

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年12月20日(2007.12.20)

【公表番号】特表2003-520582(P2003-520582A)

【公表日】平成15年7月8日(2003.7.8)

【出願番号】特願2001-548221(P2001-548221)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

B 0 1 J 19/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 30/88 (2006.01)

G 0 1 N 35/08 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

G 0 1 N 35/10 (2006.01)

G 0 1 N 27/447 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

B 0 1 J 19/00 Z

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/68 Z

G 0 1 N 30/88 E

G 0 1 N 35/08 A

G 0 1 N 37/00 1 0 1

G 0 1 N 35/06 A

G 0 1 N 27/26 3 3 1 E

【手続補正書】

【提出日】平成19年10月30日(2007.10.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a)核酸テンプレート精製の段階：

b)サーモサイクリング反応の段階：および

c)段階b)の生成物の精製の段階

を含み、段階が微小流体ディスクで連続して行なわれることを特徴とする、一連の段階を行なう方法。

【請求項2】 微小流体ディスクを通した流体の流動をディスクの回転により行なうことができる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 核酸テンプレートがプラスミドである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 サーモサイクリング反応b)が核酸シーケンシング反応である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 更に：

d)段階c)で得られた精製産物の分離の段階；

を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】 段階 a) を核酸テンプレートを微小流体ディスクに含まれる微小構造中の精製カラムを通過させることにより行なう、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 段階 c) を微小流体ディスクに含まれる微小構造中のゲル濾過カラムを通過させることにより行なう、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 段階 d) がシーケンシング反応の生産物の電気泳動的分離である、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 a) テンプレート核酸を含む細胞の培養を融解試薬で処理し、細胞質膜を融解させる；

b) 段階 a) の融解物を微小流体ディスクの微小構造に入れ、ここで各微小構造はテンプレート核酸を精製するための手段を含む第 1 チャンバー、サーモサイクリング反応のための手段を含む第 2 チャンバー、およびサーモサイクリング反応の生成物を精製するための手段を含む第 3 チャンバーを含む；そして

c) 分析のために精製産物を回収する

ことを含む、テンプレート核酸における核酸シーケンシング反応を行なう方法。

【請求項 10】 a) 少なくとも一つの入口；接続先

b) テンプレート核酸を精製するための手段を含む第 1 チャンバー；接続先

c) サーモサイクリング反応のための手段を含む第 2 チャンバー；接続先

d) サーモサイクリング反応の産物を精製するための手段を含む第 3 チャンバーを含むことを特徴とする、流体用の微小構造。

【請求項 11】 更に：

e) 第 3 チャンバーに接続した分離マトリックスを通した電位を適用するための手段を含む第 4 チャンバー

を含む、請求項 10 に記載の流体用の微小構造。

【請求項 12】 テンプレート核酸のサーモサイクリング反応を行なうための装置であり、微小流体ディスクを含み、該ディスクは請求項 10 または 11 に記載の流体用の複数の放射状に広がる微小構造を含む装置。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

次いで、プラスミド質をアガロースゲル電気泳動を用いて評価し、その量を分光光度法により決定でき、両方の技術とも当業者によく知られている。水中にまたは次段階(すなわち、PCR または サイクルシーケンシングのような直接シーケンシング反応)に適合できる希釈緩衝液中にプラスミドを得ることが有利である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

マイクロマシンを用いるシリコン構造上でのカオトロープ存在下での DNA の単離法が公開されている(Christel, L. A., K. Petersen, et al. (1999). "Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration." J Biomech Eng 121(1):22-7)。米国特許第 5,882,496 号は、加熱反応チャンバー、電気泳動装置およびサーモニューマティック(thermopneumatic)センサー - アクチュエーター、化学前濃縮物、および濾過または制御流動装置の表面領域を増加させるための多孔性シリコン構造の製作および使用を記載している。特に、このような高表面領

域または特異的孔サイズ多孔性シリコン構造は、小規模スケールでこのようなプロセスを使用する適用において、吸着、蒸発、脱着、縮合ならびに液体およびガスの流れを明白に増加させるために有用である。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

回転可能な、通常、プラスチックでできたディスクから形成されるマイクロチャンネルに基づく微量分析システムは、しばしば、“遠心ローター”、“チップ上の試験 (lab on a chip)” または “CD デバイス” としばしば呼ばれる。このようなディスクは、少量の流体の分析および分離の実行に使用できる。酵素アッセイを行なう目的でプラスチックディスクのチャンネルを通して液体を移動させる原理は、例えば、Duffy, D. C., H. L. Gillis, et al. (1999). “Microfabricated centrifugal microfluidic systems: characterization and multiple enzymatic assays.” *Analytical Chemistry* 71(20):4669-4678 に記載されている。適当なプラスチックディスクの一つのタイプは、コンパクトディスクまたは CD と呼ばれるものである。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

本発明は、テンプレート単離、サイクルシーケンシングおよび CD デバイスへのクリーンアップの段階の統合のための装置、およびこの装置の使用法に関する。特に、本発明は多数のサンプルの取り扱いを可能にし、したがって、自動化を非常に単純化し、試薬の消費およびしたがって全費用を削減し、必要な装置のサイズを減少させる、一つの密閉デバイスに関する。今日まで、一つの封入された構造内で、クリーン・アップされたシーケンシング反応の獲得を介した、DNA テンプレート細菌コロニーの単離を可能にする類似の統合レベルの装置の報告はない。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

