ビオチン化プローブおよび二重ビーズ検定で用いるのに適したビーズタイプを用いて、上記のパートAおよびパートBのステップを繰り返すことができる。

【0372】

結合後、非共有結合プローブを、ビーズの熱処理により選択的に除去することができる

。このために、最高 3×10^7 のビーズを、70 で10分間加熱した100 μ lのCDB溶液に再懸濁した。次に、ビーズを即座に磁氣的に濃縮し、上清を除去した。ビーズを、洗浄緩衝液で2回、CDBで1回洗浄し、100 μ lのCDBに再懸濁した。この時点で、ビーズは二重ビーズ試験で使用される準備が整っている。

【実施例8】

【0373】

固相上のDNAプローブの共有結合効率を高めるためのプローブ結合の間の二本鎖DNAの使用を評価するためにも、実験を行った。

【0374】

A. 二本鎖DNAの形成

利用された捕捉プローブは、40ヌクレオチド長であり、5'末端にアミノ基(NH₂)と、PEG(ポリエチレングリコール)リンカーのいくつかの鎖とを含んでいた。この実験で用いられるアミノ化プローブと相補的な鎖は、40ヌクレオチド長であり、5'末端にビオチン基を含んでいた。ハイブリダイゼーション反応を、37のストリンジェントな条件下で、過剰な相補的プローブを用いて実行した。

【0375】

B. ビーズ上の二本鎖DNAプローブの結合

Polysciences製の磁気ビーズ(1~2 μ m)、Spherotech製の磁気ビーズ(3 μ m)、Polysciences製の蛍光ビーズ(1.8 μ m)、およびMolecular Probes製の蛍光ビーズ(2.1 μ m)を、この実施例で評価した。約 5×10^8 を共役反応ごとに用いた。ビーズを洗浄し、1mlの0.05M MES緩衝液(2-N-モルホレノ-エタンスルホン酸)、pH6.0に再懸濁し、0.1M EDC(1-エチル-3-(3ジメチルアミノ)プロピルカルボジイミド-HCl)の添加により15分間活性化した。活性化後、pHをNaOHを用いておよそ7.5に調節した。次に、0.5ナノモルの容量のプローブを溶液に添加した。プローブ結合を、回転混合機において室温で2~3時間実行した。次に、ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を回収した。ビーズに結合しているプローブの量を推定するために、結合前および結合後に上清の光学濃度(260nm)を測定した。

【0376】

結合後、ビーズ上のすべての未反応カルボキシル基を、1mlの0.1M Tris-HCl、pH7.5で、混合機において室温で1時間遮断した。次に、いかなる非特異的タンパク質結合部位も遮断するように、ビーズを、PBS中10mg/ml BSA 1ml中で、混合機において室温で30分間遮断した。遮断後、ビーズをPBSで3回洗浄し、保存緩衝液(10mg/ml BSA、5% グリセロール、0.1% アジ化ナトリウムを含むPBS)に再懸濁した。

【0377】

C. 共有結合効率の決定

2×10^8 の磁気ビーズのアリコートを上記の結合ビーズから取り出し、0.1mg/mlのサケ精子DNAで室温で1時間前処理した。次に、ビーズを洗浄緩衝液で3回洗浄し、200 μ lのCDBに再懸濁した。次に、200ピコモルの遮断プローブおよび100 μ lのハイブリダイゼーション緩衝液をビーズ溶液に添加した。遮断プローブを、37で2時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を除去した。次に、ビーズを、磁気濃縮を用いて洗浄緩衝液で3回洗浄した。ビーズを550ng/mlのストレプトアビジンアルカリホスファターゼ(S-AP)を含む100 μ lの緩衝液を用いて再懸濁し、37で1時間培養した。S-APとの培養後、ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合S-APを含む上清を除去した。ビーズを洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、アルカリホスファターゼの基質として、3.7mg/mlの濃度の100 μ lのp-ニトロフェニルホスフェート(pNPP)を一定の時間間隔でビーズに添加し、培養時間の差による変動を最小にした。発色の時間は、プローブの濃度に応じて変わる。基質との培養時間は、405nmの信頼性の高いODを得るために必要とされるように、2分~30分で変化させた。405nmの光学濃度は、ビーズに結合したプロー

10

20

30

40

50

ブの量に比例した。これらの二本鎖結合実験の1つからの結果は、上記の図5 2 Aおよび図5 2 Bに提示されている。

【0378】

D. 捕捉プローブから相補鎖を分離するための熱処理の使用

100 μ lのビーズのアリコートをして70 で10分間加熱した。ビーズを磁気的に濃縮し、上清を即座に取り出した。高温の洗浄緩衝液で1回、C B Dで1回洗浄した。次にC B Dに再懸濁した。

【実施例9】

【0379】

結合の効率と固相に結び付いたプローブの接触性および剛性を高めるためのより長いスペーサのリンカーの使用を試験するためにも、実験を行った。これらの実験では、捕捉プローブおよびレポータープローブは40ヌクレオチド長であった。これらの合成ヌクレオチド配列は、対象となる検体に特異的であった。この実施例では、捕捉プローブの5'末端およびレポータープローブの3'末端は、共役する3つのポリエチレングリコール部分を含んでいた。これらの共有結合リンカーを、プローブ合成の間にプローブに導入した。これらの実験の1つから収集したデータは、上記の図5 4で示されている。図5 4に示すように、リンカーの使用により、二重ビーズ検定の感度が著しく高まる。

10

【0380】

この特定の検定で用いられたビーズは、Spherotech製の3 μ mの磁気ビーズおよびMolecular Probes製の2.1 μ mのレポータービーズであった。プローブを上述のようにビーズに共役結合させた。検定ごとに 2×10^7 のプローブ結合捕捉ビーズおよび 6×10^7 のレポータービーズのアリコートを、PBSで3回洗浄した。洗浄後、ビーズを100 μ g/mlの水中サケ精子DNAで、室温で1時間前処理した。ビーズを洗浄緩衝液(0.145 M NaCl、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、0.5% Tween-20)で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液(50 mM Tris-HCl、pH 7.5、0.1 M NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM EDTA、pH 7.5)で1回洗浄し、100 μ g/mlのDNAおよび5 \times デンハルト混合物を含むハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。

20

【0381】

図1 2 Aに提示するような2ステップハイブリダイゼーション法を、この実施例の二重ビーズ検定を行う際に用いた。100 μ g/mlのサケ精子DNAおよび5 \times デンハルト溶液を含むハイブリダイゼーション緩衝液で希釈した、対照(0フェムトモル)、10フェムトモル、1フェムトモル、0.1フェムトモル、0.01フェムトモル、0.001フェムトモルを含む種々の濃度の1つの標的を用いた。次に、種々の標的溶液を捕捉ビーズと混合し、37 で2時間培養して、ビーズの捕捉プローブへの標的のハイブリダイゼーションに十分な時間を与えた。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズした捕捉ビーズを洗浄緩衝液で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液で1回洗浄し、100 μ g/mlのDNAおよび5 \times デンハルト混合物を含む100 μ lのハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。次に、ハイブリダイズした標的を含む捕捉ビーズ溶液を、100 μ lのレポータービーズと混合し、混合を続けながら37 で2時間培養した。次に、新しい洗浄緩衝液(145 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、0.5% Tween 20、0.1% SDS、0.25% NFD M)で6回、PBSで1回洗浄した。次に、二重ビーズ複合体を含む洗浄溶液を、250 μ lのPBSを用いて再懸濁した。次に、レポータービーズからのからの蛍光シグナルを、蛍光測定器を用いて定量した。

30

40

【0382】

結果は、3つのPEGリンカーを捕捉プローブに導入した場合、二重ビーズ検定におけるバックグラウンドが低下し、リンカーのないプローブと比較して検定感度が著しく向上したことを示した。

【実施例10】

50

【0383】

この研究は、遺伝的二重ビーズ検定の検定感度および検出の範囲を明らかにするために行った。結果を図57に示す。

【0384】

A. 捕捉ビーズおよびレポータービーズの調製

この実験で用いたビーズは、磁気捕捉ビーズ(3 μ mのSpherotech製)および黄色蛍光レポータービーズ(1 μ mのPolysciences製)であり、それぞれ、DNA輸送プローブおよびDNAシグナルプローブそれぞれと共有結合している。約 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズをこの実験に用いた。これらのビーズをPBSで3回洗浄し、100 μ g/mlの消化サケ精子DNAを含む1mlの水に再懸濁した。次に、サケ精子DNA混合物中のビーズ溶液を室温で1時間培養した。培養後、ビーズを洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.05% Tween)で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液(0.1M NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、50mM Tris、pH7.5)で1回洗浄した。次に、ビーズをハイブリダイゼーション緩衝液(100 μ g/mlのDNAを含む)に再懸濁した。

【0385】

B. 二重ビーズ検定

100フェムトモル、10フェムトモル、1フェムトモル、0.1フェムトモル、0.01フェムトモル、および0フェムトモル(陰性対照)を含むDNA標的剤の連続希釈液を調製した。次に、等量の捕捉ビーズを種々の標的溶液と混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間培養して、標的をビーズの5'捕捉プローブとハイブリダイズさせた。培養後、ビーズ溶液を洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.05% Tween)で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液(0.1M NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、50mM Tris、pH7.5)で1回洗浄し、次に、ハイブリダイゼーション緩衝液(100 μ g/mlのサケ精子DNAを含む)に再懸濁した。

【0386】

レポータービーズを捕捉ビーズ溶液と混合し、回転混合機において37 $^{\circ}$ Cで2時間培養した。培養後、ビーズ溶液を0.5mlの洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.05% Tween、0.1% SDS、0.25% NFD M)で6回洗浄し、250 μ lの水に再懸濁した。次に、結合したレポータービーズの数を、励起=500nm、発光=530nm、スリット=励起-2、発光-2、および0.1秒の積分時間で、蛍光測定器により定量した。

【実施例11】

【0387】

この研究は、遺伝的二重ビーズ型検定で用いるハイブリダイゼーション緩衝液の最適な塩濃度を求めるために行った。

【0388】

A. 捕捉ビーズおよびレポータービーズの調製

この実験で用いたビーズは、磁気捕捉ビーズ(3 μ mのSpherotech製)および黄色蛍光レポータービーズ(2.1 μ mのMolecular Probes製)であり、それぞれ、DNA輸送プローブおよびDNAシグナルプローブそれぞれと共有結合している。ビーズをハイブリダイゼーション緩衝液(0.1M NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、50mM Tris、pH7.5)で1回洗浄した。ビーズを、0.1%のCHAPSおよびサケ精子DNAで、室温で1時間前処理した。次に、ビーズを洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M)で3回、各ハイブリダイゼーション緩衝液(145mM NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、100 μ g/mlのサケ精子DNA、50mM Tris、pH7.5)で1回洗浄した。洗浄後、ビーズをハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。

【0389】

B．二重ビーズ検定

セクションAで調製した磁気捕捉ビーズを、24個の10 μ lアリコートに分割した。6組のアリコートを、種々の濃度のNaCl(0mM、145mM、300mM、および400mM)を含むハイブリダイゼーション溶液で希釈した。標的DNA混合物を、以下の濃度：100fモル、10fモル、1fモル、0.1fモル、0.01fモル、0フェムトモル(陰性対照)のさまざまな塩濃度のハイブリダイゼーション緩衝液中で作成した。次に、種々の標的溶液を、ハイブリダイゼーション緩衝液の塩濃度に従ってそれぞれのビーズ溶液と混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間培養して、標的を捕捉ビーズの5'輸送プローブとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、検定溶液を、各処理群に必要な適切な量のNaCl(0mM、0.145mM、0.3mM、0.4mMのNaCl)を含む洗浄緩衝液で3回、適切なハイブリダイゼーション緩衝液で1回洗浄した。次に、ビーズを、適切な量のNaClを含む各ハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。

【0390】

種々のNaCl濃度(0mM、0.145mM、0.3mM、0.4mMのNaCl)を含むハイブリダイゼーション緩衝液中の100 μ l容量のレポータービーズを、適当な検定溶液に添加し、同じ濃度のNaClが異なる処理群内で維持されるようにした。次に、これらの検定溶液を、回転混合機において37 $^{\circ}$ Cで2時間培養した。培養後、種々の溶液を、適切な量のNaClを含む0.5mlの洗浄緩衝液で6回、同様に各ハイブリダイゼーション緩衝液と等しい濃度のNaCl(0mM、0.145mM、0.3mM、0.4mMのNaCl)を含む水で1回洗浄した。次に、種々の二重ビーズ溶液を250 μ lの水に再懸濁した。次に、結合したレポータービーズの数を、励起=500nm、発光=530nm、スリット=励起-2、発光-2、および0.1秒の積分時間で、蛍光測定器を用いて定量した。この検定からの結果は上記の図60に示されている。二重ビーズ複合体の検出は、図2に関連して説明したような光ディスクシステム、光磁気ディスクシステム、蛍光ディスクシステム、または任意の同様のデバイスを用いて実行することができる。光ディスク読み取り装置から収集される二重ビーズ複合体の特有のシグネチャトレースは、上記の図29Bに示されている。

【実施例12】

【0391】

この場合、Spherotech製の磁気捕捉ビーズ(3 μ m)およびMolecular Probes製の黄色蛍光(2.1 μ m)レポータービーズを評価した。この研究は、遺伝的二重ビーズ型検定で用いられるハイブリダイゼーション緩衝液中の最適なMgCl₂濃度を求めるために行った。

【0392】

A．捕捉ビーズおよびレポータービーズの調製

磁気捕捉ビーズおよび黄色蛍光レポータービーズそれぞれを、DNA輸送プローブおよびDNAシグナルプローブそれぞれと共有結合させた。結合後、ビーズをハイブリダイゼーション緩衝液(0.1M NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、50mM Tris、pH7.5)で1回洗浄した。ビーズを、100 μ g/mlのサケ精子DNAで室温で1時間前処理した。次に、ビーズを洗浄緩衝液(145mM NaCl、50mM Tris、pH7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDm)で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液(145mM NaCl、10mM MgCl₂、1mM EDTA、100 μ g/mlのサケ精子DNA、50mM Tris、pH7.5)で1回洗浄した。洗浄後、ビーズをハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。

【0393】

B．二重ビーズ検定

パートAで調製した磁気捕捉ビーズを、24個の10 μ lアリコートに分割した。6組のアリコートを、種々の濃度のMgCl₂(0mM、10mM、20mM、および30mM

M)を含むハイブリダイゼーション溶液で希釈した。標的DNA混合物を、以下の濃度：100 fモル、10 fモル、1 fモル、0.1 fモル、0.01 fモル、0 fモル(陰性対照)のさまざまな量のMgCl₂を含むハイブリダイゼーション緩衝液中で作成した。次に、種々の標的溶液を、ハイブリダイゼーション緩衝液の塩濃度に従ってそれぞれのビーズ溶液と混合し、37 で2時間培養して、標的を捕捉ビーズの5'輸送プローブとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、検定溶液を、各処理群に必要な適切な量のMgCl₂(0 mM、10 mM、20 mM、30 mMのMgCl₂)を含む洗浄緩衝液で3回、適切なハイブリダイゼーション緩衝液で1回洗浄した。次に、ビーズを、適切な量のMgCl₂を含む各ハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。

【0394】

種々のMgCl₂濃度(0 mM、10 mM、20 mM、30 mMのMgCl₂)を含むハイブリダイゼーション緩衝液中の100 μl容量のレポータービーズを、適当な検定溶液に添加し、同じ濃度のMgCl₂が異なる処理群内で維持されるようにした。次に、これらの検定溶液を、回転混合機において37 で2時間培養した。培養後、種々の溶液を、適切な量のNaClを含む0.5 mlの洗浄緩衝液で6回、同様に各ハイブリダイゼーション緩衝液と等しい濃度のMgCl₂を含む水で1回洗浄した。次に、種々の二重ビーズ溶液を250 μlの水に再懸濁した。次に、結合したレポータービーズの数を、励起=500 nm、発光=530 nm、スリット=励起-2、発光-2、および0.1秒の積分時間で、蛍光測定器により定量した。この検定からの結果は上記の図61Aに示されている。二重ビーズ複合体は、図1および図2に示すような光ディスク読み取り装置を用いて

10

20

【実施例13】

【0395】

以下の実験は、二重ビーズ検定の感度に対する、ビーズのプローブの密度を低減するためのプローブ遮断剤の使用の影響を判定するために行った。

【0396】

A. 捕捉ビーズおよびレポータービーズの調製

磁気捕捉ビーズ(3 μmのSpherotech製)および黄色蛍光レポータービーズ(2.1 μmのPolysciences製)それぞれを、DNA輸送プローブおよびDNAシグナルプローブそれぞれと共有結合させた。結合後、ビーズをハイブリダイゼーション緩衝液(0.1 M NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM EDTA、50 mM Tris、pH 7.5)で1回洗浄した。ビーズを、100 μg/mlのサケ精子DNAで室温で1時間前処理した。次に、ビーズを洗浄緩衝液(145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFDm)で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液(100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM EDTA、100 μg/mlのサケ精子DNA、50 mM Tris、pH 7.5)で1回洗浄した。洗浄後、ビーズをハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。

30

【0397】

B. プローブ遮断

ビオチン化輸送遮断プローブを、以下の最終濃度：500 pモル、50 pモル、35 pモル、30 pモルに希釈した。13 μl(2 × 10⁷)容量の磁気ビーズを各試験管(合計5本の試験管)に用いた。上記で調製した5 μlの量の遮断プローブおよび32 μlのハイブリダイゼーション緩衝液を、各試験管に添加した。次に、遮断プローブおよび輸送プローブを37 で2時間培養した。ハイブリダイゼーション後、ビーズを洗浄緩衝液(145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.05% Tween)で3回洗浄し、100 μlのCDB(2% BSA、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、145 mM NaCl、1.0 mM MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂、0.05% NaN₃)に再懸濁した。レポータービーズを、ビオチン化レポーター遮断プローブを用いて同様に調製した。

40

【0398】

50

C. 遮断剤処理後のビーズのプロープ密度判定

パートBで調製した各組のビーズ溶液のアリコート、 $100\ \mu\text{l}$ のS-AP ($1420\ \text{ng/ml}$)で 37°C で1時間培養し、次に洗浄緩衝液で3回洗浄した。洗浄後、 $0.1\ \text{M Tris}$ 、 $2\ \text{mM MgCl}_2$ 、 $\text{pH}10$ 中の $3.7\ \text{mg/ml}$ の濃度の、 $100\ \mu\text{l}$ 容量のS-AP基質としてのp-ニトロフェニルリン酸を、ビーズ溶液に添加した。発色に十分な時間を与えた後、分光光度計 ($405\ \text{nm}$ のOD)を用いて溶液を分析した。ビーズの遮断プロープの量を、 $405\ \text{nm}$ における吸光度から計算した。

