(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2006-511792

(P2006-511792A)

(43)公表日　平成18年4月6日(2006.4.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 30/88	(2006.01)	G01N	30/88	E	2G045
C12M 1/00	(2006.01)	G01N	30/88	J	4B024
C12M 1/40	(2006.01)	C12M	1/00	A	4B029
C12Q 1/68	(2006.01)	C12M	1/40		4B063
B01J 20/281	(2006.01)	C12Q	1/68	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 94 頁）　最終頁に続く

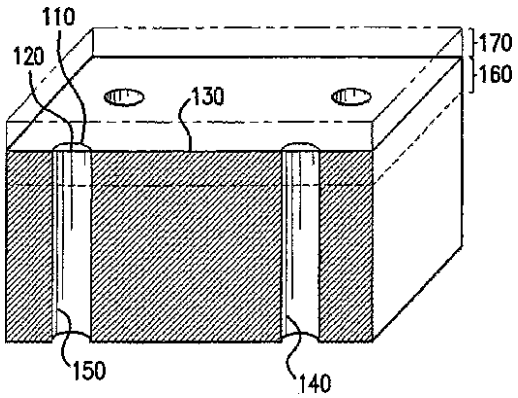
(21)出願番号　特願2004-555704 (P2004-555704)
(86)(22)出願日　平成15年11月20日 (2003.11.20)
(85)翻訳文提出日　平成17年7月25日 (2005.7.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/037598
(87)国際公開番号　WO2004/048936
(87)国際公開日　平成16年6月10日 (2004.6.10)
(31)優先権主張番号　60/429,093
(32)優先日　平成14年11月26日 (2002.11.26)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/429,259
(32)優先日　平成14年11月26日 (2002.11.26)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　505191906
ユニバーシティ　オブ　ユタ　リサーチ　ファンデーション
アメリカ合衆国，ユタ　８４１０８，ソルト　レイク　シティ，スイート　１１０，アラピーン　ドライブ　６１５
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微小孔物質、被分析物の局在化及び定量の方法、並びに被分析物の局在化及び定量用物品

(57)【要約】
液体サンプル中に存在する１以上の被分析物を分離するための方法が本明細書中に記載される。該方法は、微小孔物質を有するフィルターを通して液体を通過させることを含み、ここで該被分析物は、微小孔物質の表面付近に局在化される。さらなるハイブリダイゼーション及び増幅などのさらなるステップは、被分析物が局在された時点で、行われうる。１の方法では、、被分析物が局在された時点で、サンプル中の被分析物の濃度を測定するために、該被分析物が検出され、計数され、そして相関されうる。改変された微小孔物質及び混合物はまた、本明細書中に開示され、本明細書中に記載される方法及び物品のいずれかにおいて使用されうる。混合物は、微小孔物質及びピグメントから構成され、該ピグメントは一度被分析物が局在されると、該被分析物の検出を高める。さらなる態様では、様々なキット及び物品、例えば本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかを含むろ過装置などが提供される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
微小孔物質及びピグメントを含む複合体であって、該ピグメントが該微小孔物質内に組み込まれている前記複合体。
【請求項２】
前記ピグメントが、前記微小孔物質に共有結合されている、請求項１に記載の複合体。
【請求項３】
前記ピグメントが、リンカーにより前記微小孔物質に結合される、請求項２に記載の複合体。
【請求項４】
前記リンカーが、オルガノシリル基を含む、請求項３に記載の複合体。
【請求項５】
前記ピグメントが、前記微小孔の表面上に存在する水酸基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、アミン基、又はそれらの組合せにより、該微小孔物質に結合される、請求項２に記載の複合体。
【請求項６】
前記ピグメントが、有機色素を含む、請求項２に記載の複合体。
【請求項７】
前記有機色素が、イソチオシアネート、トリアジン、又はエステルを含む、請求項６に記載の複合体。
【請求項８】
前記微小孔物質が、セラミック、金属、炭素、又はガラスを含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項９】
前記微小孔物質が、金属酸化物を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項１０】
前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む、請求項９に記載の複合体。
【請求項１１】
前記微小孔物質が、無機電気化学的に形成された物質又はエッチ物質を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項１２】
前記微小孔物質が、約０.０２ミクロン～約０.２ミクロンの直径を有する微小孔を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項１３】
前記微小孔物質が酸化アルミニウムを含み、かつ前記ピグメントが有機色素を含み、ここで該有機色素が、オルガノシリル基を含むリンカーにより該微小孔物質に共有結合される、請求項１に記載の複合体。
【請求項１４】
前記ピグメントが、前記微小孔物質上に沈積される、請求項１に記載の複合体。
【請求項１５】
前記ピグメントが、元素金属、金属酸化物、合金、又はそれらの組合せを含む、請求項１４に記載の複合体。
【請求項１６】
前記ピグメントが元素金属を含む場合、該元素金属が遷移金属を含む請求項１５に記載の複合体。
【請求項１７】
前記遷移金属が、パラジウム、ニッケル、銀、金、又はそれらの組合せを含む、請求項１６に記載の複合体。
【請求項１８】

前記微小孔物質が酸化アルミニウムを含み、そして前記ピグメントが該微小孔物質上に沈積される１以上の元素遷移金属を含む、請求項１に記載際の複合体。
【請求項１９】
前記元素遷移金属が、パラジウム、ニッケル、又はそれらの組合せを含む、請求項１８に記載の複合体。
【請求項２０】
前記複合体がさらにサスペンション・ポリマーを含み、ここで該サスペンション・ポリマーが該複合体の表面付近に局在化される、請求項１～１９に記載の複合体。
【請求項２１】
前記サスペンション・ポリマーが、オリゴヌクレオチド、多糖、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項２０に記載の複合体。
【請求項２２】
前記サスペンション・ポリマーが、オリゴヌクレオチドを含む場合、該オリゴヌクレオチドが核酸を含む、請求項２０に記載の複合体。
【請求項２３】
前記複合体が、ビーズ又は膜を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項２４】
ピグメントを微小孔物質に共有結合することを含む、請求項１に記載の複合体の製造方法。
【請求項２５】
ピグメントを微小孔物質上に沈積することを含む、請求項１に記載の複合体の製造方法。
【請求項２６】
請求項２４に記載の方法により作られる複合体。
【請求項２７】
請求項２５に記載の方法により作られる複合体。
【請求項２８】
被分析物検出のための、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体の使用。
【請求項２９】
前記被分析物が、核酸、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細胞要素、細菌、タンパク質、又はそれらの組み合わせを含む、請求項２８に記載の使用。
【請求項３０】
バイオリアクターとしての、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体の使用。
【請求項３１】
被分析物の局在化方法であって、該分析物を、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体と接触することを含む、前記方法。
【請求項３２】
液体サンプルから被分析物を分離する方法であって、該液体サンプルを、請求項１～２０、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体と接触することを含む、前記方法。
【請求項３３】
被分析物の定量方法であって、以下のステップ：
(ａ) 該被分析物を含む既知の体積を有する液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該被分析物が、該複合体の表面付近に局在化され、そして
(ｂ) 該複合体上の該被分析物を検出するステップ
を含む前記方法。
【請求項３４】

ステップ(ａ)の後又は前のいずれかにおいて、前記被分析物のうちの少なくとも幾つかは、検出可能なトレーサーで標識されて、標識された被分析物を作り出す、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記検出ステップ(ｂ)が、光学的検出により行われる、請求項３３に記載の方法。

【請求項３６】

ステップ(ｂ)の後に、

(ｃ) 前記複合体上の前記標識された被分析物を計数し、そして

(ｄ) 該計数された被分析物を前記液体サンプルの既知の体積と相関して、該液体サンプル中の該被分析物濃度を測定する、請求項３４に記載の方法。

【請求項３７】

前記液体サンプルが生体液を含み、ここで該生体液が、全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、精液、痰、気管支肺胞洗浄液、関節吸引液、又は創傷排膿液を含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３８】

前記液体サンプルが、細菌、ウイルス、真菌、胞子、細胞培養、糞便、動物組織又は細胞、野菜組織又は細胞、それらの溶解された成分、又はそれらの組合せを含む、請求項３３～３５のいずれか1項に記載の方法。

【請求項３９】

前記液体サンプルが、前記複合体を通す前に、前ろ過されるか、又は不純物を取り除くために処理される、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４０】

前記液体サンプルはさらに、緩衝液、塩、酵素、界面活性剤、カオトロピック剤、又はそれらの組合せをさらに含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４１】

前記液体サンプルがさらにＮａＣｌを含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４２】

前記被分析物が、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル-生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細胞要素、細菌、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４３】

前記被分析物が核酸を含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４４】

前記核酸が、少なくとも約１５００塩基又は塩基対を有するＲＮＡ又はＤＮＡを含む、請求項４３に記載の方法。

【請求項４５】

前記核酸がビリオンを含む、請求項４３に記載の方法。

【請求項４６】

前記ビリオンがＨＩＶビリオンを含む、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

前記核酸が、検出可能なトレーサーで標識され、ここで該検出可能なトレーサーが、蛍光マイクロビーズ、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、蛍光生成酵素、蛍光色素、又はそれらの組合せを含む群を含む、請求項４３に記載の方法。

【請求項４８】

ステップ(ａ)の後に、前記局在された核酸が、特異的に局在された標的核酸を含む、請求項４３に記載の方法。

【請求項４９】

前記特異的に局在された標的核酸が、蛍光核酸色素を含むトレーサーで標識される、請

求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
ステップ(ａ)の後に、前記局在された核酸が、非特異的に局在された核酸を含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項５１】
前記非特異的に局在された核酸が、蛍光トレーサーを含む特異的に結合するプローブで標識された標的核酸を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記非特異的に局在された核酸が、特異的に結合するプローブとハイブリダイゼーションされて、表面局在化ハイブリッドを形成する標的核酸を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
前記表面局在化ハイブリッドが、蛍光核酸色素で標識される、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記核酸が、核酸に付着される２以上の異なる検出可能なトレーサー分子を含む検出可能なトレーサーで標識される、請求項４３に記載の方法。
【請求項５５】
前記検出可能なトレーサー分子が、蛍光トレーサー分子を含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記標識された核酸が、３超のシグナル対ノイズ比を達成するために、十分な蛍光を有する、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記標識された核酸が、約３～約１０のシグナル対ノイズ比を達成するために、十分な蛍光を有する、請求項５５に記載の方法。
【請求項５８】
前記標識された被分析物は、０又は１の標識された被分析物が検出領域内で検出されることを許容するための十分小さい検出領域の光学的な検出により計数される、請求項３４に記載の方法。
【請求項５９】
前記標識された被分析物が、走査共焦点上面蛍光光度計で光学的に検出される、請求項３４に記載の方法。
【請求項６０】
前記標識された被分析物が、ＣＣＤアレイに基く蛍光装置で光学的に検出される、請求項３４に記載の方法。
【請求項６１】
ステップ(ａ)の前に、サスペンション・ポリマーを前記液体サンプルに加え、ここで該サスペンション・ポリマーが、前記被分析物と相互作用する、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６２】
核酸の増幅方法であって、(ａ) 該核酸を含む既知の体積を有する液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該核酸が、該複合体の表面付近に局在化され、そして(ｂ) 該核酸を増幅することを含む、前記方法。
【請求項６３】
核酸の増幅方法であって、(ａ) 既知の体積を有する液体サンプル中の核酸を増幅して、増幅された核酸を作り出し、そして(ｂ) 増幅された核酸を含む該サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通すことを含み、ここで該増幅された核酸が該複合体の表面付近に局在化される、前記方法。

【請求項６４】
核酸のハイブリダイゼーション方法であって、(ａ) 該核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該核酸が該複合体の表面付近に局在化され、そして(ｂ) 該核酸を、該核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションすることを含む、前記方法。
【請求項６５】
核酸のハイブリダイゼーション方法であって、(ａ) 液体サンプル中の核酸を、該核酸と相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションして、ハイブリダイゼーションされた核酸を作り出し、そして(ｂ) 該ハイブリダイゼーションされた核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該ハイブリダイゼーションされた核酸が、該複合体の表面付近に局在化される、前記方法。
【請求項６６】
核酸同定方法であって、(ａ) 該核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該核酸が、該複合体の表面付近に局在化され、そして(ｂ) 該核酸を、該核酸に相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションすることを含む、前記方法。
【請求項６７】
核酸同定方法であって、(ａ) 液体サンプル中の核酸を、該核酸と相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションして、ハイブリダイゼーションされた核酸を作り出し、そして(ｂ) ハイブリダイゼーションされた核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該ハイブリダイゼーションされた核酸が、該複合体の表面付近に局在される、前記方法。
【請求項６８】
請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体を含む物品。
【請求項６９】
前記物品がろ過装置である、請求項６８に記載の物品。
【請求項７０】
前記ろ過装置が、入口と出口を有するウェル本体であって、ここで該ウェル本体が入口壁と出口壁を有するウェル本体、並びに(ｂ) 請求項１～２２、２６、２７のいずれか１項に記載の複合体を含むフィルターであって、ここで該フィルターが該ウェル本体の該入口壁に付着されるフィルターを含む、請求項６８に記載の物品。
【請求項７１】
前記ウェル本体の前記入口が、キャップを取り付けられる、請求項６９に記載の物品。
【請求項７２】
前記ウェル本体の前記出口が、キャップを取り付けられる、請求項６９に記載の物品。
【請求項７３】
前記ろ過装置が、２以上のウェル本体を含み、ここで各ウェル本体が、トップ開口部及び底開口部、並びに(ｂ) 請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体を含むフィルターを含み、ここで該フィルターは、各ウェル本体の底開口部をカバーする、請求項６９に記載の物品。
【請求項７４】
前記ろ過装置がさらに、該ろ過装置の前記フィルターを通して液体を移動させるための装置を含む、請求項７３に記載の物品。
【請求項７５】
前記ろ過装置がさらに、吸引装置を含み、ここで該ろ過装置が、シールを形成するように吸引装置内に配置される、請求項７３に記載の物品。
【請求項７６】
請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体、並びに被分析物を検

出するための検出手段を含むキット。
【請求項７７】
請求項６８～７５のいずれか１項に記載の物品、並びに被分析物を検出するための検出手段を含む、キット。
【請求項７８】
前記被分析物が、標識された被分析物を含む、請求項６８～７５に記載のキット。
【請求項７９】
既知の体積を有する液体サンプル中の１以上の被分析物を分離するための方法であって、(ａ)該液体を、微小孔物質を含むフィルターに通すことを含み、ここで該被分析物が該微小孔物質の表面付近に局在化される、前記方法。
【請求項８０】
前記局在化ステップ(ａ)の前又は後に、前記被分析物が検出可能トレーサーで標識される、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
前記局在化ステップ(ａ)の後に、(ｂ) 標識された被分析物を光学的に検出し；(ｃ) 該標識された被分析物を計数し、そして(ｄ) 該被分析物を前記液体サンプルの既知の体積と相関して、該液体サンプル中の該被分析物の濃度を測定する、請求項８０に記載の方法。
【請求項８２】
前記微小孔物質が、無機電気化学的に形成された膜又はエッチ膜を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８３】
前記微小孔物質が、０.２ミクロン未満の直径を有する微小孔を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８４】
前記微小孔物質が、約０.０２ミクロン～約０.２ミクロンの直径を有する微小孔を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８５】
前記微小孔物質が、金属酸化物を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８６】
前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記サンプルが、生体液を含み、ここで、該生体液が、全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、精液、痰、気管支肺胞洗浄液、関節吸引液、又は創傷排膿液を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
前記液体サンプルが、細菌、ウイルス、真菌、胞子、細胞培養、糞便、動物組織又は細胞、野菜組織又は細胞、それらの溶解された成分、又はそれらの組合せを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８９】
前記液体サンプルが、前ろ過され、又は前記フィルターを通る前に不純物を取り除くために処理される、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９０】
前記液体サンプルが、さらに緩衝液、塩、酵素、界面活性剤、カオトロピック剤、又はそれらの組合せを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９１】
前記液体サンプルが、さらにＮａＣｌを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項９２】
前記被分析物が、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル-生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細胞要素、細菌、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９３】
前記被分析物が、核酸を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９４】
前記微小孔物質が、前記核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドを含まない、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】
前記核酸が、少なくとも約１５００塩基又は塩基対を有するＲＮＡ又はＤＮＡを含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項９６】
前記核酸が、ビリオンを含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項９７】
前記ビリオンが、ＨＩＶビリオンを含む、請求項９６に記載の方法。
【請求項９８】
前記核酸が、検出可能なトレーサーで標識され、ここで該検出可能なトレーサーが、蛍光マイクロビーズ、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、蛍光生成酵素、蛍光色素、又はそれらの組合せを含む少なくとも１の群を有する、請求項９３に記載の方法。
【請求項９９】
ステップ(ａ)の後に、前記核酸が、特異的に局在された標的核酸を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項１００】
特異的に局在された標的核酸が、蛍光核酸色素を含むトレーサーで標識される、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
ステップ(ａ)の後に、前記核酸が、非特異的に局在された核酸を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項１０２】
前記非特異的に局在された核酸が、蛍光トレーサーを含む特異的結合性プローブで標識された標的核酸を含む、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０３】
前記非特異的に局在された核酸が、特異的結合性プローブとハイブリダイゼーションされて、表面局在化ハイブリッドを形成する標的核酸を含む、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０４】
前記表面局在化ハイブリッドは、蛍光核酸色素で標識される、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
前記核酸が、検出可能なトレーサーであって、該核酸に付着される２以上の異なる検出可能なトレーサー分子を含む検出可能なトレーサーで標識される、請求項９３に記載の方法。
【請求項１０６】
前記検出可能なトレーサー分子が、蛍光トレーサー分子を含む、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記標識された被分析物が、３超のシグナル対ノイズ比をを達成するために十分な蛍光を有する、請求項８０又は８１に記載の方法。
【請求項１０８】

０又は１の標識された核酸が、検出領域内で検出されることを許容するため、十分に小さい検出領域を光学的に検出することにより、前記標識された被分析物が計測される、請求項８０又は８１に記載の方法。

【請求項１０９】

前記標識された被分析物が、走査共焦点上面蛍光光度計で光学的に検出される、請求項８０又は８１に記載の方法。

【請求項１１０】

前記標識された被分析物が、ＣＣＤアレイに基く蛍光装置で光学的に検出される、請求項８０又は８１に記載の方法。

【請求項１１１】

ステップ(ａ)の後、前記被分析物が増幅される、請求項７９に記載の方法。

【請求項１１２】

ステップ(ａ)の後に、前記被分析物が、前記核酸と相補的な結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションされる、請求項９３に記載の方法。

【請求項１１３】

ステップ(ａ)の後に、前記核酸が、該核酸を同定するため、該核酸と相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドでハイブリダイゼーションされる、請求項９３に記載の方法。

【請求項１１４】

ステップ(ａ)の前に、サスペンション・ポリマーを前記液体サンプルに加え、ここで該サスペンション・ポリマーが、前記被分析物と相互作用する、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１５】

ステップ(ａ)の前に、前記微小孔物質の表面付近へ、サスペンション・ポリマーを局在化する、請求項７９～１１４に記載の方法。

【請求項１１６】

前記サスペンション・ポリマーは、オリゴヌクレオチド、多糖、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項１１５に記載の方法。

【請求項１１７】

前記サスペンション・ポリマーがオリゴヌクレオチドを含むとき、該オリゴヌクレオチドが核酸を含む、請求項１１６に記載の方法。

【請求項１１８】

微小孔物質及びサスペンション・ポリマーを含む改変微小孔物質であって、該サスペンション・ポリマーが、該微小孔物質の表面付近に局在化される、前記物質。

【請求項１１９】

前記微小孔物質が、無機電気化学的に形成された膜又はエッチ膜を含む、請求項１１８に記載の物質。

【請求項１２０】

前記微小孔物質が、０.２ミクロン未満の直径を有する微小孔を含む、請求項１１８に記載の物質。

【請求項１２１】

前記微小孔物質が、約０.０２ミクロン～約０.２ミクロンの直径を有する微小孔を含む、請求項１１８に記載の物質。

【請求項１２２】

前記微小孔物質が、金属酸化物を含む、請求項１１８に記載の物質。

【請求項１２３】

前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む、請求項１２２に記載の物質。

【請求項１２４】

前記サスペンション・ポリマーが、オリゴヌクレオチド、多糖、タンパク質、又はそれ

らの組合せを含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項１２５】
前記サスペンション・ポリマーがオリゴヌクレオチドを含むとき、該オリゴヌクレオチドは核酸を含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項１２６】
入口及び出口を有するウェル本体を含むろ過装置であって、ここで該ウェル対が内部壁及び外部壁、並びに(ｂ)被分析物を局在化できる微小孔物質を含むフィルターを含み、ここで該フィルターが、該ウェル本体の該内部壁に取り付けられる、前記装置。
【請求項１２７】
前記ウェル本体の前記入口が、キャップを取り付けられる、請求項１１８に記載の物品。
【請求項１２８】
前記ウェル本体の前記出口が、キャップを取り付けられる、請求項１１８に記載の物品。
【請求項１２９】
２以上のウェル本体を含むろ過装置であって、ここで各ウェル本体が、トップ開口部と底開口部、並びに(ｂ) 被分析物を局在化できる微小孔物質を含むフィルターを含み、ここで該フィルターは、各ウェル本体の底開口部をカバーする、前記装置。
【請求項１３０】
前記ろ過装置が、さらに吸引装置を含み、ここでシールが形成されるように該ろ過装置が吸引装置内に配置される、請求項１２８に記載の物品。
【請求項１３１】
被分析物を局在化することができる微小孔物質を含む膜、並びに標識された核酸を検出するための検出手段を含む、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
液体サンプル中に存在する１以上の被分析物を分離するための組成物、方法、装置、及び機械が、本明細書中で記載される。
【０００２】
本出願は、２００２年１１月２６日に出願された米国仮出願第60/429,093号及び第60/429,259号の利益を主張する。これらの出願は、その教示の全てを本明細書中に援用される。
【背景技術】
【０００３】
背景技術
対象由来のサンプル中に存在する被分析物(analyte)の定量及び同定は、医学分野において重要である。特に、サンプルからの被分析物の定量及び同定は、多数の疾患の診断及び治療の大きな助けとなりうる。
【０００４】
例えば、医学診断において、核酸分析は、広く使用される技術である。現在の核酸分析技術は、患者サンプル１ｍｌあたりの標的核酸の数百の分子コピーをルーチンに定量する。従来の研究室装備で検出するための十分に高い核酸濃度を達成するために、十分な量の分子増幅を必要とし、該増幅はポリメラーゼ・チェーン・リアクション(ＰＣＲ)を介することが多い。この分子増幅は、増幅前に核酸の精製を必要とし、これは時間の浪費であり、値段が高く、調整が難しく、そして限られた正確性しか有さない。最終アッセイ結果は、幾つかの多段階の過程をしっかり制御することに左右される。現在、少なくとも一部において、現在の技術に特有の限られた精密度及び正確性のため、ウイルス量アッセイは、核酸濃度の(線形というよりはむしろ)対数値を記録する。
【０００５】

上記の増幅技術は、競合又は妨害する混入物を含まない精製された核酸サンプルを必要とする。混入物は、サンプル中に存在しうるし、そして酵素、タンパク質、ヘモグロビン、細菌、粒子などを含むこともある。或いは、混入物は、使用された精製システム由来でありうるし、そして有機溶媒、塩、金属イオンなどを含むこともある。核酸増幅(逆転写、増幅、など)を妨げる混入物を取り除くこと並びに検出(ハイブリダイゼーション、蛍光、など)を妨げる混入物質を取り除くことは、時間がかかる過程を行うことを必要とする。

【０００６】

核酸を精製するための技術が存在する。例えば、クロロホルム、フェノール、及び低級アルコールを使用する複数回の有機試薬抽出/精製は、次なる分析のため核酸を単離及び精製するために何年も使用されてきた。更なる精製技術は、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、及びそれらの種々の組合せを使用するクロマトグラフィー技術を含む。

【０００７】

シリカに基く核酸精製技術は、現在広く商業的に使用されている。これらのシステムは、カオトロピック剤及び/又は有機溶媒の存在下において、シリカ及びその誘導体上での可逆的結合(沈降)を通して核酸を精製する。典型的に、これらのシステムは、５+Mのグアニジン・チオシアネート(ＧＴＣ)中に核酸を含む患者サンプルを希釈する。この混合液を室温で反応させ、次に等量の無水エチル・アルコールを加え、そしてボルテックスをかける。この混合液を、核酸が即座に結合する表面積の大きいシリカに晒す。シリカを回収し、ＧＴＣ及びエチル・アルコールを含む溶液で数回洗浄し、乾燥し、そして次に結合した核酸を、低塩濃度の水で溶出させる。この技術のいくつかの別方式も存在し、そして使用されるシリカに基いた結合剤に基いて区別される。例えば、一のシステムは、小さいろ過又は厚い結合用シリカ繊維マットを含むスピンカラムを使用する。別のシステムは、グラスビーズ、磁性を帯びたシリカに基くビーズ、シリカを充填されたフィルターなどを使用する。これらのシステムは、かなり低濃度の標的核酸を単離及び精製を可能にするために、担体核酸(共沈剤)を加える。シリカに基く核酸精製技術は、それらの意図された機能を適切に果たす一方、これらの技術は、時間がかかりそして高価である。

【０００８】

核酸の精製と同様に、核酸の固定化のための技術も多く存在する。核酸の捕獲を亢進するために、核酸を含む溶液に接触された際に核酸に結合する種々の化学物質で、表面は処理される。例えば、ガラス及び酸化アルミニウムに有機化合物を共有結合することは、知られている。そうした結合は、電荷、疎水性効果などの制御を目的とし未変性の酸化物表面を完全に改変するために、並びに表面に特異的標的分子の捕捉をもたらすことを目的とし、核酸、タンパク質、ポリマーなどの共有結合を可能にするため、シラン化試薬の使用を含むこともある。種々の表面化学物質を伴う石英、ガラス、及びシリコン基質は、光学的分子検出用に核酸を補足するために使用されてきた。これらの技術は、固定化又は捕捉のため、反応性の表面に標的核酸を拡散することを必要とする。低い濃度では、これらの拡散に制御される反応は、完了するために数時間必要とする。これらの技術は、時間がかかり、高価であり、そして迅速な光学的分子検出技術に適さないこともある。

【０００９】

従って、サンプルから被分析物を迅速で、高価でなく、そして高効率で単離するための物質、装置、及び方法が所望されている。被分析物がサンプルから取り出された時点で、被分析物の更なる操作(例えば定量及び単離)を妨げうる混入物の全てを取り除くことが所望される。

【発明の開示】

【００１０】

要約

液体サンプル中に存在する１以上の被分析物を分離するための組成物、方法、装置、及び機械が、本明細書中で記載される。一の態様では、該方法は、液体を微小孔物質(Micro

porous Material)から構成されるフィルターに通すことを含む。ここで被分析物は、微小孔物質の表面に局在化される。被分析物が微小孔物質上に局在された時点で、処理ステップ、例えばハイブリダイゼーション及び増幅が行われる。一の態様では、被分析物が微小孔物質上に局在された時点で、既知の体積を有するサンプル中の被分析物の濃度を検出するために、該被分析物は検出、計数、及び/又は相関される。

【００１１】

別の態様では、複合体物質が開示される。特定の実施態様では、これらの複合体は、本明細書中に記載される方法及び物品の全てにおいて使用されうる。該複合体は、微小孔物質とピグメント(pigment)から構成されており、ここで該ピグメントは、微小孔物質内に組み込まれている。該ピグメントは、微小孔物質の光学的性質を変化させ、これにより、被分析物が複合体の表面付近に局在された時点で、被分析物の検出が高められる。

【００１２】

別の態様では、改変された微小孔物質であって、微小孔物質とサスペンション・ポリマー(suspention polymer)から構成される物質が開示される。ここで該サスペンション・ポリマーは、微小孔物質の表面付近に局在される。

【００１３】

さらなる態様では、微小孔物質のいずれかを含むか又は本明細書中に記載されるろ過装置などの種々のキット及び物品が提供される。

【００１４】

本明細書中に記載される微小孔物質、方法、物品、及び機械の利点は、以下の記載において部分的に説明されるであろうし、又は以下に記載の態様の実行により確認されうる。以下に記載の利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘される要素及び組み合わせを用いて認識され、そして達成されるであろう。前の一般的な記載と以下の詳細な記載の両方とも例示的及び説明的のみであり、そして制限的ではないということは理解されるべきである。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１５】

詳細な説明

Ａ.被分析物の分離及び分析のための組成物及び方法。

所定のサンプルから又は所定のサンプルにおいて被分析物を分離又は分析できることが所望される状況が多くある。被分析物は、例えばサンプル中で分析される標的物質のいずれかでありうる。例えば、疾患診断において、病原体又はその一部により産生される特定の被分析物が存在し、そして医師は、この被分析物の有無を使用して、患者が病原体に感染しているかどうかを決定する。この決定の型に影響する特性及びパラメーターが多くあり、例えば検出効力、検出方法がどの程度の感度であるか、病原体により産生される被分析物の量、分析を行うために必要とされるサンプル量、被分析物の安定性、サンプル中に存在するバックグラウンドとなる被分析物の量などである。検出の感度及び被分析物を検出できる簡便性を増大させる方法及び組成物は所望される。

【００１６】

典型的に、該方法は、例えばサンプルから被分析物を分離することによりサンプル中で被分析物を操作し、被分析物を局在化し、例えば分離された被分析物の数を計数することにより被分析物を分析し、計数された被分析物の数をサンプル中の被分析物の数に相関し、被分析物を精製し、そして、例えば１以上の別の操作が完了した後に被分析物を収集することを含む。これらのステップ及び他のステップは順々に行われるか、又はこれらのステップの多く又は全ては一緒に行われうる。

【００１７】

液体サンプルなどのサンプル中に存在する１以上の被分析物を分離する方法が本明細書中に記載される。典型的に、液体サンプルは、既知の体積であって、被分析物の分析の特定の類型を容易にする体積を有するであろう。「液体サンプルから被分析物を分離する」は、液体サンプルなどのサンプルから被分析物を取り出すことを意味する。サンプルから

分離される被分析物の量及び正確性は変化しうる。一の態様では、被分析物の有無の定性測定は、正確性を欠きかつ非効率的にサンプルから分離された被分析物に基いて行われうる。別の態様では、被分析物は、高まった正確性及び効率で分離される。この態様では、分離された被分析物は、さらなる操作、例えば本明細書中で議論される定量にかけられうる。分離された被分析物の純度は、かなり高純度なものからサンプル由来の不純物を含む被分析物までの範囲で変化しうる。開始サンプルに対する少なくとも２、５、１０、２５、５０、７５、１００、１５０、２５０、５００、７５０、１,０００、５,０００、１０,０００、及び２５,０００倍の精製度が達成されうる。

【００１８】

一の態様では、該方法は、液体サンプルなどのサンプルを、フィルターに通すことを含む。典型的には、該フィルターは、微小孔物質を有するか又は微小孔物質から作られる。サンプルがフィルターを通過するとき、被分析物は、フィルターの表面付近に局在化されうる。開示されたフィルター及び微小孔物質は、多くの異なる表面、例えば平面的表面、外部表面、内部表面、湿表面、及びチャネル表面などを有する。被分析物は、しばしば微小孔物質を通り抜ける。微小孔物質は、複数の孔、穴、及び/又はチャネルを有する物質のいずれかである。微小孔物質は、液体が物質中に又は物質を通り流れることを許容する。

【００１９】

特定の実施態様では、該物質は局在化され、そしてこの局在化は可逆的であり、そして別の実施態様では局在化は非可逆的である。局在化は、固定化される特徴も含み、このことは、被分析物が規定の領域に、分析、例えば計数又はアッセイされるために十分長く保持されるということを意味する。

【００２０】

フィルター及び微小孔物質の特徴は、サンプル中の被分析物の分離及び/又は操作のパラメーターに影響する。特定の実施態様では、微小孔物質は複合体又は改変された微小孔物質であり、そしてこれらの複合体は、本明細書中に記載される。例えば該被分析物を直接観察することにより、又は被分析物に結合する標識のいくつかの類型についてアッセイすることにより、局在された被分析物を検出することが所望される。該検出は、従来からアナログ・シグナル検出技術と名付けられる技術により行われてきた。ここで全ての被分析物は、微小孔表面に局在された被分析物の数を表す「総」シグナルに関与する。加えて、本明細書中に開示される技術は、デジタル検出又は被分析物分子計数と名付けられるものを許容する。以下にさらに詳細に記載されるように、被分析物の分子計数は、被分析分子又は標識から実際に検出できるシグナル及び検出方法により観測されるバックグラウンドのシグナル量を含む多くの異なるパラメーターにより影響される。さらに、検出に必要とされるシグナルの閾値レベルが存在し、そして該閾値レベルは、使用される検出方法毎に異なる。フィルターの平面的表面に局在された特定の被分析物の「計数」を可能にするため、局在される被分析物分子又は標識からの絶対検出可能シグナルは、検出方法においてバックグラウンド・シグナルより高く、そしてシグナル検出についての絶対閾値より高い被分析物から観測されるシグナルが存在するように十分高いことが必要であり、そうでなければ被分析物は、局在されるが、計数されなくなってしまう。本明細書中に記載されるように、本明細書中に記載される微小孔物質は、フィルター内に使用されて、特定の検出方法用のフィルターにより産生されるバックグラウンド・シグナルを低減することができる。アナログ検出では、このバックグラウンド・シグナルの低減は、より少ない絶対数の被分析物を検出することを可能にする。なぜなら、被分析物からのより小さいシグナルであって、バックグラウンドを超えて観測されるシグナルが必要とされるからである。分子計数のようなデジタル検出では、バックグラウンド・シグナルの低下は、個々の分子のよりよい解像を可能にし、かつ分子の検出を大幅に改良する。こうして、開示された方法及び組成物は、被分析物検出におけるより良い感度を可能にし、つまり、サンプル中のより少ない数の被分析物の検出を可能にした。このことは、被分析物の有無を同定するためにより少ないサンプル及び試験物質の使用を可能にし、かつ感度及び正確性がより高い可

能性があるので望ましい。本明細書中に記載されるように、特定の実施態様では、複合体は、バックグラウンド・シグナルを低減するためにピグメントを使用する。

【００２１】

被分析物質が微小孔物質、例えば複合体又は改変微小孔物質の表面付近に局在された時点で、さらなる処理ステップが行われうる。被分析物は、例えば増幅、検出、又は単離されうる。例えば、被分析物はまた、計数、相関、精製、又は収集されうる。

