

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4546534号
(P4546534)

(45) 発行日 平成22年9月15日(2010.9.15)

(24) 登録日 平成22年7月9日(2010.7.9)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 35/08 (2006.01)

GO 1 N 35/08 A

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 T

GO 1 N 33/48 (2006.01)

GO 1 N 33/48 E

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 37/00 I O 1

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/53 M

請求項の数 40 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-536193 (P2007-536193)
 (86) (22) 出願日 平成17年10月17日(2005.10.17)
 (65) 公表番号 特表2008-517259 (P2008-517259A)
 (43) 公表日 平成20年5月22日(2008.5.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/055303
 (87) 国際公開番号 WO2006/042838
 (87) 国際公開日 平成18年4月27日(2006.4.27)
 審査請求日 平成19年9月3日(2007.9.3)
 (31) 優先権主張番号 102004050576.4
 (32) 優先日 平成16年10月15日(2004.10.15)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 390039413
 シーメンス アクチエンゲゼルシャフト
 Siemens Aktiengesellschaft
 ドイツ連邦共和国 D-80333 ミュンヘン
 ヴィッテルスバッハープラッツ 2
 Wittelsbacherplatz 2, D-80333 Muenchen, Germany
 (74) 代理人 100075166
 弁理士 山口 巖
 (74) 代理人 100133167
 弁理士 山本 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 使い捨てカートリッジ内のDNAまたはタンパク質の総合的かつ自動的な分析装置、このようなカートリッジの製造方法、およびこのようなカートリッジを使用したDNAまたはタンパク質分

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乾燥試薬を充填した使い捨てカートリッジ(カード)内の測定試料のDNAまたはタンパク質を総合的かつ自動的に分析する装置において、カートリッジ内での個々のプロセスからプロセス分析のために必要な全ての処置を自動的に実行するために、

カートリッジ(100)内に、微小流体プロセス技術のための微小通路および/または微小空洞(101~131)の系が設けられ、

微小通路もしくは微小空洞(101~131)が、試薬を受け入れるために予め定められた幾何学構造を有し、

試薬が、カートリッジ(100)の微小通路もしくは微小空洞(101~131)内の特定個所に安定に貯蔵され、

各プロセス用の乾燥貯蔵された試薬を好適な態様で、特に液体試薬として用意する手段が設けられており、

安定に貯蔵された乾燥試薬を受け入れるための構造が試薬用窪み(112、132)を有し、

窪みが段高さ10~500μmを持つ少なくとも1つの段を有することを特徴とするDNAまたはタンパク質分析装置。

【請求項 2】

窪みが約1mmの広がり約100μmの奥行きとを有することを特徴とする請求項1記載の装置。

【請求項 3】

窪みが円筒状であり、広がり直径であることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

【請求項 4】

微小通路もしくは微小空洞（101～131）に導入された試薬が次の性質を有する、すなわち、

無視し得る蒸気圧を有する乾燥可能な物質が室温において安定しており、細胞分解もしくはPCRのための性質もしくは生化学的寸法を検出するための性質が維持されることを特徴とする請求項 1 乃至 3 の 1 つに記載の装置。

【請求項 5】

微小通路もしくは微小空洞（101～131）の部分内に導入された物質がDNAまたはタンパク質結合性を有することを特徴とする請求項 1 乃至 4 の 1 つに記載の装置。

10

【請求項 6】

微小通路もしくは微小空洞（101～131）の部分内に導入された物質が、固有の結合性を有する磁気ビーズであることを特徴とする請求項 1 乃至 5 の 1 つに記載の装置。

【請求項 7】

磁気ビーズが抗体で被覆されていることを特徴とする請求項 6 記載の装置。

【請求項 8】

磁気ビーズがDNA結合物質で被覆されていることを特徴とする請求項 6 記載の装置。

【請求項 9】

溶解試薬と磁気ビーズとが等しく存在し、溶解試薬と磁気ビーズとが単一の乾燥マトリックス内に含まれていることを特徴とする請求項 1 乃至 8 の 1 つに記載の装置。

20

【請求項 10】

いわゆるDNA-ELISA（酵素結合免疫吸着測定）分析またはタンパク質-ELISA分析（130、131）が実行可能であり、ELISA分析（130、131）のための試薬として標識酵素（試薬1）および酵素基質（試薬2）が設けられていることを特徴とする請求項 1 乃至 9 の 1 つに記載の装置。

【請求項 11】

ハイブリタイゼーション過程を電気的に検出する検出モジュール（130）が設けられていることを特徴とする請求項 1 乃至 10 の 1 つに記載の装置。

【請求項 12】

検出モジュール（130）が貴金属-プラスチック複合体からなることを特徴とする請求項 11 記載の装置。

30

【請求項 13】

検出モジュールが半導体シリコンチップと貴金属電極とからなることを特徴とする請求項 11 記載の装置。

【請求項 14】

電気的検出手段として電気化学的、磁気式および/または圧電式測定法が利用されることを特徴とする請求項 11 記載の装置。

【請求項 15】

カートリッジ（100）が全血試料の投与ポート（102）を有することを特徴とする請求項 1 乃至 14 の 1 つに記載の装置。

40

【請求項 16】

給水手段（103～103'）、特に流入ポートが設けられていることを特徴とする請求項 1 乃至 15 の 1 つに記載の装置。

【請求項 17】

外部給水部に接続するための流入ポートが設けられていることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

【請求項 18】

流入ポートが、一体的に組み込まれた貯水器に接続されていることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