【0399】

D. 二重ビーズ検定

パートBで調製したビーズを洗浄し、 $100\ \mu\text{g/ml}$ のサケ精子DNAおよび $5\times$ デンハルト溶液を含むハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。溶液標的DNA混合物を、以下の濃度： $0\ \text{f}$ モルの対照、 $10\ \text{f}$ モル、 $1\ \text{f}$ モル、 $0.1\ \text{f}$ モル、 $0.01\ \text{f}$ モル、 $0.001\ \text{f}$ モル、 $0.0001\ \text{f}$ モルのハイブリダイゼーション緩衝液中で調製した。次に、標的溶液を等量の捕捉ビーズおよびレポータービーズと混合し、 37°C で2時間培養した。捕捉ビーズおよびレポータービーズは、各組の検定混合物につき同量のプロープ遮断剤で遮断されている。すなわち、 $10\ \mu\text{l}$ の $10\ \text{f}$ モル標的を、それぞれ $50\ \text{p}$ モルの遮断プロープで遮断された $100\ \mu\text{l}$ のレポーターおよび捕捉ビーズ溶液に添加する。ハイブリダイゼーション後、検定溶液を洗浄緩衝液で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液で1回洗浄し、ハイブリダイゼーション緩衝液 ($100\ \mu\text{g/ml}$ のサケ精子DNAおよび $5\times$ デンハルト溶液を含む)に再懸濁した。検定溶液を濃縮し、 $250\ \mu\text{l}$ の水に再懸濁した。次に、結合したレポータービーズの数を、励起 = $500\ \text{nm}$ 、発光 = $530\ \text{nm}$ 、スリット = 励起 - 2 、発光 - 2 、および 0.1 秒の積分時間で、蛍光測定器により定量した。

【実施例14】

【0400】

以下の実験は、遺伝的二重ビーズ検定の最適なハイブリダイゼーション培養時間を求めるために実施した。この実験からの結果は、上記の図63および図64に示されている。

【0401】

A. 捕捉ビーズおよびレポータービーズの調製

この実験で用いたビーズは、共有結合により結び付いた $5'$ 輸送プロープを伴った $25\ \mu\text{l}$ の捕捉ビーズ (1.5×10^7 ビーズ/ μl の濃度の $3\ \mu\text{m}$ のカルボキシ化磁気粒子)と、 $400\ \mu\text{l}$ のレポータービーズ (6.6×10^6 ビーズ/ μl の濃度の $2\ \mu\text{m}$ のYFビーズ)であった。これらのビーズをPBSで3回洗浄し、 $100\ \mu\text{g/ml}$ のサケ精子DNAおよび 0.1% CHAPSで室温で1時間前処理した。次に、ビーズを洗浄緩衝液 ($145\ \text{mM NaCl}$ 、 $50\ \text{mM Tris}$ 、 $\text{pH}7.5$ 、 0.05% Tween)で3回、ハイブリダイゼーション緩衝液 ($50\ \text{mM Tris-HCl}$ 、 $\text{pH}7.5$ 、 $10\ \text{mM MgCl}_2$ 、 $0.1\ \text{M NaCl}$ 、 $1\ \text{mM EDTA}$)で1回洗浄した。次に、捕捉ビーズを $250\ \mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁し、レポータービーズを $400\ \mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。

【0402】

B. 二重ビーズ検定

1組の標的DNA溶液を、以下の濃度： 0 ピコモル、 1 ピコモル、 10 ピコモル、 100 ピコモルの標的を含むハイブリダイゼーション溶液中で作成した。 $10\ \mu\text{l}$ の捕捉ビーズ、 $15\ \mu\text{l}$ のレポータービーズ、 $1\ \mu\text{l}$ のサケ精子DNA、および $74\ \mu\text{l}$ の標的溶液を全てハイブリダイゼーション緩衝液に含む試験サンプルを調製した。この試験サンプルのアリコートを、種々の培養時間、 30 分間、 1 時間、 2 時間、 3 時間、 4 時間、および一晩で分析した。1つの組を混合せずに 37°C で培養し、他の組を回転混合機において混合した。

【0403】

サンプルのアリコートを、 $0.5\ \text{ml}$ の洗浄緩衝液 ($145\ \text{mM NaCl}$ 、 $50\ \text{mM}$

Tris、pH 7.5、0.05% Tween、0.1% SDS、0.25% NFD M)で6回洗浄し、次に202 μ lのPBSに再懸濁した。次に、結合したレポータービーズの数を、励起 = 450 nm、発光 = 480 nm、スリット = 励起 - 1.365、発光 - 1.05、および0.1秒の積分時間で、蛍光測定器により定量した。

【実施例15】

【0404】

図67Aに関連して説明したように二重ビーズ複合体を形成した後、レポータービーズを、DNA依存手順で捕捉ビーズから分離することができる。二重ビーズ複合体を、DNase (DNAを特異的に切断する酵素)に付す。この処理により、レポータービーズおよび捕捉ビーズを結合しているDNAを切断することによって、レポータービーズを捕捉ビーズから分離する。これにより、非標的媒介二重ビーズは影響を受けない。DNase処理後に解放されるレポータービーズは、サンプル中に存在する標的DNAの量を示す。この実験では、二重ビーズ検定におけるDNase Iの影響を評価した。この実験からの結果は、図69および図70に示されている。

【0405】

A. 二重ビーズ検定

実施例1のパートAで上述したように、二重ビーズ検定を実行した。簡潔に言えば、検定物は、共有結合した輸送プローブで被覆された3 μ mの磁気捕捉ビーズ (Spherotech, Libertyville, IL)、共有結合したレポータープローブで被覆された2.1 μ mの蛍光レポータービーズ (Molecular Probes, Eugene, OR)、および対象となる標的DNA分子から構成される。この実施例では、標的DNAは、合成の80オリゴヌクレオチド長である。輸送プローブおよびレポータープローブは、40ヌクレオチド長であり、標的DNAと相補的であるが互いには相補的ではない。

【0406】

検定物の調製に用いられる特定の方法は、100 μ g/mlのサケ精子DNA中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを含む。この前処理により、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減する。捕捉ビーズを、上清を除去して磁氣的に濃縮した。100 μ l容量のハイブリダイゼーション緩衝液 (0.2 M NaCl、1 mM EDTA、10 mM MgCl₂、50 mM Tris HCl、pH 7.5、および5 \times デンハルト混合物、1 μ g/mlの変性サケ精子DNA)を添加し、ビーズを再懸濁した。1、10、100、1000フェムトモルの範囲の種々の濃度の標的DNAを、捕捉ビーズ懸濁液に添加した。ビーズ懸濁液を、37°Cで2時間混合しながら培養した。ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合標的DNAを含む上清を除去した。100マイクロリットル容量の洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M (脱脂粉乳)、10 mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。この洗浄手順を2回繰り返した。

【0407】

次に、100 μ lのハイブリダイゼーション緩衝液 (0.2 M NaCl、1 mM EDTA、10 mM MgCl₂、50 mM Tris HCl、pH 7.5、および5 \times デンハルト混合物、10 μ g/mlの変性サケ精子DNA)中 2×10^7 の量のレポータービーズを添加して、捕捉ビーズを洗浄した。ビーズを再懸濁し、37°Cでさらに2時間混合しながら培養した。培養後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合レポータービーズを含む上清を除去した。100マイクロリットルの洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M (脱脂粉乳)、10 mM EDTA)を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。この洗浄手順を2回繰り返した。

【0408】

B. DNase I 検定

DNAse Iは配列特異的でないため、DNAse Iをこの目的に選択した。洗浄後、二重ビーズ複合体を87.5 µLの水に再懸濁した。10ユニットのDNAse I(2.5 µl)および10 µLのDNAse I反応緩衝液(40 mM Tris-HCl、10 mM MgSO₄、1 mM CaCl₂)を、再懸濁したビーズに添加した。消化反応を37で1時間実行した。消化後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、レポータービーズを含む上清を除去した。磁気捕捉ビーズを100 µlの水で2回洗浄した。洗浄した水を上清と合わせた。レポータービーズの数を、励起500 nm、発光530 nm、およびスリットサイズ2.0で、蛍光測定器Fluoromax-2により定量した。この実験からの結果については図69および図70を参照されたい。別法として、蛍光レポータービーズの数は、上述のようなバイオディスク読み取り装置により定量することができる。

10

【実施例16】**【0409】**

この実施例では、二重ビーズ複合体を、物理的または化学的な処理により分離する。二重ビーズ検定を、実施例15で上述したように実行した。洗浄後、ビーズ生成物を洗浄緩衝液(145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M(脱脂粉乳)、10 mM EDTA)で5回洗浄し、4つの組に分割した。

1. 対照：未処理、ビーズを200 µLの洗浄緩衝液で2回洗浄した。

2. 酸洗浄：ビーズを0.1 M 酢酸(pH 4)を含む200 µLの洗浄緩衝液で2回洗浄した。

20

3. 塩基洗浄：ビーズを0.1 M 重炭酸ナトリウム(pH 9)を含む200 µLの洗浄緩衝液で2回洗浄した。

4. 尿素：ビーズを7 M 尿素を含む200 µLの洗浄緩衝液で2回洗浄した。

【0410】

物理的または化学的処理の後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、解放されたレポータービーズを含む上清を保存した。ビーズを洗浄緩衝液で3回洗浄した。洗浄物を保存した。磁気捕捉ビーズを400 µLの洗浄緩衝液に再懸濁した。捕捉ビーズの上清中および溶液中のレポータービーズの量を、励起=500 nm、スリット2.0、発光=530 nm、スリット=2.0で、蛍光測定器Fluoromax-2により定量した。別法として、蛍光レポータービーズの数を、上述のようなバイオディスク読み取り装置により定量することができる。

30

【0411】

この実施例から明らかであるように、高pHでの洗浄により、低い標的濃度でレポータービーズを捕捉ビーズから解離することができる。図72の実験結果により示されるように、塩基洗浄は、低い標的濃度でレポータービーズを捕捉ビーズから完全に解離した。

【0412】

この実験の結果は、7 Mの尿素での処理が、感度を著しく低下させることなく、レポータービーズを捕捉ビーズから効率的に解離することも証明する。図73Aおよび図73Bの棒グラフに提示する実験結果により示されるように、尿素処理は、レポータービーズを捕捉ビーズから効率的に解離する。

40

【実施例17】**【0413】**

上述の実例15および16では、標的DNAは一本鎖であった。臨床的サンプルを用いる場合、DNAは二本鎖であるため、ハイブリダイゼーション緩衝液はグアニジンイソチオシアネートなどの変性試薬を必要とする。検定に用いられる変性試薬の濃度は、二重ビーズ検定の特異性および感度に主に寄与する。この実施例では、HSVを検出するための二重ビーズ検定を、1.5 Mのグアニジンイソチオシアネートの存在下で行った。

【0414】**A. 捕捉ビーズの調製**

二重ビーズ検定物は、共有結合した5' HSV輸送プローブで被覆された3 µmの磁気

50

捕捉ビーズ (Spherotech, Libertyville, IL)、および 3' HSV レポータープローブに結合した Molecular Probes (Eugene, OR) 製の $2.1 \mu\text{m}$ 蛍光レポータービーズ、および対象となる標的 DNA 分子から構成される。この実施例では、標的は、30 サイクル増幅して Qiagen カラムで精製した、HSV 遺伝子配列を含む二本鎖 PCR 産物であった。輸送プローブおよびレポータープローブは、40 ヌクレオチド長であり、標的 DNA と相補的であるが互いには相補的ではない。

【0415】

検定物の調製に用いた特定の方法は、 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のサケ精子 DNA 中で室温で 1 時間処理することを伴った。この前処理により、標的 DNA の非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減される。捕捉ビーズを、上清を除去して磁氣的に濃縮した。捕捉ビーズを、5 × デンハルト混合物および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のサケ精子 DNA を含む $600 \mu\text{L}$ のハイブリダイゼーション緩衝液 (1.5 GuSCN、8 mM EDTA、40 mM Tris、pH 7.5) に再懸濁した。

10

【0416】

B. 標的 DNA の調製

標的は、30 サイクル増幅して Qiagen カラムで精製した二本鎖 PCR 産物であった。標的を適切な濃度に希釈し、95 °C で 5 分間過熱して、二本鎖を変性し、氷上で急速に冷却した。

【0417】

C. 標的 DNA とのハイブリダイゼーション

合計 $12.5 \mu\text{L}$ の冷却した標的を、 $100 \mu\text{L}$ の前処理した捕捉ビーズに添加した。 0 、 10^{-16} 、 10^{-15} 、 10^{-14} 、 10^{-13} 、および 10^{-12} モルの種々の濃度の標的 DNA を、捕捉ビーズ懸濁液に添加した。ビーズ懸濁液を、37 °C で 2 時間混合しながら培養した。ビーズを磁氣的に濃縮して、未結合標的 DNA を含む上清を除去した。 100 マイクロリットルの洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M (脱脂粉乳)、10 mM EDTA) を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。この洗浄手順を 2 回繰り返した。

20

【0418】

D. 二重ビーズ検定

5 × デンハルト混合物、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子 DNA を含む $100 \mu\text{L}$ のハイブリダイゼーション緩衝液 (1.5 GuSCN、8 mM EDTA、40 mM Tris、pH 7.4) 中 2×10^7 の量のレポータービーズを添加して、捕捉ビーズを洗浄した。ビーズを再懸濁し、37 °C でさらに 3 時間混合しながら培養した。培養後、捕捉ビーズを磁氣的に濃縮し、未結合レポータービーズを含む上清を除去した。 100 マイクロリットルの洗浄緩衝液 (145 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.5、0.1% SDS、0.05% Tween、0.25% NFD M (脱脂粉乳)、10 mM EDTA) を添加し、ビーズを再懸濁した。ビーズを磁氣的に濃縮し、上清を再び除去した。この洗浄手順を 2 回繰り返した。

30

40

【0419】

E. 標的 DNA の定量

二重ビーズ複合体を $250 \mu\text{L}$ の PBS に再懸濁し、標的の量を、励起 = 500 nm、スリット 2.0、発光 = 530 nm、スリット = 2.0 で、蛍光測定器 Fluoromax-2 により定量した。別法として、蛍光レポータービーズの数を、上述のような光バイオディスク読み取り装置により定量することができる。

【実施例 18】

【0420】

以下の実施例は、図 37 に関連して説明した光磁気バイオディスク 110 などの磁氣的に書き込み可能かつ消去可能な分析ディスクで実行される二重ビーズ検定を説明する。

50

【0421】

この実施例では、男性に存在するが女性には存在しない遺伝子配列 D Y S を検出するために二重ビーズ検定を実行した。検定物は、共有結合した輸送プローブで被覆された 3 μ m の磁気捕捉ビーズ (Spherotech, Libertyville, IL)、共有結合した D Y S 遺伝子に特異的な配列で被覆された 2 . 1 μ m の蛍光レポータービーズ (Molecular Probes, Eugene, OR)、および D Y S 配列を含む標的 D N A 分子から構成される。標的 D N A は、合成の 80 オリゴヌクレオチド長である。輸送プローブおよびレポータープローブは、40 ヌクレオチド長であり、D Y S 配列と相補的であるが互いには相補的ではない。

【0422】

検定物の調製に用いられる特定の方法は、100 μ g / m l のサケ精子 D N A 中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを伴った。この前処理により、標的 D N A の非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減する。 10

【0423】

サケ精子 D N A での前処理後、捕捉ビーズを、注入ポートを介して M O バイオディスク内にロードした。M O バイオディスクは、光磁気ドライブにより形成された磁性領域を含む。これにより、捕捉ビーズは M O バイオディスクの特定の磁性領域内に保持される。

【0424】

次に、200 μ l のハイブリダイゼーション緩衝液 (0 . 2 M N a C l、1 m M E D T A、10 m M M g C l₂、50 m M T r i s - H C l、p H 7 . 5、および 5 \times デンハルト混合物、10 μ g / m l の変性サケ精子 D N A) 中の標的 D N A およびレポータービーズを含むサンプルを、注入ポートを介して M O バイオディスクに添加する。次に注入ポートを密閉する。磁界を解放する。ディスクをドライブにおいて非常に低速 (800 r p m 未満) で回転させて、捕捉ビーズへの標的 D N A およびレポータービーズのハイブリダイゼーションを促進させる。ドライブの温度は常に 33 $^{\circ}$ に保つ。2時間のハイブリダイゼーション後、光磁気ドライブにより磁界を生成する。この段階で、未結合であるかまたは二重ビーズ複合体の一部としての磁気捕捉ビーズのみが M O バイオディスクに残る。未結合の標的およびレポータービーズを、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。次に、200 マイクロリットルの洗浄緩衝液 (145 m M N a C l、50 m M T r i s、p H 7 . 5、0 . 1 % S D S、0 . 05 % T w e e n、0 . 25 % N F D M (脱脂粉乳)、10 m M E D T A) を添加する。磁界を解放し、ディスクを低速 (800 r p m 未満) で5分間回転させて、捕捉ビーズとレポータービーズとのいかなる非特異的結合も除去する。次に磁界を再印加する。洗浄緩衝液を、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。この洗浄手順を2回繰り返す。 20 30

【0425】

この段階で、未結合であるかまたは二重ビーズ複合体の一部としての磁気捕捉ビーズのみが残る。磁界を解放し、二重ビーズ複合体を検出チャンバに導く。次に、捕捉された標的 D N A の量を、捕捉磁気ビーズの数およびレポータービーズの数を定量することにより確定する。これは、図 28 A、図 28 B、図 29 A、および図 29 B で上述したように、各タイプのビーズが別個のシグネチャを有するからである。 40

【実施例 19】

【0426】

この実施例では、図 32 および図 37 に関連して上述した多重化技法を用いた二重ビーズ検定を、図 37 を参照して説明した M O バイオディスク 110 などの磁気的に書き込み可能かつ消去可能な分析ディスクで実行する。

【0427】

2つ以上の D N A 標的を同時に検出するために二重ビーズ検定を実行する。検定物は、3 μ m の磁気捕捉ビーズ (Spherotech, Libertyville, IL) から構成される。磁気捕捉ビーズの1つの集団を D N A 標的 1 と相補的な輸送プローブ 1 で被覆する。磁気捕捉ビーズの別の集団を D N A 標的 2 と相補的な輸送プローブ 2 で被覆する。別法として、2つ以上 50

の異なるタイプの磁気捕捉ビーズを用いてもよい。検定では2つ以上の別個のタイプのレポータービーズがある。これらのレポータービーズは、化学組成物（例えばシリカおよびポリスチレン）および/またはサイズが異なってもよい。1つのタイプのレポータービーズを、DNA標的1と相補的なレポータープロンプ1で被覆する。他のレポータービーズは、DNA標的2と相補的なレポータープロンプ2で被覆する。この場合も、輸送プロンプおよびレポータープロンプは、各標的とは相補的であるが、互いには相補的ではない。