【００２２】

本明細書中に記載される微小孔物質、方法、物品、及びキットは、慣用の被分析物の分離及び分析方法を超える改良を提供し、そして現行技術より単純化されている。さらに、本明細書中に記載される微小孔物質、方法、物品、及びキットは、分離したステップ、又は物質若しくは方法として個々に、或いは開示された物質及び方法のステップの組合せとして有用である。例えば、多種多様な不純物質から迅速にかつ単純に微小孔物質を通して核酸を単離する能力は、これらの単離された核酸が次に計数されるかどうかにかかわらず有用である。

【００２３】

開示された物品並びに組成物及び微小孔物質の類型の様々な部分、並びに様々なステップ及び方法ステップのセットは、以下のより例示的な詳細において説明される。

【００２４】

Ｂ.被分析物の局在

開示された方法は、サンプル中の被分析物を局在化するために一般的に使用される。使用されうるサンプルであって、被分析物の源となりうるサンプルの多くの異なった類型が存在する。

１.サンプル

液体は、例えば開示されたフィルター又は微小孔物質を通過するように機能するので、サンプルは典型的には液体である。被分析物を含むサンプル液体は、溶液又は懸濁液、例えば分子的に溶解された物質の溶液又は流体力学的に懸濁された物質を含む。被分析物を含むサンプル液体は、生体液、例えば全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、精液、痰、気管支肺胞洗浄液、関節吸引液(joint aspirate)、又は創傷排膿液(wound drainage)を含む。使用されうる別のサンプル液は、細菌、ウイルス、真菌、胞子、細胞培養、糞便、動物組織又は細胞、野菜組織又は細胞、それらの溶解された成分、又はそれらの組合せを含む。被分析物を含む固体サンプルは、ホモジェナイズされうるか、又はそうでなければサンプルの分析を容易にする溶液中に入れられることが理解されるだろう。

【００２５】

別の態様では、被分析物の源は、環境サンプルでありうる。例えば、ポリマー又は他の化学物質などの汚染物質を含む排水でありうる。別の態様では、サンプルは、生物戦争サンプルであって、生物戦争薬剤で汚染された可能性があるサンプルと考えられるものでありうる。例えば、生物戦争サンプルは、飲料水サンプルなどの水サンプルであって、汚染された可能性のあるサンプルでありうる。別の態様では、サンプルは、空気サンプルでありうる。

【００２６】

ｉ．既知体積サンプル

サンプルは、しばしば既知の体積状態において利用されるであろう。既知の体積サンプルとは、サンプルの体積又は量が知られているサンプルである。典型的には、処理の間の幾つかの点でサンプル中に存在する被分析物の濃度を測定することを望む場合、さらにサンプル中に存在する被分析物の量が、サンプルの由来元の生物における被分析物の量に相関させる場合、既知の体積サンプルを使用することは重要である。例えば、対象内にどれだけの量のウイルス粒子が存在するかを知ることが所望される場合、血液サンプルなどのサンプルは、対象から取られうる。開示された方法及び組成物を使用して、この血液サンプルが分析され、そしてサンプル中に存在する被分析物の量が測定されうる。どれだけ多くの被分析物が対象中に存在するかを決定するために、既知の体積のサンプル中にどれだ

け多くの分析物が存在するかを測定し、そして次にこれを、例えば対象の液体の全体積についての知見に基いて、対象中に存在する被分析物の量に当てはめることを必要とする。

【００２７】

既知体積のサイズは、例えば、サンプル中の被分析物の量、被分析物の検出感度、又は被分析物について計画された操作の類型に左右されうる。例えば、サンプルが血液サンプルである場合、既知の体積は、遺伝子試験については、４０μｌ未満、３０μｌ未満、２０μｌ未満、１０μｌ未満、又は５μｌ未満でありうる。一方、ウイルス量試験についての血漿又はＣＳＦサンプルは、２００μｌ超、例えば２００μｌ～１０,０００μｌでありうる。別の態様では、被分析物を含むサンプルの量は、０.５μｌ～１,０００μｌ、０.５μｌ～９００μｌ、０.５μｌ～８００μｌ、０.５μｌ～７００μｌ、０.５μｌ～６００μｌ、０.５μｌ～５００μｌ、０.５μｌ～４００μｌ、０.５μｌ～３００μｌ、０.５μｌ～２００μｌ、０.５μｌ～１００μｌ、０.５μｌ～５０μｌ、０.５μｌ～２５μｌ、又は０.５μｌ～１０μｌである。別の態様では、サンプルが環境サンプル、例えば水、空気などである場合、サンプルの体積は、１ミリリットル超、例えば１０ｍｌ～１,０００ｍｌでありうる。

【００２８】

２.被分析物

示されたように、開示された組成物及び方法は、情報が所望される被分析物を取り扱うように、典型的に設計される。微小孔物質上への局在化に必要とされる性質を有する被分析物のいずれかは、標的されうるか又は取り扱われうる。

【００２９】

多数の被分析物は、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかの表面付近に局在化されうる。例えば、被分析物は、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル-生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細菌、タンパク質、又はそれらの組合せでありうる。さらに、被分析物は、サスペンション・ポリマーに結合された標的分子のいずれかを含む。被分析物のこれらの類型は、局在効率を増加させる。例えば、ＤＮＡ及び抗体から構成されるサスペンション・ポリマーは、抗原を特異的に結合するために使用されうる。例えば、抗原は、１０００ｋＤａ未満の分子量であり、そして微小孔物質上に効率よく局在するためにはおそらく小さすぎる。抗原を、核酸に結合された抗体と最初に相互作用させることにより、例えば、該抗原は、核酸との会合に基いてより効率的に局在化されうる。特定の態様では、標的分子をサスペンション・ポリマーと反応させることにより、実質的に局在化効力が改良されうる。局在効率を増加するためのサスペンション・ポリマーの使用の更なる詳細は、以下に考察されている。

【００３０】

被分析物を分類する１の方法は、該被分析物を局在化するために使用される微小孔物質の孔サイズに対する被分析物のサイズによる。例えば、被分析物は、微小孔物質における孔の直径の少なくとも１.５倍、２倍、３倍、４倍、６倍、８倍、１０倍、又は２０倍の輪郭線長(contour length)又は球形直径(globular diameter)を有しうる。特定の実施態様において、目標は、微小孔物質の表面付近に被分析物を局在化し、そして次に局在された分析物を検出することであると理解されている。孔サイズに対して被分析物が大きければ大きいほど、被分析物は、より効率よく局在されるであろう。つまり、微小孔物質を通り抜けることによって局在化位置から逃れる被分析物分子の数が、より少なくなることを意味する。しかしながら、孔のサイズが小さくなると、液体がフィルター又は物質を通過することができるスピードは減少し、そして所望の被分析物と伴に局在される不純物の数も高くなる。被分析物の大きさが測定され、そして使用される物質の適切な孔サイズを決定するために計算が使用され、そしてさらに、実験に基く分析が孔サイズを決定又は最適化するために使用されうるということも理解される。

【００３１】

ｉ.　組織

サンプルは、生物の組織のいずれの類型からも取得されうる。例えば、特定の状況では、例えば、組織が血である場合、組織は直接使用されうる。しかしながら、別の状況では、組織は収集され、そして次に例えばホモジェナイザー又は粉砕により、取り扱われうる。

【００３２】

４種の基本的な組織型が存在する。これらは、器官、構造、及び生物の別の構成要素の全てを作り出す。裏打ち、被覆、保護、吸収及び分泌する上皮細胞が、生物の中又は表面上に存在する。他の組織及び構成要素を一緒に保持する結合組織が存在する。血液は、結合組織とみなされる。互い通過しそして細胞のサイズを変化させる収縮性繊維を含む筋肉細胞を含む筋肉組織が存在する。最後に、神経組織が存在する。組織の１より多い類型を含む組織サブタイプ又は器官の例は、脂肪、乳房、脳、骨、腸、胃、皮膚、血液、肝臓、腎臓、子宮、前立腺、大腸、尿路、心臓、肺(pulmonary)、肺(lung)、筋肉、靭帯、腱、軟骨、精液、リンパ液などである。

【００３３】

ｉｉ．細胞

細胞のいずれの類型は、被分析物として考えられうる。例えば、真核細胞及び原核細胞は、被分析物でありうる。被分析物でありうる真核細胞の例は、例えば哺乳動物細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、及び鳥類細胞などの動物細胞、血液細胞、肝細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、脳細胞、骨細胞、神経細胞、免疫細胞、リンパ細胞、脳細胞、植物細胞、及び真菌細胞の全ての類型である。別の態様では、被分析物は、細胞の構成要素であることもあり、非限定的に、核、核膜、白色体、小胞体、リボソーム、染色体、細胞膜、ミトコンドリア、核小体、リソソーム、ゴルジ体、ペルオキシソーム、又は葉緑体を含む。

ｉｉｉ．細菌

細菌の類型のいずれかは、被分析物でありうる。細菌の例は、非限定的にアビオトロフィア(Abiotrophia)、アクロモバクター(Achromobacter)、アシダミノコッカス(Acidaminococcus)、アシドボラックス(Acidovorax)、アシネトバクター(Acinetobacter)、アクチノバシラス(Actinobacillus)、アクチノバクルム(Actinobaculum)、アクチノマデュラ(Actinomadura)、アクチノマイシス(Actinomyces)、アエロコッカス(Aerococcus)、アエロモナス(Aeromonas)、アフィピア(Afipia)、アグロバクテリウム(Agrobacterium)、アルカリゲネス(Alcaligenes)、アロイオコッカス(Alloiococcus)、アルテロモナス(Alteromonas)、アミコラタ(Amycolata)、アミコラトプシス(Amycolatopsis)、アナエロボスピリラム(Anaerobospirillum)、アナエロラブダス(Anaerorhabdus)、アラクニア(Arachnia)、アルカノバクテリウム(Arcanobacterium)、アクロバクター(Arcobacter)、アルスロバクター(Arthrobacter)、アトポビウム(Atopobium)、アウレオバクテリウム(Aureobacterium)、バクテロイデス(Bacteroides)、バルネアトリクス(Balneatrix)、バルトネラ(Bartonella)、ベルゲイェラ(Bergeyella)、ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)、ビオフィリア(Bilophila)、ブランハメラ(Branhamella)、ボレリア(Borrelia)、ボルデテラ(Bordetella)、ブラシスピラ(Brachyspira)、ブレビバシラス(Brevibacillus)、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)、ブレブンジモナス(Brevundimonas)、ブルセラ(Brucella)、ブルコルデリア(Burkholderia)、ブチアウゼラ(Buttiauxella)、ブチリビブリオ(Butyrivibrio)、カリマトバクテリウム(Calymmatobacterium)、カムピロバクター(Campylobacter)、カプノシトファーガ(Capnocytophaga)、カルジノバクテリウム(Cardiobacterium)、カトネラ(Catonella)、セデセア(Cedecea)、セルロモナス(Cellulomonas)、センチペダ(Centipeda)、クラミジア(Chlamydia)、クラミドフィラ(Chlamydophila)、クロモバクテリウム(Chromobacterium)、シセオバクテリウム(Chyseobacterium)、クリセオモナス(Chryseomonas)、シトロバクター(Citrobacter)、クロステリジウム(Clostridium)、コリンセラ(Collinsella)、コマモナス(Comamonas)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、コキセラ(Coxiella)、クリプトバクテリウム(Cryptobacterium)、デルフチア(Delftia)、デルマバクター(Dermabacter)、デルマトフィラス(Dermatophilus)、デスルフォモナス(Desulfomonas)、デスルフォビブリオ(Desulfovibrio)、ジアリスター(Dialister)、ジケルボバクター(Dichelo

bacter)、ドロシコッカス(Dolosicoccus)、ドロシグラヌルム(Dolosigranulum)、エドワードシエラ(Edwardsiella)、エゲルセラ(Eggerthella)、エクリキア(Ehrlichia)、エイケネラ(Eikenella)、エムペドバクター(Empedobacter)、エンテロバクター(Enterobacter)、エンテロコッカス(Enterococcus)、エルウィニア(Erwinia)、エリシペロスリクス(Erysipelothrix)、エスケリキア(Escherichia)、ユーバクテリウム(Eubacterium)、ユーインジェラ(Ewingella)、エキシグオバクテリウム(Exiguobacterium)、ファックラミア(Facklamia)、フィリファクター(Filifactor)、フラビモナス(Flavimonas)、フラボバクテリウム(Flavobacterium)、フランシセラ(Francisella)、フソバクテリウム(Fusobacterium)、ガルドネレラ(Gardnerella)、ベメラ(Gemella)、グロビカテラ(Globicatella)、ゴルドナ(Gordona)、ハエモフィラス(Haemophilus)、ハフニア(Hafnia)、ヘリコバクター(Helicobacter)、ヘロコッカス(Helococcus)、ホルデマニア (Holdemania)、イグナビグラヌム(Ignavigranum)、ジョンソネラ(Johnsonella)、キンゲラ(Kingella)、クレブシエラ(Klebsiella)、コクリア(Kocuria)、コセレラ(Koserella)、クルチア(Kurthia)、キトコッカス(Kytococcus)、ラクトバチルス(Lactobacillus)、ラクトコッカス(Lactococcus)、ロートロピア(Lautropia)、レクレルシア(Leclercia)、レジオネラ(Legionella)、レミノレラ(Leminorella)、レプトスピラ(Leptospira)、レプトトリキア(Leptotrichia)、ルコノストック(Leuconostoc)、リステリア(Listeria)、リストネラ(Listonella)、メガスファエラ(Megasphaera)、メチロバクテリウム(Methylobacterium)、ミクロバクテリウム(Microbacterium)、ミクロコッカス(Micrococcus)、ミツオケラ(Mitsuokella)、モビルンカス(Mobiluncus)、モエレレラ(Moellerella)、モラキセラ(Moraxella)、モルガネラ(Morganella)、マイコバクテリウム(Mycobacterium)、マイコプラズマ(Mycoplasma)、ミロイデス(Myroides)、ネイセリア(Neisseria)、ノカルディア(Nocardia)、ノカルディオプシス(Nocardiopsis)、オクロバクトラム(Ochrobactrum)、オエスコビア(Oeskovia)、オリゲラ(Oligella)、オリエンティア(Orientia)、パエニバシラス(Paenibacillus)、ペントエア(Pantoea)、パラクラミジア(Parachlamydia)、パスツレラ(Pasteurella)、ペディオコッカス(Pediococcus)、ペプトコッカス(Peptococcus)、ペプトストレプトコッカス(Peptostreptococcus)、フォトバクテリウム(Photobacterium)、フォトラブダス(Photorhabdus)、プレシモナス(Plesiomonas)、ポルフィリモナス(Porphyrimonas)、プレボテラ(Prevotella)、プロピオニバクテリウム(Propionibacterium)、プロテアス(Proteus)、プロビデンシア(Providencia)、シュードモナス(Pseudomonas)、シュードノカルジア(Pseudonocardia)、シュードラミバクター(Pseudoramibacter)、シクロバクター(Psychrobacter)、ラネラ(Rahnella)、ラルストニア(Ralstonia)、ロドコッカス(Rhodococcus)、リケッチア(Rickettsia)、ロカリマエア(Rochalimaea)、ロセオモナス(Roseomonas)、ローチア(Rothia)、ルミノコッカス(Ruminococcus)、サルモネラ(Salmonella)、セレノモナス(Selenomonas)、セルプリナ(Serpulina)、セラチア(Serratia)、シュウェンネラ(Shewenella)、シゲラ(Shigella)、シムカニア(Simkania)、スラッキア(Slackia)、スフィンゴバクテリウム(Sphingobacterium)、スフィンゴモナス(Sphingomonas)、スピリラム(Spirillum)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)、ステノトロフォモナス(Stenotrophomonas)、ストマトコッカス(Stomatococcus)、ストレプトバチルス(Streptobacillus)、ストレプトコッカス(Streptococcus)、ストレプトマイシス(Streptomyces)、スクシニビブロ(Succinivibrio)、ステレラ(Sutterella)、ストネラ(Suttonella)、タツメラ(Tatumella)、ティシエレラ(Tissierella)、トラブルシエラ(Trabulsiella)、トレポネマ(Treponema)、トロフェリマ(Tropheryma)、ツァカムレラ(Tsakamurella)、ツリセラ(Turicella)、ウレアプラズマ(Ureaplasma)、バゴコッカス(Vagococcus)、ベイロネラ(Veillonella)、ビブリオ(Vibrio)、ウィークセラ(Weeksella)、ウォリネラ(Wolinella)、ザントモナス(Xanthomonas)、ゼノラブダス(Xenorhabdus)、イエルシニア(Yersinia)、及びヨケネラ(Yokenella)である。

【００３４】

細菌の別の例は、マイコバクテリウム・ツベルクロシス(Mycobacterium tuberculosis)、Ｍ.ボビス(M. bovis)、Ｍ. チフィムリウム(M. typhimurium)、Ｍ. ボビスＢＣＧ株(M. bovis strain BCG)、ＢＣＧ亜種(BCG substrains)、Ｍ. アビウム(M. avium)、Ｍ. イン

トラセルラレ(M. intracellulare)、Ｍ．アフリカヌム(M. africanum)、Ｍ．カンサシ(M. kansasii)、Ｍ．マリヌム(M. marinum)、Ｍ．ウルセランス(M. ulcerans)、Ｍ.アビウム・サブスピーシーズ・パラツベルクロロシス(M. avium subspecies paratuberculosis)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、スタフィロコッカス・エピデルミジス(Staphylococcus epidermidis)、スタフィロコッカス・エキュー(Staphylococcus equi)、ストレプトコッカス・ピオゲネス(Streptococcus pyogenes)、ストレプトコッカス・アガラクチア(Streptococcus agalactiae)、リステリア・モノシトジェネス(Listeria monocytogenes)、リステリア・イヴァノヴィ(Listeria ivanovii)、バシラス・アンスラシス(Bacillus anthracis)、Ｂ．サチリス(B. subtilis)、ノカルディア・アステロイデス(Nocardia asteroides)、及び別のノカルディア種、ストレプトコッカス・ビリダン群(Streptococcus viridans)、ペプトコッカス種(Peptococcus)、ペプトストレプトコッカス種)(Peptostreptococcus)、アクチノマイシス・イスラエリ(Actinomyces israelii)及び別のアクチノマイシス種、並びにプロピオニバクテリウム・アクネ(Propionibacterium acnes)、クロストリジウム・テタニ(Clostridium tetani)、クロストリジウム・ボツリヌム(Clostridium botulinum)、別のクロストリジウム種、シュードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、別のシュードモナス種、カンピロバクター種(Campylobacter)、ビブリオ・コレラ(Vibrio cholerae)、エシェリキア種(Ehrlichia species)、アクチノバシラス・プレウロニューモニア(Actinobacillus pleuropneumoniae)、パスツエラ・ヘモリティカ(Pasteurella haemolytica)、パスツエラ・ムルトシダ(Pasteurella multocida)、別のパスツエラ種、レジオネラ・ニューモフィラ(Legionella pneumophila)、別のレジオネラ種、サルモネラ・チフィ(Salmonella typhi)、別のサルモネラ種、シゲラ種(Shigella species)、ブルセラ・アボルツス(Brucella abortus)、別のブルセラ種、クラミジア・トラコマチス(Chlamydi trachomatis)、クラミジア・シタシ(Chlamydia psittaci)、コキシエラ・バーネッティ(Coxiella burnetti)、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)、ネイセリア・メニジチジス(Neiserria meningitidis)、ネイセリア・ゴノレア(Neiserria gonorrhea)、ヘモフィラス・インフルエンザ(Haemophilus influenzae)、ヘモフィルス・デュクレイ(Haemophilus ducreyi)、別のヘモフィルス種、イエルシニア・ペスティス(Yersinia pestis)、イエルシニア・エンテロリチカ(Yersinia enterolitica)、別のイエルシニア種、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)、Ｅ．ヒラエ(E. hirae)、及び別のエシェリキア種、並びに別のエンテロバクテリア(Enterobacteria)、ブルセラ・アボルツス(Brucella abortus)、及び別のブルセラ種(Brucella species)、バルコルデリア・セパシア(Burkholderia cepacia)、ブコルデリア・シュードマレイ(Burkholderia pseudomallei)、フランシセラ・ツラレンシス(Francisella tularensis)、バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)、フドバクテリウム・ヌクレアツム(Fudobascterium nucleatum)、プロベテラ種(Provetella species)、及びコウドリア・ルミナチウム(Cowdria ruminantium)、又はそれらの系統又は変種を含む。

【００３５】

ｉｖ．ビリオン及びウイルス

ウイルスのいずれかの類型は、被分析物でありうる。ウイルスの例は、非限定的に１型単純ヘルペス・ウイルス(Herpes simplex virus type-1)、２型単純ヘルペス・ウイルス(Herpes simplex virus type-2)、サイトメガロウイルス(Cytomegalovirus)、エプステイン-バー・ウイルス(Epstein-Barr virus)、バリセラ-ゾスター・ウイルス(Varicella-zoster virus)、ヒト・ヘルペスウイルス６(Human herpesvirus 6)、ヒト・ヘルペスウイルス７(Human herpesvirus 7)、ヒト・ヘルペスウイルス８(Human herpesvirus 8)、バリオラ・ウイルス(Variola virus)、ベシクラー・ストマチチス・ウイルス(Vesicular stomatitis virus)、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｄ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、ライノウイルス(Rhinovirus)、コロナウイルス(Coronavirus)、Ａ型インフルエンザ・ウイルス(Influenza virus A)、Ｂ型インフルエンザ・ウイルス(Influenza virus B)、メアスレス・ウイルス(Measles virus)、ポリマーウイルス(Polyomavirus)、ヒト・ポリオーマ・ウイルス(Human Papilomavirus)、呼吸器合胞体ウイルス(

Respiratory syncytial virus)、アデノウイルス(Adenovirus)、コクサッキー・ウイルス(Coxsackie virus)、デング・ウイルス(Dengue virus)、ムンプス・ウイルス(Mumps virus)、ポリオウイルス(Poliovirus)、ラビエ・ウイルス(Rabies virus)、ラウス・サルコーマ・ウイルス(Rous sarcoma virus)、黄熱病ウイルス(Yellow fever virus)、エボラ・ウイルス(Ebola virus)、マルバーグ・ウイルス(Marburg virus)、ラッサ熱ウイルス(Lassa fever virus)、東部ウマ脳炎ウイルス(Eastern Equine Encephalitis virus)、日本脳炎ウイルス(Japanese Encephalitis virus)、セントルイス脳炎ウイルス(St. Louis Encephalitis virus)、ムライ渓谷熱ウイルス(Murray Valley fever virus)、西ナイル・ウイルス(West Nile virus)、リフト・バレー熱ウイルス(Rift Valley fever virus)、Ａ型ロタウイルス(Rotavirus A)、Ｂ型ロタウイルス(Rotavirus B)、Ｃ型ロタウイルス(Rotavirus C)、シンドビス・ウイルス(Sindbis virus)、サル免疫不全ウイルス(Simian Immunodeficiency virus)、１型ヒトＴ細胞白血病ウイルス(Human T- cell Leukemia virus type-1)、ハンタウイルス(Hantavirus)、ルベラ・ウイルス(Rubella virus)、トリ免疫不全ウイルス(Simian Immunodeficiency virus)、１型ヒト免疫不全ウイルス(Human Immunodeficiency virus type-1)、ワクシニア・ウイルス(Vaccina virus)、ＳＡＲＳウイルス(SARS virus)、及び２型ヒト免疫不全ウイルス(Human Immunodeficiency virus type-2)、又はそれらの系統又は変種のいずれかを含む。

【００３６】

ｖ．寄生虫

寄生虫のいずれかの類型は、被分析物でありうる。寄生虫の例は、非限定的に、トキソプラスマ・ゴンジー(Toxoplasma gondii)、プラスモジウム・ファルシパルム(Plasmodium falciparum)、プラスモジウム・ビバクス(Plasmodium vivax)、プラスモジウム・マラリア(Plasmodium malariae)、別のプラスモジウム種、トリパノソーマ・ブルセイ(Trypanosoma brucei)、トリパノソーマ・クルジー(Trypanosoma cruzi)、リーシュマニア・メジャー(Leishmania major)、別のリーシュマニア種、シストソーマ・マンソーニ(Schistosoma mansoni)、別のシストソーマ種、エンタモエバ・ヒストリティカ(Entamoeba histolytica)、又はそれらの系統又は変種のいずれかを含む。

【００３７】

ｖｉ．タンパク質

タンパク質のいずれかの類型は、被分析物でありうる。例えば、タンパク質は、ペプチド又はタンパク質若しくはペプチドの断片を含みうる。タンパク質は、微小孔物質における孔サイズに依存するいずれかの長さであり、そして１以上のアミノ酸又はそれらのバリアントを含む。タンパク質(１つ又は複数)は、分析前にプロテアーゼ分解などにより断片化されうる。分析されるタンパク質サンプルは、サンプルの複雑度を低減するために分画又は分離されうる。断片化及び分画は、同じアッセイにおいて一緒に使用されうる。そうした断片化及び分画は、タンパク質分析を単純化及び拡張できる。

【００３８】

ｖｉｉ．抗体

いずれかの類型の抗体は、被分析物でありうる。本明細書中で使用されるとき、「抗体」という用語は、非限定的に全てのクラスの全免疫グロブリン(つまり、未処理の抗体)、２又は多数の抗原又はエピトープ特異性を有するキメラ抗体及びハイブリッド抗体、並びにハイブリッド断片を含むＦ(ａｂ’)２、Ｆ(ａｂ’)、Ｆａｂなどの断片を包含する。こうして、抗体の特異的抗原に結合する能力を保持する抗体断片が提供される。例えば、結合活性を維持する抗体断片は含まれる。そうした抗体及び断片は、当該技術分野に周知である技術により作られうる。抗体を産生する方法及び特異性及び活性について抗体をスクリーニングする方法は、Harlow and Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)を参照のこと。「抗体」という用語は、本明細書中で広い意味で使用され、そしてポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方を含む。無傷の免疫グロブリン分子に加えて、これらの免疫グロブリン分子の断片又はポリマー、並びにヒト又はヒト化免疫グロブリン分子又はその断片もまた、「抗体」とい

う用語の中に含まれる。例えば米国特許第4,704,692号に記載される抗原結合タンパク質(一本鎖抗体)と抗体断片の抱合体も、「抗体」の意味の中に含まれる。該文献の内容は、本明細書中に援用される。

【００３９】

ｖｉｉｉ.抗原

抗原のいずれかの類型は、被分析物でありうる。本明細書中に使用される「抗原」は、投与された際、免疫応答を誘発でき、それにより抗原に特異的に結合する抗体の産生及び放出を刺激する物質を含む。抗原は、抗体により特異的に結合されて、抗原/抗体複合体を形成する分子及び/又は成分を含む。抗原の例は、非限定的にペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、多糖、それらの組合せ、それらの断片、又はそれらのミメティクスを含む。

【００４０】

ｉｘ．真菌

真菌のいずれかの類型は、被分析物でありうる。真菌の例は、非限定的に、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、クリプトコッカス・ネオフォーマンス(Cryptococcus neoformans)、ヒストプラマ・カプスラツム(Histoplama capsulatum)、アスペルギルス・フミガツス(Aspergillus fumigatus)、コッシドデス・イミチス(Coccidiodes immitis)、パラコシジオデス・ブラシリエンシス(Paracoccidiodes brasiliensis)、ブラストマイシス・デルミチジス(Blastomyces dermitidis)、ネモシスチス・カルニ(Pneomocystis carnii)、ペニシリウム・マルネッフィ(Penicillium marneffi)、及びアルテルナリア・・アルテルネート(Alternaria alternate)、並びにそれらの変種又はことなる系統を含む。

【００４１】

ｘ．エフェクター分子

被分析物は、エフェクター分子でありうる。「エフェクター種」、「エフェクター」、及び「分子エフェクター」とも呼ばれる「エフェクター分子」は、エネルギーを仕事に、仕事をエネルギーに、仕事又はエネルギーを情報に、又は情報を仕事又はエネルギーに変換することができる選択された分子であり、非限定的に、シグナル-生成種、刺激-応答分子、応答-生成分子、酵素、合成酵素、薬剤、触媒抗体、触媒、収縮性タンパク質、輸送タンパク質、制御タンパク質、酸化還元タンパク質、酸化還元酵素、酸化還元メディエーター、シトクロム、電気活性化合物、光反応性化合物、超分子、超分子デバイス、及び形状-記憶構造、又はそれらのバリアント若しくは誘導体のいずれかを含む。

【００４２】

ｘｉ．リガンド

いずれの類型のリガンドは、被分析物でありうる。「リガンド」という用語は、親和性に基いた相互作用によりレセプターに特異的に結合できる分子である。リガンドは、非限定的に、レセプターアゴニスト、部分アゴニスト、混合アゴニスト、アンタゴニスト、応答-誘導又は刺激分子、薬、ホルモン、フェロモン、伝達物質、オータコイド、成長因子、サイトカイン、補欠分子族、補酵素、コファクター、基質、前駆物質、ビタミン、トキシン、制御因子、抗原、ハプテン、炭水化物、分子擬態、プリント(print)分子、構造分子、エフェクター分子、選択分子、ビオチン、ジゴキシゲニン、及びコンジナー、交差反応物質、アナログ、コンペティター、又はそれらの分子の誘導体、並びにライブラリーから選ばれた分子であって選ばれた標的に特異的に結合できる分子、及びこれらの分子のいずれかを第二の分子に付着させることにより形成された抱合体、又はそれらの誘導体又はバリアントを含む。

【００４３】

ｘｉｉ．レセプター

被分析物は、レセプターでありうる。「レセプター」という用語は、親和性に基く相互作用によりリガンドに特異的に結合できる分子である。「レセプター」は、非限定的に、生物学的、合成の、又は遺伝子組換えにより作られた膜レセプター、ホルモン・レセプター、薬物レセプター、伝達物質レセプター、オータコイド・レセプター、フェロモン・レ

セプター、刺激応答カップリング又は受容性分子、抗体、抗体断片、遺伝子組換えされた抗体、抗体模倣物又はミメティクス、分子模倣物、分子インプリント、分子認識単位、接着分子、凝集素、レクチン、セレクティング(selecting)、細胞レセプター、アビジン及びストレプトアビジン、及びコンジェナー、アナログ、コンペティター、又はそれらの分子の誘導体、並びに非オリゴヌクレオチド分子であって、例えばコンビナトリアル方法及び/又はライブラリースクリーニングにより、別の選択された分子に特異的に結合するように選ばれる分子、及びこれらの分子のいずれかを第二分子に付着させることにより形成される抱合体を含む。レセプターは、さらに、構造分子、エフェクター分子、及びリガンドを含む選択分子、或いはその誘導体又はバリアントのいずれかを特異的に認識することができる選択分子をさらに含む。

ｘｉｉｉ．シグナル生成分子

被分析物は、シグナル生成分子でありうる。「シグナル生成分子」及び「シグナル生成種」は、検出できるシグナルを生成するか、物質の検出性を高める若しくは調節するか、或いは物質のエネルギー、活性、出力、若しくはシグナルを、定性的、定量的又は検出可能な異なるエネルギー、活性、出力、シグナル、状態、若しくは形態に変換することができる分子である。或いは、シグナル-生成分子は、標的分子と相互作用でき、局在できる被分析物を生成する。シグナル-生成分子は、非限定的に、分子、分子群、抱合体及び複合体であって、検出可能な(及び場合により染色された、改変された、結合された、標識された、又は誘導体化された)タグ、トレーサー、ラジオアイソトープ、ラベル、レポーター、ポリマー、集光複合体、アンテナ構造、天然及び合成の並びにバイオミメティックの光合成分子、反応中心、光化学系、シグナル伝達経路、分子カスケード、巨大分子、微小粒子、ナの粒子、コロイド、金属、色素、フルオロフォア、蛍光体、及び別の光子吸収体、光子放出体、及び感光性分子を含むもの、例えば、別の分子又は基の光子吸収又は光子放出性質を増強、減弱、転調、又は消光する分子、エネルギー転移ドナー及びアクセプター、酵素、補酵素、コファクター、触媒抗体、合成酵素及び触媒、分子模倣物及びミメティクス、発光、摩擦発光、音発光、電気発光、化学発光、及び生物発光分子、電子伝達ドナー及びアクセプター、酸化及び還元化合物、メディエーター及び別の電気活性分子、代謝性、光活動性、シグナル及びシグナル処理分子であって、生物学的及び生物ミメティックのプロセス及びシステムにおいてエネルギーを捕捉及び伝達するために使用される分子、例えば場合により天然、合成、ミメティック骨格を含み、組織的及びカップリング分子、シャペロン及びアクセサリー生物又バイオミメティック分子、或いは第一の形態のエネルギー又は情報を第二の形態のエネルギー又は情報への変換に関わる分子群を含む。

【００４４】

ｘｉｖ．構造分子

被分析物は、構造分子のいずれかでありうる。実施例は、非限定的に、元素、原子、分子、イオン、及び化合物であって、表面、親水・疎水の両性表面(amphibious surfaces)、無機及び有機金属、例えば炭素、シリコン、ガラス、有機及び無機結晶、選択された溶媒、選択された溶質、天然の、バイオミメティックの、及び合成のナノ構造及び微小構造、ファイバー、フィラメント、シルク、分子骨格、ナノチューブ、ナノロッド、フラーレン、バッキーボール、ダイヤモンド様分子、半導体、絶縁体、金属、プラスチック、エラストマー、ポリマー、界面活性剤、潤滑剤、ワックス、オイル、粉末、フィラー、賦形剤、繊維、錠剤化成分、パッケージング物質、紙、工業用プラスチック、環状及び多環分子、デンドロン、デンドリマー、電解質、及び多価電解質、塩、炭化水素、セラミックス、及び生物の、生物適合の、生物ミメティックの、生分解性の、及び刷り込み可能な(Imprintable)モノマー、マルチマー、及びポリマー、例えば脂肪酸、脂質、界面活性剤、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、ポリアミン、ポリ酸、糖、スターチ、セルロース、グリコシル化分子、グリコポリマー、及びそれらの抱合体を含むものを含む。

ｘｖ．イオン

被分析物は、いずれのイオンでありうる。イオンの例は、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、遷移金属イオン、又はランタノイド金属イオンを含む。一の態様では

、キレートは、イオンを含むサンプルへと加えられ、局在化の前に、イオン/キレート複合体を形成する。この態様では、イオン、キレート、及び/又はイオン/キレート複合体は、被分析物である。別の態様では、キレートは、イオンと相互作用できる微小孔物質の表面付近に共有結合されうる。

ｘｖｉ．核酸被分析物

一の態様では、被分析物は核酸である。デオキシリボ核酸(ＤＮＡ)、リボ核酸(ＲＮＡ)、及びペプチド核酸(ＰＮＡ)は、重合体であり、特定の条件下で水溶液中に可溶性の多イオン性分子である。ｐＨ、イオン強度、対イオン、電荷中和、水和、有機沈殿、分子組成物などに応じた溶液中における核酸の推定の三次元構造は、当業者に周知である。一の態様では、核酸は、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ又はＲＮＡでありうる。