50

【請求項 19】

微小通路もしくは微小空洞（101～131）が、給水後、規定のイオン強度を有する乾燥緩衝物質を充填されていることを特徴とする請求項1乃至18の1つに記載の装置。

【請求項 20】

全血試料と水もしくは緩衝液とを混合する手段が設けられていることを特徴とする請求項1乃至19の1つに記載の装置。

【請求項 21】

溶解ビーズ試薬で被覆された微小通路もしくは微小空洞に血液または血液 - 水混合物もしくは血液 - 緩衝液混合物を流通させる手段が設けられていることを特徴とする請求項1乃至20の1つに記載の装置。

10

【請求項 22】

DNA - 磁気ビーズ複合体またはタンパク質 - 磁気ビーズ複合体を固定するために磁界発生手段が設けられていることを特徴とする請求項1乃至21の1つに記載の装置。

【請求項 23】

PCR空洞内にDNA - 磁気ビーズ複合体を固定するために磁界発生手段が設けられていることを特徴とする請求項1乃至22の1つに記載の装置。

【請求項 24】

PCR空洞を閉鎖する手段が設けられていることを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項 25】

試料をサーマルサイクリングさせる手段が設けられていることを特徴とする請求項1乃至24の1つに記載の装置。

20

【請求項 26】

使用済み試料材料および/または使用済み試薬の貯蔵手段がカートリッジ（カード）内に設けられていることを特徴とする請求項1乃至25の1つに記載の装置。

【請求項 27】

使用済み試料材料および/または使用済み試薬の貯蔵手段が廃棄物リザーバを形成することを特徴とする請求項26記載の装置。

【請求項 28】

廃棄物リザーバを、細菌を通さず、粒子なしもしくは細胞なしに通気する手段が設けられていることを特徴とする請求項1乃至27の1つに記載の装置。

30

【請求項 29】

カートリッジを読取装置内に固定する手段が設けられていることを特徴とする請求項1乃至28の1つに記載の装置。

【請求項 30】

請求項1乃至29の1つに記載の装置において使用されるカートリッジの製造方法であって、

上向きに開口している通路および/または空洞を有するカートリッジ本体がポリマーから作成され、

開いた通路内に試薬がスポット注入され、そこで乾燥され、

上向きに開口している通路および/または空洞が上カバーとしてのフィルムによって閉鎖される

40

ことを特徴とするカートリッジの製造方法。

【請求項 31】

カード本体が射出成形技術によって製造されることを特徴とする請求項30記載の製造方法。

【請求項 32】

密封膜又は通気膜の特殊材料がカード本体に被着されることを特徴とする請求項30記載の製造方法。

【請求項 33】

カード本体の密封前に、測定手段を有する検出モジュールが挿入され、貼付けられるこ

50

とを特徴とする請求項 30 記載の製造方法。

【請求項 34】

請求項 1 乃至 29 の 1 つに記載の装置における DNA 分析のための操作方法であって、
カートリッジ内へ試料を投与し、
読取装置内へカートリッジを押込み、
全自動分析を開始する

ことを特徴とする DNA 分析のための操作方法。

【請求項 35】

全自動分析の操作時に、
計量区間を介して試料計量を行うステップ、
計量区間を洗浄するステップ、
測定試料を希釈して溶解通路内に導入するステップ、
溶解通路内での滞留によって細胞分解を行うステップ、
形成された DNA - ビーズ複合体を液体流によって PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 室内に入れ、ビーズ集合器によって PCR 室内に保持するステップ、
DNA - ビーズ複合体の水洗を行うステップ、
PCR を実行するステップ、
PCR の終了後、PCR 生成物を検出室内に移送するステップ、
検出室内で特殊な捕捉プローブを用いてハイブリタイゼーション過程を行うステップ、
標識酵素で検出室の洗浄を行うステップ、
酵素基質で検出室の洗浄を行うステップ、
電気化学的測定を実行するステップ、
酵素基質溶液のさまざまな温度とさまざまな流速とにおいて電気化学的測定を行うステップ

10

20

を含むことを特徴とする請求項 34 記載の操作方法。

【請求項 36】

PCR 中に ELISA 試薬通路に水が充填されることを特徴とする請求項 35 記載の操作方法。

【請求項 37】

ハイブリタイゼーション後に両方の ELISA 通路が通気され、引続いて検出室がまず第 1 ELISA 試薬で気泡なしに洗浄され、引続いて第 2 ELISA 試薬で気泡なしに洗浄され、引続いて電気化学的測定が実行されることを特徴とする請求項 35 記載の操作方法。

30

【請求項 38】

請求項 1 乃至 29 の 1 つに記載の装置におけるタンパク質分析のための操作方法であって、

カートリッジ内へ試料を投与し、
読取装置内へカートリッジを押込み、
全自動分析を開始する

ことを特徴とするタンパク質分析のための操作方法。

40

【請求項 39】

全自動分析の操作時に、
計量区間を介して試料計量を行うステップ、
計量区間を洗浄するステップ、
測定試料を希釈し、液体流によって検出室内に移送するステップ、
検出室内で測定試料のタンパク質と特殊な捕捉抗体もしくは捕捉タンパク質との間で結合過程が起きるステップ、
酵素標識を担持する抗体溶液 (第 1 ELISA 試薬) で検出室の洗浄を行うステップ、
酵素基質 (第 2 ELISA 試薬) で検出室の洗浄を行うステップ、
電気化学的測定を実行するステップ

50

を含むことを特徴とする請求項 3 8 記載の操作方法。

【請求項 4 0】

ハイブリタイゼーション後に両方の E L I S A 通路が通気され、引続いて検出室がまず第 1 E L I S A 試薬で気泡なしに洗浄され、引続いて第 2 E L I S A 試薬で気泡なしに洗浄され、引続いて電気化学的測定が実行されることを特徴とする請求項 3 9 記載の操作方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本発明は、使い捨てカートリッジ内の D N A またはタンパク質の総合的 (integrated) かつ自動的な分析装置に関する。キャッシュカードサイズの平らなカードがカートリッジと称される。そのほかに、本発明は、このようなカートリッジの製造に関する。最後に本発明は、このようなカートリッジを使用した D N A またはタンパク質分析のための操作方法にも関する。