【0428】

二重ビーズ検定多重化の調製に用いられる特定の方法は、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のサケ精子DNA中で 1×10^7 の捕捉ビーズおよび 2×10^7 のレポータービーズを室温で1時間処理することを伴った。この前処理により、標的DNAの非存在下での捕捉ビーズとレポータービーズとの非特異的結合が低減する。

10

【0429】

サケ精子DNAでの前処理後、捕捉ビーズをMOバイオディスクにロードする。特定の捕捉ビーズに対して異なる磁気領域を形成するために磁界を印加する。捕捉ビーズは、 $10 \mu\text{m}^2$ あたり1つの捕捉ビーズの密度で、MOバイオディスク上に保持することができる。MOバイオディスクにビーズが堆積するのに使用可能な表面積は、約 $3 \times 10^9 \mu\text{m}^2$ である。所与の密度の $3 \mu\text{m}$ のビーズに対するMOバイオディスクの容量は、約 3×10^8 ビーズである。

【0430】

対象となる標的DNAを含むサンプルを、 $200 \mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション緩衝液（ 0.2M NaCl 、 1mM EDTA 、 10mM MgCl_2 、 50mM Tris-HCl 、 $\text{pH } 7.5$ 、および $5 \times$ デンハルト混合物、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子DNA）中で種々のタイプのレポータービーズと混合し、注入ポートを介してMOバイオディスクに添加する。次に注入ポートを密閉する。磁界を解放する。ディスクをドライブにおいて非常に低速（ 800rpm 未満）で回転させて、種々のタイプの捕捉ビーズへの標的DNAおよびレポータービーズのハイブリダイゼーションを促進させる。ドライブの温度は常に 33°C に保つ。2～3時間のハイブリダイゼーション後、光磁気ドライブにより磁界を再生成する。この段階で、未結合であるかまたは二重ビーズ複合体の一部としての磁気捕捉ビーズのみがMOバイオディスクに残る。未結合の標的およびレポータービーズを、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。次に、 200 マイクロリットルの洗浄緩衝液（ 145mM NaCl 、 50mM Tris 、 $\text{pH } 7.5$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 $0.05\% \text{ Tween}$ 、 $0.25\% \text{ NFDM}$ （脱脂粉乳）、 10mM EDTA ）を添加する。磁界を解放し、ディスクを低速（ 800rpm 未満）で5分間回転させて、捕捉ビーズとレポータービーズとのいかなる非特異的結合も除去する。次に磁界を再印加する。洗浄緩衝液を、上述の機構のいずれかにより廃液チャンバに導く。この洗浄手順を2回繰り返す。

20

30

【0431】

この段階で、磁界を解放し、二重ビーズ複合体を検出チャンバに導く。種々のタイプの標的DNAの量は、対応する捕捉磁気ビーズおよびレポータービーズの数を定量することにより確定することができる。これは、上記の図28A、図28B、図29A、および図29Bに示したように、各タイプのビーズが別個のシグネチャを有するからである。

40

【実施例20】

【0432】

A. 常磁性ビーズに結び付いたモノクローナルCD4抗体を用いた、AIDS患者におけるTヘルパー細胞の分離

サンプル（全血または単核細胞）を、混合/ロードチャンバに注入し、このチャンバで、抗CD4被覆常磁性ビーズ（生体磁気粒子）と混合する。15分間の培養後、常磁性ビーズをCD4+細胞に結合させるために、MODライブのレーザを用いて、流路または分析チャンバ内に磁区を形成する。次に、標的CD4+細胞をこれらの磁区に結合させ、デ

50

ディスクが所定の速度および時間で回転すると、タグ付けされていない細胞および細胞成分がフロー流路を進んで廃液チャンバに移動するようにする。次に、磁区に結合したCD4+細胞の数をMO読み取り装置により定量する。このようにして求められたCD4+細胞の数は、患者の健康状態を示す。

【0433】

B. 選択されたTヘルパー細胞の操作

CD4+細胞が他の細胞成分から分離された後、次に磁区を消去する。次に、ディスクを所定の速度および方向に回転させて、新たに解放されたCD4+細胞がフロー流路を通じて異なる試験チャンバに移動するようにし、ここで細胞が、そのHIV分解に対する感受性を低減し得る種々の薬物治療に付される。流体回路の設計およびディスクの回転速度および方向は、日常的な実験のみによって当業者により決定されることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0434】

【図1】本発明による光ディスクシステムの斜視図である。

【図2】本発明の実施の形態による光学式読み取りシステムのブロックイラスト図である。

【図3A】本発明の実施の形態による反射型ディスクの分解図である。

【図3B】本発明の実施の形態による反射型ディスクの上面図である。

【図3C】本発明の実施の形態による反射型ディスクの斜視図である。

【図4A】本発明の実施の形態による透過型ディスクの分解図である。

20

【図4B】本発明の実施の形態による透過型ディスクの上面図である。

【図4C】本発明の実施の形態による透過型ディスクの斜視図である。

【図5】Aは、内部に形成されたウォブル溝を示す、図3A、図3B、および図3Cに示す反射型光ディスクの長手方向部分断面図である。Bは、内部に形成されたウォブル溝を示す、図4A、図4B、および図4Cに示す透過型光バイオディスクの長手方向部分断面図である。

【図6】Aは、図5Aに示すディスクの半径方向部分断面図である。Bは、図5Bに示すディスクの半径方向部分断面図である。

【図7】Aは、遺伝的検定に関連して利用される捕捉ビーズの概略表現である。Bは、免疫化学的検定に関連して用いられる捕捉ビーズの概略表現である。

30

【図8】Aは、遺伝的検定に関連して利用される捕捉ビーズの概略表現である。Bは、免疫化学的検定に関連して用いられる捕捉ビーズの概略表現である。

【図9】Aは、遺伝的検定に関連して利用されるレポータービーズの概略表現である。

Bは、免疫化学的検定に関連して用いられるレポータービーズの概略表現である。

【図10】Aは、遺伝的検定に関連して利用される二重ビーズ複合体の概略表現である。

Bは、免疫化学的検定に関連して用いられる二重ビーズ複合体の概略表現である。

【図11A】遺伝的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の一実施の形態のイラスト表現である。

【図11B】免疫化学的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の一実施の形態のイラスト表現である。

40

【図12A】遺伝的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の別の実施の形態のイラスト表現である。

【図12B】免疫化学的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の別の実施の形態のイラスト表現である。

【図13】混合またはロードチャンバと組み合わせたディスク層を示す長手方向断面図である。

【図14】二重ビーズ複合体溶液がロードされた混合チャンバを示す図13と同様の図である。

【図15】遺伝的検定において薬剤を捕捉するためのレポータービーズの結合の一実施の形態を示す、ディスクおよび標的領域の半径方向断面図である。

50

【図16】遺伝的検定において薬剤を捕捉するためのレポータービーズの結合の別の実施の形態を示す、ディスクおよび標的領域の半径方向断面図である。

【図17】遺伝的検定において薬剤を捕捉するための捕捉ビーズの結合の一実施の形態を示す、ディスクおよび標的領域の半径方向断面図である。

【図18】遺伝的検定において薬剤を捕捉するための捕捉ビーズの結合の別の実施の形態を示す、ディスクおよび標的領域の半径方向断面図である。

【図19】遺伝的検定において二重ビーズ複合体のレポータービーズを捕捉層に結合させる本発明による方法の一実施の形態を示す部分断面図を示す。

【図20】免疫化学的検定において二重ビーズ複合体のレポータービーズを捕捉層に結合させる本発明による方法の一実施の形態を示す部分断面図を示す。

【図21】遺伝的検定において二重ビーズ複合体のレポータービーズを捕捉層に結合させる本発明による方法の別の実施の形態を示す部分断面図を示す。

【図22】免疫化学的検定において二重ビーズ複合体のレポータービーズを捕捉層に結合させる本発明による方法の別の実施の形態を表す部分断面図を示す。

【図23】遺伝的検定において二重ビーズ複合体の捕捉ビーズを捕捉層に結合させる本発明による方法の一実施の形態を示す部分断面図を示す。

【図24】Aは、遺伝的検定において二重ビーズ複合体の捕捉ビーズを捕捉層に結合させる本発明による方法の別の実施の形態を示す部分断面図を示す。Bは、遺伝的検定

において二重ビーズ複合体のレポータービーズを捕捉層に結合させる本発明による方法の別の実施の形態を示す部分断面図を示す。

【図25】光バイオディスクを利用して遺伝サンプル中の標的DNAまたはRNAの存在を検出する本発明による方法を示す。

【図26】光バイオディスクを利用して遺伝サンプル中の標的DNAまたはRNAの存在を検出する本発明による別の方法を示す。

【図27】光バイオディスクを利用して生体試験サンプル中の標的抗原の存在を検出する本発明による方法を示す。

【図28】Aは、本発明による光バイオディスクのトラックに対して位置付けられた個別の $2.1\mu\text{m}$ レポータービーズおよび $3\mu\text{m}$ 捕捉ビーズのグラフィカル表現である。

Bは、本発明による光ドライブからの検出信号を利用して図28Aのビーズから得られる一連のシグネチャトレースである。

【図29】Aは、本発明による光バイオディスクのトラックに対して位置付けられた、共に連結して二重ビーズ複合体になった $2.1\mu\text{m}$ レポータービーズおよび $3\mu\text{m}$ 捕捉ビーズのグラフィカル表現である。Bは、本発明による光ドライブからの検出信号を利用して図29Aの二重ビーズ複合体から得られる一連のシグネチャトレースである。

【図30A】本発明による二重ビーズ検定からの結果を示す棒グラフである。

【図30B】蛍光測定器を用いて検出された蛍光ビーズの検出限界を示す標準曲線を示す棒グラフである。

【図30C】二重ビーズ複合体の形成を説明するイラスト表現である。

【図31】二重ビーズ複合体を用いるディスクドライブ検出の感度を示す棒グラフである。

【図32】本発明の実施の形態による二重ビーズ検定多重化のためのビーズの結合の概略表現である。

【図33-1】磁気ビーズの移動を制御する磁界発生器に関連して利用される、本発明による流体回路の概略表現である。

【図33-2】本発明の流体輸送態様の一実施の形態による、図33Aの弁構造を実施する第1の流体回路の概略図である。

【図34】本発明の流体輸送態様の別の実施の形態による、図33Aの弁構造を実施する第2の流体回路の概略図である。

【図35】磁界発生器と、本発明による磁気ビーズに関連して用いられる流体回路の一実施の形態を含むディスクとの斜視図である。

10

20

30

40

50

【図36】図35に示す流体回路を用いた二重ビーズ検定のための分離および検出の方法を示す平面図である。

【図37】本発明の別の態様による、磁区すなわち磁性領域、磁氣的に結合した捕捉ビーズ、および二重ビーズ複合体の形成を示す光磁気バイオディスクの斜視図である。

【図38】捕捉ビーズとレポータープローブとの間に共有結合を形成するライゲーションの使用を示す。

【図39】ライゲーション実験において酵素検定により検出された遺伝試験からの結果を示す棒グラフである。

【図40】ライゲーションを行った場合および行っていない場合の2.1 μmレポータービーズを用いて結合したビーズの数を標的濃度に応じて比較した棒グラフである。

【図41】ライゲーションを行った場合および行っていない場合の39量体ブリッジを用いて結合したビーズの数を標的濃度に応じて比較した棒グラフである。

【図42A】本発明による切断可能または置換可能なスペースを用いて二重ビーズ複合体で用いられるDNA配列を含む種々のプローブ構造の概略表現である。

【図42B】標的の結合前に二重ビーズ複合体を接続する切断可能スペースを示すイラストによる概略表現である。

【図42C】標的の結合後に二重ビーズ複合体を接続するNotIを含む切断可能スペースを示す、図42Bと同様の図である。

【図42D】標的の結合後およびNotIによる切断後の二重ビーズ複合体を示す、図42Cと同様の図である。

【図43A】標的の結合前に二重ビーズ複合体を接続する置換可能スペースを示すイラストによる概略表現である。

【図43B】標的の結合後に二重ビーズ複合体を接続する置換可能スペースへの置換プローブの最初の結合を示す、図43Aと同様の図である。

【図43C】標的媒介結合の存在下で二重ビーズ複合体を接続する置換プローブの完全な置換を示す、図43Bと同様の図である。

【図44】本発明による捕捉ビーズに共有結合する切断可能スペースのイラスト表現である。

【図45】金属レポータービーズに共有結合する切断可能スペースに結び付いたチオール基を示す、図44と同様の図である。

【図46-1】Aは、標的の結合前に切断可能スペースにより共に結合された一对の二重ビーズ複合体のイラスト表現である。

【図46-2】Bは、標的の結合後および標的の結合がない場合の切断可能スペースにより共に結合された二重ビーズ複合体を示す、図46Aと同様の図である。Cは、酵素切断後に解離した二重ビーズ複合体のうち的一方と、標的の存在により結合された他方を示す、図46Bと同様の図である。

【図47-1】Aは、一对の切断可能スペースにより形成された二重ビーズ複合体と、標的に結合したブリッジの使用とのイラスト表示である。

【図47-2】Bは、2つの切断箇所を含む二重螺旋となる、ブリッジを含む標的結合後の図47Aと同様の図である。Cは、切断可能スペースの制限消化および二重螺旋の切断箇所のライゲーションの後の、図47Bと同様の図である。

【図48A】標的抗原結合の前に免疫化学的検定において実施される、一对の切断可能スペースによりそれぞれが共に接合された2つの二重ビーズ複合体のイラスト表現である。

【図48B】標的結合がある場合およびない場合の切断可能スペースにより共に結合された二重ビーズ複合体を示す、図48Aと同様の図である。

【図48C】酵素消化後に解離した二重ビーズ複合体のうち的一方と、標的の存在により共に結合された他方を示す、図48Bと同様の図である。

【図49】プローブの共有結合のために固相を評価する方法を提示する概略図である。

【図50】固体基板に共有結合したプローブおよび非共有結合したプローブの定量の種々のステップを詳細に示す概略図である。

10

20

30

40

50

【図 5 1】A は、プローブの共有結合のための磁気ビーズ担体の種々の試験の実験結果のグラフ表示である。 B は、プローブの共有結合のための蛍光ビーズ担体の種々の試験の実験結果のグラフ表示である。

【図 5 2 A】プローブとしてのその使用に関連する一本鎖 DNA と二本鎖 DNA との構造的相違を示すイラスト表現である。

【図 5 2 B】固相への一本鎖および二本鎖 DNA の結合特性を評価するように計画された実験の結果のグラフ表示である。

【図 5 3】A は、二重ビーズ検定で用いる 2 つの異なる捕捉ビーズのスクリーンの酵素検定結果であって、プローブが共有結合しているか非共有結合しているかにかかわらず、試験したビーズの両方が同様の量の標的に結合することを示す結果のグラフ表示である。

B は、2 つの異なる捕捉ビーズにより捕捉されたレポータービーズの数を調べるように設計された二重ビーズ検定の結果であって、捕捉ビーズへのプローブの共有結合により検定感度が大幅に向上することを示す結果のグラフ表示である。

【図 5 4】プローブへの PEG リンカーの導入により標的媒介結合が著しく向上することを説明するグラフ表示である。

【図 5 5】3 μ m ビーズを用いたプローブ密度測定を示す棒グラフ表示である。

【図 5 6】非特異的結合を 10 分の 1 に低減した、サケ精子 DNA を含む種々の界面活性剤でのビーズの前処理を示す棒グラフ表示である。

【図 5 7】二重ビーズ検定の検出範囲を示す棒グラフ表示である。

【図 5 8】様々な濃度の NaCl の使用および関連する非特異的結合を示す棒グラフである。

【図 5 9】EDTA 濃度の上昇および関連する非特異的結合を示す棒グラフ表示である。

【図 6 0】NaCl 濃度の上昇および関連する非特異的結合を示す棒グラフ表示である。

【図 6 1】MgCl₂ の濃度の上昇および関連する非特異的結合を示す棒グラフ表示である。

【図 6 2】ビーズ検定の感度を高めるためのプローブ遮断剤の使用を示すイラストによる概略表現である。

【図 6 3】ハイブリダイゼーション反応中の培養時間の影響を示す棒グラフ表示である。

【図 6 4】二重ビーズ結合の効率を高めることを目的とした混合方法を示す棒グラフ表示である。

【図 6 5 A】図 6 5 B と合わせて、図 1 1 A に関連して説明した方法に関する遺伝的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の別の実施の形態のイラスト表現を構成する。

【図 6 5 B】図 6 5 A と合わせて、図 1 1 A に関連して説明した方法に関する遺伝的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の別の実施の形態のイラスト表現を構成する。

【図 6 6 A】図 6 6 B と合わせて、図 1 1 B に示すものと同様の免疫化学的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の別の実施の形態のイラスト表現を形成する。

【図 6 6 B】図 6 6 A と合わせて、図 1 1 B に示すものと同様の免疫化学的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法の別の実施の形態のイラスト表現を形成する。

【図 6 7 A】図 6 7 B と合わせて、図 1 2 A に示す方法に関する遺伝的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法のさらに別の実施の形態のイラスト表現を示す。

【図 6 7 B】図 6 7 A と合わせて、図 1 2 A に示す方法に関する遺伝的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法のさらに別の実施の形態のイラスト表現を示す。

【図 6 8 A】図 6 8 B と合わせて、図 1 2 B に示すものと同様である免疫化学的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法のさらに別の実施の形態のイラスト表現を示す。

【図 6 8 B】図 6 8 A と合わせて、図 1 2 B に示すものと同様である免疫化学的二重ビーズ複合体溶液を生成する方法のさらに別の実施の形態のイラスト表現を示す。