【００４５】

本明細書中に開示される様々な分子であって、核酸に基いた分子が存在し、例えば本明細書中に開示される核酸及び別のタンパク質のいずれか、並びに様々な機能性核酸を含む。開示される核酸は、例えばヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドから作られる。これら及び別の分子の非制限的な例は、本明細書中で考察される。例えば、ベクターが細胞において発現される場合、発現されたｍＲＮＡは、典型的にＡ、Ｃ、Ｇ、及びＵから作られるということが理解される。

ｘｖｉｉ．核酸及び関連分子

核酸は、塩基部分、糖部分、及びリン酸エステル部分を含む分子である。ヌクレオチドは、ヌクレオシド間の結合を作るリン酸エステル部分及び糖部分を介して結合されうる。ヌクレオチドの塩基部分は、アデニン-９-イル(Ａ)、シトシン-１-イル(Ｃ)、グアニン-９-イル(Ｇ)、ウラシル-１-イル(Ｕ)、及びチミン-１-イル(Ｔ)でありうる。ヌクレオチドの糖部分は、リボース又はデオキシリボースである。ヌクレオチドのリン酸エステル部分は、５価リン酸エステルである。ヌクレオチドの非制限的な例は、３'-ＡＭＰ(３’-アデノシン・一リン酸)又は５’-ＧＭＰ(５’-グアノシン一リン酸)である。

【００４６】

ヌクレオチド・アナログは、塩基、糖、又はリン酸エステル部分のいずれかに対する幾つかの類型の改変を含むヌクレオチドである。ヌクレオチドに対する改変は、当該技術分野に周知であり、そして例えば、５-メチルシトシン(５-ｍｅ-Ｃ)、５-ヒドロキシメチル・シトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、及び２-アミノアデニン、並びに糖又はリン酸部分における改変を含む。

【００４７】

代替ヌクレオチドは、ヌクレオチドに類似の機能性質を有するが、リン酸エステル部分を含まない分子であり、例えばペプチド核酸(ＰＮＡ)である。代替ヌクレオチドは、ワトソンクリック又はフーグステン型の核酸を認識するが、リン酸エステル部分以外の部分を解して互いに結合される分子である。代替ヌクレオチドは、適切な標的核酸と相互作用するとき、二重ヘリックス型の構造を構成することができる。

【００４８】

例えば細胞取り込みを高めるために、別のタイプの分子(抱合体)をヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに結合することができる。抱合体は、化学的にヌクレオチド又はヌクレオチド・アナログに結合される。そうした抱合体は、非限定的に、コレステロール部分などの脂質部分を含む(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989,86, 6553-6556)。

【００４９】

ワトソン-クリック相互作用は、ヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのワトソン-クリック面との少なくとも１の相互作用である。ヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのワトソン-クリック面は、プリンに基いたヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのＣ２、Ｎ１、及びＣ６位、並びに、ピリミジンに基いたヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのＣ２、Ｎ３、Ｃ４位を含む。

【００５０】
フーグステン相互作用は、ヌクレオチド又はヌクレオチド・アナログのフーグステン面であって、二重鎖ＤＮＡのメジャー・グルーブに晒される面上で生じる相互作用である。フーグステン面は、Ｎ７位、及びプリンヌクレオチドのＣ６位における反応性基(ＮＨ$_2$又はＯ)を含む。
【００５１】
こうして、核酸は、一般的に塩基と呼ばれるヌクレオチドから作られるポリマーである。核酸分子は、核酸を作り上げる塩基の数により特徴付けることができる。例えば、特定の態様では、核酸被分析物は、少なくとも、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、２９５、３００、３２０、３４０、３６０、３８０、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、３０００、３２００、３４００、３６００、３８００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、６５００、７０００、７５００、８０００、８５００、９０００、９５００、１００００、１１０００、１２０００、１３０００、１４０００、１５０００、１６０００、１７０００、１８０００、１９０００、２００００、２５０００、５００００、１０００００、２０００００、３０００００、４０００００、５０００００、及び１０００００００塩基又は塩基対の長さである。別の態様では、ＤＮＡ又はＲＮＡは、少なくとも約１５００塩基又は塩基対を有する。
【００５２】
核酸の１次構造は直線であり、各塩基又は塩基対は、完全に伸ばされた輪郭線長（contour length）とすると、おおよそ０．３４ｎｍになる。様々な核酸の代表的な輪郭線長を表１に示した。
【００５３】
【表１】

表１

核酸	塩基又は塩基対	輪郭線長
オリゴ・プローブ	40	0.013ミクロン
	200	0.068ミクロン
	1,000	0.340ミクロン
HIV RNA	9,000	3.06ミクロン
Ｔ４ファージ・ゲノム	160,000	54.4ミクロン
Ｅ．コリ　ゲノム	420万	1,428ミクロン

【００５４】

核酸分子の推定の直径は、約２ｎｍであり、並外れて異方性で高い縦横比の一次構造をもたらす。高次構造(例えば、２次、３次など)は、核酸についてよく知られており、そしてかなり環境に左右される。有機性、イオン性、又はポリマー性の沈殿剤がない水溶液中では、核酸は、コイル型又は弛緩型の三次元立体配置として通常記載されるが、既知の試薬で可逆的に球形又は凝集体へと沈殿される。同様に、コイル型の核酸は、以下の溶液中で、例えば伸張、分子配向などの実質的な３次元変化を受ける。

【００５５】

一の態様では、本明細書中で記載される微小孔物質、方法、及び物品は、診断目的用に生物学的液体から核酸を単離することができる。高感度アッセイは、統計的に有意となる十分な核酸を補足するため、２００μｌ以上の患者サンプルを必要とする。市販のウイルス量アッセイは、標的ウイルス核酸に基いた標的又はシグナル増幅技術(例えばＰＣＲ、βＤＮＡなど)を使用する。つまり、これらの技術は、ビリオンを溶解後にサンプル液体中に存在する全ウイルス核酸を定量する。「ビリオン」は、完全な成熟ウイルス粒子である。溶解前のサンプル液体中に存在する未封入ウイルス核酸も、全量の一部として含まれてしまう。未封入ウイルス核酸は、非感染性であると広くみなされているので、それらを全ウイルス量に含めてしまうことにより、計測が不正確になってしまう。

【００５６】

未封入核酸の大部分を分析前に取り除くことにより、現存するウイルス量アッセイを改良するために使用されうる方法及び物質が本明細書中に記載される。一の例では、アッセイされるビリオンは、ＨＩＶビリオンである。患者サンプル(例えば血漿、血清、ＣＳＦ、生物戦争抽出液など)は、本明細書中に記載される微小孔物質を通してろ過される。微小孔物質は、可溶性核酸(例えば、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ)並びに直径が数ミクロンより大きい細胞要素の全てを局在させる。無傷のビリオンは、フィルターを通過し、そして患者サンプルのろ液は、ウイルス核酸を遊離させるために溶解される。次にウイルス核酸を遊離するため溶解した。該溶解された患者サンプルろ液は、ろ過され、次に第二微小孔物質をとおして洗浄され、ビリオン由来の核酸を第二微小孔物質の表面付近へと局在させた。

【００５７】

３.フィルター

ろ過は、フィルターの流路寸法に対する分子の大きさに主に基く分離方法と考えられる。ろ過は、微小孔物質の孔の寸法が小さく均一であるためフィルターの入口表面上でろ過が主に起こる表面ろ過、或いは微小孔物質の孔が蛇行経路構造を有し、そして粒子をフィルターの深部にトラップする深部フィルターに一般的に分類される。

【００５８】

本明細書中に記載される微小孔物質であって、複合体及び改変された微小孔物質を含む微小孔物質のいずれかは、フィルターとして製造されうる。一の態様では、微小孔物質は、例えばビーズ又は膜などのフィルターへと成形されうる。ビーズは、システムの要求に依存して、直径数ミリメートル～直径１ミクロン未満でありうる。ビーズは、球形であるか、不規則な形であるか、又は要求される形のいずれにも形成されうる。ビーズの大きさは、その用途に応じて変化しうる。ビーズは、均一の多孔物質であるか、又は限定された空隙率を有する中心を覆う微小孔表面を示す。さらに、ビーズは、磁性体、常磁性体でありうるか、又はビーズの分離を手助けする別の性質を有しうる。

【００５９】

膜は、限られた厚さを有する２次元構造である。一の態様では、膜フィルターは、１ミクロン未満～１００ミクロン超の厚さを有する。一の態様では、該膜は、１ミクロン～１００ミクロン、１０ミクロン～９０ミクロン、２０ミクロン～８０ミクロン、３０ミクロン～７０ミクロン、又は４０ミクロン～６０ミクロンの厚さを有する。別の態様では、０.２ミクロン・アノポア(Ａｎｏｐｏｒｅ)(商標)無機酸化膜は、典型的に４０～５０ミクロンの厚さであり、一方、０．０２ミクロン・アノポア膜は、厚さ１ミクロン未満のとても薄い０．０２ミクロンの孔の層を有し、該層は、厚さ約４０ミクロンである０．２ミク

ロンの支持層上に重層している。従って、膜は、被分析物局在表面として、支持物質上に形成されるか又は作られうる。この支持物質は、強度、取り扱いの容易さ、流量の性質、熱的性質などの有用な特性をシステムに付与する。この態様では、支持物質、及びそれゆえ膜は、全体の要求に沿う様々な形、大きさ、及びデザインでありうる。

【００６０】

本明細書中に記載される方法において、表面フィルター又は深部フィルターは、被分析物を分離及び局在する前に、サンプルから不純物及び別の破片を前以ってろ過するために使用されうる。試験サンプルのろ過性の改良を手助けするために、当業者に知られる別の技術は、本明細書中に記載される物品のいずれかと組み合わせて使用されうる。これらは、巨大な不純物を取り除くために試験サンプルを前以ってろ過するか、又は酵素の使用、界面活性剤の使用、カオトロピック剤の使用、超音波及び熱処理、タンパク質沈殿などを含むサンプル分解などによる試験サンプルの処理を含む。

４．　表面

微小孔物質は、多くの異なる表面を有する。例えば、平面的表面、外部表面、内部表面、及び湿表面がある。微小孔物質から構成されるフィルターの模式図は、図１ａ及び１ｂにおいて図示される。図１ａは、微小孔物質１００を示すフィルターの上面図であり、ここで１１０は、微小孔物質における多数の穴又は孔のうちの一つをあらわす。これらの穴は、均一の間隔又は大きさである必要はないが、多くの実施態様では、均一の間隔又は大きさである。フィルターに付随する多くの異なる表面が存在する。図１ｂは、微小孔物質を有するフィルターの断面図である。例えば、微小孔物質の外部表面１３０により作られる平面、並びに複数の孔及び穴に起因する開口部１１０により定義される平面的表面１２０が存在する。内部表面１４０は、微小孔物質を貫通するチャネル１５０により形成される。

【００６１】

５．　被分析物の微小孔物質との相互作用

ｉ．　局在

被分析物が、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかと接触されるとき、微小孔物質は、被分析物が微小孔物質中に入り込むこと及び微小孔物質を通り抜けることを妨げるか又は阻害する。微小孔物質は、被分析物と相互作用して、微小孔物質を通した被分析物の分子崩壊を実質的に妨げる。一の態様では、表面ろ過は、被分析物を迅速に局在化し、そして濃縮するために使用されうる。表面ろ過の効率は、種々のパラメーター、例えば、被分析物対孔サイズ比、ろ過される液体中の不純物の組成、及び被分析物と表面との相互作用に左右されるであろう。

【００６２】

上に記載される態様では、被分析物を含むサンプルが、微小孔物質と接触するときに、被分析物は、微小孔物質上に局在される。本明細書中に使用される「局在される」という用語は、物質の表面付近における被分析物の濃度の増加として定義される。こうして、被分析物の微小孔物質内への流れ込み、及び/又は微小孔物質通過が低減又は抑制される。

【００６３】

局在された被分析物は、微小孔物質の表面付近に存在し、そして微小孔物質内にはトラップされない。図１ｂを参照すると、本明細書中で使用される「表面付近」は、(１)微小孔物質の平面的表面の下１０ミクロンの領域、該領域は１６０である、(２)微小孔物質の平面的表面１２０の近接部、又は(３)平面的表面の上２５μｍの領域、該領域は１７０である、として定義される。一の態様では、被分析物の全体又は一部は、微小孔物質の平面的表面の多くとも１０ミクロン下に存在する。一の態様では、被分析物が、平面的表面に近接する場合、該被分析物は、微小孔物質の外部表面と直接接触する。一の態様では、被分析物は、平面的表面の下、孔の深さに対して１０％、孔の深さに対して８％、孔の深さに対して６％、孔の深さに対して４％、孔の深さに対して３％、又は孔の深さに対して２％の位置に存在する。一の態様では、被分析物は、微小孔物質の平面的表面の下、１０μｍ、５μｍ、４μｍ、３μｍ、２μｍ、１μｍ、又は０.５μｍ～平面的表面の上２５μ

ｍ、１０μｍ、９μｍ、８μｍ、７μｍ、６μｍ、５μｍ、４μｍ、３μｍ、２μｍ、１μｍの位置に存在する。ここで、平面的表面の下の端点のいずれもが、平面的表面の上の端点のいずれかと共に使用されうる。

【００６４】

一の態様では、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、又は９０％の被分析物は、微小孔物質の表面付近に局在化される。別の態様では、局在化される被分析物の量は、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９.５％、又は１００％である。一の態様では、標的の被分析物は、個々の単離された分子としての微小孔分子の表面付近に濃縮される。この態様は、以下に記載される分子計測に有用である。別の態様では、標的分子は、微小孔物質の表面付近の互いの上面上に層状になりうる。機械的ろ過による被分析物の局在化は、次の処理用の純粋な被分析物の取得方法であって、極めて早く、複雑ではない方法を提供する。

【００６５】

さらに、分子計数用に被分析物質を保持するために拡散制御反応を必要とする先行技術とは異なって、本明細書中に記載される微小孔物質は、微小孔表面付近に被分析物を局在させるための弱い表面相互作用を使用する。例えば、被分析物が核酸である場合、可逆性の核酸処理、並びにフィルター表面に急速に核酸を局在させるための強力な表面相互作用、例えばハイブリダイゼーション、共有結合などは、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかを使用した場合に可能になる。任意なものであるが、局在化される核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドが、該核酸を局在化させるために微小孔上に存在することは必要とされない。別の態様では、極度に感度の高いウイルス量アッセイにおいて見られる極度に低濃度の核酸を検出するために、微小孔物質は、光学的分子計数技術とともに使用されて、分子増幅なしに核酸濃度を直接決定することを可能にする。このことは、高い濃縮の効果、並びに微小孔物質の表面付近に局在された核酸の優れた検出性のため可能になる。

【００６６】

上で記載されるように、核酸の分離は、微小孔物質の表面付近における核酸と表面との弱い相互作用により促進される。しかしながら、分子規模(molecular scale)について厳密に考えると、核酸は、ミクロンサイズの規模に変形可能であり、特定の条件下では、実際のフィルターの孔の直径を通り抜けうる。局在化により核酸を選別することは、被分析物が崩壊して微小孔物質内に入ることを妨げるために、被分析物質と微小孔物質との間の相互作用を含む。この点から見て、微小孔物質中に存在する孔の大きさは、いつ微小孔物質を選ぶかを考慮するために変化する大きさである。孔は、被分析物を効率的に除外するために十分小さくあるべきであるが、サンプル液体中に残存する不純物の早い通過を可能にするために十分大きくあるべきである。該技術の模式的描写は、図２に図示される。

【００６７】

図２a及び２ｂに示されるように、被分析物２００は、溶液流２４０からの機械的なろ過により、複数の微小孔２２０とフラット２３０を有する微小孔物質２１０の表面付近に局在された。被分析物２００の長さは、微小孔２２０の寸法に比べて大きく、そして図２aに図示されるように幾つかのか開口部に物理的にまたがう。

【００６８】

図２ｂに示されるように、表面相互作用は、局在化被分析物２００とフラット２３０の露出した表面との間におこる。ポリマーと表面との間の相互作用は、広く試験され、そして実質的に０の相互作用から完全な共有結合による固定化まで変化する。機械システムに純粋に類似することによって、図２ｂの溶液２４０がフィルターを通して流れる場合、被分析物２００は、被分析物２００とフラット２３０との間に生じる剪断力２６０に支えられる分子張力２５０により微小孔２２０にわたって支えられる。このことは、既知の分子変形能力に関連して実際のろ過に所望される比較的大きい孔直径の結果である。大きな被分析物が多くの孔にまたがっていることを考慮にいれても、剪断力２６０は、被分析物２

００が崩壊して微小孔２２０を通過することを防ぐために必要とされる。

【００６９】

シリカ又は別の多孔支持体の孔の中に吸着/沈降することに頼る周知の被分析物の精製方法論とは異なって、被分析物が核酸である場合、核酸局在に必要とされる弱い相互作用が、穏和な条件下における可溶性、コイル形態の核酸において達成される。一の態様では、可逆性核酸処理についての弱い表面相互作用が考慮される。別の態様では、ハイブリダイゼーション、共有結合などの強力な表面相互作用は、迅速な核酸局在化のために使用されうる。

【００７０】

ｉｉ．固定化

「局在化」という用語はまた、微小孔物質の表面付近に被分析物質を固定化することを含む。本明細書中で使用される「固定化」という用語は、計数されるのに十分長い時間微小孔物質の表面付近の特異的領域に被分析物を制止することとして定義される。一の態様では、被分析物は、特異的検出期間の間、１μｍ^{3}の領域に固定化される。「局在化」という用語はまた、被分析物を微小孔物質の表面付近に濃縮することも含む。本明細書中に使用される「被分析物の濃縮」は、濃縮された被分析物の純度に関わらず、決められた領域で、微小孔物質の表面付近に被分析物を集積することとして定義される。被分析物が、微小孔物質の表面付近に局在される場合、被分析物は、可逆的に又は非可逆的に微小孔物質に結合されうる。被分析物が「可逆的に」結合される場合、被分析物の大部分が、微小孔から取り外されうる。逆に、被分析物が「不可逆的に」結合される場合、被分析物の大部分を微小孔物質から取り外すことができない。

【００７１】

６．局在化条件

一の態様では、被分析物の局在化を手助けするために、様々な無機塩は、場合によりサンプル溶液中に使用されうる。例えば、ＮａＣｌなどの塩又はグアニジニウム・イソチオシアネート、グアニジニウム・ヒドロクロリドなどを含むカオトロピック塩は、望まれるとき、サンプル溶液中にも使用されうる。一の態様では、使用される塩の濃度は、２Ｍ未満、例えば１．８Ｍ、１．６Ｍ、１．４Ｍ、１．２Ｍ、１．０Ｍ、０．８Ｍ、０．６Ｍ、０．４Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０５Ｍでありうる。ここで、濃度のいずれかは、別の濃度とともに範囲を形成しうる(例えば０．１Ｍ～１．８Ｍ)。

【００７２】

別の態様では、緩衝液は、局在化を促進するため、被分析物を含むサンプルへと加えられうる。一の態様では、トリス、カーボネート／バイカーボネートなどは使用されうる。別の態様では、リン酸緩衝液は、微小孔物質上への被分析物の保持を無効にするために使用され、そうして、被分析物は、所望されるなら次の分析のため微小孔物質から容易に取り除かれうる。リン酸イオンは、酸化アルミニウム・クロマトグラフィーの充填剤に結合することが知られており、並びに微小孔物質上の同じ弱い結合部位と競合できる。一の態様では、緩衝液は、サンプルのｐＨを制御する為に使用されうる。一の態様では、約４より低いｐＨ値は、緩衝イオンとは無関係の核酸局在の高い効率をもたらす。別の態様では、９～１０より高いｐＨ値は、アミン改変された微小孔表面でさえ局在効率の低下を示す。一の態様では、サンプルｐＨは、タンパク質沈降を最小化するために、サンプルのｐＨは、６～８の範囲に維持される。このｐＨ範囲では、核酸を効率よく局在化するための微小孔物質の能力は、表面の改変、塩濃度、及び緩衝塩などのイオン添加物により左右される。別の態様では、酵素又は界面活性剤は、サンプル中に存在しうる。別の態様では、後でより十分に記載されるように、様々な緩衝液、塩、タンパク質、界面活性剤などの局在化についての効果は、微小孔表面と被分析物との間の相互作用の性質に左右される。例えば、０．２ミクロンの公称の孔サイズを有する平面的、改変されていない無機金属酸化物の微小孔、例えばアノポア０．２ミクロン膜フィルター表面上への核酸の局在化は、塩濃度を伴うことにより局在効率の増加を示す。本明細書中に記載されるように、この塩効果は、この塩がカオトロピック塩であるかに左右されない。さらにこの塩効果は、低濃度の

塩のみが効果的な局在化を作り出すために必要とされていることを示し、該濃度は、一般的に１モル濃度未満、通常１００ミリモル濃度未満である。アミン改変アノポア０．２ミクロン膜フィルターは、塩濃度とは独立である効率的な局在を示す。

【００７３】

微小孔表面をコートする物質、例えば、タンパク質、界面活性剤などは、被分析物－表面相互作用の改変によって局在化に影響しうる。例えば、タンパク質及び界面活性剤は、未改変０．２ミクロンアノポア膜フィルターについて一般的に低い局在効率であるが、アミン改変フィルターにおいてほとんど効果を有さない。以前に記載されるように、特定のイオン例えば、リン酸、ホウ酸、重炭酸などは、おそらく微小孔表面上の弱い結合部位について被分析物と競合することによって、未改変の平面的０．２ミクロンアノポア膜フィルター上における核酸の局在化に影響しうる。一の態様では、アミン改変された０．２ミクロンのアノポア膜フィルターは、イオン効果のかなりの低下を示した。

【００７４】

７．微小孔物質

本明細書中で使用される「微小孔物質」という用語は、複数の孔、穴、及び／又はチャネルを有する物質のいずれかである。この微小孔物質は、液体が、物質を通過して流れるか又は物質内に流れることを可能にする。微小孔物質は、１ミクロン未満の寸法を有する小さく均一であり、高密度である穴又は孔を一般的に有する。微小孔物質は、局在された被分析物を分析するために使用される特定の検出技術に応じて、場合により可視光、紫外線、又は赤外線に対し透過型でありうる。微小孔物質は、該物質を通した早い水の流れを可能にするため親水性でありうる。微小孔物質は、望まれる場合、場合により不透明(opaque)でありうる。微小孔物質は、簡単な取り扱いのため良好な機械的強度、低い非特異性結合、及び被分析物と比較的反応しない性質を有する。本明細書中で使用される「微小孔物質」という用語は、以下に記載される複合体及び改変微小孔物質のいずれかを含む。

【００７５】

一の態様では、微小孔物質は、約０．０２ミクロン～約０．２ミクロンの範囲の大きさの直径を有しうる。無傷の細菌、細胞、粒子などのかなり大きい被分析物では、大きい孔サイズが意図される。以前に議論されたように、孔の大きさが大きいほど、幾つかの例で一般的に見られる不純物で栓される傾向が少なくなる。１０ミクロンまでの孔のサイズは、特定のサンプルの分析について意図されうる。別の態様では、孔の直径は、約０．０２ミクロン～約０．１８ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１６ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１４ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１２ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１ミクロン、約０．０４ミクロン～約０．２ミクロン、約０．０６ミクロン～約０．２ミクロン、約０．０８ミクロン～約０．２ミクロン、又は約０．１ミクロン～約０．２ミクロンでありうる。

【００７６】

微小孔物質は、高濃度の小さく、均一な穴又は孔を有するか、又はそうした材料へと変換されうる物質のいずれかから構成されうる。そうした物品の例は、非限定的に、無機物質、ポリマーなどを含む。一の態様では、微小孔物質は、セラミック、金属、炭素、ガラス、金属酸化物、又はそれらの組合せである。別の態様では、微小孔物質は、トラック・エッチ(track etch)物質、電気化学的に形成された無機物質などを含む。「電気化学的に形成された無機物質」という用語は、金属を金属酸化物へと電気的に変換することにより形成される物質として本明細書中に定義される。「トラック・エッチ物質」という用語は、物質内に穴を作りだすために、ポリマー膜上に電離放射線を使用することにより形成される物質として定義される。そうした物質は、市販されている。米国特許第5,716,526号に開示される微小孔物質のいずれもが使用されうる。該文献は、その全てを援用される。さらなる態様では、微小孔物質が金属酸化物である場合、該金属酸化物は、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む。ゼオライトの例は、非限定的に、米国特許第4,304,675号;第4,437,429号;第4,793,833号;及び第6,284,232号に記載される。これらの文献は、その全てを本明細書中に援用される。一の

態様では、微小孔物質が、金属酸化物である場合、金属酸化物は、１以上の金属塩を様々な量で含みうる。例えば、リン酸アルミニウム、塩化アルミニウム、又は硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩は、微小孔物質の一部でありうる。

【００７７】

一の態様では、微小孔物質は、電気鋳造された無機金属酸化物であり、例えば米国特許第6,225,131号において記載される。該文献の開示は、本明細書中に援用される。そうしたセラミック膜は、Whatman, Incから販売され、そしてアノポア(商標)及びアノディスク(Anodisc)(商標)という商標名で流通している。アノポア膜は、各孔がおおよそ直径０．２ミクロン×長さ５０ミクロンを有する蜂の巣上の構造を有する。アノポア膜は、少量のリン酸アルミニウム(５～１０％)を伴う酸化アルミニウムから主に構成される。この態様では、これらの微小孔物質は、以下の望ましい特徴を有する：可視光スペクトルにおいて実質的に非蛍光であり；かなり均一な孔構造であり；高密度の孔及び高い液流速であり；比較的硬く；平面的であり；及び濡れたとき場合により透明であり；高い融点であり及びプラスチックに容易に熱溶接でき；比較的生物学的に不活性であり、そして非特異的結合が少なく、又はタンパク質、核酸などの変性効果が少ない。

【００７８】

別の態様では、微小孔物質は、被分析物の表面局在化を高めるために化学的に改変されうる。例えば、核酸は負に荷電された分子であり、微小孔物質は、正の荷電を有するように様々な化学物質で処理されて、その結果、核酸は、イオン性の引力を介して微小孔物質の表面付近に留まる。そうした、弱い引力は、核酸が微小孔物質を通り抜けることを妨げる点で役に立つ。一の態様では、微小孔物質は、弱い正の表面荷電を与えるために、非限定的に、アミノプロピルトリメトキシシラン(ＡＰＳ)、エチレンジアミノプロピルトリメトキシシラン(ＥＤＡＰＳ)、又は別のアミノシラン試薬を含むシラン化試薬で前処理されうる。別の態様では、被分析物局在を高めることを目的としわずかな表面荷電を与えるために、微小孔物質は、非限定的にポリリジンを含むポリマー物質で前処理されうる。従って、微小孔物質は、被分析物の保持を変化するため、ジオールなどの中性試薬で改変されうる。該ジオールの例は、酸加水分解されたグリシドキシプロピルトリメトキシシラン(ＧＯＰＳ)である。

【００７９】

本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかは、当業者に周知の技術により改変されうる。一の態様では、ＥＤＡＰＳ改変された微小孔物質は、約５％のＥＤＡＰＳを分子研究品質(molecular grade)の水に室温で溶解することにより調製されうる。水溶液は、約５分間室温でインキュベーションされて、トリメトキシ基を加水分解させた。この溶液は、およそ１ｃｍ^{2}あたり１ミリリットルの流速で、約５分間かけて微小孔物質をとおしてろ過され、活性化微小孔物質は、約４０℃で吸引オーブン中で脱水された。乾燥微小孔物質は、次に、等量の１×ＴＥ緩衝溶液(１０ｍＭ・トリス－ＨＣｌ(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩基)、１ｍＭ・ＥＤＴＡ(エチレンジアミン四酢酸)緩衝液など、ｐＨ７～８)を数回ろ過することにより洗浄されて、表面のｐＨを調節した。該微小孔物質を、等量の分子研究用品質の水で数回ろ過し、そして次に再び脱水した。乾燥フィルターは、室温で乾燥状態で保存された。別の態様では、ジオール改変膜フィルターは、ＥＤＡＰＳの代わりにＧＯＰＳを使用し、そして吸着されたエポキシドをジオールに変換する周知の酸加水分解ステップを含むことにより同様に作られうる。

【００８０】

８.組成物

市販される微小孔物質のいくつか、例えばアノポア無機酸化物膜は、低い自己蛍光を有した。しかしながら、幾つかの用途では、少量の自己蛍光でさえ有害である。例えば、蛍光顕微鏡は、生物学的及び形態学的分析において広く使われる強力な分析ツールである。弱い蛍光標本は、並外れて低い自己蛍光を伴う表面、例えば処理融合シリカ、ガラス、またはクリスタリン・シリコン上で調製されなければならない。直接ろ過表面上の小粒子(例えば、細胞、ビリオン、核酸、など)の蛍光分析は、典型的にろ過膜自己蛍光により制

限される。無機酸化微小孔物質は、ポリマー製の膜よりずっと低い自己蛍光を示すが、該自己蛍光は、弱い蛍光粒子の分析には高すぎることもある。

【００８１】

上記されるように、アノポア膜は、各孔がおよそ直径０.２ミクロン×長さ５０ミクロンの蜂の巣状の構造を有する。微小孔物質の内部領域は、外部表面領域よりずっと大きい。実際、アノポア膜の内部湿領域は、投影表面領域より、典型的に５００倍大きい。いくつかの場合、この巨大内部表面領域は、外部表面上に存在する粒子の光学分析に有害である。例えば、生物学的細胞は、蛍光標識された特異的タンパク質の結合反応により頻繁に分析される。理論的には、微小孔物質の表面付近に未知細胞を局在化し、続いて局在された細胞を蛍光標識されたタンパク質に晒すシステムが開発されうる。結合していないタンパク質を微小孔物質から洗い流した後に、局在化細胞と標識タンパクとの間の特異的結合反応は、局在された細胞の蛍光の増加により検出される。残念ながら、全ての表面は、非特異結合(ＮＳＢ)と知られるものを示す。すなわち、少量の標識タンパク質は、細胞上の特異的レセプターがない微小孔物質に結合する。多くの光学検出器は、特異的に標識された表面局在化細胞から生じる特異的シグナルと、透明微小孔物質の内部における巨大内部膜表面領域に非特異的に結合される蛍光タンパク質から生じるシグナルを区別することができない。上記微小孔物質は、効果的にサンプル粒子を、分析のためその表面に濃縮及び局在化できるが、微小孔物質の巨大内部表面領域へのＮＳＢは、有用な感度を頻繁に制限する。

【００８２】

これらの問題を解決するため、微小孔物質の光学的性質(例えば自己蛍光、内部光学散乱、及び蛍光ＮＳＢの検出)を変化するために改変された微小孔物質から構成される組成物が本明細書中に記載される。一の態様では、微小孔物質は、物質自身由来(自己蛍光)又は内部に結合されたトレーサー又は汚染物質由来(ＮＳＢ)の物質内部から生じる検出可能な蛍光及び散乱を低減するために、微小孔物質を光学的に不透明にするように改変される。

【００８３】

ｉ．ピグメントを含む複合体

本明細書中で使用される「複合体」という用語は、２以上の物質から構成される製品である。材料の選別に依存し、材料は、複合体を作り出すために互いに反応することもあるし、又は反応しないこともある。一の態様では、複合体は、微小孔物質及びピグメントから構成される。本明細書中で使用される「ピグメント」という用語は、微小孔物質の光学的性質を改変する化合物のいずれかである。ピグメントは、微小孔物質中に取り込まれる。本明細書中に使用される「微小孔物質中に取り込まれる」という用語は、ピグメントを微小孔物質に付着する方法のいずれかとして定義される。ピグメントの微小孔物質への付着は、共有結合、イオン性相互作用を介してなされ、微小孔物質の孔によるピグメントのトラップ、又はピグメントを微小孔物質の表面付近及び/又は微小孔物質の内部表面に沈積することによる。ピグメントは、微小孔物質の湿表面のいずれか上に取り込まれうる。本明細書中に記載される複合体のいずれかは、本明細書中に記載される物品、方法、又はキットのいずれかに使用されうる。

【００８４】

複合体は、ピグメントを微小孔物質中に取り込むことにより形成される。一の態様では、ピグメントは、微小孔物質に共有結合される。「微小孔物質に共有結合される」というフレーズは、本明細書中で、リンカーが存在しない状態で、ピグメントと微小孔物質との間での直接的な化学結合を形成すると定義される。例えば、微小孔物質の表面上の成分は、共有結合を形成するためにピグメント上に存在する成分と反応しうる。例えば、微小孔物質の表面上の成分は、ピグメント上に存在する成分と反応して、共有結合を形成しうる。ピグメントは、微小孔物質のいずれの湿表面(つまり、内部及び外部表面)に共有結合されうる。ピグメントと反応しうる微小孔物質に結合される成分の例は、非限定的に水酸基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、アミン基、又はそれらの組合せを含む。

【００８５】
或いは、「共有結合」という用語はまた、リンカーを使用して、微小孔物質の表面にピグメントを付けることを含む。例えば、リンカーは、微小孔物質の表面上の成分と結合を形成することができる成分、並びにピグメントと共有結合を形成することができる成分を有する化合物のいずれかでありうる。リンカー上の成分は、選ばれる微小孔物質及びピグメントに依存して同じであるか又は異なりうる。一の態様では、リンカーは、オルガノシリル基である。シラン化は、以前に記載され、そして物質の表面を改変するよく知られた化学方法であり、そして様々な有機分子を結合するための反応性表面を作成するためにさらに使用されうる。例えば、アミン末端の反応性シラン化試薬、例えばアミノプロピル・トリメトキシシラン(ＡＰＳ)及びエチレンジアミノプロピル・トリメトキシシラン(ＥＤＡＰＳ)は、タンパク質リンカーと共有反応できる表面を作るために使用されうる。さらに、エポキシ末端の反応性シラン化試薬、例えば、グリシドキシプロピル・トリメトキシシラン(ＧＯＰＳ)は、色素、タンパク質、又は他の試薬中の求核試薬と直接反応できる表面を作るために使用されうる。一の態様では、微小孔物質は、様々な有用な表面の官能性、例えば、カルボキシレート、スルフヒドリル、ヒドロキシ、芳香族、疎水性などを与える他のシラン化試薬で、当業者により改変されうる。シラン化合物のいずれかは、米国特許第5,959,014号に開示されるシラン化合物のいずれかは、この態様で使用されうる。該文献は、その全てを援用される。