10

【 0 0 0 2】

ヒト・ゲノム上の疑問に答えるための核酸分析のために、例えば全血から白血球を分析するために、まず第 1 段階において試料準備ステップとして細胞が破壊され、その際に遊離された D N A が引続いて単離されねばならない。第 2 段階において、D N A を選択的に複製するための P C R (Polymerase Chain Reaction = ポリメラーゼ連鎖反応) が行われ、検出すべき D N A の濃度が高められ、第 3 段階においてこれが検出される。

20

【 0 0 0 3】

実験室では最後の部分プロセスが、公知の従来技術に従って個別に実行される。上で述べた 3 つの段階はそれぞれ複数の作業ステップを含み、相互に独自に異なる機器で実行される。個々の作業ステップは殆ど手動で行われる。

【 0 0 0 4】

これらのステップの実現は、実験室機器 (細胞分解装置、P C R 機器 (いわゆるサーモサイクラ)、場合によっては定量的 P C R に適した P C R 機器、電気泳動装置、ハイブリタイゼーションステーション、光学読取装置、いわゆるエッペンドルフチューブ、複数のピペット機器、試薬冷却容器等) の存在に依存しており、習熟した人員によって、感染の危険、廃棄物管理等に関する安全規則を守りながら実行されねばならない。特に、試薬溶液の容量式計量、すなわち厳密な計量 (ピペッティング) を複数回実行しなければならない。このような作業ステップは時間を要し、費用がかかる。

30

【 0 0 0 5】

従来技術により公知の生化学的分析機構は国際公開第 0 2 / 0 7 3 1 5 3 号パンフレットに相応して、チップカードに一体化することのできる特にシリコン系測定モジュールを使用している。国際公開第 0 2 / 0 7 2 2 6 2 号パンフレットに相応して、分析に使用される試薬は乾燥貯蔵されて分析モジュール内に組み込まれる。

【 0 0 0 6】

そのことを前提に、本発明の課題は、小型化したカートリッジ内で価格的に手頃で簡単に扱うことのできる完全な D N A またはタンパク質分析過程を実現することである。特に、実験室法と比較して以下の改善が実現されねばならない。

40

- ・ 密閉された使い捨てカートリッジ内に (場合によっては水以外の) 全ての物質を完全に組み込むこと。
- ・ 室温で安定に試薬を貯蔵すること。
- ・ カートリッジ内で全プロセスを自動的に実行すること。
- ・ 分析すべき試料、例えば血液の注入以外に、手動作業ステップがないこと。
- ・ 健康に有害な物質との直接接触がないこと (血液と試薬廃棄物はカートリッジ内に留まる) 。
- ・ カートリッジ形状が効率的かつ迅速なサーマルサイクリングを可能にすること。
- ・ 全ての検出過程は電氣的に進行し、簡単に読取可能でなければならないこと。

50

- ・ 使用するカートリッジが小さく、コスト的に手頃に製造できること。

【 0 0 0 7 】

この課題は、本発明によれば、請求項 1 記載のカートリッジを有する装置によって解決される。このようなカートリッジの製造は請求項 3 4 の対象である。このようなカートリッジを使った操作方法は請求項 3 8、4 2 の対象である。請求項 3 8 は D N A 分析に関し、請求項 4 2 はタンパク質分析に関する。装置、製造方法、および分析時の操作様式の実施態様は各従属請求項に明示されている。

【 0 0 0 8 】

本発明は、特に国際出願第 0 2 / 0 7 2 2 6 2 号パンフレットおよびそこに指摘されたその他の従来技術から出発する。そこに述べられた分析機構は流体通路内で乾燥貯蔵され室温で安定した試薬を有し、試薬は特定の使用の直前に給水によって溶液とされる。本発明はさらにまだ公開されていない独国特許出願第 1 0 2 0 0 4 0 2 1 7 8 0 号とまだ公開されていない独国特許出願第 1 0 2 0 0 4 0 2 1 8 2 2 号とから出発する。そのほかに、特に電氣的に読取可能な検出モジュールを使用することも知られている。

【 0 0 0 9 】

それに対して本発明の対象は、試料採取後の予め定められたプロセス経過のための微小通路および / または微小空洞からなる系を有するこのような使い捨てカートリッジであり、カートリッジは乾燥試薬を受け入れる構造を有し、これらの構造には、一方で細胞分解を実行し、他方で P C R を実行し、しかし電気化学的検出も実行する手段が付設されている。特に、通路は問題に適合された異なる構造を有する。特に分解通路は有利には乾燥試薬で最適に湿潤するための段状横断面を有する一方、P C R 室と E L I S A 試薬通路は滴状窪みを有する。

【 0 0 1 0 】

それゆえ、試料の供給と調製、D N A 増幅、本来の D N A 検出が 1 つの方法経過において可能であることを達成することができる。

【 0 0 1 1 】

乾燥試薬を受け入れるための微小通路もしくは微小空洞内の幾何学的構造の本発明に係る系によって一方で D N A 分析、他方でタンパク質分析のための好適な境界条件が明らかとなる。以下の特徴および処置が重要である。

微小通路もしくは微小空洞に導入される試薬は、無視し得る蒸気圧を有する乾燥可能な物質である。室温において安定した物質によって、細胞分解および / または P C R および / または検出に関するそれらの性質が維持される。物質と助剤との混合物は薄いフィルムを形成することができ、混合物は薄いパラフィン層で水密に覆っておくことができる。