【図 6 9】レポータービーズの非存在下での DNAse I 消化の効果を説明する棒グラフ表示である。

【図 7 0】DNAse I 酵素消化の効果による二重ビーズ検定の効率を示す棒グラフ表示である。

10

20

30

40

50

【図71】酵素消化および物理的または化学的処理による捕捉ビーズからのレポータービーズの分離の概略表現である。

【図72】塩基性溶液中での洗浄前および洗浄後の二重ビーズ複合体を示す棒グラフ表示である。

【図73A】7 Mの尿素溶液中での洗浄前および洗浄後の二重ビーズ複合体を示す棒グラフ表示である。

【図73B】尿素での洗浄後の解離レポータービーズの検出を含む、7 Mの尿素溶液中での洗浄前および洗浄後の二重ビーズ複合体を表す棒グラフ表示である。

【図74】二重ビーズ検定中の変性剤としての1.5 Mのグアニジンイソチオシアネートの使用を示す棒グラフ表示である。

【図75】二重ビーズ検定中に変性剤として用いられる様々な濃度のグアニジンイソチオシアネートを示す棒グラフ表示である。

【図76】流体回路を有する光磁気バイオディスクの一部の平面図である。

【図77A】図76に示す流体回路を用いて細胞を分離および試験する方法を示す平面図である。

【図77B】図76に示す流体回路を用いて細胞を分離および試験する方法を示す平面図である。

【図77C】図76に示す流体回路を用いて細胞を分離および試験する方法を示す平面図である。

【図77D】図76に示す流体回路を用いて細胞を分離および試験する方法を示す平面図である。

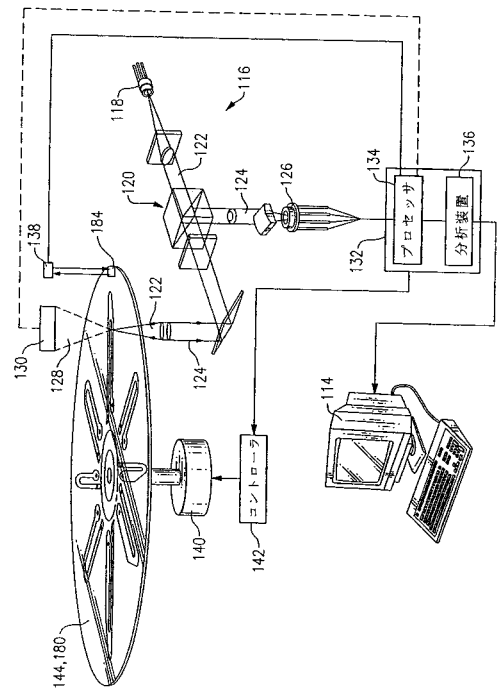
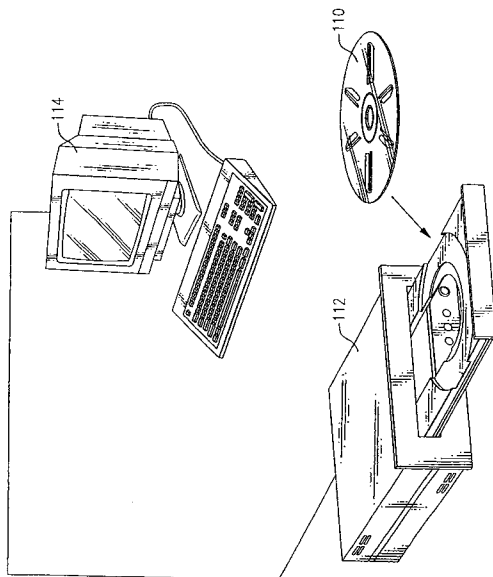
【図77E】図76に示す流体回路を用いて細胞を分離および試験する方法を示す平面図である。

10

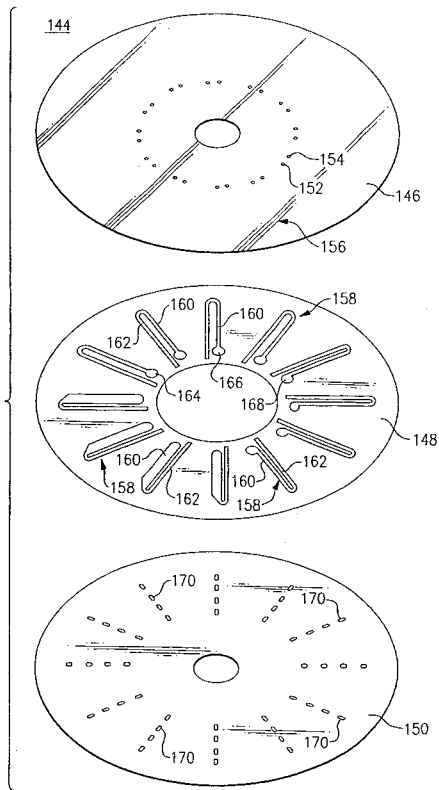
20

【図1】

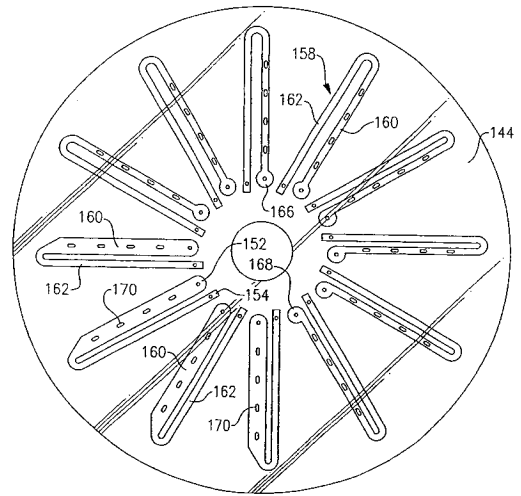
【図2】



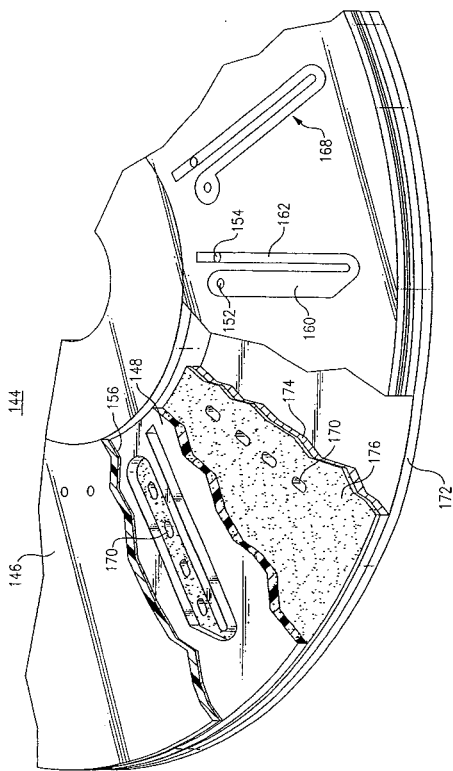
【 図 3 A 】



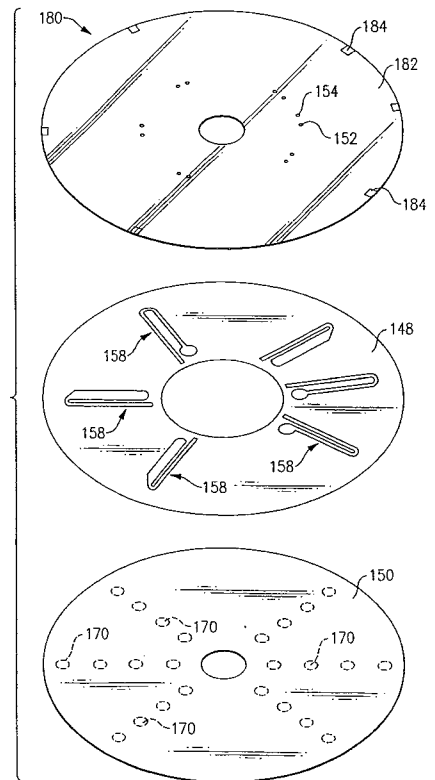
【 図 3 B 】



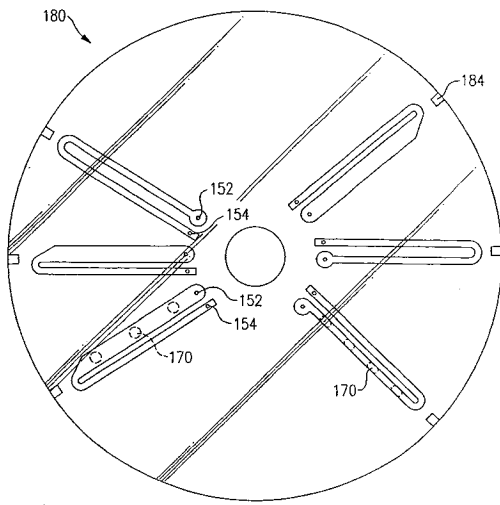
【 図 3 C 】



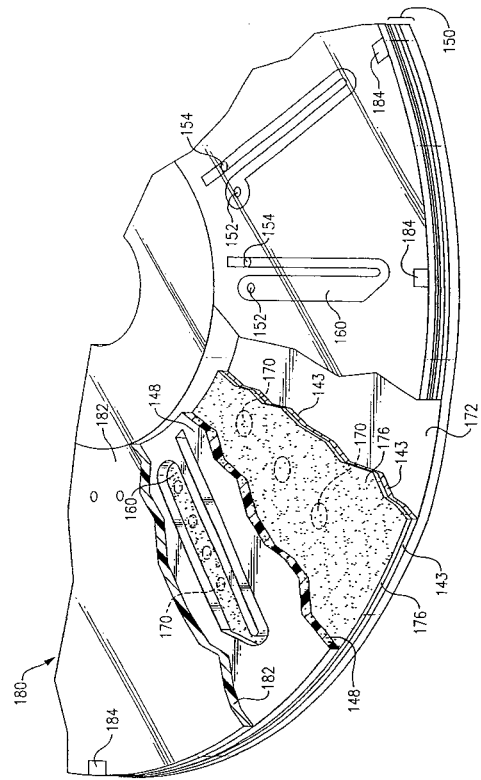
【 図 4 A 】



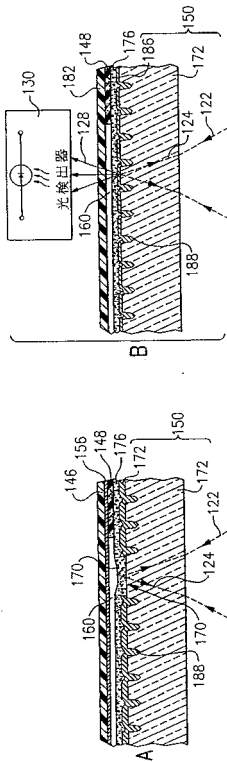
【 図 4 B 】



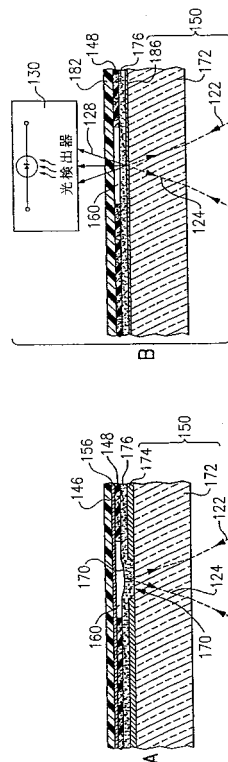
【 図 4 C 】



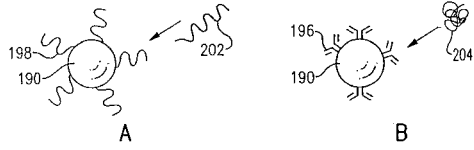
【 図 5 】



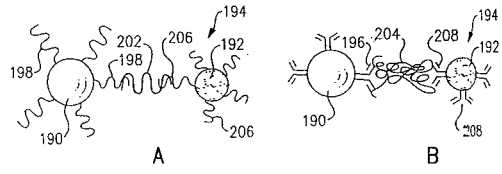
【 図 6 】



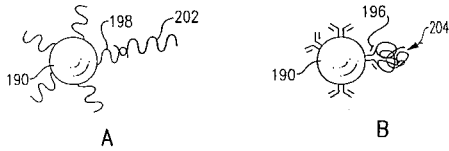
【 図 7 】



【 図 10 】



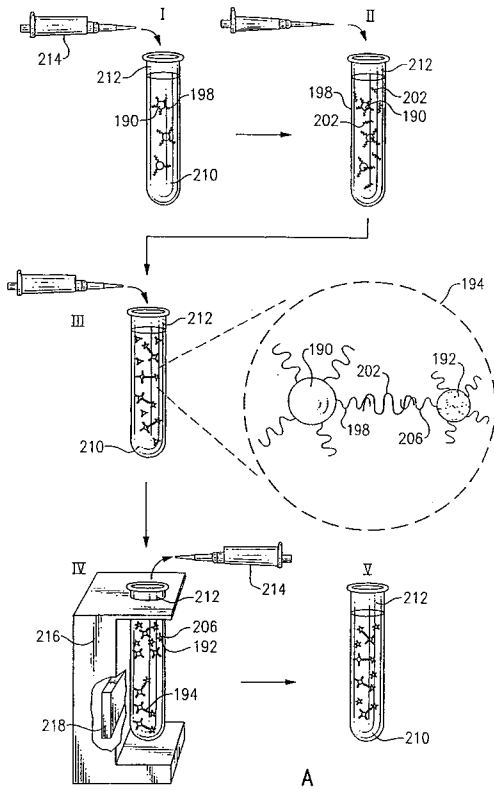
【 図 8 】



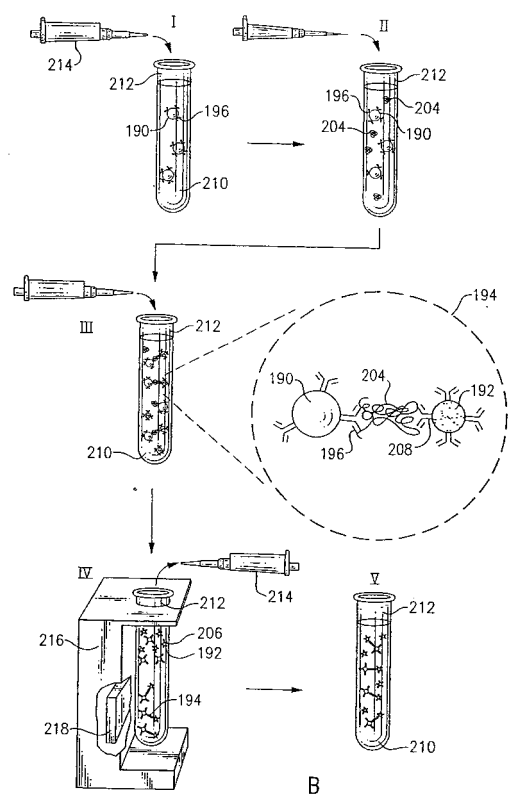
【 図 9 】



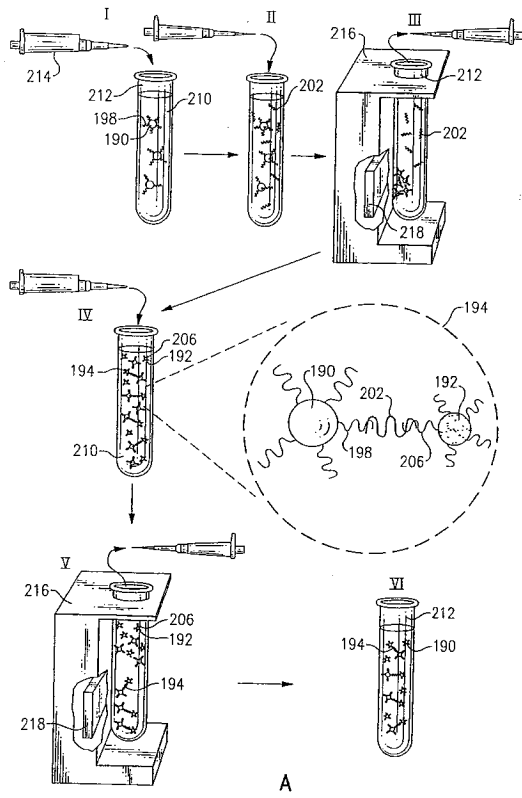
【 図 11 A 】



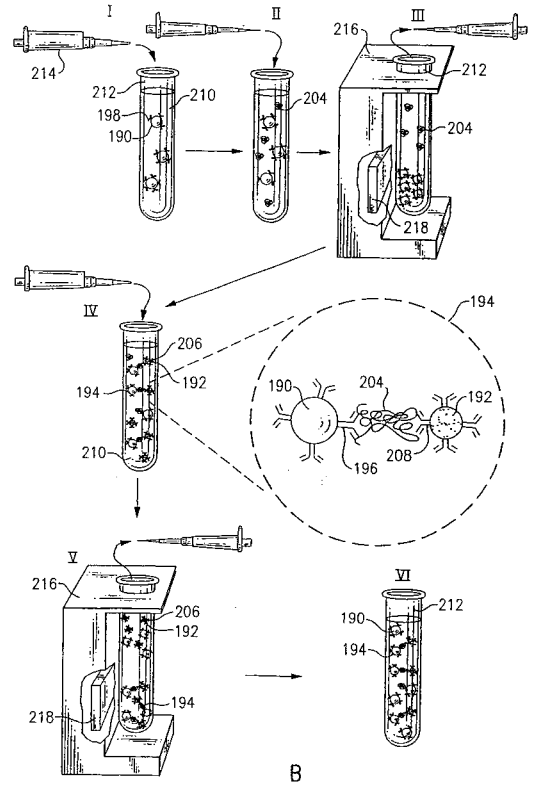
【 図 11 B 】



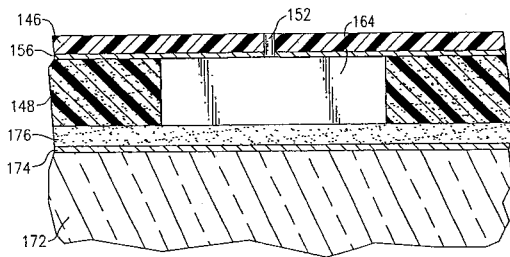
【 図 1 2 A 】



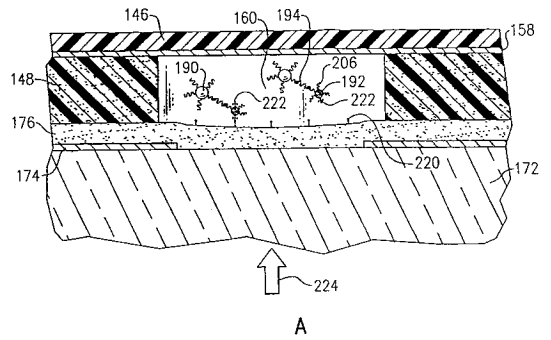
【 図 1 2 B 】



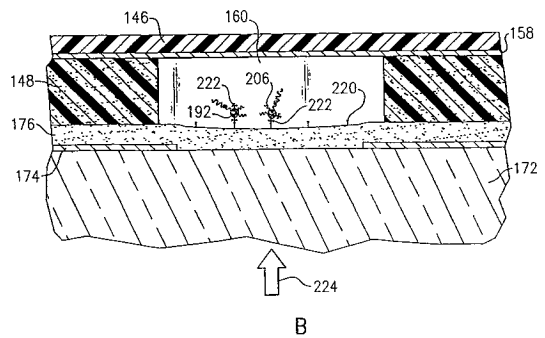
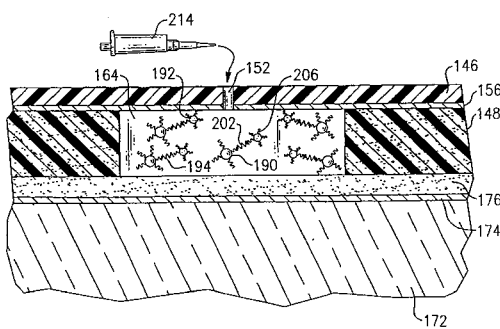
【 図 1 3 】