【００８６】
一の態様では、有機色素の形態におけるピグメントは、微小孔物質の湿表面に共有結合される。本明細書中で使用される「有機色素」という用語は、化合物が微小孔物質中に取り込まれる場合、微小孔物質の光学性質を改変できる有機化合物のいずれかとして定義される。シラン改変された微小孔物質への色素の付着は、直接的であり、そして選ばれる特異的付着化学に依存する。例えば、アミノ改変された微小孔物質(例えば、ＡＰＳ又はＥＤＡＰＳ)は、非限定的にイソチオシアネート、トリアジン、及び活性エステルを含む既知のアミノ反応性色素の幾つかの化学ファミリーと反応できる。米国特許第6,630,018号;第6,623, 908号;第5,985,514号;及び第5,294,870号に開示される有機色素のいずれかは、本明細書中に開示される複合体を作るために使用さうる。これらの文献は、その全てを援用される。

【００８７】
別の態様では、有機色素は、微小孔物質との共有結合を形成することなく微小孔物質を染めることができる。例えば、有機色素は、微小孔物質の孔の中に取り込まれうる。さらに、有機色素は、例えばポリリジンなどの表面に結合されたポリマーに付着されうる。

【００８８】
選ばれる有機色素は、最終的に所望される膜の性質によって決まる。例えば、トリアジニル色素は、布地、紙など用の繊維と反応する永続的色素、並びに分析用標識として広く使用される。それらは、蛍光及び非蛍光色素の両方として利用できる。ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン(ＤＴＡＦ)は、強力な蛍光黄色物質を作り出すために、改変された微小孔物質と反応しうる。低い蛍光トリアジニル色素、例えばリアクティブ・ブルー４(Reactive Blue４)、又は有機色素のプロシオンＭＸ(Procion MX)シリーズからの選択したものは、低減された自己蛍光、ＮＳＢ蛍光、及び微小孔物質散乱を与えるために使用されうる。

【００８９】
一の態様では、複合体は、酸化アルミニウムから構成される微小孔物質を含み、そしてピグメントは、有機色素であり、ここで該有機色素は、オルガノシリル基により酸化アルミニウムへと共有結合される。別の態様では、微小孔物質はアノポアである。

【００９０】
別の態様では、ピグメントは、微小孔物質上に沈積される。「微小孔物質上に沈積される」という用語は、微小孔物質の湿表面のいずれかの上にピグメントを沈積する方法のいずれかとして本明細書中に定義される。一の態様では、得られた沈殿物又は沈積物は、イ

オン性化合物、非イオン性化合物、元素化合物またはそれらの組合せから構成されうる。一の態様では、ピグメントは、遷移金属、金属酸化物、合金、又はそれらの組合せなどの元素化合物である。遷移金属の例は、パラジウム、ニッケル、銀、金、又はそれらの組合せを含む。別の態様では、カーボン・ブラック含有物は、微小孔物質の孔内に沈積されうる。

【００９１】

一の態様では、ピグメントは、無電解メタライゼーション加工により、微小孔物質上に沈積されうる。無電解メタライゼーション加工は、高縦横比のナノメートル規模の孔型構造中に金属合金を沈積することについて、当業者に知られている。不導体無電解質メタライゼーション加工は、開始のための表面触媒を必要とする。一の態様では、パラジウム金属は、幾つかの形態において使用され、コロイド懸濁液、イオン性液体、及び金属イオンであって、微小孔物質の表面上で化学的に還元されて金属製のナノスケール・クラスターを形成するものを含む。これらのパラジウム・ナノ粒子は、無電解メタライゼーションの成長部位を形成しうる。

【００９２】

ろ過効率に影響を与えることなく、微小孔物質の光学性質を変化させることは望ましい。多くのメタライゼーション加工は、最初に黒色沈積物(パラジウム・ブラック、ブラック・ニッケル、シルバーなど)を形成した。これは、第一メタライゼーション沈積物のかなり粗い(ナノ規模の)不連続の性質のためであり、酸化などを含みうる表面反応を伴って表面上に離れた「島」を形成する。無電解メタライゼーションの当業者は、微小孔物質の孔内の黒色色素沈積物の形成を最大限にするために、反応条件、試薬などを選ぶことができる。これらの沈積物は、非蛍光性であることが分かっており、そして膜流速に最小限の効果しか有しない。

【００９３】

一の態様では、複合体は、酸化アルミニウムと１以上の遷移金属元素から構成されるピグメントを含み、ここで該ピグメントは、微小孔物質上に沈積されている。一の態様では、微小孔物質は、アノポアである。別の態様では、遷移金属元素は、他の元素、例えばリン、ホウ素又はそれらの組合せを伴うパラジウム、ニッケル、又はそれらの組合せである。

【００９４】

さらに、特定のナノスケールの金属粒子が、プラスモン共鳴として知られる作用を受けることが広く知られている。一の態様では、この作用は、一般的に１０～２００ナノメートルの寸法の範囲のサイズにおける金及び銀粒子で生じた。正確に表面上に間隔を空けて配置された場合、そうした粒子の集合は、プラスモン共鳴表面として記載されるものを形成しうる。これらの表面は、固有の光学性質、例えば高められた吸収、蛍光、エネルギー移転などを示しうる。例えば、特定の分子のラマン散乱は、プラスモン共鳴と合わせて、桁違いに高められうる。さらに、ある体積中に正確に間隔を空けて配置される場合、プラスモン共鳴粒子の集合は、固有の光学性質を有するプラスモン共鳴体積として記載されうるものを形成しうる。プラスモン共鳴体積が孔であるなら、分子相互作用は、巨大内部のプラスモン共鳴表面内で生じ、反応比をかなり亢進する。例えば、本明細書中に開示されるように、ナノスケールの金属沈積物は、微小孔物質の孔内で形成されうる。制御された条件下で、これらの沈積物は、プラスモン共鳴表面の形成に一致するサイズ範囲及び表面密度で金又は銀から形成されうる。微小孔物質が、適切な寸法及び間隔で選ばれる場合、プラスモン共鳴は、隣接する孔の間で生じ、そしてプラスモン共鳴体積をもたらす。

【００９５】

Ｃ．　局在された被分析物の操作

被分析物が微小孔物質上に局在化されると、当業者に周知の技術を使用してさらに処理されうる。以下の技術は、例示であり、そして行われる異なる類型の技術に制限することを意図されない。

【００９６】

１．　増幅

一の態様では、被分析物が核酸である場合、局在された核酸は、非限定的にポリメラーゼ・チェーン反応、核酸配列に基いた増幅、イソサーマル方法論、リガーゼ・チェーン反応、及びストランド置換増幅を含む増幅技術を使用して分析された。米国特許第4,683,195号；第4,683,202号；第4,965,188号；第5,130,238号；第5,354,668号；第5,427,930号；及び第5,455,166号において開示される増幅技術のいずれかは、本明細書中に記載される方法のいずれかにおいて使用されうる。これらの文献は、その全てを本明細書中に援用される。使用される増幅技術に依存して、核酸の特定の領域又は核酸全体は、増幅されうる。一の態様では、被分析物が、微小孔物質の表面付近に不可逆的に局在化される場合、増幅は、微小孔物質の表面付近で起こる。別の態様では、被分析物が可逆的に微小孔物質の表面付近に局在化される場合、増幅は、微小孔物質の表面付近でおこるか及び/又は被分析物が微小孔物質の表面付近にもはや存在しない溶液中で起こる。

【００９７】

一の態様では、核酸は、

(ａ)増幅された核酸を作り出すために既知の体積を有する液体サンプル中で核酸を増幅し、そして

(ｂ)増幅された核酸を含むサンプルを、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかに通すこと

により増幅される。ここで該増幅された核酸は、複合体の表面付近に局在される。

【００９８】

別の態様では、核酸は、

(ａ)　既知の体積を有し、核酸を含む液体サンプルを、本明細書中に記載されるいずれかの微小孔物質に通し、ここで該核酸は、複合体の表面付近に局在され、そして

(ｂ)　該核酸を増幅すること

により増幅される。

【００９９】

２．　ハイブリダイゼーションと同定

以下は、本明細書中に開示されるハイブリダイゼーション/同定方法において使用されうる化合物の異なる類型について論じる。

ｉ．　配列

本明細書中に開示されるハイブリダイゼーション/同定方法で使用されうる様々な配列が存在し、これらの全ては、核酸又によりコードされるか、又は核酸である。これらの遺伝子のヒトアナログ、並びに別のアナログ、及びこれらの遺伝子のアレル、及びスプライスバリアント及び別のバリアントの類型は、ジェンバンク(Genbank)を含む様々なタンパク質及び遺伝子データーベースにおいて利用できる。この出願の出願時にジェンバンクで利用できる配列は、その全て並びにその中に含まれる個々のサブシーケンスを本明細書中に援用される。ジェンバンクには、http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgiでアクセスできる。当業者は、配列の相異及び違いの決定の仕方、及び特定の配列を別の関連配列と関連付ける組成物及び方法の調節の仕方を理解する。プライマー及び/又はプローブは、本明細書中に開示されそして当該技術分野に周知である情報を与えられた既知配列のいずれかについて設計されうる。

【０１００】

ある実施態様では、この産物は、少なくとも、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５

０、４７５、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１２５０、１５００、１７５０、２０００、２２５０、２５００、２７５０、３０００、３５００、又は４０００のヌクレオチド長である。

【０１０１】

別の実施態様では、産物は、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１２５０、１５００、１７５０、２０００、２２５０、２５００、２７５０、３０００、３５００、又は４０００ヌクレオチド長に等しいか又はそれ未満である。

【０１０２】

ａ．機能性核酸

機能性核酸とは、例えば、標的分子を結合し又は特異的反応を触媒するなどの特別な機能を有する核酸分子である。機能性核酸分子は、以下のカテゴリーに分類されうる。このことは制限することを意味しない。例えば、機能性核酸は、アンチセンス分子、アプタマー、リボザイム、トリプレックス形成分子、及び外部のガイド配列を含む。機能性核酸分子は、標的分子により所有される特異的活性のアフェクター、阻害因子、調節因子、及び刺激因子として作用しうるか、又は該機能性核酸分子は、いずれの別の分子とは独立した新規の活性を有する。

【０１０３】

機能性核酸分子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ポリペプチド、又は糖鎖などの巨大分子のいずれかと相互作用しうる。こうして、機能性核酸は、開示された核酸のいずれかのｍＲＮＡと相互作用しうる。機能性核酸は、標的分子と機能性核酸分子との間の配列ホモロジーに基いた別の核酸と相互作用するように設計される。別の状況では、機能性核酸分子と標的分子との間の特異的な認識は、機能性核酸分子と標的分子との間の配列ホモロジーに基かないが、むしろ特異的認識が起こることを可能にする三次構造に基く。

【０１０４】

ｉｉ．抗体

ａ．抗体全般

「抗体」という用語は、広い意味で本明細書中で使用されており、そしてポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方を含む。未処理の免疫グロブリン分子に加えて、これらの免疫グロブリン分子の断片若しくはポリマー、及びヒト又はヒト化バージョンの免疫グロブリン分子若しくはそれらの断片は、「抗体」という用語の中に含まれる。抗体は、本明細書中に開示されるｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイを使用して、又はそれらのｉｎ ｖｉｖｏ治療及び/又は予防活性が該試験の後に既知の臨床試験方法に従って試験される類似の方法によりそれらの所望の活性について試験されうる。

【０１０５】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な集団の抗体から得られた抗体のことを指す。つまり、該集団内の個々の抗体は、抗体分子の小サブセットにおいて存在しうる自然に生じうる突然変異を除いて、同一である。本明細書中のモノクローナル抗体は、特異的に「キメラ」抗体を含む。

キメラ抗体において、重鎖及び/又は系さの一部は、特定の種由来又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一であるか又は相同であり、一方、鎖(1つ又は複数)の残りは、別の種由来又は別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体、並びにそうした抗体の断片における対応する配列に同一であるか又は相同である(

米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)を参照のこと)。

【０１０６】

開示されたモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を作り出すいずれかの方法を使用して作られうる。例えば、開示されるモノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256: 495 (1975)に記載される方法などのハイブリドーマ法を使用して調製されうる。ハイブリドーマ法において、マウス又は別の適切な宿主動物は、免疫化剤に特異的に結合する抗体を作る又は作り出すことができるリンパ球を導くために典型的に免疫化剤で免疫化された。或いは、リンパ球は、in vitroにおいて、例えば、本明細書中に記載されるＨＩＶ　Ｅｎｖ-ＣＤ４-コ-レセプター複合体を使用して免疫化されうる。

【０１０７】

モノクローナル抗体はまた、組換えＤＮＡ方法、例えば米国特許第4,816,567号(Cabilly et al.)に記載の方法より作られうる。開示されるモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチド・プローブを使用することによる)慣用の方法を使用して、容易に単離及び配列決定されうる。抗体又は活性抗体断片のライブラリーはまた、ファージ・ディスプレー技術(例えば、Burton et al.,に対する米国特許第5,804,440号及びBarbas et al.,に対する米国特許第6,096,441号)を使用して、作成及び選別されうる。

【０１０８】

in vitro方法はまた、一価抗体を調製するために適している。抗体断片、特にＦａｂ断片を作り出す抗体の切断は、当該技術分野に周知であるルーチン技術を使用して達成されうる。例えば、切断は、パパインを使用しておこなわれうる。パパイン切断の例は、１９９４年１２月２２日に発行されたWO94/29348及び米国特許第4,342,566号において記載される。抗体のパパイン切断は、典型的にＦａｂ断片と呼ばれる２個の同一抗原結合性の断片を産生し、ここで各々は、一の抗原結合性部位、及び残渣Ｆｃ断片を伴う。ペプシン処理は、２の抗原混同部位を有する断片を作り出し、そして抗原を架橋することができる。

【０１０９】

抗体又は抗体断片の活性が、非改変型の抗体又は抗体断片に比較して有意に変化しないか又は損なわれないならば、断片は、他の配列に繋がれていようといまいと、挿入、欠失、置換、又は特定領域若しくは特異的アミノ酸残基の選ばれた改変を含みうる。これらの改変は、例えばジスルフィド結合をできるアミノ酸を取り除くか又は加えるため、生物-寿命を増加するため、その分泌特性を変換するためなどの幾つかの更なる性質を与える。幾つかの場合、抗体又は抗体断片は、その同起源の抗原への特異的な結合などの生物活性性質を有さなければならない。抗体又は抗体断片の機能又は活性領域は、タンパク質の特異的領域を突然変異させ、次に発現されたポリペプチドを発現及び試験することにより同定されうる。そうした方法は、当業者に明らかであり、そして抗体又は抗体断片をコードする核酸を部位特異的突然変異生成することを含む(Zoller, M. J. Curr. Opin. Biotechraol. 3: 348-354,1992).

【０１１０】

本明細書中に使用されるとき、「抗体」又は「抗体(複数)」は、ヒト抗体及び/又はヒト化抗体を指しうる。多くの非ヒト抗体(例えば、マウス、ラット、又はウサギ由来)は、ヒトにおいて天然抗原性を有し、そして、それゆえヒトに投与されるとき、不所望の免疫応答を生じうる。それゆえ、該方法におけるヒト又はヒト化抗体の使用は、ヒトに投与された抗体が不所望の免疫応答を引き起こす機会を減らすために役に立つ。

【０１１１】

ｂ．　ヒト抗体

開示されたヒト抗体は、いずれかの技術を使用して調製されうる。ヒト・モノクローナル抗体の産生技術の例は、Cole et al. (Monoclonal Antibodies and Cancer T7zerapy, Alan R. Liss, p. 77,1985) 及びBoerner et al. (J. Imfsautaol., 147 (1) : 86-95,1991)により記載される。ヒト抗体(及びそれらの断片)は、ファージ・ディスプレイ・ライ

ブラリーを使用して産生されうる(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381,1991 ; Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581, 1991)。

【０１１２】

開示されたヒト抗体は、トランスジェニック動物からも取得されうる。例えば、免疫化に応答して、ヒト抗体のレパートリーの全てを産生できるトランスジェニック、ミュータント・マウスは、記載されてきた(例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)を参照のこと)。キメラ及び生殖細胞系列の突然変異マウスにおける抗体の重鎖結合領域(J(H))遺伝子のホモ欠失により、内在性の抗体産生が完全に阻害され、そしてヒト生殖細胞系列の抗体遺伝子のアレイをそうした生殖細胞系列突然変異マウスへとうまく移すことにより、抗原に晒された際、ヒト抗体の産生がもたらされる。所望される活性を有する抗体は、本明細書中に記載されるようにＥｎｖ－ＣＤ４－コ－レセプターを使用することにより選択される。

【０１１３】

ｃ．ヒト化抗体

抗体ヒト化技術は、抗体分子の１以上のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列を操作する組換えＤＮＡ技術の使用を一般的に含む。従って、非ヒト抗体(又はそれらの断片)のヒト化形態は、キメラ抗体又は抗体鎖(又はそれらの断片、例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、又は抗体の他の抗原結合部位)であって、ヒト(レシピエント)抗体のフレームワーク中に組み込まれた非ヒト(ドナー)抗体由来の抗原結合部位の一部を含むものである。

【０１１４】

ヒト化抗体を作るために、レシピエント(ヒト)抗体の１以上の相補決定領域(ＣＤＲｓ)由来の残基を、ドナー(非ヒト)抗体分子であって、所望の抗原結合性質(例えば、標的抗原に対する特異性及び親和性の特定のレベル)を有すると知られている分子の１以上のＣＤＲｓ由来の残基により置換される。幾つかの例では、ヒト抗体のＦｖフレームワーク(ＦＲ)残基は、対応する非ヒト残基により置換される。ヒト化抗体は、レシピエント抗体において又は組み込まれたＣＤＲ、或いはフレームワーク配列においても見られない残基も含みうる。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトの源から該ヒト化抗体に導入される１以上のアミノ酸残基を有する。慣用的に、ヒト化抗体は、典型的に、幾つかのＣＤＲ残基及びおそらく幾つかのＦＲ領域が、げっ歯類抗体のアナログ部位由来の残基により置換されるヒト抗体である。ヒト化抗体は、抗体定常領域の少なくとも一部、典型的には、ヒト抗体の一部を含む(Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988), and Presta, Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992))。

【０１１５】

非ヒト抗体のヒト化方法は、当該技術分野に周知である。例えば、ヒト化抗体は、Winterとその同僚の方法(Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986), Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988), Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988))に従って、げっ歯類のＣＤＲｓ又はＣＤＲ配列を対応するヒト抗体配列に置換することにより作成されうる。ヒト化抗体の産生のために使用されうる方法はまた、米国特許第4,816,567(Cabilly et al.)、米国特許第5,565,332号(Hoogenboom et al.)、米国特許第5,721,367号(Kay et al.)、米国特許第5,837,243号(Deo et al.)、米国特許第5,939,598号(Kucherlapati et al.)、米国特許第6,130,364号(Jakobovits et al.)、及び米国特許第6,180,377号(Morgan et al.)において記載される。

【０１１６】

一の態様では、被分析物が核酸である場合、局在された核酸は、ハイブリ第ｚ‐ションされ、そして同定されうる。例えば、未知又は部分的に未知な配列を伴う核酸を含むサンプルが、微小孔物質又は複合体の表面付近に局在され、そして該核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドと接触されるなら、ハイブリダイゼーションが起こる。結合性オリゴヌクレオチドは、天然オリゴヌクレオチドのいずれか、又は改変オリゴヌクレオチド、

例えばＰＮＡでありうる。ハイブリダイゼーション・パターンに基いて、局在された核酸から、配列情報をもたらすことは可能である。こうして、核酸配列のいくつか又は全ては、同定されうる。これらのハイブリダイゼーション技術は、Fodor et al. (1992), Science 251,767-773及びSouthern et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22,1368-1373において開示される。これらの文献は、その全てを援用される。

【０１１７】

一の態様では、核酸は、

（ａ） 液体サンプル中の核酸を、既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドであって、該核酸に相補的であるオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせて、ハイブリダイゼーションされた核酸を産生し、

（ｂ） ハイブリダイゼーションされた核酸を含む液体サンプルを、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかに通し、ここで該ハイブリダイゼーションされた核酸が、該複合体の表面付近に局在される

ことにより、ハイブリダイゼーションされ及び/又は同定される。別の態様では、核酸は、

（ａ） 核酸を含む液体サンプルを、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかに通し、ここで該核酸は該複合体の表面付近に局在化され、そして

（ｂ） 該核酸を、該核酸と相補的である結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることにより、

ハイブリダイゼーションされる。

【０１１８】

３． バイオリアクター

一の態様では、本明細書中に記載される微小孔物質であって、複合体及び改変微小孔物質を含むもののいずれかは、バイオリアクターとして使用されうる。この態様では、該バイオリアクターは、小さい発酵器、生物化学フロー分析器、又はバイオセンサーの一部として使用されうる。一の態様では、生物活性薬剤は、複合体に直接又は上記リンカーにより共有結合されうる。例えば、酵素は、上記シラン化をとおして複合体に結合され、酵素/支持体システムを作り出す。別の態様では、反応割合を改良するため、サスペンション・ポリマーの方法により、生物活性薬剤は複合体へと結合されうる。一の態様では、反応物質の溶液が、酵素/支持体システムと接触される場合、酵素/支持体システムは、触媒として振る舞い、そして新たな化合物を作り出しうる。別の態様では、酵素/支持体システムは、バイオセンサーとして振舞い、そしてサンプル中に存在する特定の被分析物と相互作用しうる。

【０１１９】

４． 定量

一の態様では、局在された被分析物は、液体サンプル中に存在する被分析物の量を定量するために使用されうる。「被分析物の定量」というフレーズは、被分析物が、微小孔物質の表面付近に局在化されるとすぐに、サンプルの既知の量に存在する被分析物の量を計算することとして定義される。一の態様では、被分析物は、被分析物粒子を検出及び計数することにより、そして被分析物粒子の数を、サンプルの既知の体積に基く対応する濃度に相関することにより、定量される。

【０１２０】

本明細書中に記載される被分析物の定量方法は、被分析物の迅速な分析を可能にする。一の態様では、被分析物の分析は、３０分未満で行われうる。別の態様では、被分析物の分析は、標的分子の高感度の増幅(amplification)又は増幅(multiplication)(例えば、ポリメラーゼ・チェーン反応(ＰＣＲ))を必要とせず、それは改良された精度(precision)及び正確性(accuracy)を提供する。多数の別の利点が、以下に記載される。

【０１２１】

ｉ． 被分析物の標識

一の態様では、使用される検出技術に左右されて、被分析物は、検出される前に標識さ

れうる。本明細書中で使用される「標識された被分析物」という用語は、検出可能なトレーサーと相互作用した被分析物として定義される。被分析物と検出可能なトレーサーとの間の相互作用は、化学的又は物理的相互作用、例えば非限定的に共有結合、イオン性相互作用、又はルイス酸-ルイス塩基相互作用を含みうる。本明細書中に示される「検出可能なトレーサー」は、

(１) 上記被分析物と相互作用できる少なくとも１の基、及び

(２) 当該技術分野に周知である技術を使用して検出できる少なくとも１の基

を有する化合物のいずれかとして定義される。一の態様では、被分析物は、局在化の前に標識されうる。別の態様では、該被分析物は、局在された後に標識されうる。

【０１２２】

被分析物が核酸である場合、特定のハイブリダイゼーションを介した結合及び標識を可能にする核酸の改変技術は、当該技術分野に周知である。例えば、標的核酸は、表面に特異的又は非特異的に局在されうる。「特異的に局在された標的核酸」というフレーズは、サンプル中に存在する標的核酸であって、例えば特異的標的核酸を捕捉及び局在化するだけの特異的結合反応により微小孔物質の表面付近に特異的に局在される核酸として本明細書中に定義される。特異的に局在化されない標的核酸のいずれもが、本明細書中で「非特異的に局在された標的核酸」と呼ばれる。標的核酸のみが局在されるところにおいて、精製目的で特異的に局在された標的核酸を標識することは、市販の分子標識、例えば蛍光核酸色素を使用することにより達成されうる。一の態様では、特異的に局在された標的核酸の局在は、局在された特異的結合剤、例えば、相補的結合性オリゴヌクレオチドなどを使用することにより達成され、特異的に微小孔物質の表面付近に標的核酸を特異的に捕捉及び局在化する。この態様では、微小孔物質の表面付近に局在化される全ての核酸は、標的分子であり、そして標識されうるか及び計数されうる。

【０１２３】

別の態様では、非特異的局在された標的核酸局在化は、患者サンプル中に含まれる多くの核酸を、微小孔物質の表面付近に局在化することを含む。この態様では、標的及び別の核酸が表面に共局在する場合、非特異的に局在された標的核酸を標識することは、検出可能なマーカーで標識された特異的結合性プローブなどの検出可能のトレーサーを使用することにより、或いは、局在された標的核酸と特異的結合性プローブとの間の表面局在化ハイブリッドを形成し、続いて例えば蛍光核酸色素で標識することにより、達成されうる。この態様では、標的分子は、かなり高濃度の不所望核酸の存在下で、特異的に標識され、そして計数されうる。

【０１２４】

一の態様では、局在されたビリオン-由来核酸は、非特異的核酸色素で蛍光染色されうる。或いは、核酸色素は、局在化ステップの前に、溶解された患者サンプルのろ液に加えられうる。局在された蛍光核酸は、次に本明細書中に記載される技術を使用して計数されうる。このアプローチは、場合によって潜在的に感染性を有する粒子を同定するための改良された技術を提供する。

【０１２５】

一の態様では、検出可能なトレーサーは、２以上の異なる検出可能なトレーサー分子である。検出可能なトレーサー上に存在する検出できる基の例は、非限定的に、蛍光マイクロビーズ、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、蛍光発生酵素、蛍光色素、又はそれらの組合せを含む。一の態様では、検出可能なトレーサーは、標識された又は標識されていないオリゴヌクレオチド・プローブである。別の態様では、以下の検出可能なトレーサーは、核酸を標識するために使用されうる。

【０１２６】

ａ.蛍光トレーサー

蛍光核酸染色は、標的核酸分子を標識するために使用されうる。蛍光核酸色素は、相互作用、マイナー・グルーブ結合などを介して選択的に核酸を染色する。これらの色素の最も有用なものは、核酸に結合されると強い蛍光の増大を示す。そうした色素の非限定的な

例は、エチジウム・ブロマイド、プロピジウム・アイオダイド、サイバーグリーンＩ、トト-３(Ｔｏｔｏ-３)、サイトックス・オレンジ(Ｓｙｔｏｘ・Ｏｒａｎｇｅ)などを含む。これらの色素の幾つかは、高い量子収量(約５０％超)及び核酸の特定の類型に結合した際、１０００を超える蛍光増強を有する。核酸に結合した際の蛍光増強は、蛍光トレーサーのシグナル-対-ノイズ制限を最小化し、そして色素非特異的結合は、実質的に非蛍光である。さらに、標的核酸あたりの色素充填度は高く、しばしば４塩基対あたり１の蛍光色素分子に達する。蛍光核酸色素の制限は、標的表面上の全ての核酸を染色することを含むが、二重鎖ＤＮＡ、ＲＮＡなどについての選択性を有する事が多い。

【０１２７】

さらに、連続的蛍光染色アプローチが使用されうる。そうしたアプローチは、標的核酸が相補的なオリゴヌクレオチドを有する微小孔物質の表面付近に特異的に局在するが、表面上の全ての核酸が生物学的アッセイに必要とされる純度のレベルの標的核酸にならないような場合に、特に有用である。この場合、標的及び非標的核酸は、共局在される。連続的染色アプローチにおいて、全ての局在された核酸のうち、かなり高い親和性で二重鎖断片を好んで染色する第一核酸色素Ａが加えられた。次に遊離している色素Ａは、このシステムから取り除かれ、そして相補的なオリゴヌクレオチド・プローブ(非標識)が加えられ、そして標的核酸に結合する。次に第二の核酸色素Ｂは加えられ、そして新たに作られたオリゴプローブ-標的核酸のハイブリッド領域に結合した。これにより、真の標的核酸が色素Ｂで標識されることをもたらす一方、色素Ａが全ての非特異的核酸色素結合部位をブロックする。

【０１２８】

ＤＮＡ、ＲＮＡ、及びＰＮＡ(ペプチド核酸)オリゴヌクレオチドに基いたプローブは、特異的ハイブリダイゼーションを介した局在化の前又は後において、使用されて標的核酸を標識する。「表面に局在されたハイブリッド」というフレーズは、微小孔物質の表面付近に局在された核酸が、既知の配列を有する基質(例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ)と接触され、その結果、該基質が、局在された核酸と相互作用する場合に形成された産物として定義される。或いは、「表面に局在されたハイブリッド」というフレーズは、本明細書中で、核酸が既知の配列を有する基質(例えばＤＮＡ又はＲＮＡ)と接触され、その結果該基質が、核酸と相互作用して、ハイブリッドを作り出し、そして次に該ハイブリッドを局在化する場合において形成された産物として定義される。多くのそうしたシステムは当業者に周知である。これらのハイブリダイゼーション・プローブは、トレーサーを光学的に検出可能にするための物質で直接標識することにより検出可能なトレーサーを形成するために使用されうる。プローブの例は、非限定的に、色素、ビーズ、タンパク質及びタンパク質凝集体、量子ドット、ナノ結晶などを含む。さらに、核酸は、さらなるステップの後にそれらを光学的に検出可能にする物質で標識されうる。例えば、ビオチン化プローブは、分子診断において広く使用される。ハイブリダイゼーションの後、結合されたビオチン化プローブは、ビオチンに対する特異的結合剤、例えばアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン(neutravidin)などを含む光学検出可能な物質と反応される。ハイブリダイゼーション・プローブは、後に記載される更なるステップの後に光学シグナルを作り出すことができる酵素でさらに直接又は間接的に標識されうる。

【０１２９】

一の態様では、ウイルス量アッセイは、標識されうる。ＨＩＶは、長さ約９０００塩基の長さの一本鎖リボ核酸(ＲＮＡ)を含む。完全ＨＩＶ・ＲＮＡ分子に対して作成される３６０塩基離れた２５塩基長のオリゴヌクレオチド・プローブが存在する。ＨＩＶ・ＲＮＡ並びに別の標的核酸に特異的に結合する異なるオリゴヌクレオチドプローブを合成する能力は、当業者に周知である。同様に、色素、蛍光ビーズ、蛍光発生酵素などの取り込み又は付着を介したこれらの特異的オリゴ・プローブ蛍光を作る能力もまた、よく知られている。

【０１３０】

検出可能なトレーサーを産生するため、オリゴヌクレオチド・プローブに付着させる蛍

光標識の選択は、主に検出器のパラメーターによって決定される。実施例１４は、低パワースキャン検出システム、例えば、走査共焦点上面蛍光光度計(scanning confocal epifluorometer)を用いて、標的核酸あたり２５又は１００の多蛍光分子(例えば、フルオレセイン、ローダミン、Ｃｙ５、など)を検出することに基いた本検出データーの計算を説明する。一の態様では、そうした標識分子を産生する方法は、以下のとおりである。局在された標的核酸をプローブ溶液とインキュベーションして、ハイブリダイゼーションを起こさせた。多孔性膜への局在化の場合、ハイブリダイゼーションの間、膜を通して流れるプローブ溶液は、反応時間を短くすることができる。ハイブリダイゼーションしていないプローブ溶液は、ハイブリダイゼーションの厳密度、ＮＳＢなどを制御する条件下で、光学的検出表面から洗い流される。

【０１３１】

蛍光ビーズに基いたトレーサープロセスは、図３に模式的に図示される。最初に、蛍光マイクロビーズ３００などの蛍光粒子は、マイクロビーズ上に局在化される特異的結合性オリゴヌクレオチド・プローブでコートされる。蛍光マイクロビーズ３００は、膜フィルター３１０の表面上で保持されるような大きさである。標的核酸が、膜フィルター３１０の表面付近に局在された後に、蛍光マイクロビーズは、膜フィルター３１０の表面上に導入され、そしてろ過される。結合性オリゴヌクレオチドで被膜される蛍光マイクロビーズは、局在された標的核酸と直接接触されるよう配置され、そしてハイブリダイゼーションは、拡散により妨げられることなく即座に生じる。適切なインキュベーション時間の後、結合していないマイクロビーズ３２０を、ハイブリダイゼーションの厳密度及び結合特異性を制御する条件下で洗い流した。非特異的に結合するトレーサー・ビーズに対して区別するために、複数のビーズを、各標的核酸に付着すべきである。

【０１３２】

ｂ．酵素トレーサー

別の実施態様では、酵素技術は、被分析物を高ＳＮＲで標識するために、検出可能なトレーサーとして使用されうる。「サスペンドされた(suspended)」反応物質の増大された活性の原理が使用されうる。例えば、抗体及び別のタンパク質、並びに別の分子は、表面に保持されるとき活性を失うということが知られている。微小孔物質に局在される巨大分子の「足場(scaffolding)」に被分析物を保持することは、表面での不活性化を最小限にすることによって、並びに活性微小孔物質を通した流れを許容することにより物質移動を改良することによって、活性をかなり改良しうる。

【０１３３】

蛍光沈殿アッセイは、当該技術分野において記載されており、そして可溶性の非蛍光基質を、酵素活性がある点に局在される蛍光沈殿へと変換する酵素トレーサーを使用する。沈殿アッセイにおいて使用される酵素トレーサーの例は、非限定的に、酵素標識蛍光(ＥＬＦ)において使用されるアルカリ・ホスファターゼを含む。該酵素標識蛍光は、Molecular Probes, Incから市販されている。この場合、局在された標的核酸は、適切な酵素で標識されたオリゴヌクレオチド・プローブにハイブリダイゼーションし、該酵素は次に局在された蛍光微小沈殿物であって、標的核酸に一対一対応して計数されうる沈殿物を作り出す。

【０１３４】

図４は、本明細書中で使用されるＥＬＦ反応を示す。標的核酸４００は、微小孔物質４０１の表面付近に局在され、そして物理的に幾つかの開口部４０２にまたがっている。ビオチン化ハイブリダイゼーション・プローブ４０３は、標的核酸４００に特異的にハイブリダイゼーションされた。図は、縮尺比に従っていないことを注意のこと。典型的な２５塩基の核酸プローブは、たった約８ナノメートルであり、公称の孔直径約１８０ナノメートルと比較される。アルカリホスファターゼ・ストレプトアビジン抱合体４０４は、ビオチン化プローブ４０３に結合された。結合していないプローブ及び結合していない抱合体は、システムから洗い流された。非蛍光・可溶性ＥＬＦ基質４０５は加えられ、そして抱合体４０４は、フィルター４０１上及び４０１内に蛍光沈殿物４０６を作る。この場合、