【 0 0 1 2 】

本発明において試薬と助剤は、既にカートリッジ製造時に、乾燥物質としてカートリッジ通路の窪みに導入される。そのことから以下の利点が得られる。

- ・ カートリッジ製造時に試薬の投与が簡単かつ精密になる。
- ・ 試薬が試薬通路への充填時に保護される。すなわち、試薬はいわゆる水流によって洗浄除去されるのではなく、通路全体の充填時に維持される。通路充填後にはじめて、試薬スポットは拡散過程を介して溶解し、均質な試薬溶液が生じる。

【 0 0 1 3 】

他の特別な実施態様において窪みは予め定められた間隔で試薬通路に沿って配置されている。間隔は等間隔とすることができ、または特別有利には可変間隔パターンに配置しておくことができる。

【 0 0 1 4 】

窪みは有利には可変量の乾燥試薬を充填しておくことができる。さまざまな量の乾燥試薬と窪みの間隔パターンとの組合せによって、仕上げられる試薬溶液の所望の濃度分布を調整することができる。

【 0 0 1 5 】

例えば磁気ビーズおよび溶解試薬の存在下での細胞分解のような特定の機能にとって、

10

20

30

40

50

不溶成分、すなわちビーズが乾燥試薬内に均一に分布している必要がある。このため磁気ビーズは懸濁液として溶解通路内に与えられる。溶媒の蒸発時、ビーズが溶解通路の縁領域に後退し、これにより均一分布は与えられていない。溶解通路横断面の段状構造化によって、段を介して磁気ビーズが分布し、均一分布が達成される。

【 0 0 1 6 】

本発明に係るカートリッジを用いて細胞分解、PCR、いわゆるDNAまたはタンパク質ELISAテストを等しく実行できるように、微小通路もしくは微小空洞内には、DNA結合性、特にDNA結合磁気ビーズを有する基質が設けられていると有利である。溶解試薬と磁気ビーズは共に単一の乾燥マトリックス内に含有させておくことができる。さらに、カード内にはELISA分析用試薬も設けられている。詳細にはELISA分析のために2つの試薬、すなわち第1試薬としての標識酵素と、第2試薬としての酵素基質とが必要とされる。

10

【 0 0 1 7 】

特に、カートリッジ内にはハイブリタイゼーション過程を電氣的に検出する検出モジュールが配置されている。検出モジュールは有利には貴金属 - プラスチック複合体からなり、または半導体シリコンチップと貴金属電極とからなる。電氣的検出には特に電気化学的、磁気式または圧電式測定法が適している。

【 0 0 1 8 】

本発明に係るカートリッジの本発明の用途のために特に全血試料の投与ポートが設けられている。さらに、給水手段、例えば外部給水部に接続するための流入ポートまたは一体に組み込まれた貯水器が設けられている。微小通路もしくは微小空洞内において、乾燥した緩衝物質は、給水後、規定のイオン強度を有する。

20

【 0 0 1 9 】

全血の白血球を分析するための本発明の用途において、有利には、全血試料と水もしくは緩衝液とを混合する手段が設けられている。溶解ビーズ試薬で被覆された微小通路もしくは微小空洞に血液もしくは血液 - 水混合物または血液 - 緩衝液混合物を流通させる手段が設けられている。

【 0 0 2 0 】

特にDNA分析に応用する際に本発明に係るカートリッジにおいて実施すべきPCRのためにさらに、PCR空洞内にDNA - 磁気ビーズ複合体を固定するために磁界発生手段が設けられている。このために、PCR空洞は好適に閉鎖することができねばならず、サーマルサイクリング手段が設けられていなければならない。

30

【 0 0 2 1 】

最後に、本発明に係るカートリッジにおいて重要なことは、使用済み試料材料および使用済み試薬を貯蔵する手段が設けられ、これらの手段が廃棄物リザーバを形成することである。これらの手段は、少なくとも1つの廃棄物リザーバを、細菌を通さず、粒子なしもしくは細胞なしに通気するのに適していなければならない。最後に、本発明の対象ではない読取装置内でカートリッジを読取るためにカートリッジ固定手段が設けられていなければならない。

【 0 0 2 2 】

本発明のその他の詳細および利点は、特許請求の範囲と合せて図面に基づいて実施例についての以下の図面説明から明らかとなる。

40

【 0 0 2 3 】

図中、同じ要素もしくは同一作用の要素は同じ符号を有する。特に、一方で図1～図10、他方で図11～図23は一緒に述べられる。

【 0 0 2 4 】

図1にはELISA (= Enzyme Linked Sorbent Assay : 「酵素結合免疫吸着測定」) テスト用カートリッジ100とそのなかにある微小通路 (マイクロチャネル) 系もしくは微小空洞 (マイクロキャビティ) 系が平面図で示してあり、理解し易いように付随する機能表示が付加的に表示されている。カートリッジ100は詳細にはプラスチック本体10

50

1 とそこに導入されるフルイデックス構造とからなり、フルイデックス構造はプラスチックフィルムで覆われている。この構造は図2～図10に基づいて以下でさらに説明される。

【0025】

図1の平面図からは試料ポート102とこれに続く計量区間105が明らかになり、ヒト・ゲノム上の疑問に答えるために特に核酸分析、例えば全血から白血球を分析するための規定の液体試料を試料ポート102を介して導入することができる。試料の細胞分解用通路領域110が続き、さらには特にDNA分析のために、選択的なDNA複製のためのPCR (Polymerase Chain Reaction = ポリメラーゼ連鎖反応) 用領域120が続き、検出すべきDNAの濃度が高められ、第3段階においてDNAを検出できる。本来のPCR室は弁122、122'によって閉鎖可能である。次に、このように調製された試料の特にELISA法による検出は領域130において行われる。