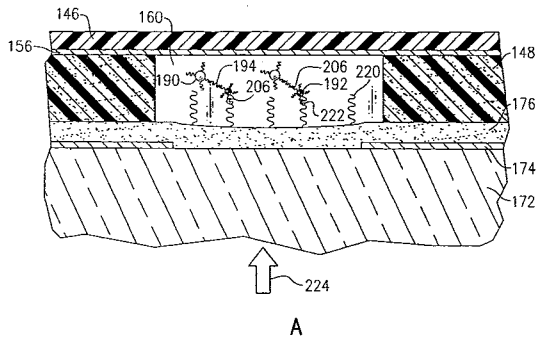
【 図 1 5 】



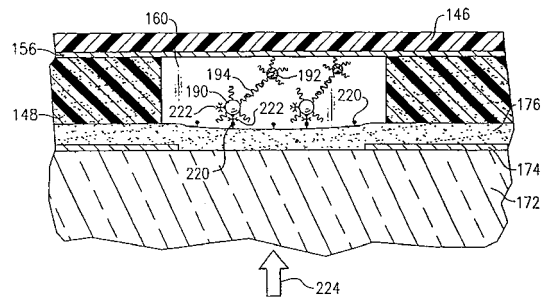
【 図 1 4 】



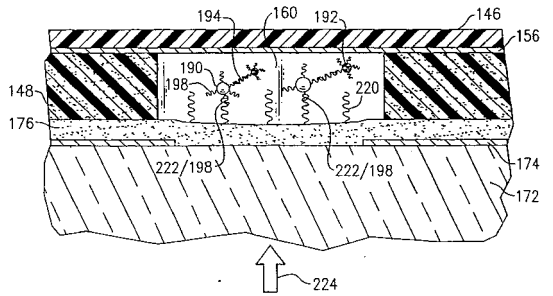
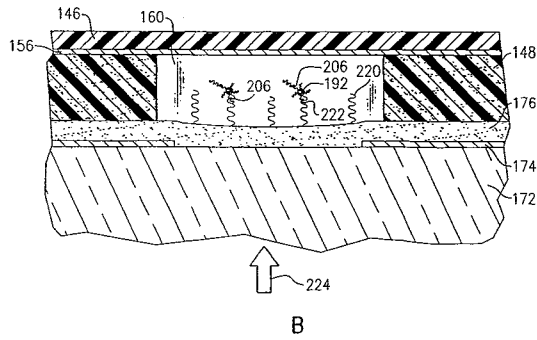
【図 16】



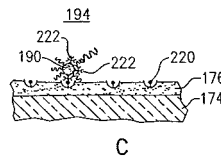
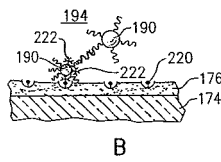
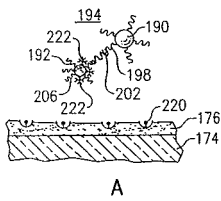
【図 17】



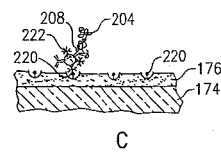
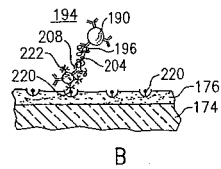
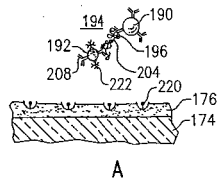
【図 18】