ハイブリダイゼーションされたプローブ４０３に結合された抱合体４０４は、典型的に、表面の孔上に渡って「サスペンドされている」。これにより典型的に、最小限の表面変性及び他方向性の基質の優れた分散のため、高い酵素活性がもたらされた。膜表面上に存在する非特異的に結合された結合体４０７は、結合体の表面変性のため並びに比較的阻害され基質の表面への拡散のため、典型的にずっと低い活性である。さらに、ＥＬＦ蛍光沈殿物４０６は、微小孔物質の表面付近で作られる。これは、ナノ結晶沈殿を増大し、ナノ結晶を表面付近に局在し、そしてある程度典型的な孔直径にまでナノ結晶の成長を制御する。これらの全ては、検出性を改良する点に貢献する。以前に論じられる様に、複数のトレーサー結合は、ＳＮＲを改良するために、付加的に使用されうる。

【０１３５】

図５は、本明細書中に記載される方法を使用した典型的なＥＬＦ反応のタイミングのグラフを示す。水平軸は時間であり、そして垂直軸は脱リン酸化基質を沈殿するＥＬＦの局所濃度であり、これはＥＬＦアルコールとしても知られている。点線の水平方向の線、沈殿形成での標識された濃度５１０は、ナノ結晶沈殿が始まる有効濃度を表す。二つの斜の線が存在する。急勾配の線は、標識された特異的シグナル５１１であり、一方なだらかな勾配の線は、標識された非特異シグナル５１２である。これらの二つの線は、局所的なＥＬＦアルコール濃度であって、時間に対して、高い(急勾配)及び低い(緩やかな勾配)酵素活性の位置の付近を表す。低酵素活性の位置は、前述されるように非特異的な結合の結合体である一方、高い酵素活性の位置は特異的に結合された酵素であり、阻害されない単一分子の酵素活性又は小さい領域(１ミクロン^2)に結合する複数のプローブ及び酵素が原因である。この系では、ＥＬＦアルコールの局所的濃度が、線５１０により指し示される濃度を超えるまで、蛍光ナノ結晶は、形成できない。開始沈殿時間５１３と名付けられる反応中の幾つかの時間点では、比較的高い酵素活性の位置が、ナノ結晶形成を引き起こすために十分なＥＬＦアルコールを作り出した。その後、低酵素活性の領域でさえ、ナノ結晶を最終的に作り出しうる。従って、特異的対非特異的結合プローブについての高ＳＮＲが、反応過程における比較的早い時期に存在する。

【０１３６】

図６は、実施例２２に記載されるように核酸計数についての蛍光スポットカウント対時間のグラフである。簡潔にいうと、ラムダファージＤＮＡは、２０の相補的ビオチン化プローブと前もってハイブリダイゼーションされ、本明細書中に記載される改変されたニッケル-ホウ素アノポアに局在され、そして実施例において記載されるＥＬＦで現像される。ご覧のように、ラムダ・ポジティブ対ラムダ・ネガティブサンプルの明白な差は、反応過程における特に早い時期において検出された。

【０１３７】

同様に、チラミド(tyramide)に基いたアッセイは、酵素活性のポイント付近にタンパク質を共有結合させる反応性蛍光中間体を酵素学的に作り出し、そして標的核酸に１対１対応で計数されうる局在された微小蛍光ゾーンを産生するために構成されうる。

【０１３８】

ｃ.反応比を増大するための改変された微小孔物質

別の態様では、サスペンドされた反応物質の増大された反応割合は、有利に使用されうる。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、本明細書中に記載のいずれの複合体を含む微小孔物質の表面付近に局在されて、改変された微小孔物質を作り出す。１の態様では、改変された微小孔物質は、微小孔物質をサスペンション・ポリマーを含む溶液と反応することにより産生されうる。ここで、該溶液は、微小孔物質を通り抜け、そしてサスペンション・ポリマーは、微小孔物質の表面付近に局在化される。別の態様では、サスペンション・ポリマーは、サンプルを微小孔物質へと接触する前に、被分析物を含むサンプル中へと加えられる。この実施態様では、該サスペンション・ポリマーは、微小孔物質の表面付近へと局在化される前に、被分析物と相互作用した。サスペンション・ポリマーは、共有結合又はいずれかの物理的又はイオン性相互作用を介して、被分析物と相互作用できる。

【０１３９】
これの一の態様は、図７a～７ｃにおいて図示される。微小孔７１０を含む微小孔物質７００は、図７aにおいて示される。図７ｂは、微小孔表面７００の表面付近に局在化し、微小孔７１０に渡ってまたがるサスペンション・ポリマー７２０を示す。サスペンション・ポリマー７２０は、微小孔物質７００に付着されて、本明細書中に示されるように微小孔７１０を介した分子崩壊を妨げるために十分である。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、例えば共有結合、トラッピング、又は物理的又はイオン性相互作用により微小孔物質に局在されうる。図７ｃは、微小孔表面７００の断面図を示し、微小孔７１０上に「サスペンドされた」サスペンション・ポリマー７２０を示す。サスペンドされている被分析物７３０は、微小孔７１０上でサスペンション・ポリマー７２０に付着されることが示され、そしてサスペンドされていない被分析物７４０は、微小孔７１０上ではなく、一般的に７５０として示される微小孔物質の固体表面支持体上でサスペンション・ポリマー７２０に付着されることがしめされる。開示されるように、サスペンドされた被分析物７３０は、７４０で示されるようにサスペンション・ポリマー上であるが微小孔上でサスペンドされない非サスペンド型の被分析物、又は７６０に示されるように非特異的に結合されるか又は慣用的に(表面に対して直接)局在化される被分析物と比べて、立体障害、拡散、変性などに基いた亢進された反応割合を有する。

【０１４０】
サスペンション・ポリマーは、微小孔物質上の微小孔にまたがることができる巨大分子のいずれかでありうる。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、オリゴヌクレオチド、多糖、又はタンパク質である。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、ＤＮＡ及びそのアナログ、並びにＲＮＡなどの核酸である。別の態様では、サスペンション・ポリマーは、セルロース及びスターチなどの多糖である。反応物質は、タンパク質又は別の分子、例えば非限定的に酵素及び抗体、生物分子、又は触媒でありうる。被分析物は、例えば共有結合を介して、リンカー又はビオチン-アビジンなどの結合反応を介して、直接サスペンション・ポリマーに付着されうる。被分析物は、微小孔物質に付着される前又は後にサスペンション・ポリマーに付着されうる。例えば、抗体は、当該技術分野に一般的に周知である方法により溶液中のＤＮＡに付着され、次に付着された抗体を含む該ＤＮＡは、微小孔表面に局在される。付着された抗体の一部は、微小孔上にサスペンドし、そして高められた反応性を有する。ＤＮＡが、表面上に可逆的に局在されたなら、本明細書中に開示される方法により取り除かれることもあり、それにより付着された抗体をさらに取り除く。別の態様では、ＤＮＡを含む抗体は、溶液中で関心の被分析物又はトレーサーと反応されて、特異的結合に作用する。ここで、該ＤＮＡを含む付着抗体及び特異的に結合された被分析物又はトレーサーは、本明細書中に開示されるトレーサーの検出を増進するために、次に微小孔表面に局在される。この場合、サスペンション・ポリマーを微小孔物質に局在化することにより、反応物質、例えば抗体、被分析物、及びトレーサーを溶液から濃縮することが容易であることは、サスペンドされた被分析物の相対活性を亢進することに関わらず、この方法のもう一つの利点である。

【０１４１】
d. プラスモン共鳴アッセンブリ

プラスモン共鳴粒子(ＰＲＰ)は、特異な光学的性質を示す金属製のサブミクロンである。特に、金及び銀のＰＲＰは、格別高くかつ波長選択性の光散乱能力を有することが知られている。１個の６０ナノメートルの金粒子は、５００,０００個のフルオレセイン分子の蛍光発光と同等の光子を散乱する。銀のＰＲＰは、金の約８倍の効果を有すると知られているが、化学的に安定でない。ＰＲＰは、診断における使用を提案されてきており、そしてＰＲＰ及び関連技術を商業化するために数社が形成されてきた。

【０１４２】
球状のＰＲＰ光学性質は、周知である：
１．かなり小さいＰＲＰでは(金について４０ｎｍ以下)、散乱断面は6倍になるまで粒子半径に比例し、一方、ピーク散乱波長は一定である。この形態では、金は主に５２０

ｎｍで散乱し、一方銀は３８０ｎｍで散乱する。

２．ＰＲＰが大きくなるにつれて(金について４０ｎｍ超)、散乱断面は増大し続け、一方、ピーク散乱波長はより長い波長へとシフトする。例えば、以下の散乱光の色が見られる：

金ＲＰＰ直径	散乱光の色
４０ｎｍ	緑色
７８ｎｍ	黄色
１１８ｎｍ	橙色
１４０ｎｍ	赤色

３．透明誘電散乱粒子(ガラス、プラスチック・ビーズなど)とは異なり、ＰＲＰは、媒体屈折率適合に関する散乱パラメーターの低減を示さない。実際、液浸培地屈折率を固有粒子屈折率に適合することにより、ＰＲＰからの散乱は培地屈折率の増加を伴って増加し、並びにピーク散乱波長における明白な赤方偏移をうける一方、慣用粒子からの散乱は実質的に取り除かれる。

【０１４３】

非球形(例えば棒状などの)ＰＲＰの性質は、ほとんど明らかにされていない。棒状ＰＲＰについての公表されているデーターは、実質的に２の軸方向の散乱パラメーターを示し、ここで散乱波長は、照明光へのＰＲＰ配向に左右される。例えば、４０ｎｍ未満の直径を有するＰＲＰ棒は、５２０ｎｍの散乱ピーク及びその長さに関連するかなり強力で長い波長ピークを示す。

【０１４４】

球状ＰＲＰのアッセンブリの性質は、密集したＰＲＰとの間の共鳴相互作用を示す。つまり、密集した球状ＰＲＰの直線状のアレイ・アッセンブリは、同等の棒に類似した長波長散乱性質を示す。二つの密集粒子のアッセンブリは、ＰＲＰ直径に基いた基本的散乱波長(例えば４０ｎｍ未満の金では、５２０ｎｍ)、並びに相互共鳴プラスモン状態の間の共鳴相互作用に関連された長波長を示す。３個のＰＲＰの直線状のアッセンブリは、基本波長並びに３個の球状ＰＲＰアッセンブリの長さに関連した固有の長波長を示す。ＦＲＥＴと同様に、ＰＲＰのこの共鳴アッセンブリは、かなり短い距離の作用であり、そして近接結合事象の分析を得るために有用でありうる。

【０１４５】

本明細書中に記載される方法において、被分析物が核酸であるとき、プラスモン共鳴アッセンブリ(ＰＲＡ)の検出は、核酸構造分析を可能にしうる。前に記載されるように、検出可能なトレーサー、例えば多数のプローブ結合は、非特異結合事象から特異的結合事象を区別するために使用されうる。上記多数のプローブ技術が、真の標的分子から(ＮＳＢ)を区別することを首尾よく可能にする一方、核酸配列の情報は、いくらか確実性がない。一塩基多型(ＳＮＰ)を伴う標的分子が想定される。さらに、ＳＮＰを含む２５０の塩基領域に特異的に結合する１０個のプローブが合成されることが想定される(１０個のプローブは、各々２５塩基の長さであることが想定される)。各プローブは、蛍光レポーター手段(マイクロビーズ、量子ドット、高蛍光タグ、連続的標識用のビオチンなど)を含む。ＳＮＰを実際にコードするプローブは、非ＳＮＰ標的分子上の結合に比較したとき、計測できる及び予測できる結合偏差(融解温度など)を示す。理論的に、高い厳密度の条件下においてプローブ-標的分子の融解又は結合の間における変則的な蛍光強度の変化によりＳＮＰを同定することができる。慣用的に、核酸計数(ＮＡＣ)検出器は、デジタル分子検出と一致する比較的低いシグナル対ノイズ比で稼動し、そして上の例で記載される蛍光強度の１０分の１の偏差を信頼性を有して検出することができない。少数のプローブ(例えば１０よりはむしろ３)は、ＳＮＰ検出について蛍光強度の差を大きい物にするが、ＮＳＢのため擬陽性を潜在的に増大させてしまう。

【０１４６】

複数のプローブ結合が、特異的かつ明らかに低いシグナル対ノイズ比で検出されるなら、利点がある。例えば、蛍光共鳴エネルギー転移(ＦＲＥＴ)は、広く使用される。ここで

、小さい領域内の複数の結合は、固有の波長放出により検出される。類似のシステムであるが、ＮＡＣ検出(高感度、固有多プローブ痕跡(unique multiprobe signature)など)に対する影響を受けやすい性質は、分子増幅をすることなくＳＮＰ同定を可能にしうる。

【０１４７】

ＰＲＡ検出は、光学散乱パラメーターに独自に基いた多数(２,３,４など)のＰＲＰｓのアッセンブリを区別することができる。例えば５-プローブ・システムは、ＳＮＰ検出に使用されうる。一の態様では、該プローブは、センター(＃３)プローブの下のＳＮＰ位置と近接するように設計されうる。この場合では、ＳＮＰがない場合、予測された融解を行なう５ＰＲＰのアッセンブリ、及び問題のＳＮＰを含む核酸についての２ＰＲＰの２個のアッセンブリへと融解する５ＰＲＰのアッセンブリは、予期される。融解の間における＃３プローブの欠失は、主要分散波長の遠赤外(１×５～４０ｎｍ金ＰＲＰアッセンブリ)から黄色(２×２～４０ｎｍ金ＰＲＰアッセンブリ)への偏移をもたらす。別のスキームは可能であり、球状のＰＲＰ直径、材質、及びＰＲＰアッセンブリ・パラメーターに左右される。さらに、かなり小さい金粒子で開始する溶液中でＰＲＰを「成長」するために、銀の増強が使用されうるということがよく知られている。一の態様では、これらの小さい金粒子(直径２ｎｍ未満)は、アノポア膜上のＮＳＢを少なくすると証明されうる。小さな金核に基く銀によるＰＲＡの増強は、より多くの棒状構造及び固有の検出をもたらす。

【０１４８】

ｉｉ．検出

標的被分析物が局在された時点で、被分析物は次に、検出システムにより検出されうる。一の態様では、局在された被分析物は標識される。検出技術に左右されて、被分析物は、局在の前又は後に標識されうる。一の態様では、当該技術分野に周知であるように、アナログタイプ検出スキームが使用されうる。ここで、標識された被分析物の各々は、検出のため十分な強度を必要とする総量のシグナルに寄与する。別の態様では、デジタル分子計数(ＭＣ)又はデジタル核酸計数(ＮＡＣ)検出システムは、蛍光の有無について、アッセイ標的表面上の分子サイズ領域を調べるために使用されうる。

【０１４９】

局在された被分析物のデジタル検出は、高感度検出器、例えば高感度、高空間分解能蛍光検出器であって、微小孔物質の表面の小領域(例えば、約１～１０ミクロン^{2}の領域)を、標識された被分析物由来の蛍光シグナルの有無について調べる検出器を用いて達成されうる。実質的に０又は１の標識被分析物のみが、調査領域内に存在するようにするため、調査領域は十分小さく、かつ局在された被分析物表面濃度は十分低い。検出されたシグナルが、規定の又は動的に計算された閾値であって、標識された標的被分析物とバックグラウンド・シグナル由来の蛍光の相対規模により測定される閾値を超えるときに、被分析物は計数されたとみなされる。

【０１５０】

別の態様では、被分析物の検出は、非限定的に蛍光、リン光、化学発光、生物発光、ラマン分光法、光学的散乱分散、プラスモン共鳴粒子(ＰＲＰ)分析などを含む別の技術、並びに一般的に当業者に知られる別の技術を用いて達成されうる。

【０１５１】

デジタル核酸検出の場合、以下の核酸検出の要件の幾つか又は全ては、使用される検出システムの類型に依存されて合わされるべきである。

１．約１～１０ミクロン^{2}の面積の調査領域からの蛍光を明確に単離する。

２．使用される蛍光標識システムに一致させて、調査領域から蛍光発光を高効率及び高感度で計測する。

３．一秒あたり約５,０００～５００,０００の別個の調査領域を計測する。

４．計測の間、焦点を標的表面上に維持する。

５．バックグラウンド差分について強度-位置の関係を維持(画像形成)する。

【０１５２】

本明細書中で使用されうる適切な検出装置の例は、非限定的に、高速走査共焦点上面蛍

光光度計、高感度蛍光共焦点顕微鏡、電荷結合素子(ＣＣＤ)アレイ、例えばＣＣＤアレイに基いた蛍光顕微鏡、画像増幅カメラなどを含む。高速走査共焦点上面蛍光光度計は、各核酸上のわずかな蛍光標識を検出することができる。前に議論されたいくつかの標識スキーム(例えば蛍光マイクロビーズ、核酸色素、酵素、量子ドットなど)は、十分に大きいシグナルを作り出し、そして洗練されていない装備で検出可能であった。

【０１５３】

超高感度光学検出においての近年の進歩は、単一の蛍光分子を同定する能力をもたらし、それにより表面に局在される単一分子の数値計数が可能になる。一の態様では、微小孔物質の表面付近に局在される標識された被分析物は、光学検出により検出されうる。光学検出は一般的に、約２００ｎｍ～約２０,０００ｎｍの範囲の波長における電磁気的放射を使用する検出方法を含む。一の態様では、例えば超高感度ウイルス量アッセイにおいて見られる超低濃度の核酸検出について、本明細書中に記載された方法のいずれかにおいて、分子増幅を行わない核酸濃度の直接的決定用に、光学検出は使用されうる。

【０１５４】

一の態様では、上で記載される連続的蛍光染色法は、局在された核酸を標識するために使用され、そして２個の色素(Ａ及びＢ)は同じであり、光学表面は２回計測され、一回は、最初の染色の後であり、そしてもう一回は、相補性特異的結合性オリゴヌクレオチド・プローブ添加の後にであった。一の態様では、この場合に使用される検出器は、画像検出器例えば、共焦点顕微鏡、ＣＣＤカメラなどである。これらそれぞれの計測から得られた画像は、単純に引き算されて、真の標的核酸計数を与える。これは、最初の染色の間、真の標的核酸が、部分的に染色される場合であってもいえることである。

【０１５５】

このタイプの技術の例は、ピコグリーン色素を使用するＨＩＶウイルス量核酸検出アッセイである。この色素は、二重鎖ＤＮＡ又はＤＮＡ-ＲＮＡハイブリッドを選択的に染色することが知られている。一本鎖ＨＩＶ・ＲＮＡを含む患者サンプル中の核酸は、アノポア膜などの微小孔物質の表面付近に局在化される。ピコグリーン溶液を加え、そしてＨＩＶ・ＲＮＡの自己ハイブリダイゼーション領域(ヘアピンなど)を含む全ての局在された二重鎖核酸を蛍光染色した。膜フィルターは、蛍光的に画像化されて、バックグラウンドの画像計測を与えた。ＨＩＶ・ＲＮＡに相補的なオリゴヌクレオチド・プローブを加え、そして一本鎖ＨＩＶ・ＲＮＡに特異的にハイブリダイゼーションすることを可能にした。ピコグリーン溶液を再び加え(又は単純に第一回目の染色及びハイブリダイゼーションステップで取り除かない)、そして膜フィルターを再び画像化した。前に撮ったバックグラウンドの画像を、二回目の画像から引き算して、差分画像を作り出した。差分画像は、相補的オリゴヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイゼーションされたＨＩＶ・ＲＮＡ領域を表す。標的ＨＩＶ・ＲＮＡは、次に差分画像上の蛍光スポット又はピクセルとして検出される。

【０１５６】

上記の例において、色素Ａ及びＢがスペクトル的に独立した物であるなら、色素Ｂの計測のみが必要とされる。色素Ａは非蛍光であり、その結果色素Ａは、蛍光色素Ｂの非標的核酸結合部位を単純にブロックする。この場合、蛍光イメージは、引き算される必要がないので、非画像検出器は、核酸検出に使用されうる。

【０１５７】

ａ．走査共焦点上面蛍光光度計

分子計数において使用するための適切なスキャン検出システムの１の態様は、図８に模式的に示される。該検出システムは、一般的に８００と名付けられており、光線デリバリー及びコレクション・モジュール８０４と光路で繋がっているレーザー光源８０２を含み、該コレクション・モジュール８０４は、計測されるサンプルにレーザー光を向けるため及び蛍光を収集するための様々な光学要素含みうる。図８において示されるように、デリバリー及びコレクションモジュール８０４の光学要素は、コリメータレンズ８０６を含み、蛍光ビーム・スプリッタ８０８、偏向ビーム・スプリッタ８１０、４分の１波長板８１

２、ダイナミック・フォーカス対物レンズ８１３、及び焦点検出器８１４を含む。該焦点検出器８１４は、焦点レンズ８１５、円柱レンズ８１６、及び４分割フォトダイオード検出器８１７を含む。これらの光学要素と光源８０２からのレーザー・ビームとの相互作用は、以下にさらに詳細に記載される。デリバリー及びコレクション・モジュール８０４は、検出器モジュール８１８と光路で繋がっており、該検出器モジュール８１８は、干渉フィルター８２０、第一焦点レンズ８２２、空間フィルター８２４、第二焦点レンズ８２６、及び光子計数アバランシェ・フォトダイオード(ＡＰＤ)８２８を含む。

【０１５８】

検出システム８００を作動する間、レーザービーム８３０、例えば直線偏向連続波(ｃｗ)レーザービームは、事前に選択された直径、例えば最大直径６ｍｍにまで拡大されそして平行にされた。該レーザー・ビームは、蛍光ビーム・スプリッタ８０８、偏向ビーム・スプリッタ８１０、４分の１波長板８１２を横切り、そしてダイナミック・フィーカス対物レンズ８１３により、サンプルコンテナ８３２の内部表面上に焦点を合わせられる。蛍光ビームスプリッター８０８は、レーザービーム８３０を伝達し、そして光の全ての異なるの波長を反射する。蛍光ビーム・スプリッタ８０８は、約１５度の入射角などの角度で配置されて、偏向の影響を最小限にし、そしてシグナル対ノイズ比を改善する。偏向ビーム・スプリッタ８１０は、４分の１波長板８１２と繋がっており、従来の光アイソレーターを形成する。直線偏向レーザー光は、偏向ビーム・スプリッタ８１０を横切り、そして４分の１波長プレート８１２により環偏向へと変換される。該光の正反射は、環偏向の方向を逆(右方を左方環偏向に)にする。該逆方偏向は、四分の一波長板８１２を介して元に戻される際に、直線偏向へと変換される。該戻された光は、元のレーザービームに対し直角の直線偏向であり、そして偏向ビームスプリッタ８１０を介して９０度反射されて、検出器８１４に焦点を合わせる。

【０１５９】

ダイナミック・フォーカス対物レンズ８１３は、レーザービーム及び蛍光検出器の焦点を、スキャンの間標的表面上に維持する。スキャンは、コンテナ又は検出器をコンテナの中心線に沿って動かす間、サンプルコンテナ８３２(例えば、使い捨てポリスチレン培養チューブ、無機光学膜フィルター)を回転することにより達成される。代わりのスキャン・スキームは、スキャンミラー(図示せず)を、４分の１波長板８１２と対物レンズ８１３との間に使用して、直角方向においてスキャンする。対物レンズの開口数(ＮＡ)は、約０.６に制限されて、自動焦点システムが作動するための十分な焦点深度を許容し、並びに対物レンズ８１３とサンプルコンテナ８３２との間の使い勝手の良い作業距離を許容する。

【０１６０】

対物レンズ８１３をリニアモーター(音声コイル)内に配置し、そしてスキャンの間サンプルコンテナ８３２の内部表面上に焦点を維持するように、焦点システムを閉ループ制御の下で、サンプルコンテナ８３２の方向へ又はから離れる方向へ平行移動した。光学設計の当業者によく知られているように、光の反射は、異なる屈折率を有する二つの透明な物質の間の境界面で生じる。例えば、ガラスから水に対する境界面からの反射は約０.５％であり、一方、ガラスから空気に対する境界面からの反射は、約４％である。検出システム８００は、乾燥表面(境界面)上か、又は固体と液体との間で形成される境界面上に動的に焦点を合わせるように設定されうる。従って、コンテナ-液体境界面からの弱い反射レーザー光(約０.５％)が、焦点検出器の８１４の円筒状レンズ８１６を通過し、そしてフォトダイオード検出器８１７へと照射される。対物レンズ８１３が、コンテナ-液体境界面に焦点をあてるとき、円形状のスポットが焦点検出器８１４上に作られるように該光学系はなっている。理想的な焦点位置からの差分は、環状スポットの伸張(elongation)をもたらす。該伸張は、フォトダイオード検出器８１７により計測され、そして対物レンズ８１３の焦点制御についてのフィードバック・ループにおけるエラーシグナルとして使用される。

【０１６１】

サンプルコンテナ８３２の内部表面からの蛍光は、レーザー励起のリターンパスに沿って通り、蛍光ビーム・スプリッター８０８により反射される。この位置では、最も正反射された励起光は、偏向ビームスプリッタ８１０により蛍光シグナルから取り除かれる。蛍光偏向に左右されて、幾つかの蛍光シグナルも失われうる。代わりの配置では、蛍光ビームスプリッター８０８は、４分の１波長板８１２と対物レンズ８１３との間に配置されうる。この代わりの配置において、蛍光シグナルは最も強くなるが、さらなる反射励起光を有するだろう。図８において示されるように、蛍光ビームスプリッタ８０８から反射された蛍光ビーム８４０は、干渉フィルター８２０を通過する。該フィルターは、かなり高効率であり、多孔性の干渉フィルターでありうる。蛍光ビーム８４０は、レンズ８２２により空間(spatial)フィルター上へと焦点を合わせられる。空間フィルター８２４は、コンテナ-液体表面の像平面に位置し、そして他の領域由来の光を排除することにより、空間分解能及びシグナル-対-ノイズ比を改良する。空間フィルター８２４を通過する光は、レンズ８２６により、光子計数アバランシェ・フォトダイオード８２８の小領域上に焦点を合わせられる。活性のあるフォトダイオード領域及び大画面表示に依存して、該空間フィルター・システムは、蛍光を小領域のフォトダイオード上に直接焦点を合わせることにより単純化されうる。当業者に周知であるように、画像は、シグナル強度対スキャン位置を追跡することにより構築されうる。そうした画像は、コンピューターのモニターなどの出力ディスプレー上に可視的に表示されうるか、又はさらにコンピューターにより分析されて、検出された核酸を数え上げる。検出システム８００は、多くの異なる構成、例えば、フィルター膜、フローセル、多穴プレートなどを伴って使用するように設計されうる。

【０１６２】

ｂ．　暗視野蛍光光度計に基くカメラ

本明細書中に記載される分子計数法において使用されうる別の適切な検出システムは、模式的に図９において示される。該検出システムは、一般的に９００と名付けられ、微小孔物質上に局在される核酸を検出するために特に適している。該検出システム９００は、励起フィルター９５０を含む光源９０２を含み、これは、検出器モジュール９０４、例えば電荷結合素子(ＣＣＤ)カメラと光路で繋がっている。該検出器モジュール９０４は、標識された核酸蛍光を単離するため、１以上の干渉フィルター９０６を含む。検出器モジュール９０４はフラット・フィールド(flat field)対物レンズ９０８、例えば約０.１～約０.３のＮＡを有して、約５ミクロン～約１５ミクロンの焦点深度をもたらすレンズを有しうる。この大きな焦点深度は、サンプルフィルター膜の位置の自由度を許容する。或いは、高ＮＡの対物レンズは、さらなるシグナルを集めるために使用されうるが、焦点深度を小さくしてしまう。検出器モジュールはまた、検出レンズ９１０、及びＣＣＤアレイ９１２、例えば数秒間～数分間の照射用の冷却型高量子効率裏面入射型ＣＣＤ検出器を含む。別のレンズ及び光ファイバー照射(fiber optic illumination)を介したものを含む別の光学デザインもまた、代わりの態様において使用されうる。

【０１６３】

検出システム９００の作動の間、照射ビーム９２０は、局在された核酸を有する微小孔物質９３０の表面に向けられる。照射ビーム９００は、蛍光標識された被分析物が蛍光を発することを引き起こす。局在された被分析物は、多くの蛍光マイクロビーズで標識されたとしても、かなり小さい対象である。各々標識された被分析物は、蛍光ビーム９４０から典型的にＣＣＤアレイ９１２上の単一の明ピクセルを発する。検出システム９００は、１０００×１０００ＣＣＤアレイで、直径３ｍｍの標的表面について設計されるとすると、各ピクセルは、膜フィルター上の約３×３ミクロンの領域を表す。検出器システム９００は、前部で記載された図８の走査共焦点システムとは異なって、分析上まとまった照射部及び検出部になるよう設計されうる。これにより、ピクセル・シグナル強度とピクセルあたりの蛍光核酸濃度との相関が許容されるべきである。従って、密集した被分析物(同じピクセル内)は、ピクセル強度における段階関数により分解されて、検出器が計数するダイナミックレンジを改良する。ＣＣＤアレイにより作られる画像は、コンピューターモニターなどの出力ディスプレー上に視覚的に表示さうるし、又は検出された被分析物を計

数するために、コンピューターによりさらに分析される。

【０１６４】

ｃ．暗視野分光計によるスキャン

一の態様では、プラスモン共鳴アッセンブリ(ＭＣ-ＰＲＡ)検出に基く分子計数に適した検出器を、図１０に示し、そして一般的に１０００と名付ける。これは、暗視野、共焦点スキャン分光法として最適に特徴付けられる。分子計数用に前部で記載された蛍光に基くシステムとは異なって、この検出器は、十分な光のレベルで作動し、そして高い感度の検出を必要としない。

【０１６５】

照射は、白色光源由来であるべきであり、そして直接の反射が検出器により検出されないように配置されるべきである。これは、微小孔物質を、高強度の小型のアーク灯を検出対象の全集束角より大きい角度で微小孔物質を照らすための適切な光学系と伴に使用することによって典型的に達成される。これは、慣用の暗視野顕微鏡照射装置又は暗視野金属顕微鏡本体と関連のハードウェアを用いて行われうる。小型アーク灯１００１は、広範な(多波長の)光であって、コンデンサーレンズ１００２により平行化された光を放出する。この光は目隠し円盤(obscuration disc)１００３に衝突し、輪状の放射ビーム１００４を形成する。照射光の輪状のビームは、検出された光が通り抜けるための中央穴を含む鏡１００５により反射される。輪状の照射光は、微小孔物質１０１０上に局在された適切な標識１００９を含む核酸に照射されるために、対物レンズ１００７の最大光集束角より大きい角度で、輪状のレフレクター(１００６)により反射される。このようにして、例えば微小孔物質由来の第一表面反射から鏡面反射された照射光は、集束光学系に入ることができない。光学シグナルは、対物レンズ１００７により集束され、比較的第一表面反射がなく、そして鏡１００５の穴を通過し、そしてレンズ１０１２により共焦点ピンホール１０１３上の結像される。共焦点ピンホール１０１３は、偽(sprious)散乱光などを低減する点で役に立つ。ピンホールを通過した光は、凹面光子１０１４に向けられ、ここで光は個々の波長１０１５へと分散され、そしてフォトダイオード・アレイ１０１６により検出される。このアレイは、ＰＲＡ標識された核酸からの散乱シグナル中に存在する複数の波長を同時に検出する。前部に論じたように、これらの散乱波長の強度は、局在された核酸の標識パラメーターを測定するために使用されうる。この例では、スキャンは、１０１７により表される静止検出器の下で膜アッセンブリを動かすことにより、或いは膜アッセンブリを静止させている間に検出器アッセンブリを動かすことにより達成されうる。

【０１６６】

ＰＲＡからの散乱光は、微小孔物質の表面付近のかなり小さい領域内から生じる。外部散乱が検出器に達することを制限するために、高開口数の対物レンズ及び共焦点ジオメトリーを使用することは有利である。

【０１６７】

ＭＣ-ＰＲＡ検出器は、複数の波長を同時に検出するべきである。図１０は、これの一の実施態様を図示する。該検出は、共焦点を通過した散乱光を直線アレイ光検出器上に分散するために、光学格子を使用することによって達成される。光レベルは十分高いので、高価な光子計数及び冷却型ＣＣＤシステムではなくて、慣用のフォトダイオード検出器の使用を可能にする。

【０１６８】

ｄ.融解曲線分析

被分析物が核酸である場合、融解曲線分析(ＭＣＡ)は、核酸ハイブリダイゼーションの可逆的な性質に基いた技術である。二本鎖の核酸、並びに広範な二次構造(自己ハイブリダイゼーション)を有する一本鎖の核酸は、温度及び溶媒組成のよく規定された条件下で単純な一本鎖構造へと戻される。この過程は、融解と呼ばれている。多くの核酸染色は、二本鎖核酸断片に結合されたとき蛍光の大幅な増大を示し、そしてこれらの二本鎖断片が融解すると、蛍光を失う。融解曲線は、一般的に、蛍光染色された核酸の蛍光対温度のプロットである。曲線の形は、融解核酸の構造についての情報を含み、そして、低い分解能

ではあるが、核酸同定の特異的指標として使用されうる。この技術は、リアルタイムＰＣＲ分析及び分子生物学において広く使用される。

【０１６９】

一の態様では、ＭＣＡは、少ない異なる核酸の混合体において、標的核酸を区別するために使用されうる。一の態様では、膜フィルター温度又は核酸融解を引き起こす別の因子を制御及び変化させるために改変されたＭＣ検出システムを伴って、核酸局在化及び標識を上で記載されるように行った。これは、微小孔物質を流れる液体の温度を制御することにより、全体の使い捨ての溶媒組成物などの温度を制御することにより、達成されうる。核酸計数融解曲線分析(ＮＡＣ-ＭＣＡ)は、幾つかの微小孔物質の温度でＮＡＣ計測することにより、そして標的核酸の既知の性質に蛍光変化対温度を相関することにより行われる。

【０１７０】

例えば、標的核酸は、８０℃の融点を有しうる。検出装置は、約７５℃～約８５℃まで０.５℃単位で、ＮＡＣ計測を行うためにセットされた。標的核酸は、融解温度に達すると、特異的蛍光の減少を引き起こす。非標的核酸は、多くが異なる温度で融解するようである。検出装置は、前以って規定された範囲で溶解する核酸を計数するためだけに設定される。限られた数の混じりこんだ非標的核酸を含む適用では、この付加された特異性は、相補的プローブ、染色などの開発における面倒な事態を削ることができる。大規模な二次構造を有する一本鎖ＲＮＡ(例えばＨＩＶ、ＨＣＶ、エンテロウイルスなど)は、予測された固有の温度で融解する染色二次構造でＮＡＣ-ＭＣＡにより分析されうる。さらに、複数の相補核酸に結合するプローブは、特異的標的核酸、例えばＨＩＶ用に設計され、これらは全て一定の温度で融解する。この場合、複数のプローブにハイブリダイゼーションし、そして適切な核酸色素で染色された局在化ＨＩＶは、特異的プローブ設計に固有の決められた温度で融解する。