第 1 の態様の好ましい実施態様において、微小流体ディスクを通じた流体の流れを、ディスクの回転により行なうことができる。ディスクを約 250 rpm (低速) から 15,000 rpm (高速) の範囲の種々の速度で回転 (または回転) できる。方法の任意の特定の段階でのディスクを通じた流体の正確な流れを達成するために必要な実際の速度は：

- 微小流体ディスク上における構造の位置 (すなわち、構造がディスクの中心から遠いほど、構造がディスクの中心にあるのと同じ遠心力を達成するために必要な rpm が低い) ;
- 液体が通過すべき構造の物理的寸法 ;
- 液体の粘性 ; および
- 構造における表面の化学的および物理的特性

を含む多くの因子に依存する。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

図面の簡単な説明

本発明を、添付の図面的手段により実施態様の非限定的例により説明し、ここで：

図1 aは微小流体ディスクにおけるその配向を示す本発明の流体の微小構造のプランにおける模式図を示す(一部示す)；

図1 bは、本発明の流体のための一つの微小構造のプランの模式図を示す；

図1 cは、図1 bのマイクロチャネルの廃棄制御構造(34)の拡大図を示し、ここで、aは微小流体ディスクが低速で回転した場合の液体の経路を示し、bは微小流体ディスクが高速で回転した場合の液体の経路を示す；

図1 dは、図1 bに示す微小構造のサンプル調製マイクロチャネル構造(すなわち、(13)-(22)の部分)と電気泳動構造((23)-(28)の部分)の間の領域(36)の拡大図を示す；

図1 eは、微小流体ディスク上に配置された本発明の流体のための微小構造の別の態様を示す；

図2は本発明の微小流体ディスク上のウェルの二つの可能性能ある構造を示す。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

疎水性ブレーキを、例えば、オーバーヘッドペン(パーマネント・インク)(Snowman pen, Japan)でマーキングすることにより、マイクロチャネル構造に導入できる。疎水性ブレーキの目的は、流体を望ましくない方向に誘導する毛管作用の防止である。疎水性ブレーキは、遠心力により、すなわち、ディスクを高速で回転させることにより打開できる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0054】

図1 aはまた微小流体ディスクの外側端(4)に向かって位置決めされたウェル(12)を示す。このウェルは、サンプルの入口(5)への添加の前にサンプル調製に使用できる。例えば、使用する核酸テンプレートが細菌コロニー由来である場合、細菌コロニーを最初に、例えば、ピペティングロボットにより取りだし、固体液体培地の表面から、それを約10 μ lの等張液に懸濁させる。懸濁液をついで微小流体ディスクのウェル(12)に入れる。細菌細胞をついで微小流体ディスクを回転させることによりペレット化でき、上清を傾捨し得る。ペレットをついで溶液Iに再懸濁し、続いて回転し、溶液IIおよびIIIに連続して再懸濁する。沈殿ゲノムDNAおよびタンパク質を回転によりペレット化し、プラスミド含有上清をさらに処理する(下記参照)。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

図1 eの本発明の微小構造の他の実施態様において、チャンバー(23)-(25)、(27)および(28)として図1 bに記載された電気泳動構造およびチャネル(26)が無い。

この態様において、サーモサイクリング反応の精製産物(すなわち、チャンバー(16)からの溶出液)をウェル(29)に別の電気泳動デバイスへの移動のために保持する。この態様において、生成物は約サブマイクロリットル容量で得られ、これは更なる分析のための別の構造に移動するための液体(例えば、ホルムアミドまたは水)の添加により希釈できる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

13. 反応混合物をサーモサイクリングチャンバーから、遠心力によりおよびゲル濾過チャンバーを通して排出する。ゲル濾過チャンバーは、微小構造中の深いおよび浅いセクションの間に捕捉された単分散(ふるった)Sephadex G-50 DNAグレードビーズを含む。非包含ターミネーターおよびまた塩が保持される。残りの配列ラダーは、最終“ピックアップ”ウェルに続き、必要な場合、より多くの水を添加し、液体取り扱いを助け、蒸発を減少させる。

14. クリーン・アップ反応物を、ピペッティングロボットによりピックアップウェルから取りだし、マイクロタイタープレートに入れ、MegaBACEによる更なる処理のために5 - 10 μ lに希釈する。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1a】 微小流体ディスクにおけるその配向を示す本発明の流体の微小構造のプランにおける模式図を示す(一部示す)；

【図1b】 本発明の流体のための一つの微小構造のプランの模式図を示す；

【図1c】 図1bのマイクロチャネルの廃棄制御構造(34)の拡大図を示し、ここで、aは微小流体ディスクが低速で回転した場合の液体の経路を示し、bは微小流体ディスクが高速で回転した場合の液体の経路を示す；

【図1d】 図1bに示す微小構造のサンプル調製マイクロチャネル構造(すなわち、(13)-(22)の部分)と電気泳動構造((23)-(28)の部分)の間の領域(36)の拡大図を示す；

【図1e】 微小流体ディスク上に配置された本発明の流体のための微小構造の別の態様を示す；

【図2】 本発明の微小流体ディスク上のウェルの二つの可能性能ある構造を示す。