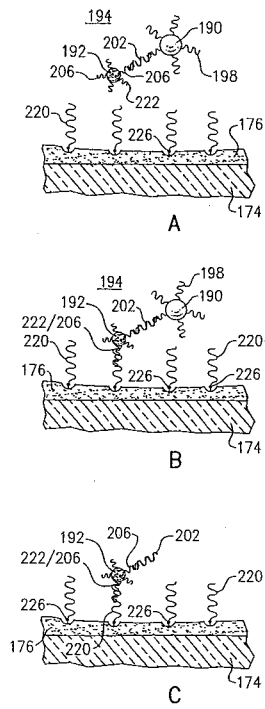
【図 19】



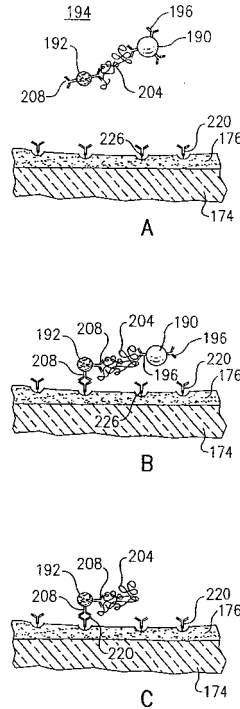
【図 20】



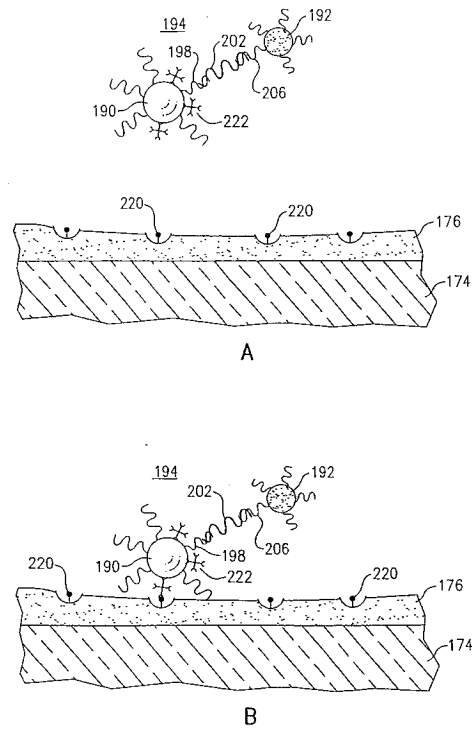
【 図 2 1 】



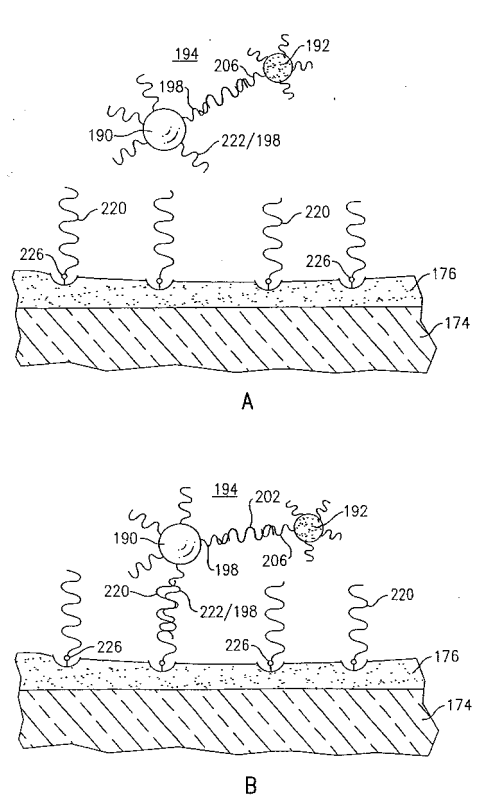
【 図 2 2 】



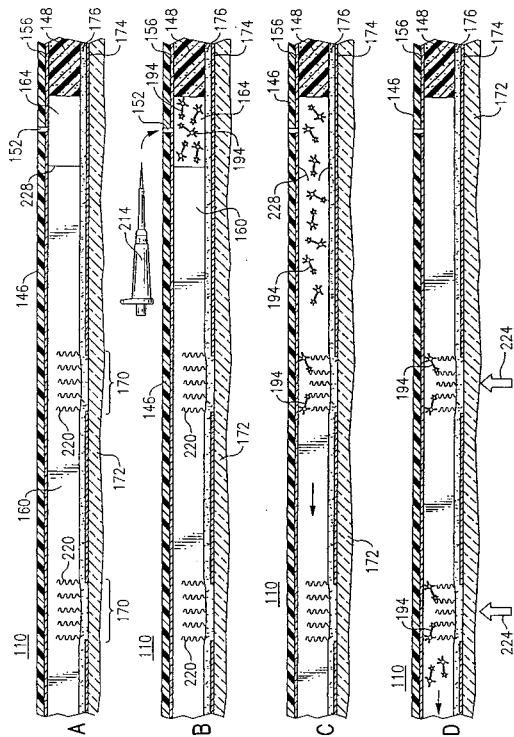
【 図 2 3 】



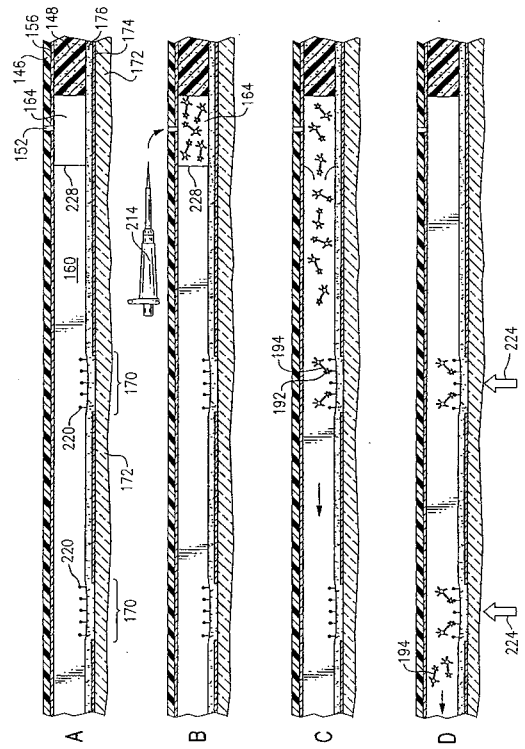
【 図 2 4 】



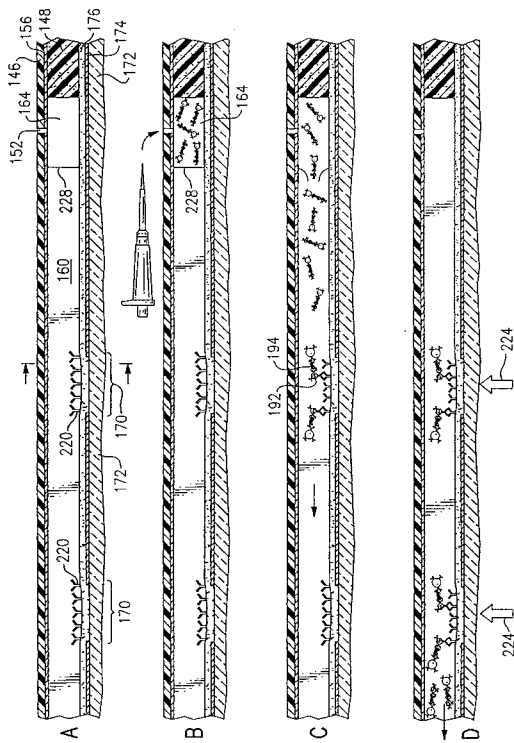
【図 25】



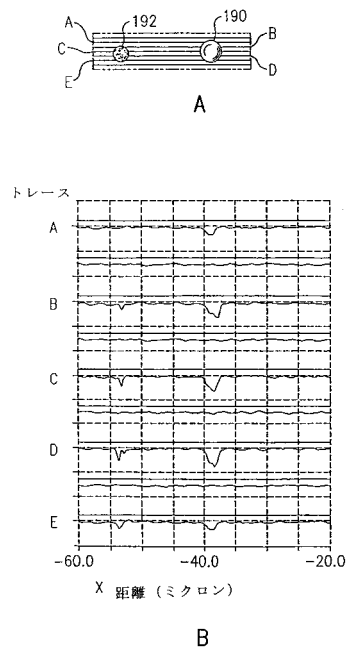
【図 26】



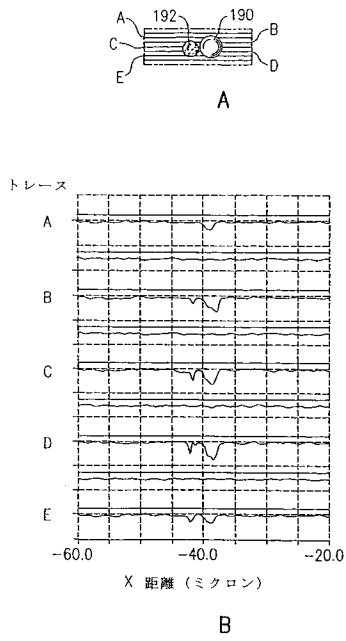
【図 27】



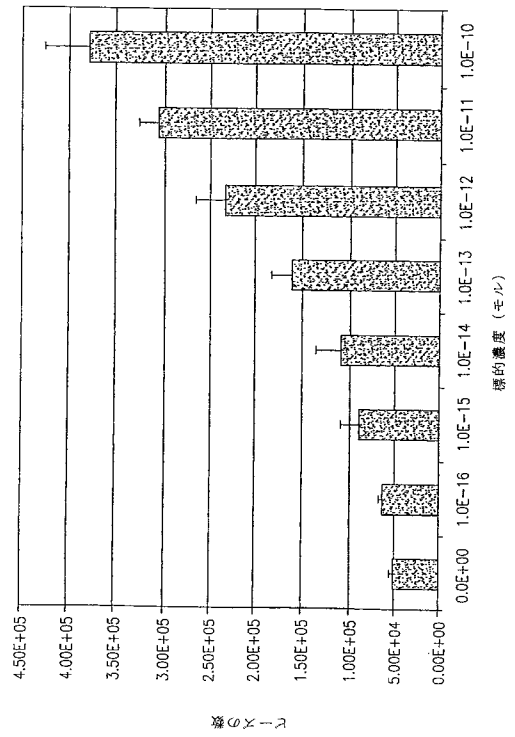
【図 28】



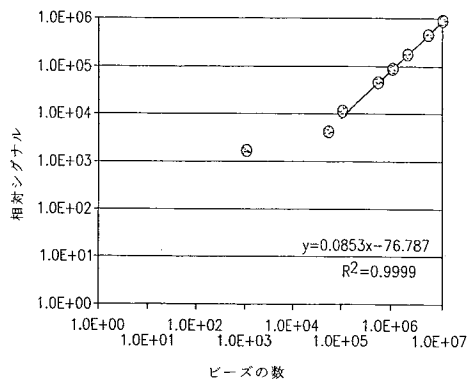
【図29】



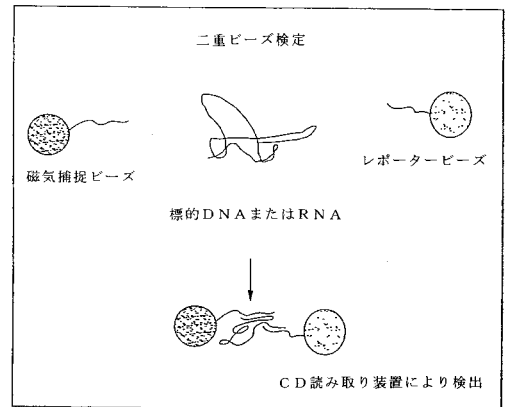
【図30A】



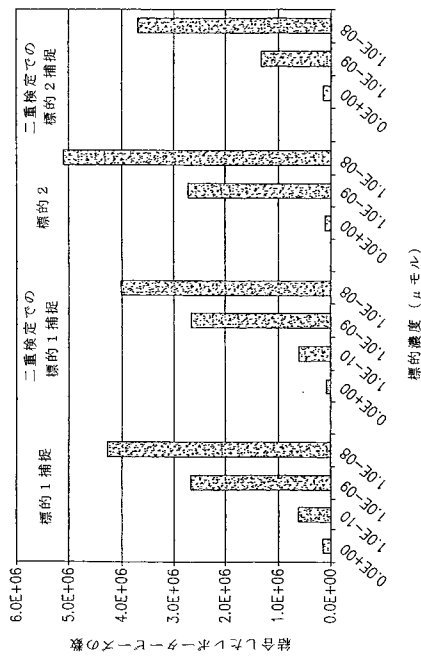
【図30B】



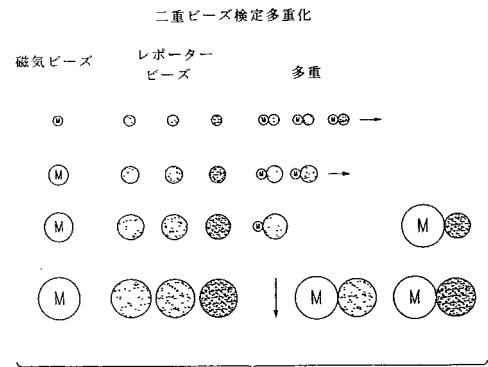
【図30C】



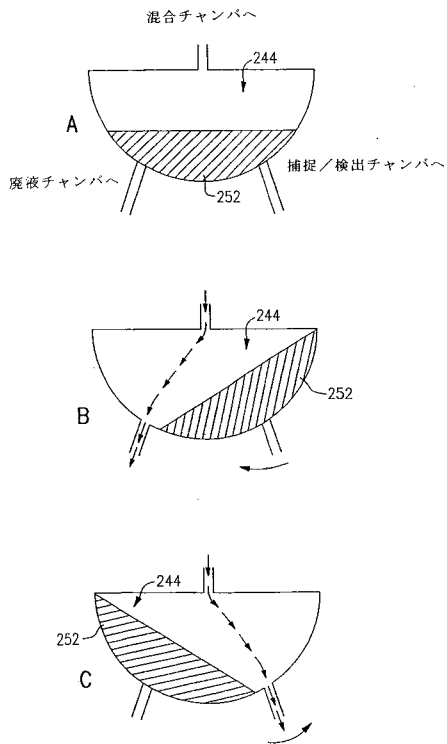
【 図 3 1 】



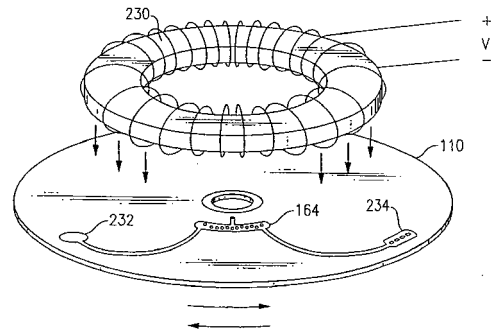
【 図 3 2 】



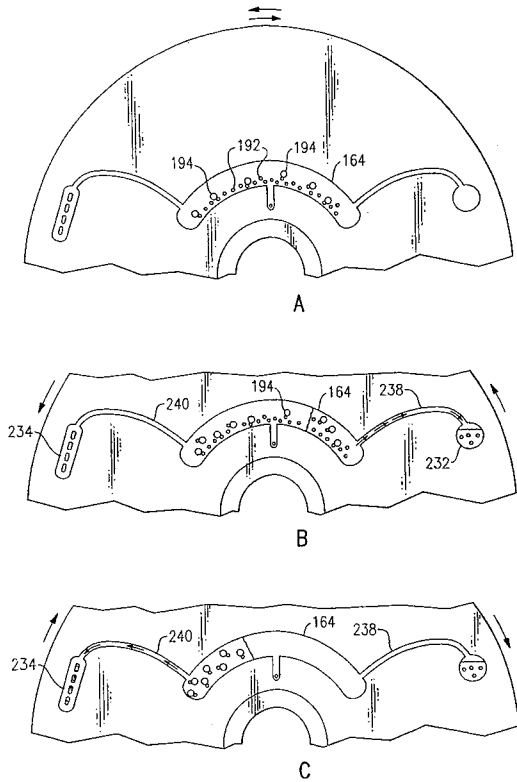
【 図 3 4 】



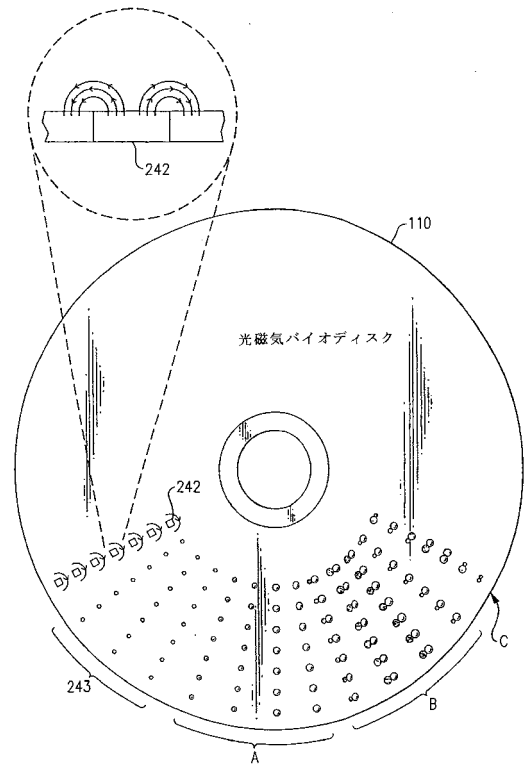
【 図 3 5 】



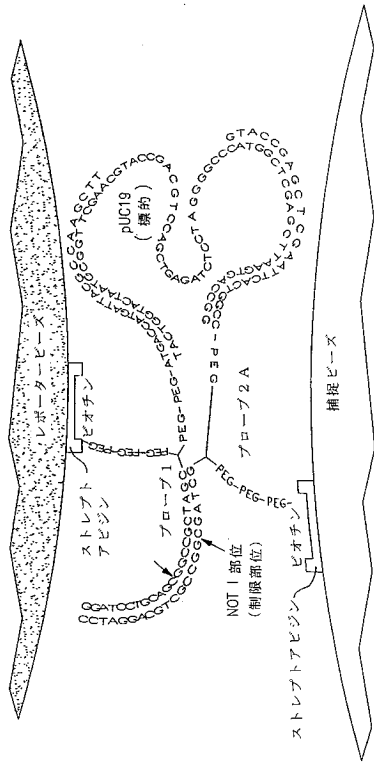
【 図 3 6 】



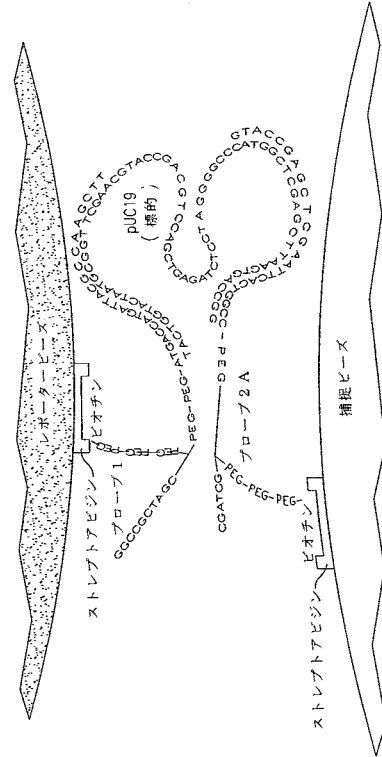
【 図 3 7 】



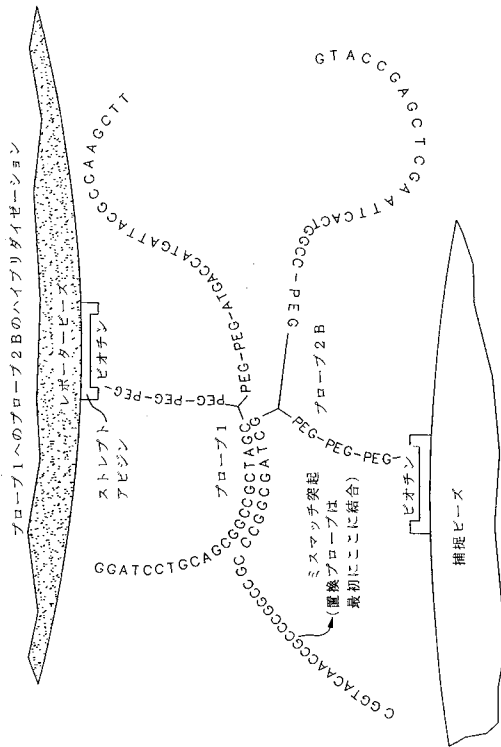
【図42C】



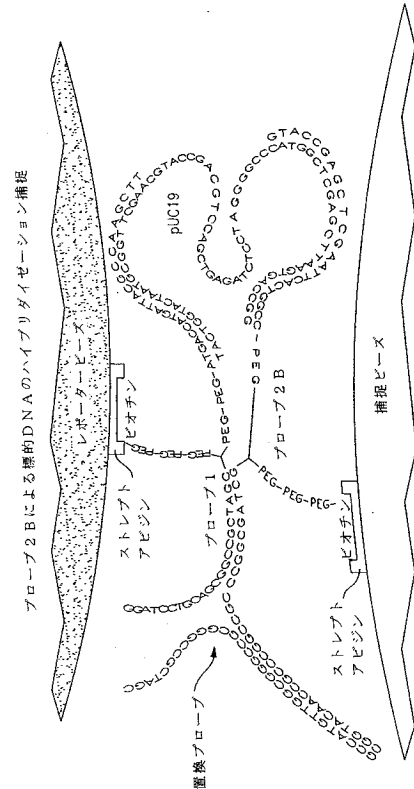
【図42D】



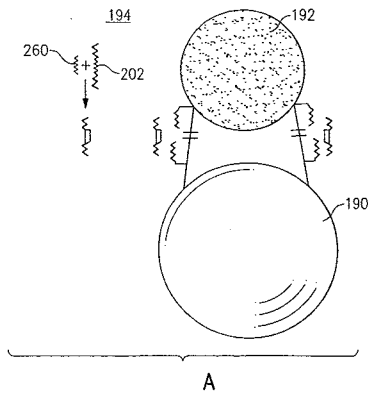
【図43A】



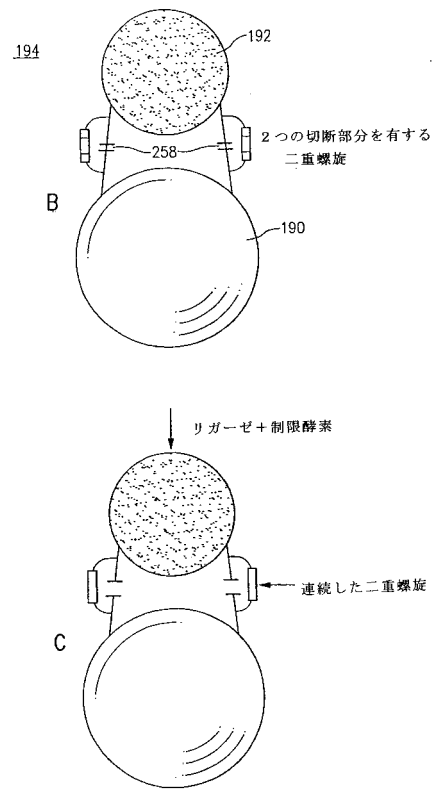
【図43B】



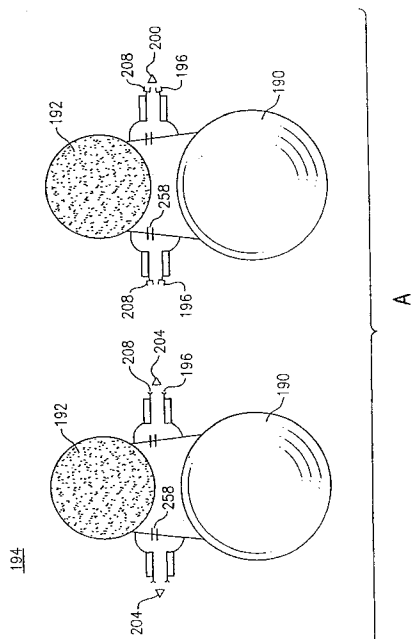
【図 47 - 1】



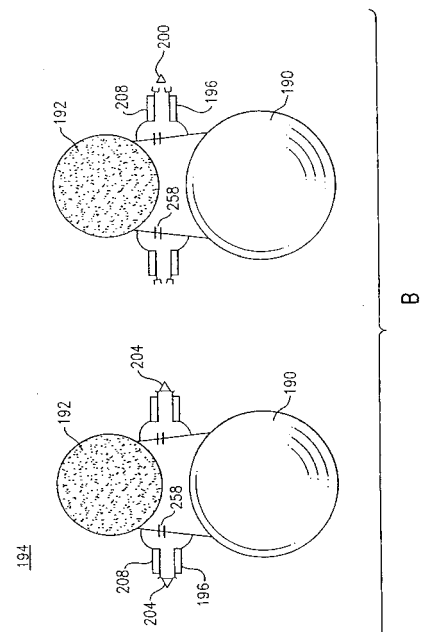
【図 47 - 2】



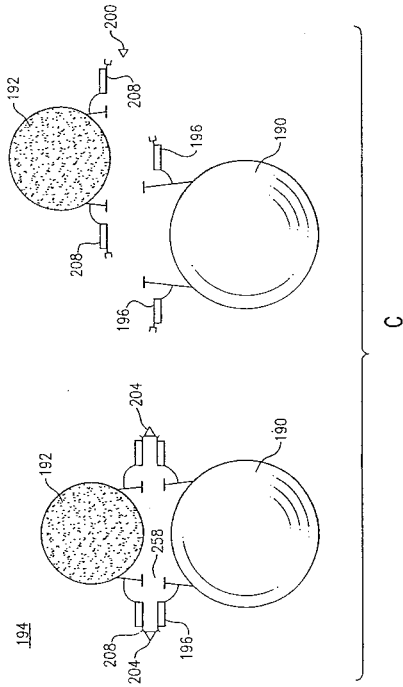
【図 48 A】



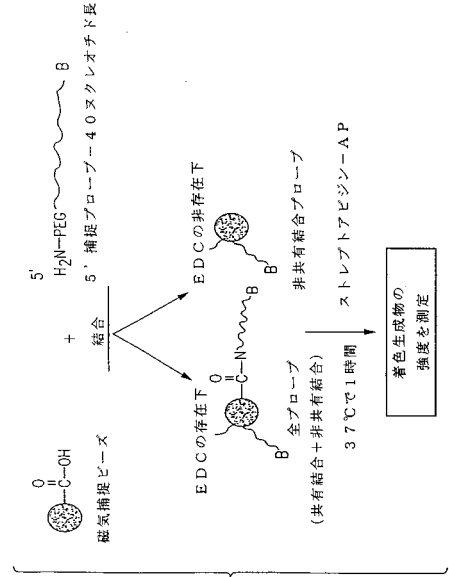
【図 48 B】



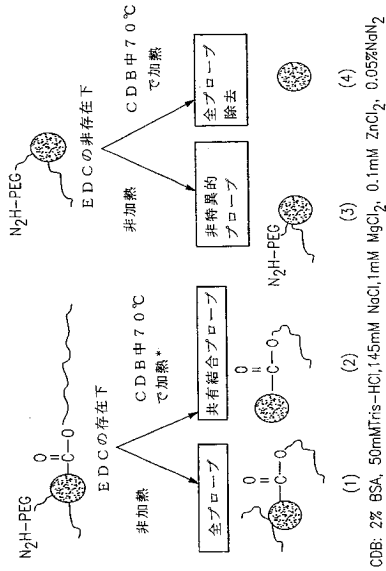
【 図 48 C 】



【 図 49 】

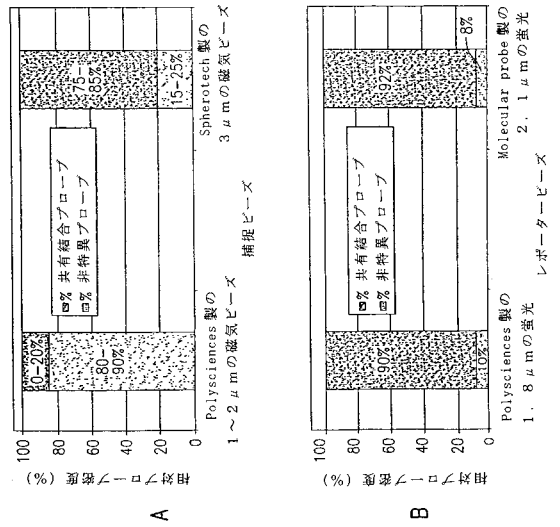


【 図 50 】

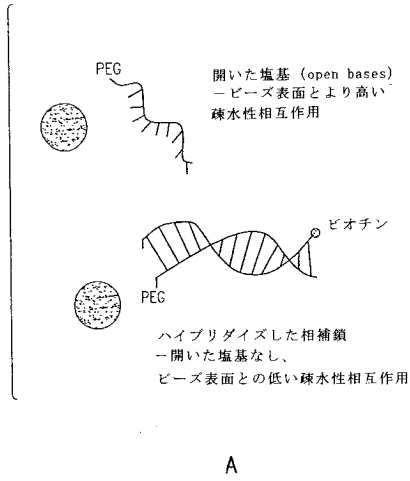


CDB: 2% BSA, 50mMTris-HCl, 1.45mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 0.05%NaN₂

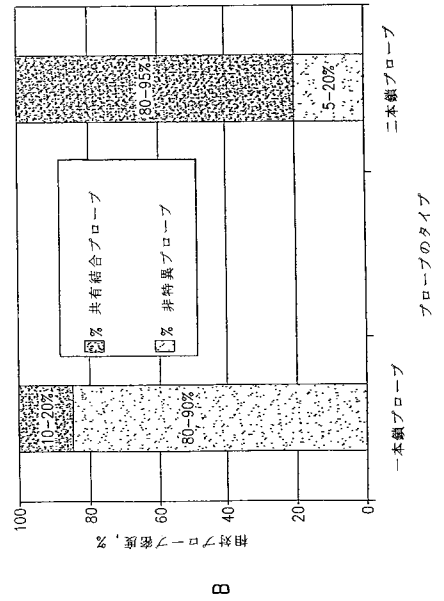
【 図 51 】



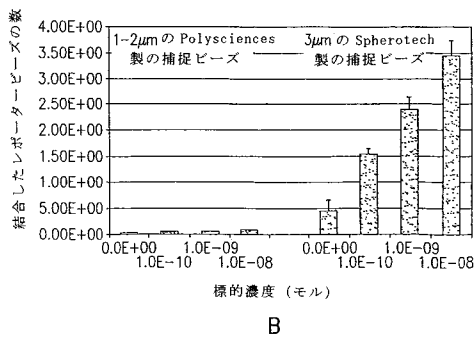
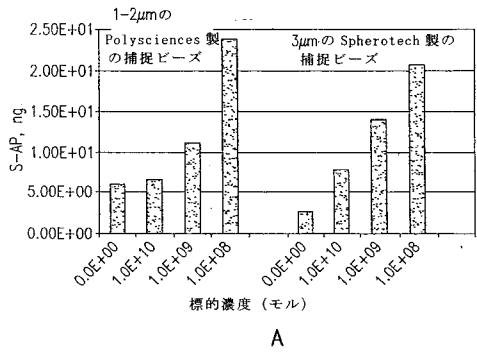
【 図 5 2 A 】