【０１７１】

特定の状況では、局在された核酸の形態学は、ＳＮＲ検出を改良するために使用されうる。前部で論じたように、核酸は、並外れた高い縦横比を有する分子である。多くの標的核酸は、明確に同定できる形態で局在化される。図１１は、ニッケル・ホウ素アノポア膜に局在化され、サイバー・ゴールド色素で染色し、そして実施例１２に従って図９において示される検出器を用いて、画像化されたヒト・ゲノムＤＮＡを示す。棒状のＤＮＡが明らかに見られる。この場合、ＤＮＡのピクセルの明るさは、周りのバックグラウンドのピクセルよりは明るいが、ＤＮＡは、先ず形により同定される。イメージ分析技術は、特定の形を同定を助けるため、重なり領域を補正するため、画質を改良するためなどに利用でき、そして計数の正確さを改善する。特定の核酸及び染色技術は、光学的に同定できる構造であって、小型の検出領域内に容易に適合しない構造もたらし、実質的な画像の重なりが存在し、そしてそうでなければ個々の核酸を同定するための画像分析技術を必要とする。これらの技術は、広く使用され、そして当業者に周知である。

iii. 計数

比較的純粋な被分析物を微小孔物質の表面付近に固定化することであって、本明細書中に記載される技術により達成される固定化は、被分析物の計数に関して重要な変量である。「計数」という用語は、本明細書中で、微小孔物質の特定の領域で、微小孔物質の表面付近に局在された個々の被分析粒子の数を測定することとして定義される。比較的大きく、多標識された被分析物についてでさえ、単一分子の計数は、特別な検出能力を必要とする。結果として、単一分子計数は、競合又は相互作用物質がないかなり精製された非分析物を固定化することを必要とする。以下の原理は、本明細書中で記載される技術により達成される表面固定化が、どれだけ分子計数を高めるかを示す。

【０１７２】

光学系では、装置の光収集能力は、焦点の深度に比例するということが数学的に示される。つまり、１ミクロンの深度領域に局在された蛍光粒子を調べるために最適化された装置内で検出されるシグナルは、１００ミクロンの深度領域に局在された同じ蛍光粒子を調

べる装置であって同等に最適化された装置内で検出されるシグナルよりも１００倍大きくなるだろう。焦点装置の１ミクロンの深度は、１００ミクロンの深度領域を段階的に調べるために使用されうるが、１００倍の時間がかかる。

【０１７３】

光学分子計数は、光学的に調べるために並外れて小さい体積を単離することを必要とする。被分析物を計数するための最も直接的なアプローチは、標的分子の有無についてかなり小さい検出体積について調べることである。検出体積が大きくなれば、分子の解像度が失われ、検出体積中の非特異的源由来のバックグラウンドシグナルが大きくなり、そして標的分子の存在からもたらされる特異的シグナルは低くなり、それにより標的分子が検出体積に存在する場合を見分ける実用面での能力を低下させる。

【０１７４】

小さい検出体積は、分子解像度の増加及び光学シグナル対ノイズ比の改善をもたらし、そうした体積は又、アッセイ時間に影響する。検出体積(例えば、必要とされる解像度及びシグナル対ノイズ比の計数に基く)について考えると、必要とされる計数時間は、調べなければならない総体積に比例する。例えば、２００マイクロリットル(μｌ)の患者のサンプルは、１０の標的核酸分子のみを含みうる。１０立方ミクロンの検出体積を想定すると、２００μｌの体積は、１０の標的分子を計数するため２００億回調べなくてはならない。１０の標的分子が、直径５ミリメートルの表面に局在されるなら、該表面は、おおよそ１００万回調べなければならなない。本明細書中に開示されるように、標的分子をフィルター表面上に局在化することは、検出に基いた２００００倍効果的な濃度改良を表し、アッセイ時間の同等の節約になる。

【０１７５】

分子配置は、光学的計数の間知らされるべきである。サンプル中の検出体積を数百万回～数億回調べることは、完了するために数分かかりうる。自由に拡散する分子は、高速走査検出器により複数回計数されうるか、又は接続された電荷結合素子(ＣＣＤ)アレイ検出器で全く計数されない。こうして、標的分子の配置は、微小孔物質の表面付近に固定化されることにより最も容易に制御される。核酸計数の場合、微小孔物質は、非蛍光であり、そしてハイブリダイゼーション及び/又は蛍光染色が起こる条件下で標的核酸を固定化できることが望ましい。

【０１７６】

許容される被分析物計数アッセイでは、以下の条件が考慮されるべきである：

１．シグナル-対-ノイズ比(ＳＮＲ)：標的被分析物は、許容されるエラー割合に一致する装置のシグナル-対-ノイズ比を達成するために十分蛍光を有するべきである。核酸の場合、３より大きい、又は約３～約５０、約３～約４０、約３～約３０、約３～約２０、又は約３～約１０のＳＮＲが、明確な、低エラー割合の核酸計数に所望されるということが計算により示される。

２．アッセイ特異性：非標的被分析物は、許容されるアッセイ特異性の要件に合致して非蛍光性であるべきである。

３．ダイナミックレンジ：標的被分析物は、微小孔物質の表面付近に、解像でき、蛍光実体を分離できるものとして、局在されるべきである。つまり、各々の標的被分析物は、他の全てから個別に計測できるべきである。こうして、検出器が調べる各ピクセル又は検出領域は、１又は０の蛍光標的被分析物を含むべきであり、又はシグナル処理技術は、計数間違いを防ぐため、個々の分子の境界線を同定するために使用されうる。

【０１７７】

標的被分析物が、調べられた体積中に存在するときに検出されたシグナルと、標的被分析物が存在しない際に検出されるシグナルとの比は、シグナル-対-ノイズ比(ＳＮＲ)として定義される。検出されたシグナルは、特定の波長での強度、或いは強度、複数の波長、相、タイミングなどを含むパラメーターの複合体に単純に基きうる。必要とされるＳＮＲは、器具設計とアッセイ要件との関数である。以下の実施例１４は、共焦点上面蛍光光度計のスキャンに基く核酸計数の計算を表し、必要とされるＳＮＲの見積もり、設計された

検出領域、必要とされるスキャン時間、及びハードウェア条件を含む。

【０１７８】

被分析物が核酸である場合、核酸計数アッセイにおいて高いＳＮＲを達成するための限定因子は、非特異的なトレーサーの結合である。核酸染色であろうがオリゴに基く蛍光プローブであろうが、トレーサーは、標的核酸に結合しない微小孔物質の表面付近に存在するようである。非特異的トレーサーは、調べられたときに蛍光を発するが、該蛍光は、標的核酸として誤って計測してはいけない。

【０１７９】

例えば、局在された標的核酸が、オリゴヌクレオチドに基く蛍光プローブで標識されるとき、各々の局在された標的核酸が、検出領域において一の蛍光プローブのみとハイブリダイゼーションし、並びに相対の蛍光特性(量子収量、波長など)が特異的結合プローブと非特異的結合プローブとで同じであるなら、標的核酸は、ランダムに位置された非特異結合プローブから区別をすることができない。これは、蛍光ビーズ標識、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、多標識などを含むプローブ上の蛍光標識の程度に関わらず、いえることである。この場合では、真のＳＮＲが１０であることは、１の検出領域において標的核酸に特異的に結合する最低限１０のプローブを必要とする。但し、該プローブ非特異的結合(ＮＳＢ)は、単離された物として残り、個々の分子は、互いに集合されないという場合を想定する。

【０１８０】

上記の状況は、共通の蛍光タグで各々標識された複数のプローブを使用する検出領域の蛍光の単純強度計測に基く。各プローブが、明確に分離された蛍光タグで標識されて、分離され、同定できる検出可能なトレーサーを形成するなら、低プローブ数での高効率のＳＮＲは可能でありうる。例えば、計数アッセイに必要とされるＳＮＲは、許容される頻度の非特異事象の計数間違いに基く。単純化された場合において、これは、非特異的事象が所望の特異的事象と同一である(装置検出器により検出されるように)という確率を決定することと同様である。共通のタグ(例えば１の蛍光波長の強度計測)システムは、５個のプローブで行われる。非特異的事象が、５個が合わさったプローブと同じ強度である確率は低い。別々に同定されるタグを有する５個のプローブ(例えば、波長及び強度)に基くシステムでは、非特異的事象が同じ強度であり、そして正しい割合で必要とされる波長の全てを含むという確率はさらに低い。従って、低減されたプローブ数で高効率なＳＮＲを維持するために、より複雑な検出スキームが使用されうる。

【０１８１】

高効率のＳＮＲは、非特異結合が、それらが標的核酸に特異的に結合されたときと同じ光学応答を誘発しない技術を使用することにより、低いプローブ数で達成されうる。これらは、核酸に結合されたときに実質的な量子収量の増加を引き起こす核酸染色の使用に類似している。酵素は、表面と接触されるとき、かなりの活性を頻繁に失うことが知られている。本明細書中に開示されるように、特異的に結合されたプローブであって、酵素タグで標識されるプローブは、非特異的に結合されるプローブのように直接表面に接触するというよりはむしろ、局在された核酸の微小孔表面に渡ってにサスペンドされると考えられる。従って、酵素標識されたプローブは、少ないプローブ数で高効率のＳＮＲを表しうる。

【０１８２】

ｉｖ．被分析物濃度の相関

本明細書中で使用される「相関」という用語は、微小孔物質上で計数される被分析粒子の数に基き、そして既知の関係、例えば微小孔物質、標識効率、検出効率、視野、などについて訂正されたサンプルの既知体積中に存在する被分析物の濃度を定量することとして定義される。

【０１８３】

一の態様では、定性的核酸計数又は検出は、有利に行われうる。この態様では、元のサンプル濃度に対する検出されたシグナルの最終相関は、全然重要ではない。例えば、正確

な濃度よりはむしろ病原体の有無の同定は、診断において十分である事が多い。実施例は、非限定的に生物戦争薬剤の同定、咽頭スワブにおけるＳｔｒｅｐＡ細菌の同定、Ｓ.アレウス(Ｓ.Ａｒｅｕｓ)カルチャーにおける薬剤体制を規定するＭｅｃＡ遺伝子の同定などを含む。本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品は、迅速で、使用が簡単で、分子増幅ステップ(ＰＣＲなど)を省き、単純なハードウェアだけを必要とし、処理することなく、例えば得られた最終の結果を最初の濃度に相関することなく複数のサンプル類型の使用能力を介して定性的な分析を提供する。

【０１８４】

別の態様では、計数された核酸を、最初のサンプル核酸濃度と相関する能力は、定量的な分析に重要である。実際、固定化された核酸を計数する方法は、何年も存在してきた。

例えば、単純に比較的高濃度のサンプルをきれいな石英表面と接触することにより、核酸が石英表面に固定されうることは、当該技術分野に周知であった。核酸の幾つかは、石英に「くっつき」、そして原子間力顕微鏡(ＡＦＭ)、走査電子顕微鏡(ＳＥＭ)などにより計測されうる。一の態様では、本発明に記載される微小孔物質、方法、及び物品は、核酸が微小孔物質へ局在化される簡便さ及び速さにより、広範なサンプル類型及び微小孔物質への局在を許容する精製度により、並びに計数された核酸を最初の核酸サンプル濃度へと相関する能力により、当該技術分野に周知である技術の現状を改良する。

【０１８５】

本明細書中に記載される微小孔物質は、機械的なろ過に類似の方法を介して、被分析物の局在を許容する。該局在ステップは、特定の被分析物、例えば特定のサイズの核酸について実質的に定量的であり、計数又はＰＣＲなどの更なる処理ステップなどの検出により同定されるため、全ての標的核酸の１００％近くは物質の表面付近に局在する。このかなり高い局在効率は、かなり低い濃度の物質であって、サンプル１ミリリットルあたり、数コピーのみを有する物質の分析を可能にする。

【０１８６】

局在化の再現性はまた、相関に影響する。例えば、１００％の標的核酸が常に捕捉されそして分析に利用できる場合より確かに低い感度ではあるが、微小孔物質が常に２％の核酸を補足するなら、核酸計数と開始サンプル濃度との間の相関は確立されうる。本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品は、並外れて効率的かつ再現性のある局在を許容する。

【０１８７】

装置、ハードウェア、及び処理パラメーターは、うまくいく相関を予想されるべきである。例えば、環状ビリオンについての定量アッセイが所望されるならば、以下のパラメーターは、最終検出核酸カウントを、最初のウイルス濃度へと相関するために知られているべきである。

１．ビリオン溶解効率
２．捕捉膜を通す開始サンプル体積
３．核酸の捕捉効率
４．核酸の標識効率
５．標識核酸の検出効率
６．検出器により調べられる膜の割合
７．システムの線形性対検出されたシグナル

【０１８８】

現存している被分析物計数方法とは違って、上で記載されたパラメーターの効率と再現性を介してされる、最終被分析物カウントと最初のサンプル体積との相関はかなり改良された。図１２ａ～１２ｈは、ＹＯＹＯ１標識されたウシ胸腺ＤＮＡの処理された反転画像であって、実施例１３に従って光学的に検出された画像を示す。ろ過された試験サンプル中における相対ＤＮＡ濃度は、図１２ａの１～図１２ｈの１２８まで増加された。図１２ａ～１２ｈに見られるように、個々の核酸は、高感度診断アッセイに関心のある範囲内で容易に計数されうる。

【０１８９】
図１３は、未相関核酸カウント対核酸濃度のグラフであり、計数されたＹＯＹＯ１で標識されたウシ胸腺ＤＮＡであって、１００μｌの開始サンプル体積からアノポア膜表面へ局在されたものの曲線を示す。処理された画像に対応する該曲線カウント値は、図１２ａ-１２ｈに示される。図１３のグラフは、本明細書中に記載される技術を使用する未相関ＮＡＣアッセイ較正曲線の例である。
【０１９０】
図１４は、図１３由来の核酸濃度に関して訂正された核酸カウント(つまり、画像由来の訂正されたサンプル濃度対真の相関サンプル濃度)を示し、そして検出器及び固定化効率について訂正されたグラフである。
【０１９１】
Ｄ.物品及びキット
微小孔物質のいずれかは、ろ過装置の一部でありうる。本明細書中で名付けられる「ろ過装置」という用語は、本明細書中で記載される微小孔物質の少なくとも１を含む装置のいずれかとして定義される。
【０１９２】
一の態様では、ろ過装置は、図１５ａに記載される。ろ過アッセンブリ１５３０は、被分析物を含む試験サンプル１５３３を保持するためのウェル１５３２を含む。１のウェルのみが図１５ａにおいて示される一方、フィルター・プレート１５３４の一部である複数のウェルが使用され、該プレートは、多ウェルの形式、例えば９６又は３８４ウェルのフィルター・プレートを有することもあるということは理解されるべきである。ウェル１５３２の底開口部１５３８は、被分析物の局在化のため微小孔物質１５４０で覆われている。一の態様では、０.２ミクロンのアノポア膜フィルターは、ウェル１５３２の底部に熱融合されうる。底開口部１５３８は、約５～１０ｐｓｉの差を与えて、試験サンプル１５３３を分析フィルター１５４０を介してろ過することを手助けする吸引源(図示せず)へと繋がっている。さらに、分析フィルター１５４０は、被分析物の光学分子検出用に構成される。例えば、分析フィルター１５４０は、ウェル１５３２の底部分に取り外し可能な状態で付着されて、光学検出システムにおける使用のため、フィルター１５４０を取り出すことを可能にした。さらに、フィルター・アッセンブリ１５３０は、適切な検出器と繋がれて、取り外すことなく分析フィルター１５４０上で光学分子検出を可能にするように設計されることもある。
【０１９３】
別の態様では、図１５ｂは、別の実施態様に従った前ろ過を伴い、フィルターアッセンブリ１５３０を使用するフィルターシステムの模式的記載である。図１５ｂにおいて図示されるように、フィルターアッセンブリ１５３０は、シリンジ型のフィルター(図示)又はフィルタープレート(固定又は取り外し可能、示さず)などの前ろ過装置１５３５と接続されて使用されうる。前ろ過装置１５３５は、液体中の被分析物を含む粒子が、第一フィルターを通過することを許容する一方、プレフィルター１５３６中の微小孔より大きい汚染物又は不純物を保持するために構成されるプレフィルター１５３６を含む。一の態様では、被分析物が核酸であるとき、該核酸は、ビリオン、細菌、胞子などを含みうる。プレフィルター１５３６は、膜フィルターなどの表面フィルターでありうるか、又はプレフィルター１５３６は、デプス型フィルター(depth filter)でありうる。
【０１９４】
使用の間、試験サンプル１５３３は、プレフィルター１５３６を通してウェル１５３２へとろ過される。更なる試薬、例えばビリオン溶解試薬、色素、緩衝液などは、ウェル１５３２中のろ過された試験サンプルに加えられうる。ろ過された試験サンプルは、インキュベーションされ、そして次に分析フィルター１５４０を介してろ過されて、核酸捕捉及び局在化をもたらされた。
【０１９５】
一の態様では、フィルターアッセンブリ１５３０は、例えばＨＩＶ、Ｃ型肝炎、又は別

の感染性疾患についての試験などの迅速ウイルス量アッセイである。この態様では、感染性のビリオン粒子のみが計数されるべきである。つまり、多くのウイルス様粒子は、核酸を含まず、そして感染性がない。同様に、遊離して循環しているウイルス核酸(封入されていない)もまた感染性がない。図１５ｂにおいて示されるろ過システムを使用する際に、無傷の未溶解ビリオンは、プレフィルター１５３６を通過し、一方巨大な不純物及び遊離の核酸が保持される。ウェル１５３２中のろ液ビリオンは、分析フィルター１５４０上に捕捉するため核酸を放出するように処理され、一方タンパク質、ウイルスカプセルの破片、別の小さい不純物などは、フィルター１５４０を通過する。分析フィルター１５４０上に捕捉される唯一の核酸は、無傷のビリオン中に含まれていた核酸である。こうして、感染性のあるビリオンのみが計数される。

【０１９６】

例えば、ＨＩＶウイルス量分析は、統計的に意味ある十分な核酸を捕捉するため、約２００μｌの患者サンプルを必要とする高感度アッセイの一部として、フィルターアッセンブリ１５３０を用いて行われることもある。そうしたサンプルを獲得するため、２００μｌのヒト血漿サンプルは、図１５ｂに示されるように、大きな不純物及び遊離の核酸を取り除くために、プレフィルター１５３６を使用して前ろ過される。無傷のＨＩＶビリオンは、直径約０.１ミクロンであることが知られており、０.２ミクロンのプレフィルターを通過する。前ろ過されたサンプルは、次にウェル１５３２中で処理されて、ビリオンを溶解し、ウイルスＲＮＡを放出し、そして該ウイルスＲＮＡは、開示された方法に従って次に分析フィルター１５４０上に捕捉される。或いは、前ろ過されたサンプルは、滅菌されたきれいな容器中にいれられ、そして次に溶解試薬などを伴って、正確にウェル１５３２中にピペットで移された。フィルター１５４０の表面上に局在されたウイルスＲＮＡはつぎに、光学的分子計数又は慣用のＰＣＲ型分析などの分析にかけられる。

【０１９７】

一の態様では、ろ過装置は内部と外部を有するウェル本体から構成される。ここで該ウェル本体は、内部壁と外部壁を有し、そして(ｂ)複合体及び本明細書中に記載される改変型微小孔物質を含む微小孔物質のいずれかから構成されるフィルター、ここで該フィルターは、ウェル本体の内部壁に付着される。一の態様では、フィルターは接着剤を伴ってウェル本体の内部表面に取り付けられる。別の態様では、該フィルターはフィルター・ホルダーの使用によりウェル本体の内部表面に取り付けられる。一の態様では、ウェル本体は、化学的に不活性である物質、及びウェル本体の外形又は構造を変えることなく、熱にかけられる物質のいずれかから構成される。一の態様では、ウェル本体はポリプロピレンなどのプラスチックから構成される。

【０１９８】

被分析物を含むサンプルが、フィルターと連絡されたウェル本体の内部を通過すると、被分析物は、微小孔物質の表面付近に局在され、そして残りの溶液は、フィルターを通過し、そして出口から排出され、局在された被分析物は、さらに操作されうる。一の態様では、ウェル本体の入口及び出口は、キャップ又はシールをつけることができる。例えば、入口及び/又は出口は、ねじ式のキャップを取り付けられるため、ねじ山をつけられうる。あるいは、入口及び/又は出口は、キャップが入口又は出口上にスナップ式で取り付けられるエッジ又は外形を含みうる。一の態様では、キャップ又はシールは、ウェル本体を構成する物質のいずれかでありうる。

【０１９９】

上で記載さえれるろ過装置の幾つかの態様は、図１６に図示される。一の態様では、図１６ａは、一般的に１６５０と名付けられるフィルターアッセンブリであって、市販のサーマルサイクラー１６７０内に適合するように設計されたフィルターアッセンブリを図示する。該ろ過装置は、ウェル本体１６５１、フィルター・ホルダー１６５２、及び出口キャップ１６５３から構成される。分析フィルター１６５４は、熱融合又は別の手段によりフィルターホルダー１６５２に取り付けられて、操作の間サンプル１６５５が分析フィルター１６５４を介してろ過されることを保証する。アッセンブリの間、取り付けられた分

析フィルター１６５４を含むフィルターホルダーは、ウェル本体１６５１内に配置され、そして一般的に１６５６として示される先端の表面の間の機械的な相互作用により保護される。或いは、これらの表面は、接着接合され、又はそうでなければ、漏れがない様式で貼られる。取り付けられた分析フィルター１６５４上に過度の圧力を与えないために、ウェル本体１６５１とフィルターホルダー１６５２との間の隙間１６５７が許容されるが、サンプルの汚染及び持ち越しを妨げるために最小限にされなければならない。使用される間、図１６ｂに示されるように、サンプル１６５５は、フィルターアッセンブリ１６５０と内に配置され、そして出口キャップ１６５３は、取り付けられていない。穏やかな吸引１６６６、圧力、又は遠心力が使用されて、分析フィルター１６５４を通したサンプル１６５５の液流に作用する。ろ液１６５８は、フィルターアッセンブリ１６５０から流れて、出口１６６０から排出(図示せず)され、一方核酸１６５９は、さらなる処理のため、分析フィルター１６５４上に保持される。

【０２００】

局在された被分析物１６５９及び分析フィルター１６５４は、洗浄され、又はそうでなければ、ＮＳＢ、持ち越しなどの効果を最小限にするためにこの点で処理される。比較的乾燥したフィルター・アッセンブリ１６５０であって、分析フィルター１６５４上に被分析物１６５９を含むアッセンブリの出口１６６０は、出口キャップ１６５３で蓋をされて(図１６ａ)、さらなる処理の間におけるアッセンブリからの液流を妨げる。出口１６６０に対する液体シールは、出口１６６０上に存在する１６６１として一般的に示される先端表面と、出口キャップ１６５３との間の機械的な相互作用により影響される。当業者に知られている出口１６６０をシールする別の方法は、例えばバルブ、プラグなどについても考慮される。

【０２０１】

図１６ｃは、さらなる処理用に構成されたフィルターアッセンブリ１６５０を示す。例えば、反応試薬１６６２、例えばＰＣＲマスター・ミックス又は核酸標識用のハイブリダイゼーション試薬は加えられ、そして分析フィルター１６５４上で核酸１６５９と接触される。キャップ１６６３は、フィルターアッセンブリ１６５０のトップ開口部１６６４をシールするために加えられる。或いは、トップ開口部１６６４は、当業者に知られているフィルムでシールされうる。この構成では、該アッセンブリは、慣用のＰＣＲ、ＲＴ-ＰＣＲ、ハイブリダイゼーションなどに必要とされる熱サイクル又は別の処理、分析処理にかけられうる。さらに、この実施態様は、分子計数などの別の検出スキームに有用でありうる。この場合、ウェル本体１６５１は、特定の検出器光学設計を収容するためには短いかもしれない。しかしながら、全ての場合において、処理の間、開口部に可逆的にキャップをつけることにより、液体を膜と接触させて保持する能力は、重要である。

【０２０２】

別のフィルターアッセンブリは、図１７ａ及び１７ｂに示される。このフィルター・アッセンブリは、一般的に１７７０と名付けられ、図１６において示されたフィルター・アッセンブリについて記載されるウェル型の形よりはむしろ、サーマルサイクル用に熱を伝える平らな表面で操作されるように設計される。一の態様では、微小孔物質は、酸化アルミニウムから構成される。該酸化アルミニウムは、多くのＰＣＲサーマルサイクルにおいて見られるプラスチックのウェルの壁に比べて、優れた熱伝導性質を有する。従って、分析膜を通して熱を伝えるように設計されたフィルターアッセンブリ及びサーマルサイクラーを提供することにより、熱サイクル時間の改良が認められうる。

【０２０３】

別の態様では、２以上のウェル本体を含むろ過装置、ここで各ウェル本体は上部開口部と底部開口部を有し、そして(ｂ)本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかであって、複合体及び改変された微小孔物質を含むものから構成されるフィルターであって、ここで該フィルターが各ウェル本体の底開口部を覆うフィルターから構成される。図１７は、該実施態様の特定の態様を図示する。ウェル本体は、上記物質のいずれかから構成されうる。

【０２０４】
図１７ａは、サンプル製造の間、吸引ろ過装置１７７１に取り付けられたフィルターアッセンブリ１７７０を示す。或いは、ろ過装置のフィルターを通した液体の移動を向上させるいずれかの装置がこの実施態様において使用されうる。そうした装置の例は、非限定的に、圧力、遠心、又は流体ポンプによるろ過を含む。フィルターアッセンブリ１７７０は、３個のウェルのアッセンブリとして示されているが、一般的にどんな数のウェルをも含みうる。例えば、現在使用される多ウェルプレートは、９６又は３８４の分離されたウェルを含むことが多い。フィルターアッセンブリ１７７０は、以前に記載されるようにろ過の間、被分析物がフィルターに局在化することを可能にするように、熱シーリング又は別の手段により取り付けられた分析膜１７７２を含む。分析される溶液、この場合、全血液ライセート１７７３は、フィルターアッセンブリ１７７０のウェル中に含まれる。吸引ろ過の間、吸引シールは、吸引シーリング表面１７７５で作られる。フィルター・アッセンブリ１７７０は、対応した支持プレート１７７４であって、吸引下で該アッセンブリが変形してシーリング表面１７７５上でより均一な吸引シールをもたらすプレートと伴に示される。一の態様では、吸引により、全血液ライセート１７７３が、分析フィルター１７７２をとおしてろ過される。この態様では、全血液ライセート１７７３内に存在する核酸は微小孔物質１７７２上に局在される一方で、全血液ろ液１７７６は分析フィルター１７７２を通過し、そして最終的に廃棄部(図示せず)に達する。前の例において記載されるように、分析膜１７７２は、さらなる処理の前に洗浄されうる。

【０２０５】
図１７ｂは、ＲＴ-ＰＣＲ処理の間のフィルターアセンブリ１７７０を示す。この態様では、処理の前に、使い捨てウェルは、漏れ、汚染、及び蒸発を防ぐためにシールされうる。分析フィルター１７７２は、接着剤(粘着性フイルム)により、又は熱シールにより、薄い(１ｍｉｌ)プラスチックのシートを、膜又は膜シール１７８０と示される膜周辺のハウジングにシールされうる。この膜は、シール/ろ過膜の重ね合わせを通して熱が早く伝導することを可能にするように薄くあるべきである。一の態様では、熱伝達分析により、アノポアフィルターの熱抵抗性は、典型的なシールフィルムに比較して無視できるものであるということが示される。それにも関わらず、慣用のプラスチック・シーリング物質(ポリプロピレンフィルムなど)を使用する場合でさえ、この熱抵抗性は、光サイクルＲＴ-ＰＣＲ装置(Ｒｏｃｈｅ)において使用されるガラス製のキャピラリーより少なく、サーマルサイクラーに基くプラスチック製のウェルより数倍も少ない。ろ過膜シーリングに先立って、ぶら下がって残っているろ液の滴又は液体を取り除くために、任意の吸い取りステップは行われうる。該ステップは、使い捨てブロッティング物質を用いてうまく達成されうる。ここで、該ろ過アッセンブリ１７７０は、吸引ろ過装置１７７１から取り外され、素早く使い捨てブロッティング表面(例えばブロッティング紙)に対してブロットし、次に膜を接着剤又は熱シール膜でシールされた。

【０２０６】
この態様で、使い捨てウェルのトップ開口部は、シールされうる。さらにシーリングは、反応の光学検出を許容するように達成されるべきである。トップシールプレート１７８６は、図１７ｂにおいて、分離された成形片であって、全体として光学分析用の薄い光学窓１７８２を含む片として示される。透明な窓について灰色で示されているが、トップシールプレートは、全体窓を有する透明低蛍光物質から構成されうる。示されるように、トップシールプレート１７８６は、ウェル内で、ＰＣＲ反応液１７８８の液体レベルのすぐ上で、フィルターアッセンブリ１７７０とのシール１７８３を形成する。熱サイクルの間、ＰＣＲ反応液１７８８溶液温度は、同一でなくては成らず(定温)、液体蒸発は、定常の反応条件を維持するために最小限にされなければならず、そして正確な光学計測を可能にするため、凝集は、光学窓１７８２上に制御されるべきである。従って、ＰＣＲ反応液１７８８の液体表面及びシールプレート１７８６の光学窓との間の距離は、使用のしやすさ、物質の構成、並びに所望される熱及び凝集を最小限にするための光学窓の物質移動条件に合わせて最小限にすべきである。

【０２０７】
図１７ｂを参照すると、熱サイクルは、温度検出フィードバック・ループにおいて操作される熱電モジュール１７８５から、膜シール１７８０/分析フィルター１７７２を介した直接的な熱伝導により達成される。つまり、熱モジュール１７８５(ＴＥＭ、ペルティエ加熱/冷却)は、膜シール１７８０と直接接触しており、介在性の循環空気又は水浴、アルミニウムブロックヒーター中への緩いかみ合いに関連する断熱性の隙間を伴わない。規格が対応したマルチウェルプレート・デザインを使用することにより、熱接触は改良される。ここで、フィルターアッセンブリ１７７０の規格が対応した支持プレート１７７４は、十分な変形能力を有しており、底膜シール１７８０が、熱電過熱/冷却モジュール１７８５の表面へと適合することを可能にする。このようにして、従来のサーマルサイクル装置と比べてより良い正確性及び速さを備えて優れた伝熱能力が予期される。

【０２０８】
図１７ｂの実施態様は、図１８及び図１９において示される。これらの実施態様では、ろ過装置は、
(ａ) 第一表面及び第二表面を有するプレートであって、ここで該プレートは、少なくとも１の穴を有し、該穴は、プレートの第一表面と第二表面で一定の幅を有する、前記プレート、及び
(ｂ) 第一表面と第二表面を有する微小孔物質であって、ここで該微小孔物質の該第一表面は、プレートの第二表面に隣接しており、該微小孔物質がプレートにおける各穴を覆う、前記微小孔物質
を含む。本明細書中で使用される「隣接」という用語は、プレート及び本明細書中で記載される微小孔物質のいずれかであって、互いに物理的に接触しているものとして定義される。「隣接」という用語はまた、別の物質により分離されているプレートと微小孔物質のことも指す。例えば、プレフィルターは、プレートと微小孔物質との間に配置されうる。

【０２０９】
図１８では、プレート１８００は、剛性、低蛍光、製造の容易さ、及び熱伝導性を有する物質のいずれかから構成される。一の態様では、プレートは、陽極酸化アルミ又はプラスチックから構成される。図１８ａでは、１２個の反応ウェル１８０１は、プレート１８００を介して形成され；しかしながら、穴のいずれの数がプレート中に存在し、１の穴のみを含む場合もある。一の態様では、アノポア膜１８０２は、プレート１８００の底表面に結合され、それにより反応ウェル１８０１の底を形成する。膜は、液体接着剤、例えばエポキシ系、アクリル系など又は粘着テープで接着されうる。微小孔物質は、プレート内の各穴を覆う。図１８ｂを参照すると、該ウェルは、光学的検出、シーリング、液体の取り扱いなどを手助けするために、大きいトップ部分と小さい底部分１８０５を有する。一の態様では、大きいトップ部分１８０４は、不純物を取り除くことができるプレフィルターを受けることができる。サンプルを含む被分析物は、微小孔物質を通してろ過及び洗浄され、それにより、さらなる方法及び検出用に被分析物を局在化する。一の態様では、図１９ａを参照すると、被分析物が核酸である場合、局在された被分析物を含む微小孔物質１９０２の乾燥底表面であって、局在された被分析物質を含むものは、熱溶接ポリプロピレン熱シーリング・フィルム１９１０により、乾燥膜上に直接シールされうる。反応液体１９１３、例えばＰＣＲマスター・ミックスは次に、ウェル１９０１中に加えられうる。反応液１９１３を含むウェル１９０１のトップは、透明な粘着テープ１９１１(図１９ｂ)または透明なスナップ方式のトップ１９１２(図１９ａ)により密閉されうる。このアッセンブリは、例えば図１７において記載されように処理されうる。

【０２１０】
別の態様では、核酸被分析物の濃縮及び局在化に使用される微小孔物質は、図２０におけるカスケード・フィルターアッセンブリ２０８０の一部でありうる。フィルター・アセエンブリ２０８０は、被分析物を含むサンプルを受け取る取り外し可能なハウジング２０８２を含む。ハウジング２０８２の第一部分２０８３は、試験サンプルを前ろ過するため

の０.２ミクロンアノポア膜フィルターなどの第一フィルター２０８４を含むように構成さる。ハウジング２０８２の第二部分２０８５は、被分析物の局在化のための第二フィルター２０８６、例えば０.２ミクロンアノポア膜フィルターを含むように構成される。フィルター２０８４及び２０８６は、ハウジング２０８２内において一列のフィルター型の配置に配列され、その結果フィルター２０８４がフィルター２０８６に隣接し、そして先行する。サンプルの入口チューブ２０８７は、第一部分２０８３における第一チャンバー２０８８と流路で繋がっており、そして排出チューブ２０８９は、ハウジング２０８２の第二部分２０８５中で、第二チャンバー２０９０と流路で繋がっている。

【０２１１】

一の態様では、フィルター・アセンブリ２０８０を使用する間、血清サンプルなどの前処理された患者サンプルは、チューブ２０８７を通してチャンバー２０８８へ及びフィルター２０８４上へと配置されされる。サンプルは、フィルター２０８４、そして次にフィルター２０８６を通して流れるので、核酸は、フィルター２０８６の表面に局在化される。図２０において示されるように、補足された核酸を含むフィルター２０８６は、さらなる処理及び/又は以下に記載される光学核酸計数のため、ハウジング２０８２から物理的に取り出される。