10

【0026】

図1ではさらに水ポート103～103'''が認められる。それらを介して、試料調製時に水は移送材および溶媒としてカートリッジ100内に導入可能である。さらに、通気ポート104～104'''が設けられている。

【0027】

既に述べたように、カートリッジ100は特に全血試料の投与ポート102を有する。このため給水手段が設けられている。外部給水部に接続するための流入ポートを設けておくことができ、または一体的に組み込まれた貯水器に流入ポートを接続することができる。

20

【0028】

微小通路もしくは微小空洞101～131は通常、給水後に規定のイオン強度を保証する乾燥した緩衝物質が充填されている。血液分析のために、全血試料と水もしくは緩衝液とを混合する手段、および/または溶解ビーズ試薬で被覆された微小通路もしくは微小空洞に血液または血液-水混合物もしくは血液-緩衝液混合物を流通させる手段が設けられている。

【0029】

通路系中に、廃棄物("waste")を受け入れるリザーバとしての他の領域106、107、108、109が設けられている。そのほかに、異なるELISA試薬を受け入れるための通路131もしくは131'を有する領域が設けられている。

30

【0030】

図2～図4において符号101はそれぞれやはりカートリッジ本体である。この本体は特に細胞分解(「溶解」)のために特別に成形された貫流通路111を含み、この貫流通路111は乾燥試薬を受け入れるために側面エッジによって形成された段状窪み112を有する。窪み112は段高さ10～500μmの複数の段を有し、広がり約1mm、奥行き約100μmである。

【0031】

特に図4Aによる図示で明らかとなる選択的可能性では、補助窪みなしの貫流通路において貫流通路111のエッジ領域113にのみ溶解試薬受容部を設けることができる。それに対して図4Bでは、特に、遊離したDNAを形成するための磁気ビーズも含むこのような試薬が段112の間で貫流通路111にわたって均一に分布している。磁気ビーズは相応に準備されている限りDNAおよびタンパク質結合性を有する。磁気ビーズはDNA結合性を有し、場合によっては抗体で被覆しておくこともできる。溶解試薬と磁気ビーズとを有するマトリックスとしての乾燥試薬の導入に関しては本出願人の独国特許出願公開第102004021780号明細書および独国特許出願公開第102004021822号明細書を参照するように指示する。

40

【0032】

図5～図7ではカートリッジ本体101内のPCR室120の構造と流れ通路111が明らかとなる。特定の用途の際にPCR室を閉鎖するための弁装置はここに図示されてい

50

ない。重要なことは、PCR実行時に必要とされる特殊な試薬127、127'を受け入れるための円筒形窪み124、124'がPCR室120内に設けられていることである。このため特に図7に示すように、室温において貯蔵可能な乾燥した安定なPCR試薬127、127'は最初にパラフィン層128、128'で覆われている。

【0033】

カートリッジ内部において弁制御されるサーマルサイクリングでPCRを適切に実行することは同じ出願優先権を有する本出願人の独国特許出願第102004050576.4号明細書および独国特許出願第102004050510.1号明細書に詳しく述べられており、ここでの関連においてそれを明確に参照するように指示する（「参照による取り込み」）。特に、これらの明細書には、DNA結合のための磁気ビーズの使用と、制御可能な磁界によってPCR室120内でのDNAによる磁気ビーズの濃縮が述べられており、ここでそれに詳細には言及しない。

【0034】

図8～図10により、図1によるELISA試薬通路131、131'の構成および構造が明らかとなる。それぞれ鉢状窪み132～132⁶が設けられており、これらの窪みは図9に相応してELISAプロセス用に予め計量されかつ予め一回分に分けられた試薬量を受け入れるのに適している。そのことは、既に冒頭で従来技術として挙げた国際公開第02/072262号パンフレットに詳しく述べられており、ここでの関連においてやはりそれを明確に参照するように指示する（「参照による取り込み」）。図10に示す円筒形窪み132～132⁶は乾燥試薬133～133⁶を充填されている。第1試薬は標識酵素を実現し、第2試薬は、場合によってはPCRによって調製された試料を特殊な捕捉プローブでハイブリタイゼーションの際に公知の如くに必要とされる酵素基質を実現する。略示しただけの検出領域130において貴金属-プラスチック複合体からなるモジュール内に生化学反応を検出する種々のセンサがある。半導体チップ、すなわち特にシリコン系センサを使った特に電気化学的測定において、信号は電氣的に検出され、直接に継続処理される。電気化学的測定法の他に、磁気式および/または圧電式測定法も、相応するセンサで可能である。

【0035】

図11～図23にはそれぞれ図1によるカートリッジ100が平面図で示してあり、カートリッジ100のうち各分析過程時に活性な領域がマークされている。このためカートリッジ100が分析装置内に押込まれるが、この分析装置は図に詳しく図示されておらず、本特許出願の対象ではない。