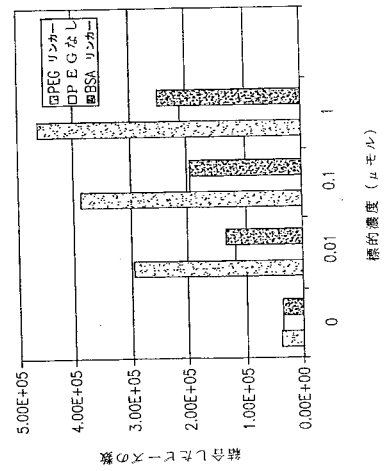
【 図 5 2 B 】



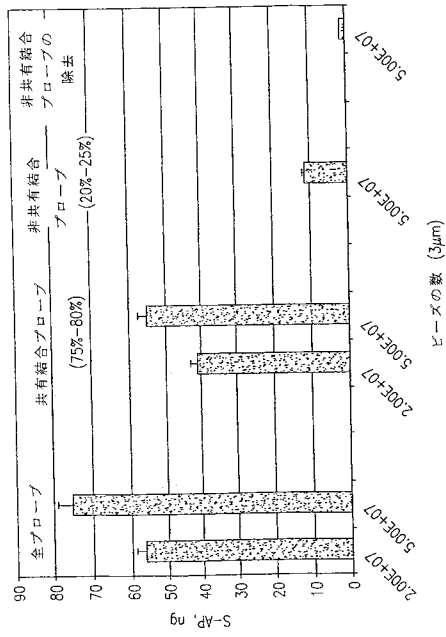
【 図 5 3 】



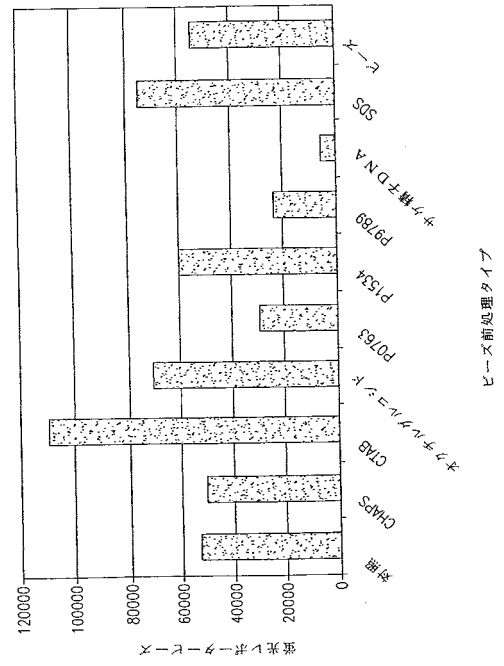
【 図 5 4 】



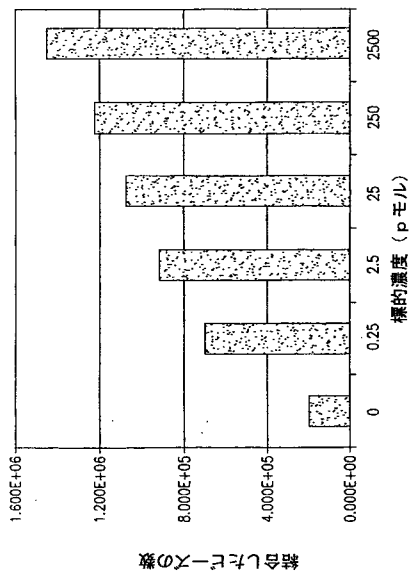
【 図 5 5 】



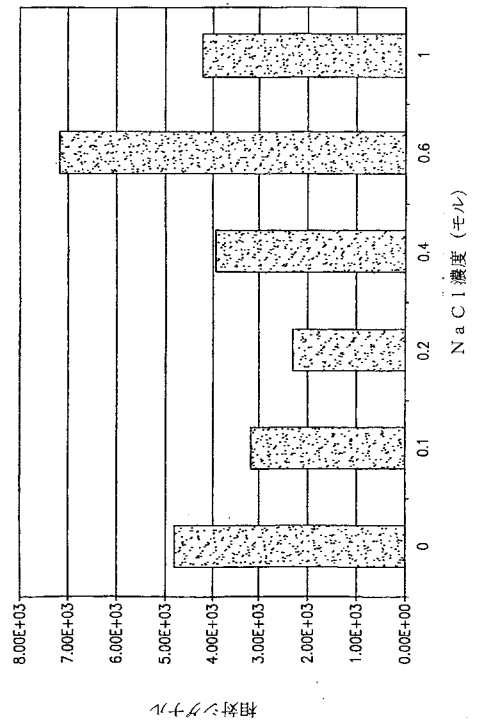
【 図 5 6 】



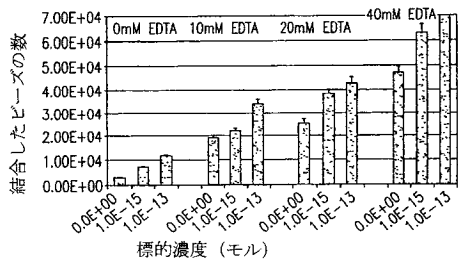
【 図 5 7 】



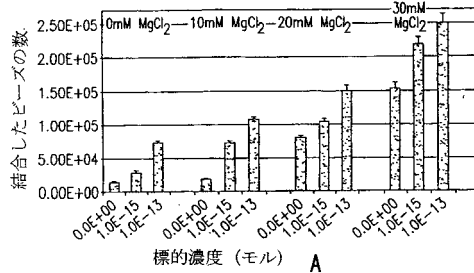
【 図 5 8 】



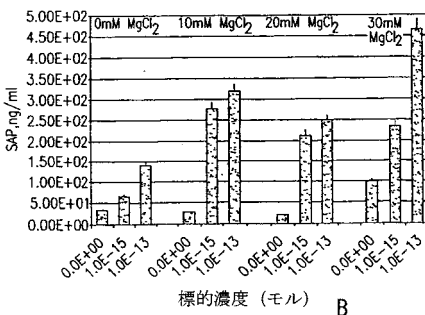
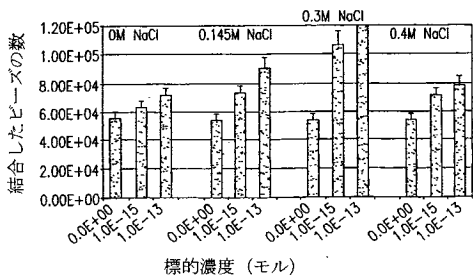
【 図 5 9 】



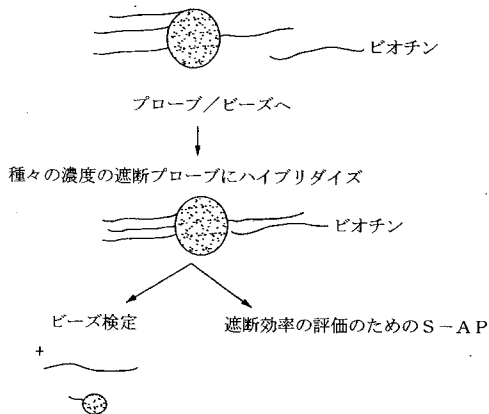
【 図 6 1 】



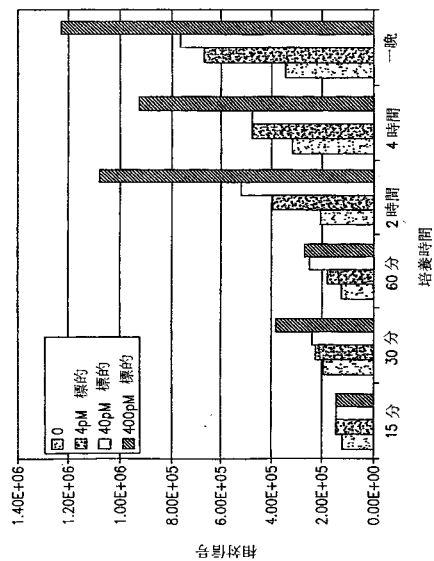
【 図 6 0 】



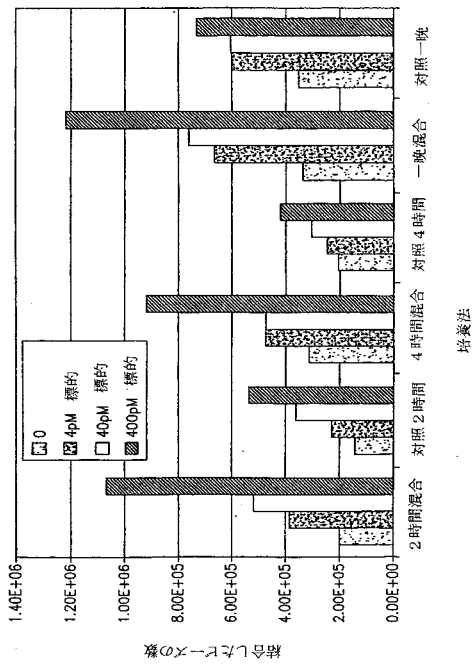
【 図 6 2 】



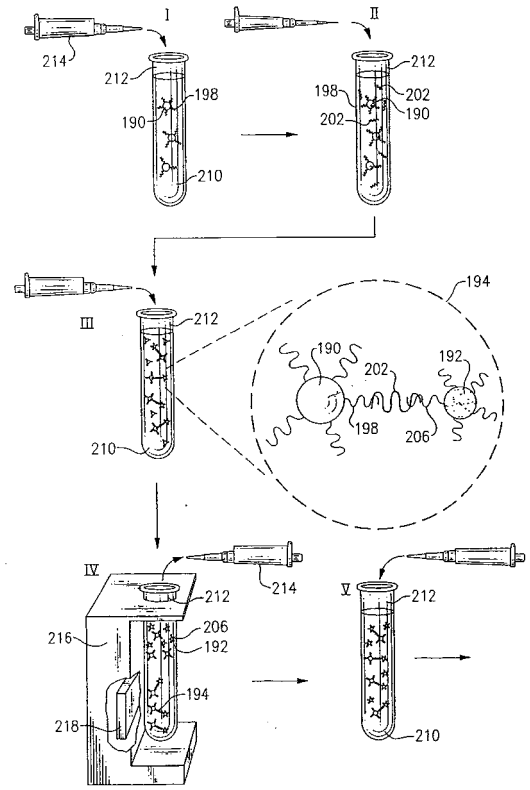
【 図 6 3 】



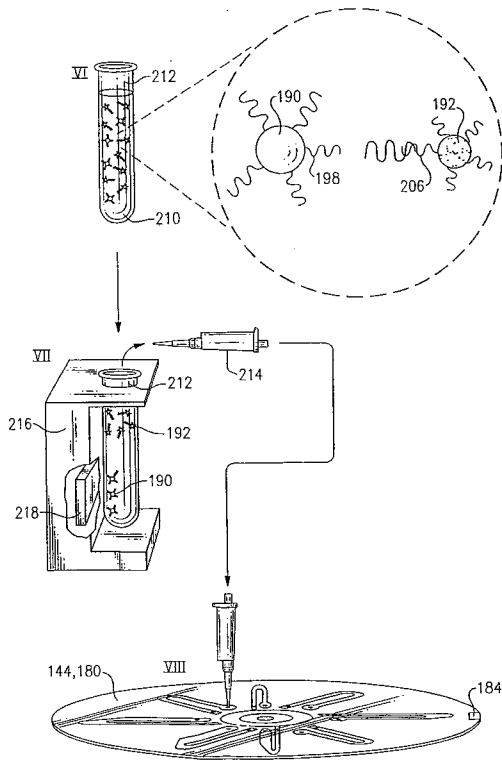
【図64】



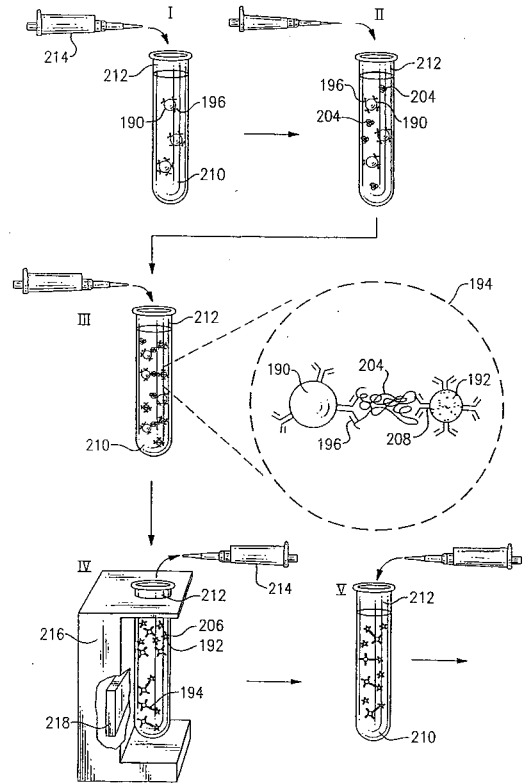
【図65A】



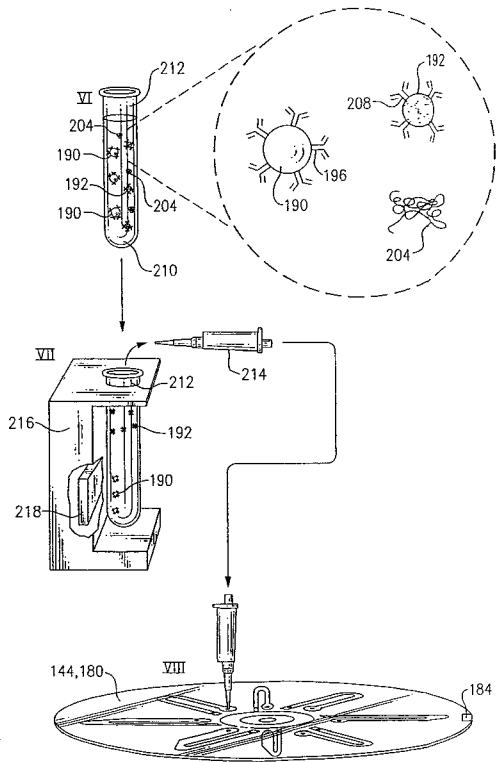
【図65B】



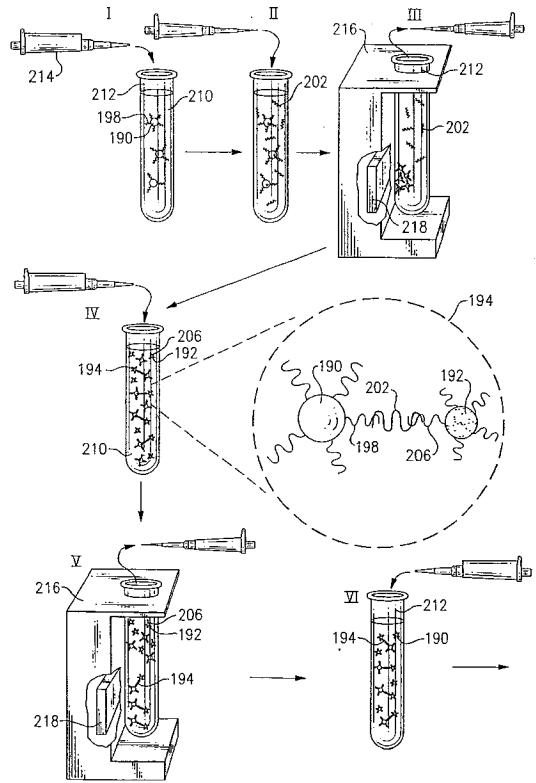
【図66A】



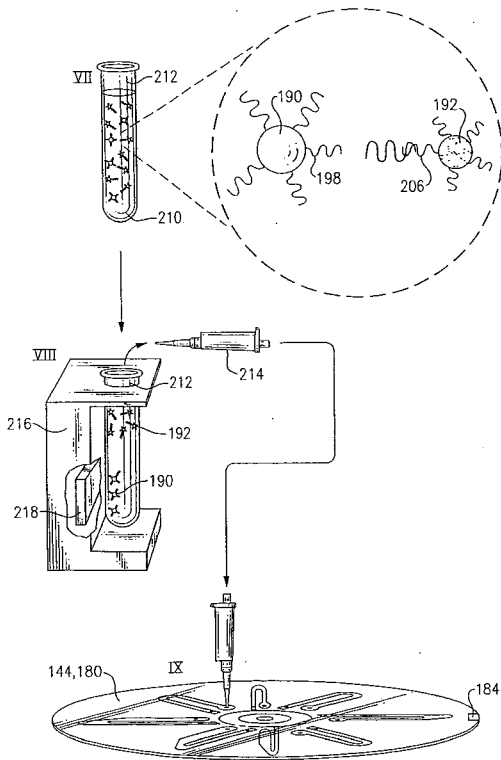
【図66B】



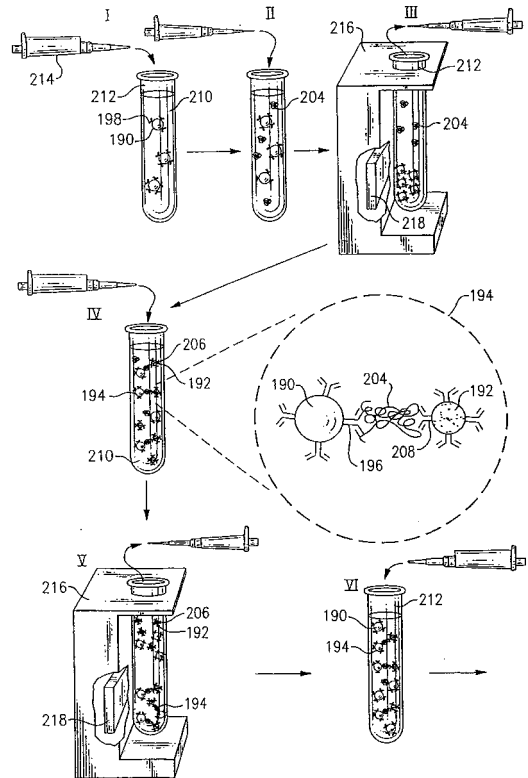
【図67A】



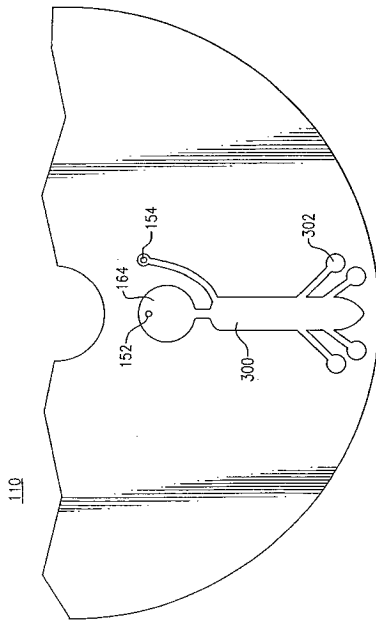
【図67B】



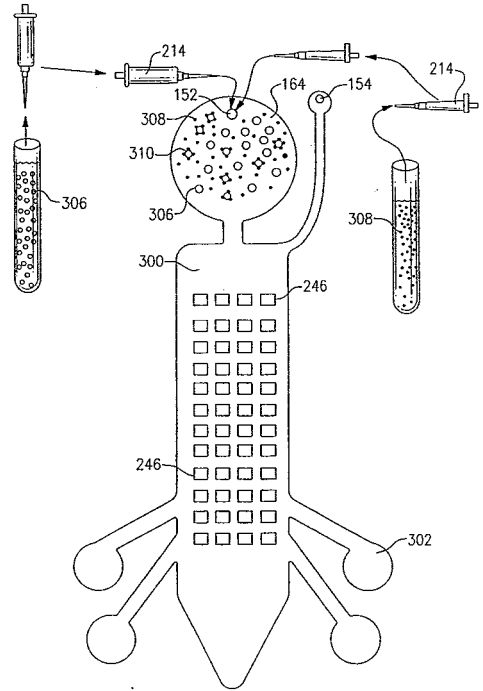
【図68A】



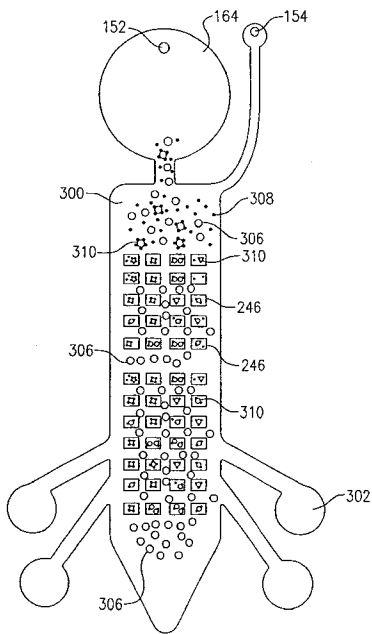
【 図 7 6 】



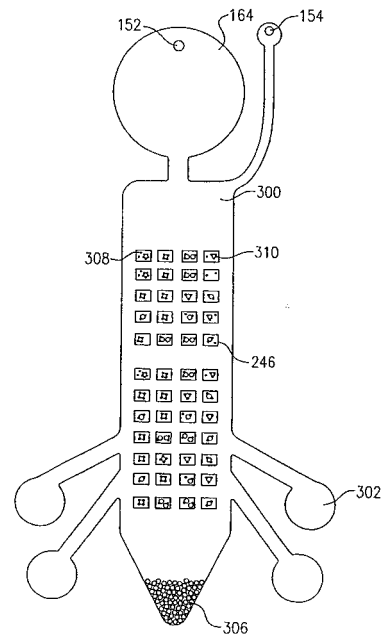
【 図 7 7 A 】



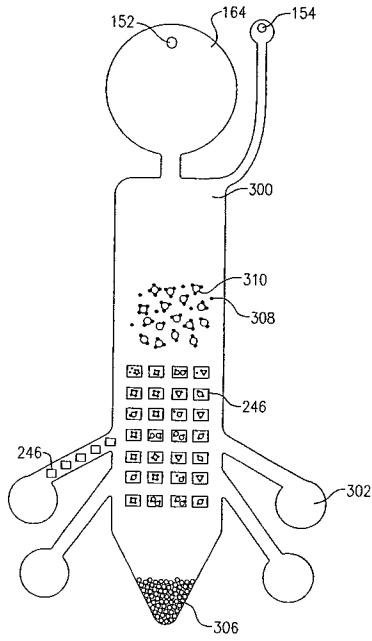
【 図 7 7 B 】



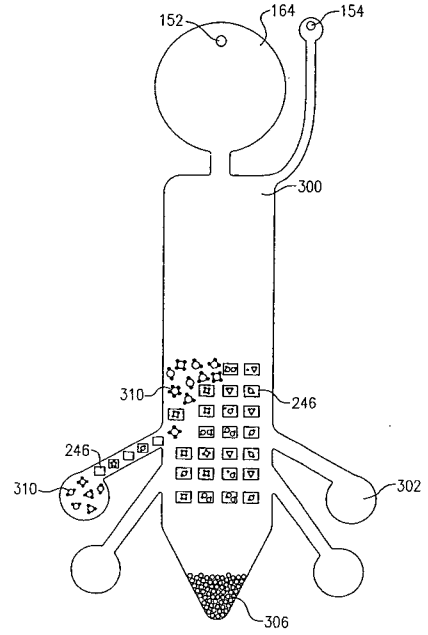
【 図 7 7 C 】



【図 77D】



【図 77E】



【手続補正書】

【提出日】平成17年6月13日(2005.6.13)