【０２１２】

さらなる実施態様において、被分析物の濃縮及び局在に使用される膜フィルターは、図２１に図示されるように、フローセル・フィルター・アッセンブリ２１００の一部でありうる。フローセルフィルターアッセンブリ２１００は、サンプル又は被分析物を含む別のサンプルを受け取るためのハウジング２１０２を含む。ハウジング２１０２は、分析フィルター２１０４を保持するように形作られる。一の態様では、被分析物フィルター２１０４は、核酸局在用の０.２ミクロンのアノポア膜フィルターである。フィルター２１０４は、任意の孔フィルター支持体２１０５上に静止する。フィルター２１０４が十分に小さい直径を有するなら、孔フィルター支持体２１０５は除かれうる。入口チューブ・ポート２１０６は、フィルター２１０４に隣接する第一チャンバー２１０７と流路で繋がっており、そして出口チューブ・ポート２１０８は、ハウジング２１０２においてフィルター支持体２１０５に隣接している第二チャンバー２１０９と流路で繋がっている。光学窓２１１０は、ハウジング２１０２の表面上に位置して、検出器への及び検出器からの光２１１２がフィルター２１０４の表面に伝わることを可能にする。光２１１２は、蛍光光度計(図示せず)などの検出器に動作可能なように接続される。

【０２１３】

フローセル・フィルター・アッセンブリ２１００を使用する間、サンプルは、チューブポート２１０６を通してチャンバー２１０７及びフィルター２１０４上へと注入される。サンプルが、フィルター２１０４を介して流れるので、被分析物は、フィルター２１０４上に局在化される。一の態様では、被分析物が核酸であるとき、サンプル中の核酸は、サンプルをフローセルフィルターアッセンブリ２１００に注入する前に標識された。しかしながら、核酸は、フィルター２１０４の表面への局在化の後に標識されうる。この態様では、フィルター２１０４上の核酸は、蛍光光度計を使用することにより、光学窓２１１０を通して、フローセルフィルターアッセンブリ２１００中で、サンプル液流とフィルター膜処理と同時に計測されうる。これは、場合により、より良いバクグラウンドシグナルを排除することにより、核酸の検出性を改善する。サンプルの前ろ過は、必要とされるなら、サンプルをフローセルフィルターアセンブリ２１００に注入する前に行われる。ポート２１０６と２１０８は、キャップされるか、又は局在された核酸のさらなる処理、例えばハイブリダイゼーション、ＰＣＲ反応などが起こることを可能にするように閉められうる。

【０２１４】

図２２は、一般化されたウェル型の形態の改変であって、被分析物の局在化の直前に特定の前ろ過を与える改変を示す。幾つかの場合において、周囲のごみ、カビ、細菌などは、分析される被分析物サンプルを含むウェル中に入り込み、そして被分析物計数について

のエラーシグナルを作り出しうる：この効果を最小化するフィルターのアッセンブリは、一般的に２２００と名付けられた。フィルター・アッセンブリ２２００は、開口部２２０３を有する第一チャンバーを規定するハウジングを有し、該開口部はチャンバー２２０１中に被分析物サンプル２２０２の配置を可能にする。チャンバー２２０１の底は、約０．２ミクロンよりより大きい粒子を保持しかつ被分析物が通り抜けるように選ばれるプレフィルター２２０４を含む。プレフィルター２２０４の下に、前ろ過された被分析物サンプルを、分析フィルター２２０７へと運ぶ液体通路２２０５が存在する。該分析フィルター２２０７は、第二チャンバー２２０９の一の末端でハウジング中に配置される。通路２２０５の一の表面の少なくとも一部は、光学窓２２０６により規定され、該光学窓２２０６は、通路２２０５と流路で繋がった分析フィルター２２０７の表面を検出することを可能にする。

【０２１５】

フィルター・アッセンブリ２２００の使用の間、サンプル２２０２がフィルター２２０７を通して流れて、チャンバー２２０９に位置する液体廃液２２０８を形成するので、サンプル２２０２中に含まれた被分析物は、分析フィルター２２０７上に局在化される。曲がったポート２２１０は、吸引源に接続されて、液流を補助及び制御することもあるし、又はチャンバー２２０１は、当業者に周知であるように少し加圧されることもある。示されるように、廃液２２０８はチャンバー２２０９中に含まれうるか、又はチャンバー２２０９から取り出されて、中央廃液コンテナ(図示せず)に移される。フィルターアッセンブリ２２００は、チャンバー２２０１におけるサンプル処理(例えば、ビリオン溶解液など)まえに、固有の核酸、粒子、及び別の不純物を取り除くために本明細書中に記載されるさらなる前ろ過を伴って使用されうる。フィルター２２０４は、フィルター２２０７上への核酸固定化の直前に、妨害する恐れのある粒子を単純に取り除く。

【０２１６】

図２３ａ及び２３ｂは、かなり低減された拡散距離を有する被分析物計数用のフローセル装置を図示し、該装置は、固体表面(フィルターではない)局在化を用いて使用されうる。低濃度の被分析物は、固体表面へと拡散するためにかなりの時間を必要とする。図２３ａは、平面図を示し、そして図２３ｂは、固体表面局在化フローセル装置２３００の側面図を示した。フローセル装置２３００は、フローセル装置２３００は、サンプル２３０２を含む被分析物をハウジングの第一部分により定義される入口チャンバー２３０７へと導入するための入口チューブ２３０１を有する。チャンバー２３０７の一の壁の少なくとも一部は、チャンバー２３０７とハウジングの第二部分により定義される局在化通路２３０４との間に存在するフロー分配構造２３０３により形成される。図２３ｂを参照すると、局在化通路２３０４を定義するハウジングの第二部分の少なくとも１の主要表面は、光学窓２３０５から構成される。さらに、少なくとも１のこれら主要表面の内部は、局在化表面２３０６としてサンプルから被分析物を局在化するために処理された。局在化表面２３０６は、光学窓２３０５上、表面反対光学窓２３０５上、又はその両方の上に存在しうる。

【０２１７】

分配構造２３０３は、局在化通路２３０４において下流への均一な流れを引き起こすために十分な圧力低下を与える孔物質から一般的に構成される。特定の状況下で、流れ分配構造２３０３は、局在化通路２３０４への狭い開口部として構成されうる。局在化通路２３０４は、一般的に約１～約１０ｍｍの幅と長さ、及び厚さ約１０～約５０ミクロンの寸法を有する平面構造である。つまり、被分析物を含むサンプル２３０２は、約１～約１０ｍｍの幅、約１０～約５０ミクロンの高さ、及び約１～約１０ｍｍの長さの通路を流れる。

【０２１８】

フローセル装置２３００の作動の間、被分析物を含むサンプルは、装置内に流れこみ、ここで該サンプルは、局在化通路２３０４へと均一に導入される。サンプルが、この通路をとおしてゆっくり流れるとき、被分析物は、通路の高さにより与えられるかなり小さい

拡散距離(約１０～５０ミクロン)のため、比較的早く局在化表面２３０６上に局在化される。残りの液体は、局在化通路２３０４から廃液として出る。局在された被分析物は、次に表面２３０６上で光学的に検出される。該フローセル装置２３００は、重力、圧力、又は吸引流量制御で設定され、そして使い捨て装置の不可欠な要素でありうる。さらに、フローセル装置２３００は、長期間光学検出器から間接的にサンプルを処理するように設計されうる。そうしたサンプルは、局在化が完了したの後に即座に光学的に分析される。

【０２１９】

上で記載される物品及びろ過装置のいずれかは、キットに含まれうる。該キットはまた、局在された被分析物を検出するために上で記載された検出手段のいずれかを含む。一の態様では、光学的検出器は、標識核酸を検出するために使用される。

【０２２０】

Ｅ.一般用語

本発命の組成物、物品、装置、及び/又は方法が開示又は記載される前では、特記ない限り、それらは特定の合成方法又は特定の組換えバイオテクノロジーの方法に制限されず、又は特記がない限り特定の試薬に制限されず、そのようなものとして当然変わりうるということを理解されるべきである。また、本明細書中で使用される専門用語は、特定の実施態様を記述する目的のみであり、制限することを意図されていないということも理解されるべきである。

【０２２１】

明細書及び添付の特許請求の範囲に使用されるとき、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が明らかにそうでないということを示さないかぎりは、複数の対象を含む。こうして、例えば、「a pharmaceutical carrier」という記載は、２以上のそうした担体などを含む。

【０２２２】

範囲は本明細書中で、「約」ある数値～「約」別の数値として表される。こうした範囲が表されるとき、別の実施態様は、該ある数値～該別の数値を含む。同様に、数値が近似として表されるとき、前述の「約」の使用によって、特定の数値が、別の実施態様を形成するということが理解されるだろう。範囲の各々の末端は、別の末端に関して、及び別の末端と独立して有効であることがさらに理解されるであろう。本明細書中に開示される多くの数値が存在し、そして各々の数値は、その数値そのものに加えて「約」該数値として本明細書中に開示される。例えば、数値「１０」が開示されるならば、「約１０」もまた開示される。ある数値が開示されるとき、「該数値以下」、「該数値以上」、及び該数値間の範囲もまた、当業者により適切に理解されるように開示される。例えば、数値「１０」が開示されるなら、「１０以下」並びに「１０以上」も開示される。本出願をとおして、データーは多数の異なる形式で提供され、そしてこのデーターは末端と開始点及びデーター点のいずれかの組合せの範囲を表すことが理解される。例えば、特定のデーター点「１０」及び特定のデーター点１５が開示されるならば、１０及び１５超、以上、未満、以下並びに１０及び１５そのものは、１０～１５と同様に開示されたと考えられる。

【０２２３】

この明細書及び添付の特許請求の範囲において、以下の意味を有すると定義される多数の用語について参照が成される。「任意」又は「場合により」は、その後に記載される事象又は状況が起こることもあるし起こらないこともあるということを意味し、そして該記載は、前記事象又は状況が起こる場合とそれが起こらない場合を含むということを意味する。

【０２２４】

本出願をとおして、様々な文献が参照される。これらの文献の開示全ては、それが属する技術の状態をより十分に記載するために、本出願中に援用される。開示された参考文献は、個々に及び特異的に、該文献中に含まれる構成要素であって、該文献の文章中に論じられる構成要素について本明細書中に援用される。

【実施例】

【０２２５】

実施例

以下の実施例は、当業者に、本明細書中に開示及び特許請求される化合物、組成物、及び方法が、どうやって作られ、そして評価されるかについての完全な開示及び記載を与えるために記載され、そして純粋に例示的であることを意図し、そして発明者が、発明であるとみなす範囲を制限することを意図しない。エフェクターは、数(例えば、量、温度など)に関する正確性を保証するために作られたが、幾つかの間違い及び偏差は、説明されるべきである。他に記載がない限り、割合は、重量による割合であり、温度は、℃で表されるか室温であり、そして圧力は、大気圧又はその付近である。反応条件、例えば、濃度要素、所望の溶媒、溶媒混合液、温度、圧力、及び他の反応試薬、並びに記載の方法から得た産物の純度及び収率を最適化するために使用されうるの多数の変動及び組合せが存在する。正当かつルーチンな実験のみが、そうした処理条件を最適するために必要とされる。

【０２２６】

Ａ．　材料

迅速なウイルス量アッセイにおいて、試験される核酸は、約８０００塩基又は塩基対を有するＲＮＡ又はＤＮＡでありうる。このサイズ範囲における核酸(ＤＮＡ及びＲＮＡ)ラダーは、局在化用に試験された。他に特記がない限り、ＥｃｏＲＩで切断されたラムダ・ファージＤＮＡであって、３,５３０、４,８７８、５,６４３、５,８０４、　７,４２１、及び２１,２２６塩基対のＤＮＡを、モデル核酸として使用した。５０～１０,０００塩基又は塩基対の断片を有する別のＤＮＡ及びＲＮＡラダーとの比較は、ＲＮＡとＤＮＡ局在における類似性を示した。ろ過された核酸ラダー上のゲル電気泳動は、約１５００塩基又は塩基対より大きい分子の高い保持効率を示した。精製されたウシ胸腺ＤＮＡであって１３,０００平均塩基対長を有するものは、様々な条件下でろ過され、そして結果は以下の実施例において記された。ろ過は、０.２ミクロンのアノポア膜フィルターを含むように改変されたミリポア・マルチウェル・フィルター・プレートを含むフィルター・アッセンブリであって、図１５ａにおいて示される直径約５ミリメートルの改変又は未改変の０.２ミクロン・アノポア膜フィルター表面を伴うウェル・アッセンブリと類似であるアッセンブリを用いて行われる。

【０２２７】

１．　実施例１

図２４ａ及び２４ｂは、プレーン未改変、ジオール(酸加水分解されたグリシドオキシプロピルトリメトキシシラン)改変、及びアミン(アミノプロピルトリメトキシシラン)改変０.２ミクロンアノポア膜についてのＮａＣｌ濃度に対する核酸保持率のグラフである。図２４ａは、０～１０００ｍＭ・ＮａＣｌ範囲を示し、一方図２４ｂは、図２４ａから拡大された０～１００ｍＭの範囲を示す。これらの結果は、１ｍＭ・トリス緩衝液、ｐＨ８.０において得られた。グラフから明らかであるように、１００ｍＭの塩が、プレーンの及びジオール改変膜上で実質的に完全に核酸を保持することに必要とされ、アミン改変膜については、実質的に塩の効果がない。

【０２２８】

２．　実施例２

図２５ａ及び２５ｂは、プレーンの未改変アノポア膜についての塩濃度に対する核酸保持率のグラフである。図２５ａは、０～４５００ｍＭの塩濃度の範囲であり、一方図２３ｂは、図２５ａから拡大された０～１００ｍＭの範囲を示す。これらの結果は、上記のＤＮＡ切断部位を使用して、１ｍＭ・トリス緩衝液、ｐＨ８.０中で得られた。図２５ａ及び２５ｂのグラフ中に記されるように、ＮａＣｌ(カオトロピック塩ではない)は、プレーンの０.２ミクロン・アノポア膜上への核酸保持を促進する点で、グアニジン・チオシアネートと同じくらい効果的であり、そしてグアニジン・ヒドロクロリドよりずっと効果的である。

【０２２９】

３．　実施例３

図２６は、プレーン未改変、ジオール改変、及びアミン(ＡＰＳ)改変の０．２ミクロン・アノポア膜についてのｐＨに対する核酸保持率のグラフである。結果は、１Ｍ・ＮａＣｌ、５０ｍＭリン酸緩衝液、及び前に記載されるように切断されたＤＮＡで得られた。図２６のグラフにおいて示されるように、核酸保持率は、ｐＨ４において一貫して高くそして表面改変とは無関係であったが、重大な表面改変効果は、ｐＨ６～８で示され、プレーン膜は、５％以下の核酸保持率へと下がり、そしてジオール改変膜は、６５％の保持率まで下がった。高ｐＨ(１０)では、核酸保持率は、プレーン及びジオール改変膜について実質的に０まで下がったが、アミン改変膜についてはまだ５０％を超えていた。

【０２３０】

４．　実施例４

図２７～２９のグラフは、１ｍＭトリス緩衝液ｐＨ８．０中で、ＮａＣｌを変量として、プレーン未改変、アミン(ＡＰＳ)改変、及びジオール改変のアノポア膜上での核酸保持率の性質を示した。これらのグラフはそれぞれ、３つの場合：

全膜保持率(プロットは図２４ａと同一である)；

膜を通した洗浄液　-　核酸を含む特定の緩衝液が膜を通してろ過された後に、等量の同一の緩衝液であって核酸を含まないものが、膜を通してろ過され、そして分析される。

膜の表面からの洗浄液　-　膜を洗浄したのち(上記膜を通した洗浄ののち)、等量の同一の緩衝液であって核酸を含まない緩衝液は、膜上のウェル中に配置される。この緩衝液は、約１０回膜上で吸引と注入が行われて、表面から局在された核酸を洗浄する。この表面洗浄液を、吸光度により分析し、そして溶出された核酸を計測した。

についての核酸保持率(％)対ＮａＣｌ濃度をプロットする。

【０２３１】

プレーン及びジオール改変されたアノポア膜(図２７及び２９各々)は、洗浄画分からの検知可能物を示した。ここでは、核酸がフィルターを通して流れたとき、核酸は保持されているよりはどうやら遅らされているようだ。この膜通過洗浄の後では、核酸は、ほとんどフィルター表面から洗浄されない。アミン改変アノポア膜(ＡＰＳ、図２８)は、異なったふるまいを示した。洗浄をとおして、改変された膜から核酸はほとんど取り除かれず、一方幾つかの場合、６０％近くの開始核酸は、膜の表面から洗い出すことができる。

【０２３２】

５．　実施例５

図３０のグラフは、プレーン未改変及びアミン(エチレンジアミノプロピルトリメトキシシラン、ＥＤＡＰＳ)改変膜に関して、リン酸緩衝液濃度の核酸保持又は溶出についての効果を示す。リン酸二ナトリウムを、グラフ上に挙げた濃度で、１ＭのＮａＣｌに加え、ｐＨを８．０に調節した。リン酸イオンは、酸化アルミニウム・クロマトグラフィー・パッキングに結合することが知られ、そして核酸と同様のアノポア膜上の弱い結合部位と競合しうる。図３０のグラフにおいて示されるように、ＥＤＡＰＳ改変アノポア膜により局在化される核酸は、リン酸濃度に対する反応性について、プレーン膜の反応性とは程遠い。

【０２３３】

別の緩衝液はまた、未改変のアノポア膜上に局在された核酸を低下できない。表２は、表に挙げられた緩衝液を含む１０００ｍＭ・ＮａＣｌ中におけるＤＮＡの保持率を示す。

【０２３４】

【表２】

表２

緩衝液	核酸局在割合（％）
１mMトリス	98.3%
50mMトリスホウ酸塩	17.8%
50mMリン酸塩	-2.6%
50mM重炭酸塩	4.6%
50mMホウ酸塩	5.7%

【０２３５】

６．　実施例６

表面の性質は、弱い相互作用を妨げる化学種の吸着により影響されることが多い。そうした化学種は、膜被膜物質として使用され、そして本明細書中に記載される幾つかの用途において存在する血漿要素及び界面活性剤を含む。表５は、ウイルス量アッセイにおいてみつかる条件下での、ＤＮＡの局在化割合を示す。該条件は、１ｍｇ/ｍｌプロテイナーゼＫ酵素、２％トウィーン２０界面活性剤、記された添加塩、及び６５％ＥＤＴＡヒト血漿の有無を含む。

【０２３６】

【表３】

表３

膜	塩	血漿％	核酸局在
アミンEDAPS	なし	65％	99％
アミンEDAPS	なし	0％	99％
アミンEDAPS	200mM NaCl	65％	96％
アミンEDAPS	200mM NaCl	0％	98％
アミンEDAPS	200mM GTC	65％	100％
アミンEDAPS	200mM GTC	0％	96％
未改変	なし	65％	42％
未改変	なし	0％	28％
未改変	200mM NaCl	65％	56％
未改変	200mM NaCl	0％	97％
未改変	200mM GTC	65％	13％
未改変	200mM GTC	0％	96％

【０２３７】
表３に示されるように、ＥＤＡＰＳ改変された膜による核酸局在化は、様々な塩及び血漿条件下で一貫して高いが、一方未改変膜は、様々な条件下での一貫しない核酸局在化を有した。
【０２３８】
７．実施例７
高感度のウイルス量アッセイでは、かなり少量の核酸が定量される。以下の表４は、貯蔵された臨床サンプル対ビリオン溶解液／血漿消化反応条件から得られたＨＩＶ・ＲＮＡの局在化割合を示す。全てのサンプルは、１３５μｌの患者サンプル(ＥＤＴＡ血漿)、２ｍｇ/ｍｌプロテイナーゼＫ、２％トウィーン、および４００ｍＭのグアニジン・チオシアネートを含んだ。該サンプルを３０分間、表４に記載の条件下でオインキュベーションした。
【０２３９】

【表４】

表４

インキュベーション	膜	RNA濃度	局在割合（%）
室温	なし	321kコピー／ml	------
室温	プレーン	274kコピー／ml	14.6%
室温	EDAPS	5.7kコピー／ml	98.2%
55℃	なし	542kコピー／ml	------
55℃	プレーン	427kコピー／ml	21.2%
55℃	EDAPS	4.1kコピー／ml	99.2%
室温超音波処理	なし	481kコピー／ml	------
室温超音波処理	プレーン	388kコピー／ml	19.3%
室温超音波処理	EDAPS	5.8kコピー／ml	98.8%

【０２４０】
表４に示されるように、ＥＤＡＰＳ改変された膜によるＲＮＡ局在は、種々のインキュベーション条件下で一貫して高い。一方、プレーン未改変膜は、種々のインキュベーション条件下でずっと低いＲＮＡ局在割合を有した。
【０２４１】
８．　実施例８
ヒト血漿ろ過上での試験サンプル切断の効果は、成分を含む３００μｌの全インキュベーション混合液を使用することにより、及び以下の表５に載せられる条件にかけることにより調査された。使用されるフィルター・アッセンブリは、改変ミリポア９６ウェル・フィルタープレートの底に熱融合された直径約５ｍｍの未改変０．２ミクロンアノポア・膜フィルターを含んだ。これは、例えば、図１５ａの実施態様に示される。
【０２４２】

【表５】

表５

サンプル[1]	プロテイナーゼＫ酵素[2]	界面活性剤[3]	カオトロピック塩	インキュベーション温度[4]	インキュベーション時間	ろ過時間[5]
1(200μl血漿)	なし	なし	なし	RT	なし	詰まった
2(上に同じ)	2.3mg/ml	なし	なし	55℃	20分	詰まった
3(上に同じ)	2.3mg/ml	なし	0.5M GITC	55℃	20分	詰まった
4(上に同じ)	2.3mg/ml	0.5%トライトン	0.5M GITC	55℃	20分	15秒
5(上に同じ)	2.3mg/ml	0.5%トライトン	なし	55℃	20分	18秒
6(上に同じ)	2.3mg/ml	2.0%トウィーン	なし	55℃	20分	15秒
7(上に同じ)	1.7mg/ml	1% SDS	なし	55℃	30分	15秒
8(上に同じ)	1.0mg/ml	2%トウィーン	なし	RT	30分	14秒
9(上に同じ)	なし	2%トウィーン	なし	RT	30分	4+分

１　－　サンプル-　新鮮又は冷凍ＥＤＴＡヒト血漿
２　-　プロテイナーゼＫ酵素-　濃縮液体(２３ｍｇ/ｍｌ),Sigma-Aldrich Co.
３　-　界面活性剤-　分子研究用品質　トライトンＸ-１００、トウィーン２０、又はＳＤＳ(ドデシル硫酸ナトリウム)
４　-　インキュベーション条件-　ＲＴ(室温)２５℃ベンチトップ；５５℃水浴
５　-　ろ過時間-　局在化膜フィルターを通して２５０μｌのインキュベーション後の液体をろ過するための秒数。

【０２４３】

表５に記載されるように、界面活性剤を使用した場合、サンプルの切断により、２００μｌの血漿サンプルが使い勝手のよいマルチウェル形式において０.２ミクロン膜を通して数秒でろ過されることが可能になる。

【０２４４】

９．実施例９

図３１は、脳脊髄液(ＣＳＦ)、ヒト血清、及び全血についてのサンプル切断/ろ過試験の棒グラフである。全ろ過体積は、左の軸に示され、一方、約３.５ミリメートルの直径の未改変０.２ミクロン・アノポア膜を通して全体積をろ過するのにかかる時間が、右の軸に記載される。様々な体積及び切断条件が示され、水(コントロール)、無傷(未切断)ＣＳＦ、及び切断ＣＳＦ、血清、血漿、及び全血液を含む。切断条件は、以下：

ＣＳＦ、血清、血漿
３１ｍＭ　トリスＨＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ
８００ｍＭ　グアニジン・イソチオシアネート
０.５％　トライトンＸ-１００
５.２％　トウィーン２０
０.９ＡＵ　プロテイナーゼ

全血
１８ｍＭ　トリスＨＣｌ、６ｍＭ　ＥＤＴＡ
５００ｍＭ　グアニジン・イソチオシアネート
０.３％　トライトンＸ-１００

３．０％　トウィーン２０
２．０ｍｇ/ｍｌ　プロテイナーゼＫ
を含んで示される全切断体積において３７℃で１５分であった。

【０２４５】

示されるように、種々の生物学的サンプルの実用的な体積は、アノポアフィルターの小さい領域を通して、無理のない時間でろ過できる。

【０２４６】

１０．実施例１０

ＰＣＲ増幅を含む全血からのゲノム核酸の抽出及び精製は、以下の方法を使用して行われる。最初に、１０μｌのＥＤＴＡ抗凝集ヒト全血を、１８０μｌの分子研究用品質の水であって、１０％ドデシル硫酸ナトリウム溶液を１０μｌ含む水に最終濃度０．５％になるように溶解した。混合液を軽く混合し、次に室温で約１５分間インキュベーションした。サンプル全体を、未処理の完全０．２ミクロン・アノポア膜を備えるマルチウェル・フィルター・プレート(前記改変ミリポアフィルター・プレート)中に配置した。混合液を約３０秒かけて乾燥するまで吸引ろ過し、次に約１００μｌの蒸留水で洗浄し、それを再び乾燥するまで膜を通して吸引ろ過した。洗浄された膜は、実質的に白色であり、かなり少量の結合されたヘモグロビンが見えた。その後、ヒトβグロビンタンパク質の遺伝子コード中に含まれる核酸配列を増幅するためのプライマーを含む２０μｌのＰＣＲマスター・ミックスをフィルター上に分注し、そして最初のＳＤＳで溶解された血液サンプルから捕捉された局在化ゲノムＤＮＡのいずれかを簡単に再溶解させた。再溶解は、繰り返し２０μｌのマスターミックスを膜上で注入及び吸入することにより助けられた。マスター・ミックスを吸引しそしてＰＣＲキャピラリー・チューブへと移し、そしてリアルタイムＰＣＲ(Roche Lightcycler)により、ヒトβグロビンタンパク質の遺伝子コード内に含まれる核酸配列について分析した。陽性の結果を得た。

【０２４７】

種々に同定されたサンプル由来の１０μｌの全血を、５００ｍＭグアニジン・イソチオシアネート、０．５％トライトン-X１００、２０ｍＭトリス-ＨＣｌ、ｐＨ６．５、１０ｍＭＥＤＴＡ及び０．２５ｍｇ/ｍｌプロテイナーゼＫ(＞５００Ｕ/ｍｇ)を含む２００μｌの全体積中に、１５分間室温(～２５℃)で溶解した。ライセートを次に未改変アノポア膜(ｄ＝～３．８㎜)を介して、吸引によりろ過し、次に１００μｌの２００ｍＭ・ＮａＣｌで洗浄した。フィルターを次に乾燥し、そして裏側を１～３μｌのＤＹＭＡＸ　ＯＰ-２１可動性プラスチック結合のビーズであって、適用後ＵＶで５秒間硬化させたビーズ(１～３μｌ)で不動体化した。全血サンプル由来の表面に局在されたＤＮＡを含む膜は、５０μｌの慣用のＰＣＲチューブ中のＰＣＲマスターミックスに加えられた。該ミックスは、１×ＰＣＲ緩衝液(Roche)、４ｍＭ・$MgCl_2$(Roche)、２ｍＭｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、及び４ｍＭｄＵＴＰ(Perkin Elmer)、５００μg/ｍｌ・ＢＳＡ(Idaho, Technology)、各０．５μＭのＰＣＯ３及びＰＣＯ４プライマー、１Ｕ Heat Labile Uracil N-Glycosylase(Roche)及び３Ｕ FastStart Taq Polymerase(Roche)を含む。慣用のサーマル・サイクラーにおいて行われるＰＣＲ熱サイクルは、以下：５０℃×５分(ＵＮＧ)、９５℃×５分(ｔａｑ活性化)、[９５℃×３秒、５５℃×４５秒、７２℃×６０秒]を４０サイクル、続いて最終伸張７２℃×５分であった。各５０μｌＰＣＲ反応のうちの１０μｌを２％アガロース、ＴＢＥゲル上にロードし、そして電気泳動した。β-グロビン(～１１０ｂｐ)又はプライマー・ダイマー(～３５ｂｐ)を表すバンドは、ゲルをエチジウム・ブロマイドにおいて染色した後に可視化し、そしてＵＶ光の下で観測した。ヒトゲノムＤＮＡの存在を示す陽性の結果が得られた。図３２は、電気泳動ゲルの写真であり、全血液サンプル中に含まれる局在化ゲノムＤＮＡ上に存在するβグロビン標的領域をＰＣＲ増幅することにより作られたアンプリコンを示す。示されるように、ＰＣＲ増幅は、全ての場合において起こる。

【０２４８】

１１．実施例１１

遺伝子分析用に、全血液サンプルをリアルタイムＰＣＲ(ＲＴ-ＰＣＲ)中で使用する能力は、研究の作業の流れを単純化し、そしてコストを削減し、そして別の利益を与える。実施例１０の全血ＰＣＲ増幅は、前記図１８及び１９において示される単純化された使い捨て形式を使用し、図１７ｂの系に類似する系において分析を行うことにより作られたアンプリコンをリアルタイム検出することを含むように拡大された。１０μｌの全血は溶解され、次に図１８において一般的に示されるように、及び実施例１０に記載されるように、ろ過されそして未改変のアノポア・フィルターを介して洗浄された。アノポアの乾燥された底表面は、全血サンプルから由来される局在されたゲノムＤＮＡを含み、熱溶接ポリプロピレン、熱シーリングフィルム１９１０により、図１９に示されるように直接乾燥膜上にシールされた。以前に記載されたとおりであるが、１：６０００希釈のサイバーグリーンＩ色素(molecular Probes)を含んだむ組成の５０μｌのＰＣＲマスター・ミックスを次にウェル１９０１中に加えた。ウェル１９０１のトップは、ＰＣＲ反応液１９１３を含み、次に透明の粘着テープ１９１１又は透明のキャップ１９１２によりシールした。このアッセンブリを、図１７ｂにおいて図示されるようにアノポア-シーリングフィルム表面を直接通して熱を伝えるように設計されたリアルタイムＰＣＲ装置で熱サイクルした。ウェル内の蛍光の変化は、ウルトラ・ブライト(ultra blight)青色発光ダイオード、フォトダイオード検出器、及び適切な干渉フィルター、エレクトロニクス、及びソフトウェアから構成される単純化された蛍光光度計により、サーマルサイクルされる間モニターされた。蛍光データーをライトサイクラー(Roche)ソフトウェアにより評価した。サーマルサイクルをPerkin Elmer４８０装置であって、特注フラットサーマルサイクル領域を遠隔操作することを許容するように改変された装置を使用することにより達成した。サーマルサイクル・プロファイルは、実施例１０(９９℃×２０秒、５０℃×３秒、７５℃×６０秒)と同じであった。融解分析は、温度を１時間かけて６５℃～９９℃まで上昇させることにより行われた。

【０２４９】

実施例１１用のリアルタイム増幅曲線は、図３３に示され、一方融点曲線は図３４において示される。類似の結果は、図３４におけるライトサイクラーで見られた。図は、単純化されたリアルタイムの形式で、分解された全血からの膜局在されたＤＮＡから、特異的ＰＣＲ増幅及びβグロビン遺伝子の同定の明快な証拠を示した。

【０２５０】

１２．実施例１２

ヒトゲノムＤＮＡは、蛍光染色により直接的に可視化されうる。１００万細胞/ｍｌ超に濃縮され精製されたヒト白血球細胞１０μｌを、０.５％ドデシル硫酸ナトリウムを含む１９０μｌのＴＥ緩衝液に加え、そして２０分間、５６℃でインキュベーションして、血球細胞を溶解し、ＤＮＡを放出させた。ＴＥ緩衝液中に１～１０,０００希釈のサイバーゴールドから構成される溶液中で、１～４００,０００の細胞溶液１０μｌで開始することに基いて、この溶液を終濃度まで希釈した。希釈ＤＮＡ溶液を、サイバーゴールド溶液中で数分インキュベーションし、次に５０μｌを実施例２２に従ったニッケル-ホウ素改変アノポア膜を通してろ過した。局在されたヒトゲノムＤＮＡを含む膜を簡単にＴＥ緩衝液で洗浄し、次に図９及びさらに実施例１３において示されるのと類似の装置に基いて可視化された。実施例に従った、典型的なヒトゲノムＤＮＡのイメージは、図１１に示される。

【０２５１】

１３．実施例１３

核酸を光学的に分析した。精製された約１３,０００塩基対のウシ胸腺ＤＮＡは、１００ｎＭのＹＯＹＯ１核酸色素を含むろ過された１０ｍＭトリス-ＨＣｌ、１ｍＭ・ＥＤＴＡ中に１～１２８の相対濃度で段階希釈された。室温でのインキュベーションの５分後、１００μｌの標識核酸サンプルを、黒色ポリプロピレン・ホルダー上に熱融合された活性フィルター直径約３ｍｍの０.２ミクロンの未改変アノポア膜を通してろ過した。４８８ｎｍでの単線で作動する２０ミリワットの空冷アルゴンレーザー、並びに１０２４×１０

５８ピクセルの裏面入射型ＣＣＤカメラであって、－１０に冷却され、０.３ＮＡ、１０×平面顕微鏡対物レンズを備えるカメラを使用し、図９に示される機器構成の蛍光顕微鏡で、フィルターを画像化した。ＤＮＡを約５秒の照射で簡単に可視化した。画像をシグナル処理して、縁部を際立たせ、明らかに核酸ではない不具合を取り除き、バックグラウンドの蛍光について訂正し、次に残っている処理されたＤＮＡスポットを計数した。処理された画像を図１２において示し、得られた単純希釈曲線を図１３において示し、装置に対し訂正された希釈曲線及びシステム・パラメーターを図１４において示した。

【０２５２】

１４．実施例１４

例えば図８に記載される共焦点スキャン検出システムについての種々の検出パラメーターを評価するために、理論モデリングを行った。理論モデリングのため、以下の仮定を行った。

１.１ｍｌサンプル中に含まれる核酸を１ｃｍ^{2}の領域に結合する。

２.１ｃｍ^{2}あたり１の計数間違いによる誤診率は許容される。

３.核酸を２５又は１００色素分子/核酸で染色する。

４.各蛍光色素分子は、検出ゾーンに存在するとき、５００００光子/秒の検出されたシグナルを生ずる。これは、１００ｋＷ/ｃｍ^{2}の照射密度で達成される。

５.ノイズは、器具によるノイズ、ラマン散乱、プラスチックの蛍光などのバックグランド源由来である。さらに、核酸染色由来の表面非特異結合(ＮＳＢ)は、均一に分散され、単離された(密集していない)色素分子であって、スキャンエリアあたり複数の色素が存在する可能性がかなり低い色素分子をもたらす。密集された蛍光シグナルを与える表面に結合された非特異的核酸などの不慮の染色は、考慮されなかった。