【0036】

カートリッジ受け入れ手段を備えた評価装置内にカートリッジが押込まれ、評価装置内にカートリッジを固定して評価装置が作動された後、評価は13の具体的な部分ステップa)～m)に基づいて以下で明確にされる。図1を参考に、詳細には以下の部分ステップが生じる。

a) 約10μlの血液が測定試料として注入される。計量毛細管105を介して1μlが自動的に計量される。

b) 過剰の血液が空室106（廃棄物1）内で洗浄される。

c) 引続いて1μlの血液試料は水で希釈され、細胞分解通路110に移送される。そこで血球の細胞分解（溶解）、遊離したDNAの磁気ビーズへの結合が起きる。

d) 引続いて磁気ビーズがPCR室内に移送され、そこに集められる。洗浄過程が行われ、洗浄液が空室107（廃棄物2）に集められる。

e) いまや洗浄過程が終了している。

f) 引続いてPCR室弁122、122'が閉じられ、PCRが実行される。

g) PCR中、酵素基質を含むELISA試薬通路131に水が同様に充填される。

h) 同様にPCR中、標識酵素を含むELISA試薬通路131'に水が充填される。

i) PCR後、PCR室弁122、122'が開放され、PCR生成物は検出モジュール130を介して（廃棄物3、通路108内に）誘導され、そこで特殊な捕捉プローブを使

10

20

30

40

50

ってハイブリタイゼーションが行われる。

j) 酵素 - 基質通路が廃棄物通路 108 (廃棄物 3) 内に通気される。

k) 標識 - 酵素通路が廃棄物通路 108 (廃棄物 3) 内に通気される。

l) 標識 - 酵素溶液は標識のため検出モジュール 130 を介して廃棄物領域 109 (廃棄物 4) 内に流れる。

m) 酵素 - 基質溶液はハイブリタイゼーションの酵素 - 電気化学的検出のために検出モジュール 130 を介して廃棄物領域 109 (廃棄物 4) 内に流れる。

これで分析方法は終了する。特に電気化学的検出の場合、発生する信号は電氣的に読取り、プロセッサで支援されて予め定められたプログラムに従って評価することができる。

【0037】

10

図 1 に基づいて通路および空洞と共に詳細に述べたカートリッジは、例えばポリカーボネート等のポリマー材料から射出成形技術で製造される。まず、上向きに開口した構造を有するカード本体 101 が製造され、最初には開口している通路もしくは空洞内に試薬がスポット注入され、引続いて乾燥させられる。検出モジュールは好適な方法でカートリッジ内に挿入され、特に貼付けられる。最後に通路および空洞は例えば上カバーとしての弾性フィルムを備え、こうして特定の使用のための準備が完了する。

【0038】

カバー側を閉鎖してカートリッジを完成させる前に、特定の特殊機構を例えば密封材料および/または通気材料として、開口したカード本体 101 に被着することも可能である。

20

【0039】

具体的測定方法は図 11 ~ 図 23 に基づいて全血試料の DNA 分析という特殊事例について説明される。一般に、前記カートリッジは一方で DNA 分析および/または他方でタンパク質分析に利用することが意図されており、既に上述したように、相応する読取装置と付属する評価アルゴリズムとが使用される。それにより、例に基づいて説明したカートリッジを医学的「ポイントオブケア」応用の範囲内で分散利用するためにはじめて実務に即したものとする規定の操作方法が得られる。

【0040】

最後に、特に DNA 分析に関して、上で詳細に述べたカートリッジの総合的な操作方法を個々の部分ステップの組合せとして、もしくは部分ステップ順で、再度まとめる。

30

- ・ カートリッジ内への試料の投与
- ・ 読取装置へのカートリッジの押込み
- ・ 自動分析の開始
 - ・ 計量区間を介した試料の計量
 - ・ 計量区間の洗浄
 - ・ 試料の希釈および溶解通路への導入
 - ・ 溶解通路内での滞留
 - ・ PCR 室内でビーズ集合器による DNA - ビーズ複合体の集合
 - ・ DNA - ビーズ複合体の水洗
 - ・ PCR 室の閉鎖
 - ・ PCR の実行
 - ・ PCR 中、両方の ELISA 試薬通路に水を充填
 - ・ PCR 室の開放
 - ・ PCR 生成物を検出室に移送
 - ・ 検出室内でハイブリタイゼーション
 - ・ 両方の ELISA 試薬通路の通気
 - ・ 検出室に ELISA 試薬 1 を充填して洗浄
 - ・ 検出室に ELISA 試薬 2 を充填して洗浄
 - ・ 電気化学的測定の実行。

40

【0041】

50

電気化学的測定の際、先ず、酵素標識を担持する抗体溶液（E L I S A 試薬 1）を用いて検出室の洗浄が行われる。次に、酵素基質（E L I S A 試薬 2）を用いて検出室の洗浄が行われる。電気化学的測定は、周知のように、酵素 - 基質溶液の設定可能なさまざまな温度および可変流速で実行される。

【 0 0 4 2 】

タンパク質の分析には対応する処理方式が応用され、その場合 P C R は応用されない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 3 】

【図 1】個々の微小通路 / 空洞系と付属する機能表示とを有するカートリッジを示す図

【図 2】細胞分解通路の平面図

10

【図 3】図 5 による細胞分解通路の横断面図

【図 4】貫流通路横断面の 2 つの選択案を拡大図

【図 5】図 1 の P C R 室の平面図

【図 6】図 5 による P C R 室の横断面図

【図 7】図 5 による P C R 室の横断面図

【図 8】図 1 による E L I S A 試薬通路の平面図

【図 9】図 8 による E L I S A 試薬通路の横断面図

【図 10】図 8 による E L I S A 試薬通路の横断面図

【図 11】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 12】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

20

【図 13】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 14】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 15】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 16】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 17】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 18】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 19】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 20】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 21】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【図 22】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