【手続補正1】

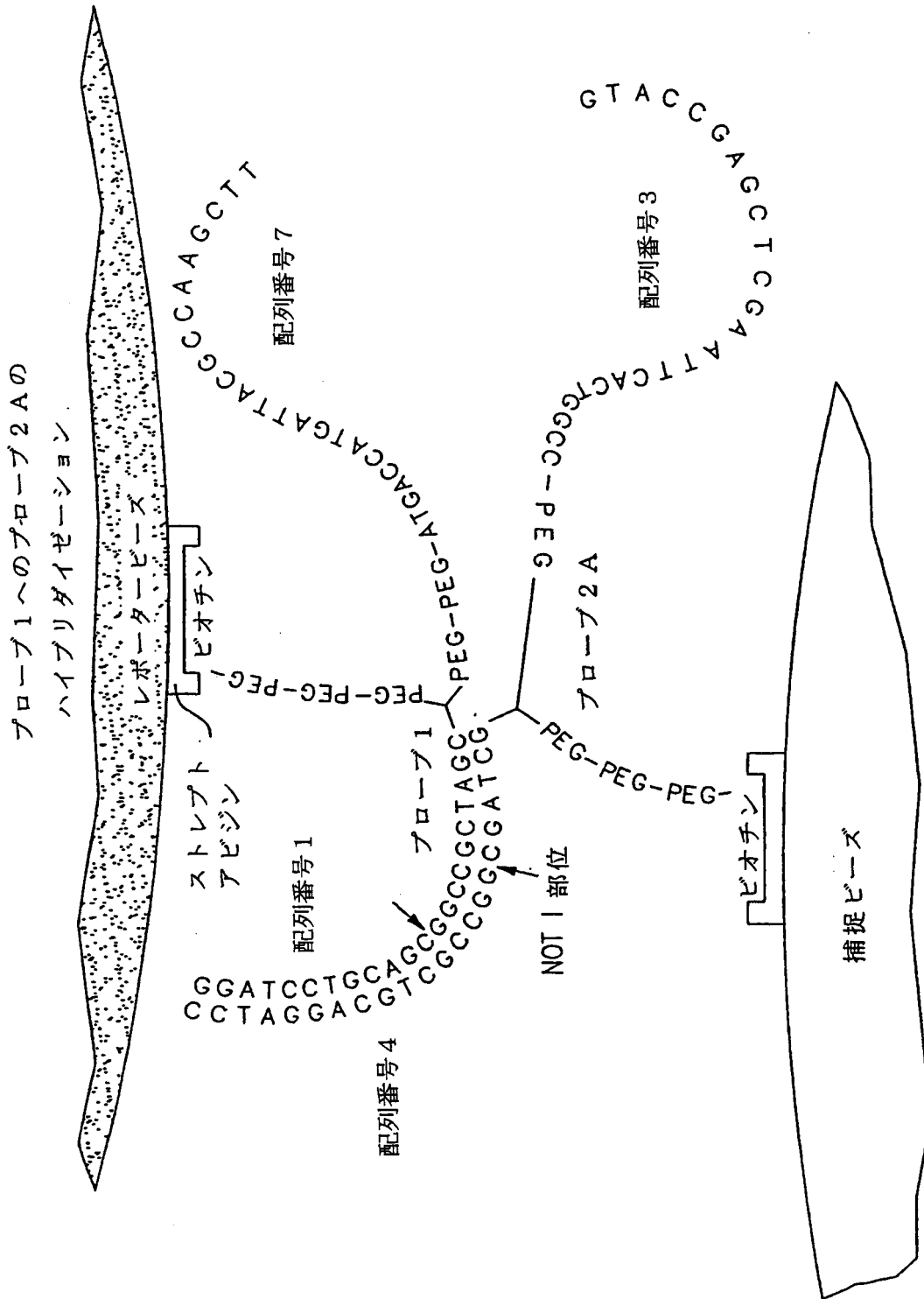
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4 2 A

【補正方法】変更

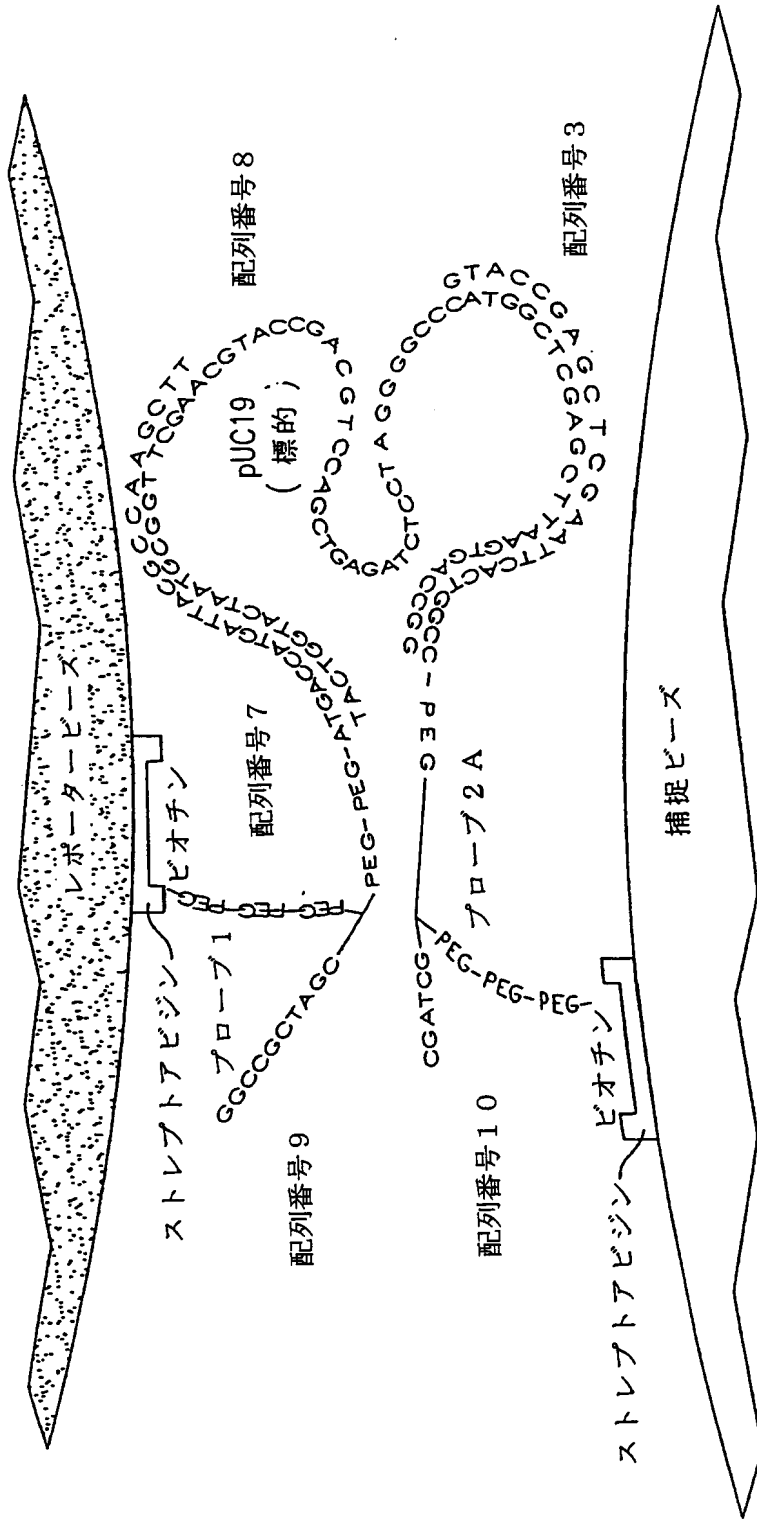
【補正の内容】

【 図 4 2 B 】



【 手続補正 3 】
 【 補正対象書類名 】 図面
 【 補正対象項目名 】 図 4 2 C
 【 補正方法 】 変更
 【 補正の内容 】

【 図 4 2 D 】



【 手続補正 5 】

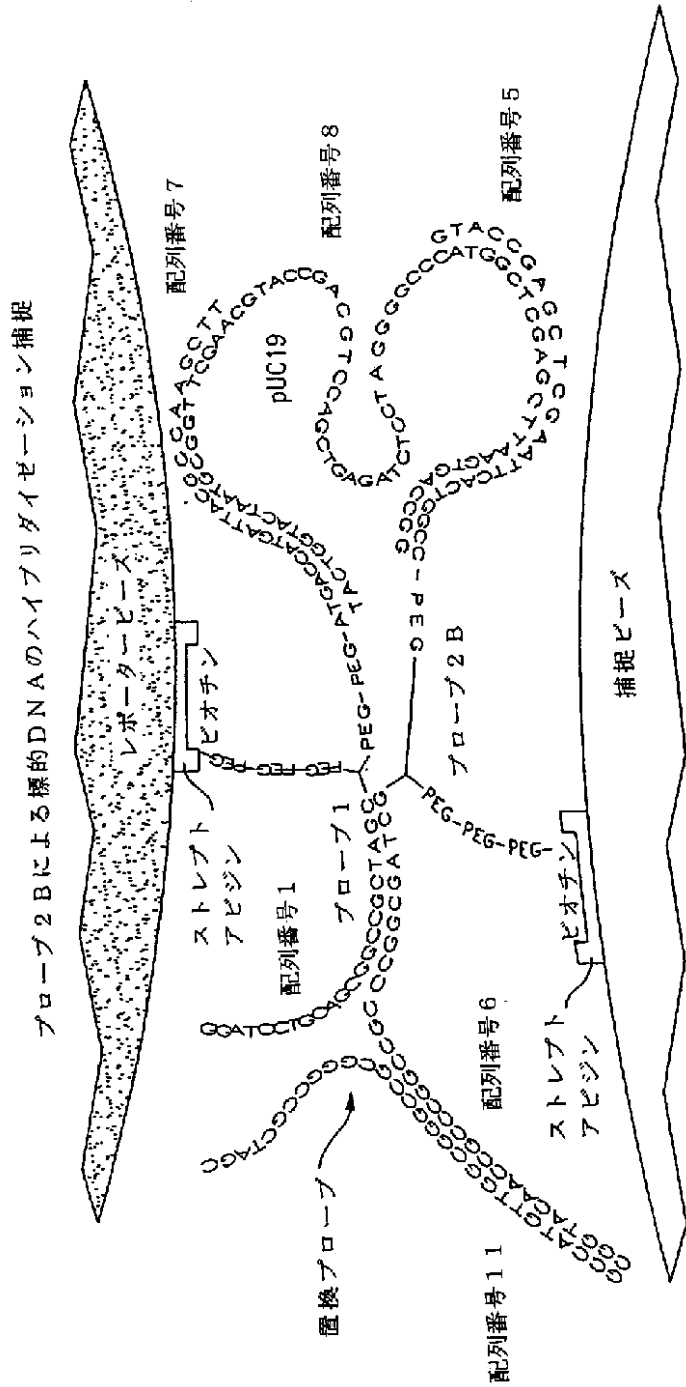
【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 4 3 A

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 4 3 B 】



【 手 続 補 正 7 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 図 面

【 補 正 対 象 項 目 名 】 図 4 3 C

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

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 1 2 N 15/00	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/06	
C 1 2 Q 1/06	G 0 1 N 1/00	1 0 1 F
G 0 1 N 1/00	G 0 1 N 37/00	1 0 1
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 5/00	E
	C 1 2 N 15/00	Z

- (31)優先権主張番号 60/358,479
(32)優先日 平成14年2月19日(2002.2.19)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 10/099,266
(32)優先日 平成14年3月14日(2002.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/372,007
(32)優先日 平成14年4月11日(2002.4.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/388,132
(32)優先日 平成14年6月12日(2002.6.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/408,227
(32)優先日 平成14年9月4日(2002.9.4)
(33)優先権主張国 米国(US)

(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,GD,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

イーサネット

- (74)代理人 100098268
弁理士 永田 豊
(74)代理人 100089244
弁理士 遠山 勉
(72)発明者 コームズ, ジェームズ ハワード
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 0 6 アーバイン サン レオン ビラ 1 7 5
(72)発明者 ファン, ブリジット チャウ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 7 0 8 ファウンテン バリー ミーガー 1 5 9 1 0
(72)発明者 ヴァレンシア, ラモンシト マグパンティ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 5 6 アリソ ヴィージョ グレッチェン コート 3
F ターム(参考) 2G052 AA28 AA29 AA30 AA32 AA33 AA36 AB20 CA03 CA04 DA09
EB12 ED04 FD20 GA11 GA30 HB00 HC04 HC32 HC36 HC42
HC44 JA09
4B029 AA07 AA21 AA27 BB11 BB15 BB17 BB20 CC02 CC03 FA03

	FA04	FA09	FA11							
4B063	QA01	QA07	QA18	QQ08	QQ42	QQ91	QR08	QR32	QR42	QR48
	QR50	QR54	QR55	QR66	QR77	QR82	QR83	QS03	QS25	QS28
	QS34	QS36	QS39	QX01	QX10					
4B065	AA90X	AC12	AC20	BB40	BC01	BC41	BD50	CA44	CA46	

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005530127A5	公开(公告)日	2006-03-09
申请号	JP2003547903	申请日	2002-11-27
申请(专利权)人(译)	伯斯坦科技股份有限公司雷开球德 长冈实业株式会社		
[标]发明人	コームズジェームズハワード ファンブリジットチャウ ヴァレンシアラモンシトマグパンティ		
发明人	コームズ,ジェームズ ハワード ファン,ブリジット チャウ ヴァレンシア,ラモンシト マグパンティ		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 C12M3/00 C12Q1/04 C12Q1/06 G01N1/00 G01N37/00 C12N5/06 C12N15/00		
CPC分类号	B03C1/00 C12M1/00 C12M1/34 C12M3/00 C12N5/06 C12N13/00 C12N15/00 C12Q1/04 C12Q1/06 G01N1/00 G01N1/28 G01N21/01 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N37/00 G11B11/00 G11B13/04		
FI分类号	G01N33/53.M C12M1/00.ZNA.A C12M1/34.F C12M1/34.Z C12M3/00.Z C12Q1/04 C12Q1/06 G01N1 /00.101.F G01N37/00.101 G01N37/00.102 C12N5/00.E C12N15/00.Z		
F-TERM分类号	2G052/AA28 2G052/AA29 2G052/AA30 2G052/AA32 2G052/AA33 2G052/AA36 2G052/AB20 2G052 /CA03 2G052/CA04 2G052/DA09 2G052/EB12 2G052/ED04 2G052/FD20 2G052/GA11 2G052/GA30 2G052/HB00 2G052/HC04 2G052/HC32 2G052/HC36 2G052/HC42 2G052/HC44 2G052/JA09 4B029 /AA07 4B029/AA21 4B029/AA27 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/FA03 4B029/FA04 4B029/FA09 4B029/FA11 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063 /QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR54 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QR83 4B063 /QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX10 4B065/AA90X 4B065/AC12 4B065/AC20 4B065/BB40 4B065/BC01 4B065/BC41 4B065/BD50 4B065 /CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	川口义行 永田豊 远山 勉		
优先权	09/997,741 2001-11-27 US 60/355644 2002-02-05 US 60/356982 2002-02-13 US 60/358479 2002-02-19 US 10/099266 2002-03-14 US 60/372007 2002-04-11 US 60/388132 2002-06-12 US 60/408227 2002-09-04 US		
其他公开文献	JP2005530127A		
摘要(译)			

本发明一般涉及分子和细胞生物磁性测定，尤其涉及在磁光生物盘上进行的分子和细胞生物磁性测定。本发明还涉及包括磁光生物盘和MO驱动器的磁光生物盘系统。更具体地，但不限于根据最佳实践模式在下文中描述的特定实施方案，本发明涉及用于检测和选择性操作细胞群中的特定靶细胞和细胞群溶液的生物磁方法，包括免疫磁性方法，使用磁性粒子或珠子，并使用MOBDS磁力引导神经突生长，神经再生和磁性神经网络。