30

【図 23】自動評価中のさまざまな方法状態における図 1 によるカートリッジの平面図

【符号の説明】

【 0 0 4 4 】

1 0 0 カートリッジ

1 0 1 本体

1 0 1 ~ 1 3 1 微小通路もしくは微小空洞

1 0 2 試料ポート

1 0 3 水ポート

1 0 4 通気ポート

1 0 5 計量区間

40

1 1 0 通路領域

1 1 2 窪み

1 2 0 P C R 室

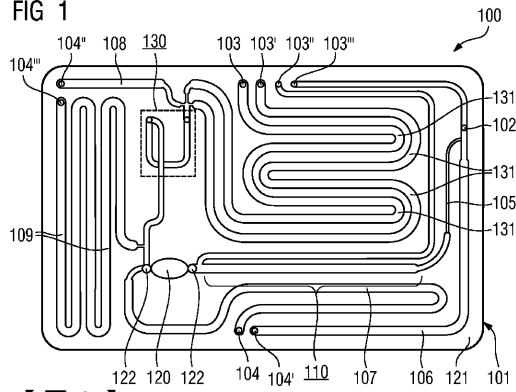
1 2 2 弁

1 3 0 検出モジュール

1 3 2 窪み

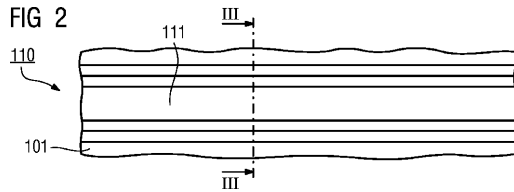
【図 1】

FIG 1



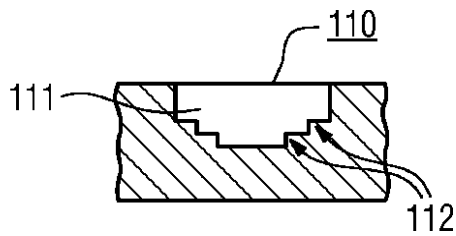
【図 2】

FIG 2



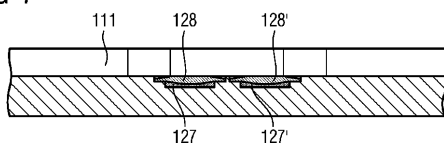
【図 3】

FIG 3



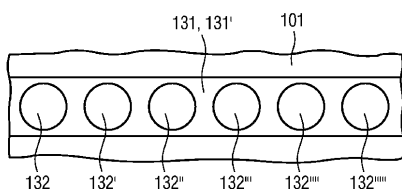
【図 7】

FIG 7



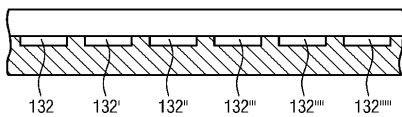
【図 8】

FIG 8



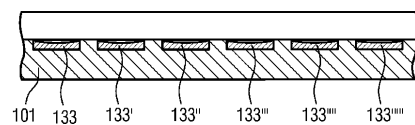
【図 9】

FIG 9



【図 10】

FIG 10



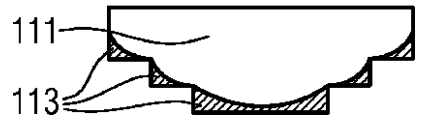
【図 4 A】

FIG 4A



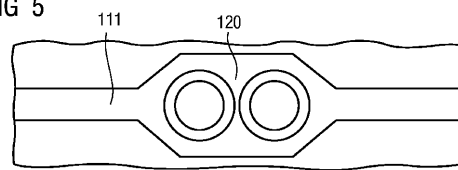
【図 4 B】

FIG 4B



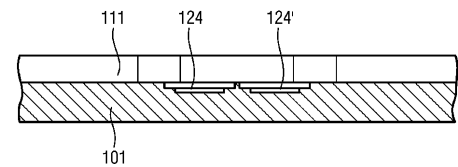
【図 5】

FIG 5



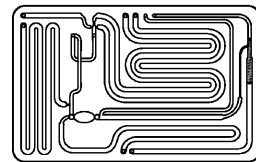
【図 6】

FIG 6



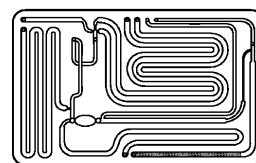
【図 11】

FIG 11



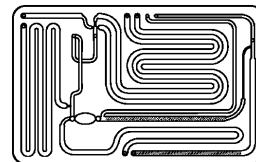
【図 12】

FIG 12



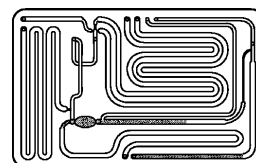
【図 13】

FIG 13



【図 14】

FIG 14



【図 15】

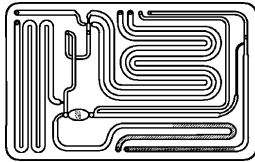


FIG 15

【図 19】

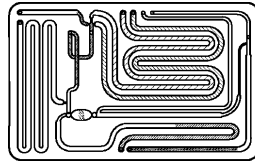


FIG 19

【図 16】

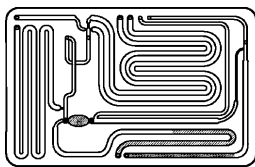


FIG 16

【図 20】

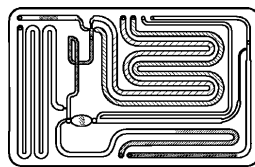


FIG 20

【図 17】

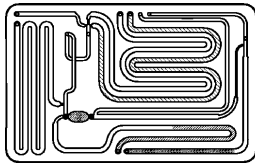


FIG 17

【図 21】

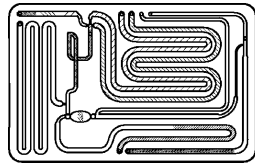


FIG 21

【図 18】

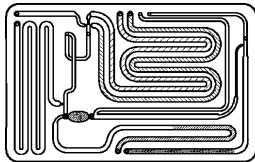


FIG 18

【図 22】

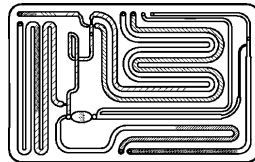


FIG 22

【図 23】

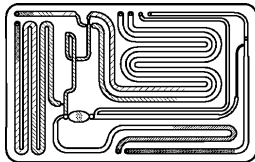


FIG 23

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/553 (2006.01)
 G 0 1 N 35/02 (2006.01)
 G 0 1 N 27/00 (2006.01)
 G 0 1 N 27/28 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/543 5 9 3
 G 0 1 N 33/553
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 35/02 F
 G 0 1 N 27/00 D
 G 0 1 N 27/00 Z
 G 0 1 N 27/28 P
 G 0 1 N 27/28 R
 G 0 1 N 27/28 3 0 1 Z
 C 1 2 M 1/00 A
 C 1 2 Q 1/68 A
 C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 バルラーク、ハイケ

ドイツ連邦共和国 9 0 4 0 3 ニュルンベルク オイセレ ラウファー ガッセ 1 0

(72)発明者 ビルクレ、ジークフリート

ドイツ連邦共和国 9 1 3 1 5 ヘビシュタット ファイト - シュトッス - シュトラーセ 4 6

(72)発明者 グンブレヒト、ヴァルター

ドイツ連邦共和国 9 1 0 7 4 ヘルツォーゲンアウラッハ イン デア レーテ 1

(72)発明者 キューン、ダニエラ

ドイツ連邦共和国 9 1 3 3 4 ヘムホーフェン ベルクシュトラーセ 3 2

(72)発明者 パウリカ、ペーター

ドイツ連邦共和国 9 1 0 5 6 エルランゲン フランツ - シュタインメッツ - ヴェーク 1

(72)発明者 シュタンツェル、マンフレート

ドイツ連邦共和国 9 1 0 5 6 エルランゲン タウヌスシュトラーセ 1 0 0

審査官 森 竜介

(56)参考文献 国際公開第02/072262(WO, A1)

国際公開第03/048736(WO, A1)

特開平09-507917(JP, A)

特開平07-077305(JP, A)

特表2004-532395(JP, A)

特表2005-512045(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 35/08

C12M 1/00

C12Q 1/68

G01N 27/00

G01N 27/28

G01N 33/48

G01N 33/53

G01N 33/543

G01N 33/553

G01N 35/02

G01N 37/00

C12N 15/09

- (54) 【発明の名称】使い捨てカートリッジ内のDNAまたはタンパク質の総合的かつ自動的な分析装置、このようなカートリッジの製造方法、およびこのようなカートリッジを使用したDNAまたはタンパク質分析のための操作方法

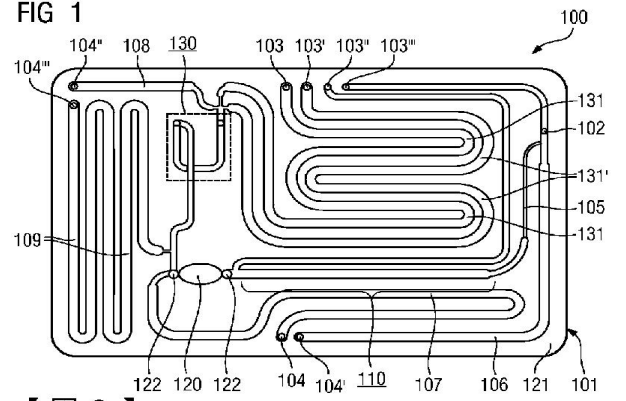
专利名称(译)	用于一次性盒中的DNA或蛋白质的全面且自动的分析器，制造这种盒的方法，以及使用这种盒的DNA或蛋白质分析的操作方法		
公开(公告)号	JP4546534B2	公开(公告)日	2010-09-15
申请号	JP2007536193	申请日	2005-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	西门子公司		
申请(专利权)人(译)	西门子激活日元Gezerushiyafuto		
当前申请(专利权)人(译)	西门子激活日元Gezerushiyafuto		
[标]发明人	バルラークハイケ ビルクレジークフリート グンプレヒトヴァルター キューンダニエラ パウリカペーター シュタンツェルマンフレート		
发明人	バルラーク、ハイケ ビルクレ、ジークフリート グンプレヒト、ヴァルター キューン、ダニエラ パウリカ、ペーター シュタンツェル、マンフレート		
IPC分类号	G01N35/08 G01N33/53 G01N33/48 G01N37/00 G01N33/543 G01N33/553 G01N35/02 G01N27/00 G01N27/28 C12M1/00 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L3/502707 B01L3/502723 Y10T436/11 Y10T436/25 Y10T436/2575		
FI分类号	G01N35/08.A G01N33/53.T G01N33/48.E G01N37/00.101 G01N33/53.M G01N33/543.593 G01N33/553 G01N33/53.D G01N35/02.F G01N27/00.D G01N27/00.Z G01N27/28.P G01N27/28.R G01N27/28.301.Z C12M1/00.A C12Q1/68.A C12N15/00.A		
代理人(译)	山口岩 山本浩		
优先权	102004050576 2004-10-15 DE		
其他公开文献	JP2008517259A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

具有微通道和/或微腔系统的筒（卡）被用于自动分析DNA或蛋白质，微通道或微腔具有用于接收干试剂的几何形状。为了工业制造的目的，盒子由扁平卡体制成，例如通过注塑技术，试剂在开放通道中被点样和干燥，随后通过膜封闭通道。可以为成品盒提供测量样品，并且通过将盒插入读取装置，可以开始完全自动的测量过程。

【 図 1 】

FIG 1



【 図 2 】

FIG 2