【０２５３】

理論モデリングは、以下の検出条件に基いた。蛍光標識された核酸は、光学表面へと結合される。共焦点走査上面蛍光光度計は、結合された核酸に強く照射し、核酸の蛍光を引き起こす。核酸から発光された蛍光光子は、捕捉され、そして計数される。さらに、上面蛍光光度計は、散乱光、器具ノイズ、ＮＳＢなどからのバックグラウンド計数率を検出する。蛍光核酸からの特異的シグナルは、スキャンスピードとスポットサイズにより定義される間隔において生じる光子のスモール・バースト(small burst)として存在する。典型的な例として、０.５～１０μ秒におこる３～２０個の光子のバーストが計算された。バックグラウンド又はノイズシグナルは、ポアソン分布に従い、そして特異的核酸シグナルから区別できないバーストにおいて生じる限界確率を有する。

【０２５４】

必要とされる検出パラメーター(ＳＮＲ、スキャンスピード、スポットサイズなど)を、１ｃｍ^{2}スキャンの間生じる最大統計ノイズ・バースト計数に等しい蛍光核酸シグナルをセットすることにより測定した。これによりバックグラウンド・ノイズからの1/ｃｍ^{2}の統計的擬陽性数がもたらされた。つまり、規定のスキャンスピード及びスキャン・スポット・サイズは、照射スポットが固定化された蛍光核酸上を通過するためにかかる時間である光子バースト時間(例えば、約０.５～約１０μ秒)をもたらす。光子バースト時間あたりの、検出器により計数される光子数は、核酸とバックグラウンドとの間で区別される。バックグラウンドノイズは、統計変動のためスモール・バーストを含む。必須最小核酸シグナル(光子/バースト時間)は、全スキャン時間の間に統計的に生じうる最大ノイズシグナル(光子/バースト時間)に等しくなるようセットされる。従って、装置は、各時間毎に１個の核酸を計数し、この示されたバースト割合(例えば、２μ秒あたり５個の光子)は超過である。統計的に、ノイズは、１ｃｍ^{2}スキャンあたりの１のそうした出現、又は１ｍｌサンプルあたりの１の擬陽性を計上すべきである。

【０２５５】

以下の等式及び数学的関係は、実施例中で行われた理論モデリングにおいて使用された。

１.ポアソンランダム変数方程式：

$$P_{(I)} = e^{-G} G^{I} / I !$$

［式中、Ｉは、規定の間隔における光子数であり；
Ｐは、規定の間隔においてＩ個の光子が生じる確率であり；そして
Ｇは、規定の間隔において光子が生じる平均確率である］

２.一般的な関係：

Ｔ＝秒/１ｃｍ^{2}スキャン
Ｄ＝スポット寸法、ミクロンである。
光子バースト時間(μ秒)＝Ｔ(Ｄ^2)１×１０^8

［式中、１×１０^{8}は、ｃｍ^{2}あたりのミクロン^{2}の数である］

スキャンスピード(ｃｍ/秒)＝１×１０^4/ＴＤ
核酸シグナル(光子数/光子バースト時間)＝ＦＲＴＤ^2/１×１０^8

［式中、Ｆは、蛍光色素分子の数/核酸であり；そして
Ｒは、検出された光子計数率/色素分子(50,000光子/秒/想定分子)である］

バックグラウンド・シグナル(光子計数/光子バースト時間)＝ＢＴＤ^4/１×１０^8

［式中、Ｂは、平均バックグラウンド・シグナル(光子計数/秒/ミクロン^2)である］

ＮＳＢシグナル(光子計数/光子バースト時間)＝ＺＴＲＤ^4/１×１０^8

[式中、Ｚは、光学表面に非特異的に結合される蛍光色素分子/ミクロン^{2}である]

フォトン・バースト・時間に基いて発現されるシグナルに関して、それらは、ポアソン・ランダム変数方程式において以下のように有用である：

Ｉ＝核酸シグナル；

これは、１擬陽性/ｃｍ^{2}につき最小核酸シグナル(光子/バースト時間)である。

Ｇ＝バックグラウンド・シグナル＋ＮＳＢシグナル；

これは、全ての非核酸源についての平均光子計数／バースト時間である。

Ｐ＜Ｄ^2／１×１０^8

この条件は、完全な１ｃｍ^{2}スキャンにおける、１未満の擬陽性の統計的発生を示す。これらの関係に関して、様々な条件下の計数パフォーマンスの曲線は、以下の実施例において記載されるように作られた。

【０２５６】

１５．実施例１５

図３５は、以下の５個の検出条件についてのスキャン時間対スポット寸法のグラフである。

１．１００色素分子／核酸、１０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、０色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；
２．１００色素分子／核酸、４０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、０色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；
３．１００色素分子／核酸、４０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；
４．２５色素分子／核酸、１０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、０色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；及び
５．２５色素分子／核酸、４０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ

【０２５７】

図３５のグラフにおいて示されるように、スキャン時間限界を２００秒に設定することにより、最もノイズの高い２５色素分子／核酸の場合以外の発現は、２ミクロンスポットで可能である。２ミクロンより大きいスポット寸法に関する場合についてのデーターは存在しない。なぜなら、曲線が、スポット寸法が２と３ミクロンの間で、ＳＮＲアプローチ２として、急激に上向きになるからである。

【０２５８】

１６．実施例１６

図３６～３９は、スキャン時間対シグナル／ノイズのグラフであり、ここで：

シグナル対ノイズ比(ＳＮＲ)＝核酸シグナル／バックグラウンド・シグナル＋ＮＳＢシグナル

図３６のグラフは、種々のスポット寸法で、２～５００のＳＮＲの間で、１００色素分子／核酸の条件に作られた。図３７のグラフは、種々のスポット寸法で、２～１００ＳＮＲの拡大されたスケールの１００色素分子／核酸の条件について作られる。図３８のグラフは、種々のスポット寸法、２～５００ＳＮＲでの２５色素分子／核酸の条件について作られた。図３９の該グラフは、２～１００ＳＮＲの拡大されたスケールを伴う種々のスポット直径で、２５色素分子／核酸の条件について作られた。

【０２５９】

図３６～３９のグラフの各々の左末端でのＳＮＲの実際の数値は、２.５、３.０、４.０、５.０、及び１０.０である。図３６～３９のグラフにより、ＳＮＲが約１０未満で、スキャン時間が劇的に増加することが明らかにされた。２.５未満のＳＮＲについてのスキャン時間は、ＳＮＲ比が２.５未満になり、スキャン時間が増大されることを観測するため以外では計算されない。

【０２６０】

理論モデリングに基いて、最も早いスキャンは、ＳＮＲの問題点が著しくなるまで、最も大きいスポットで達成される。図３７を再び参照して、２ミクロンのスポット寸法で、２５色素分子／核酸、４０ｋＨｚ／ミクロン^{2}ノイズ、１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢは、３.４７２のＳＮＲを有した。１００色素分子／核酸、５０ｋＨｚ／ミクロン^{2}ノイズ、及び１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢの場合について４ミクロンのスポット寸法でみられる同じＳＮＲである。両方の曲線は比較的なだらかである。これらの曲線の完全なプロットは、スキャン時間の急激な増加を示し、ＳＮＲが１に近づくにつれて無限に近くなる。有用な最小ＳＮＲは、おおよそ３であるようだ。

【０２６１】

ＮＳＢが単離された色素分子として存在する限り、ＮＳＢは全体のバックグラウンドに加えられ、そしてＳＮＲ予測は正当である。色素分子が、スキャンに使用されるスポットサイズと大きさが類似する領域中に濃縮されるメカニズム、例えば表面に結合された非特異的核酸を染色することは、非特異核酸を特異的核酸として計数するという過ちをもたらす。

【０２６２】

１７．実施例１７

図４０は、未改変０.２ミクロンの孔サイズのアノポア膜フィルター上に局在化され、そしてＹＯＹＯ１色素で染色された４８,５０２塩基対長のラムダ・ファージＤＮＡの高倍率反転顕微鏡写真であり、実施例３に記載の技術に従って画像化された。図４０は、ＤＮＡ分子の形が容易に明らかにされる膜フィルターの表面上のＤＮＡを明らかに示す。図４０における明るい細長い形は、十分に伸張された局在化ＤＮＡに一致し、暗い球形は、崩壊された分子構造に一致する。さらに、中間体構造は、容易に現われ、ここで直線状の尻尾は、暗いスポットとくっついて見られて、特定の分子伸張を表す。

【０２６３】

１８．実施例１８

サンプルのウイルス量は、核酸計数により測定される。計数された核酸からの、開始サンプルウイルス量濃度を相関させる多数の例は、以下の値：

１.ビリオン溶解効率	９９％
２.サンプル体積	２００μｌ
３.核酸捕捉効率	８５％
４.核酸標識効率	９５％
５.核酸検出効率	９９％
６.検出された膜割合(％)	２５％
７.システム線形性	９５％

に基きうる。

アッセイの間、膜分析の画像は、１,０００の検出された別個の標識された核酸を示しうる。パラメーター７で開始し、そして後ろから薦めると、１０００の検出された別個の核酸は、システムの線形性のため、１,０５３(１０００／０.９５)個の実際の核酸に一致する。つまり、検出器は、確かな濃度で全ての核酸を正確には計数できない。全体の膜ろ過の２５％のみが画像化されるので、１０５３個の核酸は、サンプル由来の全てのフィルター上の核酸４２１２個(１０５３／０.２５)を表す。さらに、核酸のある割合のみが、別の理由から検出されうるので、及びある割合の核酸のみが標識されて検出を可能にする。従って、４２１２個の核酸は、フィルター上の存在する４４７８個(４２１２／０.９９×０.９５)の核酸が、フィルター上に存在した。フィルター上の４,４７８個の核酸は、実際フィルターを通して流れた核酸５２６９個(４,４７８／０.８５)個の核酸を実際あらわす。なぜなら、８５％のそうした核酸のみが、フィルター上に実際保持されるからである。フィルターをとおして流された５２６９個の核酸は２００μｌの開始サンプル由来であり、つまり１０５３８(５２６９／０.２ｍｌ)個の核酸／ｍｌ(サンプル)の濃度由来である。最終的に、溶解条件は、標的ビリオンから標的核酸を９５％の効率で産生することが知られている。従って計算された１０５３８個の核酸／ｍｌは、１０６４４(１０５３８／０.９９)個の患者サンプルの１ｍｌにおける実際のビリオンを表す。

【０２６４】

１９．実施例１９

０.２ミクロンの４７ミリメートルの直径のアノポア膜を以下のように色素で改変した：

３ｍｌのＥＤＡＰＳ(エチレンジアミノプロピル・トリメトキシシラン)を２７ｍｌの高純度の水へと混合して溶解した。該溶液を２５ｍｍの直径のアノトップ・フィルター(Whatman, ０.２ミクロン)を通してろ過して、全ての不純物、ゲル化された試薬、沈殿などを取り除いた。乾燥アノポア膜を、次にろ過溶液中で完全に浸した。浸された膜を含む溶液を、軽く超音波処理し、次に吸引オーブン中に起き、そして空気を吸引して膜が湿るのに役に立つ。５分の全浸潤時間の後、湿った膜を、丁寧に溶液から移して、そして１００ｍｌの高純度水中にゆっくり混合して２回浸潤することにより洗浄して、未結合のシラン試薬を取り除いた。膜を同様に１００ｍｌの５×TE緩衝液中で同様に洗浄して、表面に結合されたアミノ基を中和し、次に再び１００ｍｌの高純度水中で洗浄した。

【０２６５】

湿った膜を吸引下の温めた(１００℃)オーブン中で約３時間、脱水した。乾燥ＥＤＡＰＳ膜を次に新たに調製され、そしてろ過されたアミノ反応性の色素(プロシオンＭＸ(Procion MX、リアクティブ・ブルー４(Reactive Blue４)、ＤＴＡＦなど)の溶液であって、約０.５ｇの色素を５０ｍｌの高純度水中に含んだ溶液中に浸潤した。気泡を超音波処理及び吸引により取り除いた。膜を室温で約４時間色素溶液中にとどめた。暗く染色された膜を素早く高純度水で洗浄し、次に乾燥された。染色された乾燥膜は、親水性であり、そして簡単に水をろ過する。

【０２６６】

２０．実施例２０

０.２ミクロンの直径４７ｍｍのアノポア膜を、以下のように、カーボンブラック光学的なピグメントを取り込むことにより改変した：約０.２ｇのカーボンブラック(Raven ５０００ Ultra ２, Columbian Chemicals, Inc.)は、界面活性剤であるトウィーン２０を約２％含む高純度水１ｍｌ中へと機械的に分散された。得られた黒色ピグメント分実機を、膜表面に適用して、数分間沈殿させ、次に水で膜から洗浄された。得られた黒色膜は、光学的に不透明であり、そしていくらか疎水性であるが、水をろ過することができる。

【０２６７】

２１．実施例２１

アノポア膜を以下のように無電解金属沈殿物により光学的に改変した：無電解沈殿に適した金属合金は、当該技術分野に周知であり、そしてニッケル、リン、ホウ素、金、パラジウム、銀などを含んだ。メタライゼーションは、光学改変が行われ、一方液体ろ過性質

が保たれることを可能にするように制御されなければならない。アノポア膜上のメタライゼーション方法は、一般的に２個の方法である；

活性化－アノポアは、一般的にメタライゼーション溶液と非反応性である。従って、膜は、メタライゼーションの前にパラジウムを取り込むことにより活性化される。これは以下のように達成された。

【０２６８】

塩化パラジウムを、攪拌及び穏やかに熱することにより、終濃度５ｍｇ/ｍｌでジメチルスルホキシド(ＤＭＳＯ)中に溶解した。０.５ｍｌの塩化パラジウム/ＤＭＳＯ溶液を、４９.５ｍｌのアセトン中に溶解した(１％溶液)。乾燥アノポア膜を、１～２分間塩化パラジウム/ＤＭＳＯ/アセトン溶液に十分浸潤し、次に取り出した。ぶら下がった水滴を膜表面から取り除き、次に膜を完全に風乾させた。アセトン/ＤＭＳＯを素早く取り除き、そして塩化パラジウムを沈殿させるために、アセトンで湿った膜をジエチルエーテル中に浸すことが、行われうる。さらに、水は、希釈剤としてアセトンの代わりになりうる。この場合、アセトンは、ジエチルエーテルの代わりに使用されて、素早く膜を脱水し、そして塩化パラジウムを沈殿する。粒子の均一な分散として膜内に存在する塩化パラジウムは、電気的メタライゼーションの前に既知の還元剤、例えば水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミノボラン、次亜リン酸ナトリウムなどで反応することにより、金属パラジウムへと化学的に還元されなければならない。多くの場合では、これは、最後のメタライゼーション反応中で行われる。ここで、パラジウム塩は、大量の金属の沈積の前に、メタライゼーション・バス還元試薬により、触媒性金属へと還元される。

【０２６９】

メタライゼーション　-　無電解メタライゼーション用に多くの剤形が存在する。例えば、無電解金属合金であって、リン又はホウ素を合金試薬として含む合金が広く知られている。両方ともが、最初に光学的に黒色の沈積(「黒色ニッケル」)を形成し、そして、本明細書中に使用される実施態様中で有用である。

【０２７０】

黒色ニッケル/リンピグメント沈積物は、塩化パラジウム活性化アノポア膜を、３０ｇ/ｌの塩化ニッケル、１０ｇ/ｌの次亜リン酸ナトリウム、５０ｇ/ｌの塩化アンモニウムを含む、ｐＨ８～１０、浴温度９０℃の溶液中に浸すことにより形成される。浸す際、アノポア膜は、ゆっくり茶色になり次に黒色になる。約５分のうちに、膜は、３.０超の光学的吸光度を有する完全な黒色になる。これらの黒色ニッケル/リン膜は、かすかに未改変アノポアよりも親水性が少ないが、ろ過のための高い水の流速を保持する。

【０２７１】

黒色ニッケル/ホウ素ピグメント沈積物は、塩化パラジウム活性化アノポア膜を、２５ｇ/ｌ硫酸ニッケル、１５ｇ/ｌの酢酸ナトリウム、４ｇ/ｌのジメチルアミノボランを含むｐＨ５.９、室温の溶液中に浸すことにより形成された。この反応は、ニッケル/リンシステムに記載されるように実質的に先行した。両方の場合において、膜は最初に黒色になるが、最終的には(１０+分)金属及び非多孔質になる。なぜなら、ニッケル合金が、孔及び該表面に沈積しつづけるからである。図４２は、黒色ニッケル/ホウ素沈積物を含むように、実施例２１に従って改変されたアノポア膜の内部の電子顕微鏡画像である。見られるように、金属の沈積は、格別に小さく、単離された粒子であり、そして材料的に膜の流れの性質に影響するようには見えない。

【０２７２】

図４１は、３種の有機色素改変されたアノポア膜、並びに実施例１９及び２１に従って膜上に沈積されたニッケル-リンを有するアノポア膜(沈積されたピグメント膜)についての波長に対する光学的吸光度を示す。

【０２７３】

図４２は、実施例２１において記載された方法により製造された改変アノポア膜の内部の電子顕微鏡写真である。明るいスポットは、実施例２１に従って沈積されたニッケル-ホウ素合金のピグメント包含物である。表６は、プレーンアノポア膜、３の有機色素で改

変された膜、及び沈積されたピグメント膜についての膜自己蛍光結果を示す。データーを図１４に示される特注設計の暗視野上面蛍光光度計で取得した。有機色素膜は、実施例１９に従って、プロシオンＭＸ・ジェットブラック、リアクティブ・ブルー４、又はプロシオンＭＸレッドで改変され、そして沈積ピグメント膜は、黒色ニッケル/リンを取り込むことにより、実施例２１に従って改変された。０.２ミクロンの直径を有する黄色蛍光ポリスチレンビーズ(Molecular Probes, Inc)を、膜に対して画像化し、そして真のビーズ蛍光を測定した。バックグラウンドのシグナルも計測した。このデーターは、非蛍光有機色素又は沈積されたピグメントを有するアノポア膜の自己蛍光が実質的に低減することを示す。

【０２７４】

【表６】

表６

膜改変	0.2ミクロンビーズ 黄色蛍光	訂正された 膜シグナル	ビーズ／膜 シグナル比
未改変膜	660,000	81,250	8.123
黒色ピグメント膜	320,000	500	640
有機黒色膜	270,000	20,500	13.17
有機青色膜	290,000	10,500	27.62
有機赤色膜	280,000	18,000	15.55

【０２７５】

表７は、プレーン並びに前に記載された黒色ピグメント(ニッケル/リン)アノポアについてのＮＳＢの検出性の低下の結果を示す。２の実施例が示される。１列目は、蛍光タンパク質ＮＳＢの検出性低下のデーターを示す。蛍光タンパク質溶液は、以下：

１００ｎＭ　Ｒ-フィコエリトリン(Molecular Probes, Inc)
１×ＴＥ緩衝液(１０ｍＭトリス、１ｍＭ・ＥＤＴＡ、ｐＨ８.０)
１％ＢＳＡ

を含んで調製された。

【０２７６】

４０μｌの上記Ｒ-フィコエリトリン溶液を、直径０.１５０インチの流量範囲の改変及び未改変０.２ミクロンアノポア膜を通してろ過し、次に４０μｌの１％ＢＳＡ-１×ＴＥ緩衝液で洗浄し、次に２００μｌのプレーン１×ＴＥ緩衝液で洗浄した。蛍光計測を、５０ｎｍの帯域通過により５９５ｎｍの中心波長に変換された照射フィルターを伴う図９の装置上で行なった。

【０２７７】

２列目は、蛍光ビーズのＮＳＢの検出低下についてのデーターを示す。これは、蛍光Ｒ-フィコエリトリン溶液を０.０２ミクロンの黄色蛍光マイクロビーズ溶液(Molecular Probes, Inc,１％の固体ストック溶液の７４８倍希釈、１％ＢＳＡ１×ＴＥ緩衝液中の１０ｎＭ等量のビーズ濃度)に置き換えれば、方法及び試薬の点で１列目と同じである。蛍光計測を図９の装置上で行った。両方の例は、非特異的結合物質から検出された蛍光の低下を示した。

【０２７８】

【表７】

表７

NSB種	未改変0.2 ミクロンアノポア	黒色ピグメント改変0.2 ミクロンアノポア	NSB検出比 未改変／改変
タンパク質	6,400	48	133
0.02ミクロン・ビーズ	255,000	858	297

*蛍光データーは膜の自己蛍光について訂正される。

【０２７９】
ピグメント改変された膜は、ＮＳＢ低減、分子捕捉、共有結合などの有用な表面特性を与えるために、プレーン膜について前に記載されたようにシラン化反応によってさらに改変されうる。

【０２８０】
２２．実施例２２

酵素結合蛍光(ＥＬＦ)による核酸検出及び定量は、以下のように行われうる。

２０の相補的にビオチン化されたオリゴヌクレオチドプローブは、ラムダファージＤＮＡに対して特注されて合成された。これらのプローブは、各々１０プローブを有する２つの群として標的ＤＮＡに特異的に結合された。各群におけるプローブは、約２００の塩基対の典型的な間隔で結合するように設計された。これは、ラムダＤＮＡターゲット上の高いプローブ結合密度の２の領域をもたらした。ラムダＤＮＡが完全に直鎖であるなら、各領域における１０のプローブが、約０.６ミクロンの長さに含まれるということを計算が示した。この２つの領域が、約２５０００塩基対、又は完全な直鎖の場合７～８ミクロンにより分離された。

ラムダＤＮＡを、以下に記すように上記プローブに前以ってハイブリダイズさせた：

１μｌの精製ラムダファージＤＮＡ(５００μｇ/ｍｌ)を、４ｍＭ・$MgCl_2$及び２００ｎＭの各２０の上記プローブを含む４９９μｌのＰＣＲファーストスタート緩衝液(Ｒｏｃｈｅ)中に加えた。この混合液を９５℃で１０分間熱し、冷却して５６度で５分間おき、冷却して３７℃で２分間置き、次に室温まで冷却した。未反応性のプローブを、キアゲンＰＣＲクローン・アップキットで製品説明書に従い取り除いた。２０個のハイブリダイゼーションされたビオチン化プローブを含む最終ラムダＤＮＡを、ＴＥ緩衝液中で１μｇ/ｍｌに希釈し、そして-２０℃で冷凍した。

【０２８１】
標識されたラムダＤＮＡを以下のように可視化した。

【０２８２】
ニッケル・ホウ素改変されたアノポア膜を、実施例２１に従って製造し、そして図１８ａに示されるように、１２個の個々のウェルを伴うアッセンブリへと構成した。このアッセンブリを、アノポア膜に対してしっかりシーリングすることにより、吸引ろ過を可能にする単純吸引ハウジング中に配置した。２０μｌの１：２００希釈のＴＥ緩衝液中の上記前以ってハイブリダイゼーションされたラムダＤＮＡを、幾つかのウェル中にろ過し、一方２０μｌのプレーンＴＥ緩衝液を異なるウェル中にろ過した。１０μｌのＴＢＴ緩衝液(１０ｍＭ・トリス、１００ｍＭ・ＮａＣｌ、１％ＢＳＡ、０.１％トゥィーン-２０、ｐＨ７.８)を全てのウェルを通してろ過し、次に、１０μｌのさらなるＴＢＴ緩衝液を加え、そして全てのウェルで５分間インキュベーションして、改変アノポア膜上に結合する非特異タンパク質の効果を抑制した。ＴＢＴインキュベーション溶液をろ過し、次にフィルターアッセンブリを、吸引ハウジングから取り出し、次にアノポア膜をカバーするパラ

フィルムを再設置した。該パラフィルムは、アノポア・フィルターを密閉して、次のステップの間液体の流れを妨げた。ＴＢＴ緩衝液中の１：５０希釈の１０μｌストレプトアビジン-アルカリ・ホスファターゼ(ＳＡＰ、molecular Probesのin situハイブリダイゼーション用ＥＬＦキット)を各ウェル中に加え、そして室温で１５分間インキュベーションした。ウェルを吸入して乾燥させ、１０μｌのTBT緩衝液を各ウェルへと加え、次に再び吸入して乾燥させ、次に１０μｌの洗浄緩衝液(Molecular Probes ＥＬＦキット)を加え、再び乾燥するまで吸入した。フィルター・アッセンブリを吸引ハウジングから取り出し、そしてパラフィルムを取り除いた。アッセンブリを次に吸引ハウジング中に再設置した。１００μｌの洗浄緩衝液を、各ウェルをとおして乾燥するまでろ過した。モルキュラー・プローブ・キットに付属の説明書に従って調整された１０μｌのＥＬＦ基質を、各ウェルに加え、そして規定の時間インキュベーションした。簡潔に説明すると、ＥＬＦ基質は、ろ過された現像緩衝液中の基質試薬の１：１０希釈液であった。２の更なる試薬ろ過ののちに加えられ、各々は１：１０００希釈であった。これらの各試薬及び緩衝液は、Molecular Probesが独自に開発した物であり、そしてＥＬＦキット中に含まれる。

【０２８３】

規定の時間のＥＬＦ現像インキュベーションの後に、各ウェルは、１０μｌの洗浄緩衝液で洗われ、そして吸引され、続いて１０μｌの蒸留水で洗浄され、吸引された。ウェルを、名目上３６５ｎｍで照射することを可能にする適切なフィルターを備える水銀励起源小型アーク灯、並びに５２７ｎｍにセットされた検出フィルターで、図９において示される検出器上で可視化した。

【０２８４】

この例の結果を、図６に示し、これは明らかに、局在されたＤＮＡを含むウェルとＤＮＡを含まないウェルとの間における現像されたＥＬＦシグナルの違いを示した。さらに、ＥＬＦインキュベーションの時間効果は、前に記載されたように明らかに目に見えた。

【０２８５】

本出願を通して、様々な文献が参照される。これらの参考文献の開示は、その全体を、より完全に本明細書中に記載される化合物、組成物、及び方法を記載するために、本出願中に援用される。

【０２８６】

様々な改変及び変化は、本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品に行われうる。本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品の別の態様は、本明細書及び本明細書中に開示される微小孔物質、方法、及び物品の慣用技術を考慮に入れることから明らかであるだろう。明細書及び実施例は、例示として考えられるということが意図される。

【０２８７】

本出願に含まれそして本出願の一部を構成する添付の図面は、以下に記載される幾つかの態様を記載する。これらの図面は、本明細書中に記載される微小孔物質、物品、及び方法の典型的な実施態様のみを記載するのみであり、そしてそれゆえその範囲を制限するものと考えるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【０２８８】

【図１】図１ａは、微小孔物質の上面図である。図１ｂは、微小孔物質の断面図を示す。

【図２】図２ａ及び２ｂは、微小孔物質の表面付近における被分析物の局在を示す。

【図３】図３は、局在化した被分析物に対する蛍光に基くビーズ・トレーサー過程を示す。

【図４】図４は、局在化被分析物の検出のための酵素結合蛍光の使用を示す。

【図５】図５は、本明細書中に記載される技術を使用する典型的なＥＬＦ過程のタイミングのグラフを示す。

【図６】図６は、蛍光スポット・カウント対核酸計数時間を表すグラフである。

【図７】図７ａ-７ｃは、改変された微小孔物質及び反応割合を高めるためのそれらの使

用を図示する。
【図８】図８は、局在された被分析物の検出用装置を図示する。
【図９】図９は、局在された被分析物の別の検出用装置を図示する。
【図１０】図１０は、局在された被分析物の別の検出用装置を図示する。
【図１１】図１１は、ニッケル/ホウ素アノポア(Anopore)表面上に局在し、そしてサイバー・ゴールド色素で染色されたヒト・ゲノムＤＮＡを示す。
【図１２】図１２ａ-１２ｈは、ＹＯＹＯ-１標識されたコウシ胸腺ＤＮＡであって、光学的に検出されたＤＮＡの処理された反転画像を図示する。
【図１３】図１３は、未校正の核酸カウント(ＮＡＣ)アッセイの較正曲線のグラフを示す。
【図１４】図１４は、核酸濃度に関して校正後の核酸カウントを示すグラフである。
【図１５】図１５は、被分析物の局在化のためのろ過装置を図示する。
【図１６ａ】図１６は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図１６ｂ－ｃ】図１６は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図１７】図１７は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図１８】図１８は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図１９】図１９は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図２０】図２０は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図２１】図２１は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図２２】図２２は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図２３】図２３は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図２４ａ】図２４ａ及び図２４ｂは、未変性、ジオール(酸加水分解されたグリシドオキシプロピルトリメトキシシラン)改変、及びアミン(アミノプロピルトリメトキシシラン)改変０.２ミクロン・アノポア膜についての核酸保持割合 対 ＮａＣｌ濃度のグラフである。
【図２４ｂ】図２４ａ及び図２４ｂは、未改変、ジオール(酸加水分解されたグリシドオキシプロピルトリメトキシシラン)改変、及びアミン(アミノプロピルトリメトキシシラン)改変０.２ミクロン・アノポア膜についての核酸保持割合 対 ＮａＣｌ濃度のグラフである。
【図２５ａ】図２５ａ及び２５ｂは、未改変、アノポア膜についての核酸保持割合 対 塩濃度(カオトロピック及びＮａＣｌ)のグラフである。
【図２５ｂ】図２５ａ及び２５ｂは、未改変、アノポア膜についての核酸保持割合 対 塩濃度(カオトロピック及びＮａＣｌ)のグラフである。
【図２６】図２６は、未改変、ジオール改変、アミン(ＡＰＳ)改変の０.２ミクロンアノポア膜についての核酸保持割合-対-ｐＨのグラフである。
【図２７】図２７は、１ｍＭ・トリス緩衝液ｐＨ８.０でＮａＣｌが変化する際の未改変アノポア膜上の核酸保持性質を示すグラフである。
【図２８】図２８は、１ｍＭ・トリス緩衝液ｐＨ８.０でＮａＣｌが変化する際のアミン(ＡＰＳ)改変アノポア膜上の核酸保持性質を示すグラフである。
【図２９】図２９は、１ｍＭ・トリス緩衝液ｐＨ８.０でＮａＣｌが変化する際のジオール改変アノポア膜上の核酸保持性質を示すグラフである。
【図３０】図３０は、未改変及びアミンについて、核酸保持又は溶出に関するリン酸緩衝濃度の効果を示すグラフである。
【図３１】図３１は、脳脊髄液(ＣＳＦ)、ヒト血清、及び全血についてのサンプル消化/ろ過試験の棒グラフである。
【図３２】図３２は、全血サンプル中に含まれる局在化ゲノムＤＮＡ上に存在するβグロビン標的領域のＰＣＲ増幅により作られた単位複製配列を示す電気泳動ゲルの写真である。
【図３３】図３３は、溶解された血からの核酸を、βグロビンＰＣＲ増幅/検出についてのリアルタイム増幅曲線である。

【図３４】図３４は、溶解された血液から得た核酸のβグロビン単位複製配列の融解曲線を示す。
【図３５】図３５は、５の検出条件についてのスキャン時間-対-スポット寸法のグラフである。
【図３６】図３６は、様々なスポット規模での１００個の色素分子/核酸の条件と２～５００シグナル-対-ノイズ比(ＳＮＲ)についてのグラフである。
【図３７】図３７は、様々なスポット規模での１００個の色素分子/核酸の条件と２～１００ＳＮＲについてのグラフである。
【図３８】図３８は、様々なスポット規模での２５個の色素分子/核酸の条件と２～５００ＳＮＲについてのグラフである。
【図３９】図３９は、様々なスポット規模での１００個の色素分子/核酸の条件と２～１００ＳＮＲについてのグラフである。
【図４０】図４０は、未改変の孔サイズ０.２ミクロンのアノポア膜フィルター上に局在し、そしてＹＯＹＯ-１色素で染色された４８,５０２塩基対のラムダ・ファージＤＮＡの高拡大反転画像である。
【図４１】図４１は、可視光吸収-対-３種の有機色素に改変されたアノポア膜及びニッケル-リンが付着した膜(付着ピグメント膜)についての波長を示す。
【図４２】図４２は、ニッケル-ホウ素で改変されたアノポア膜の内部の電子顕微鏡写真である。

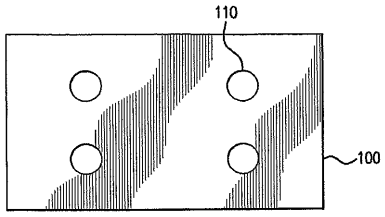


FIG.1a

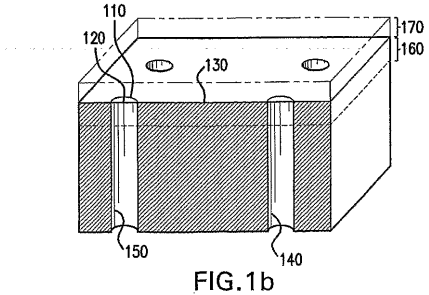


FIG.1b

【図２】

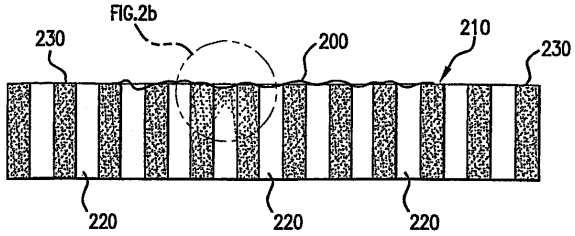


FIG.2a

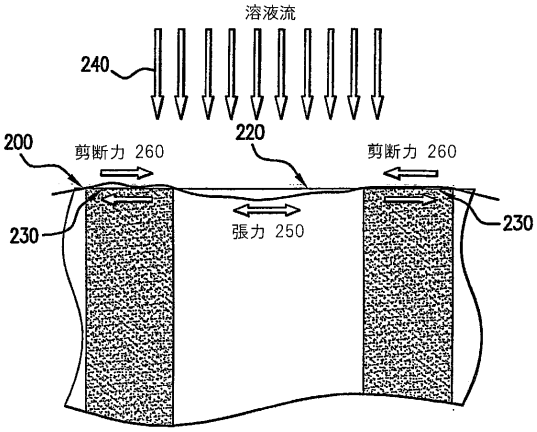


FIG.2b

【図３】

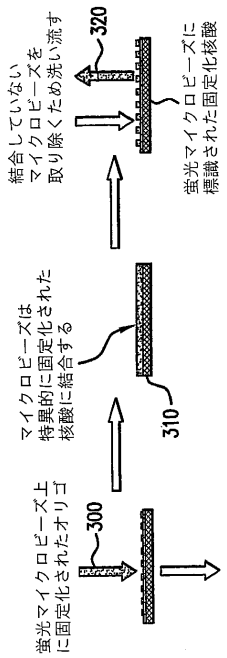


FIG.3

【図４】

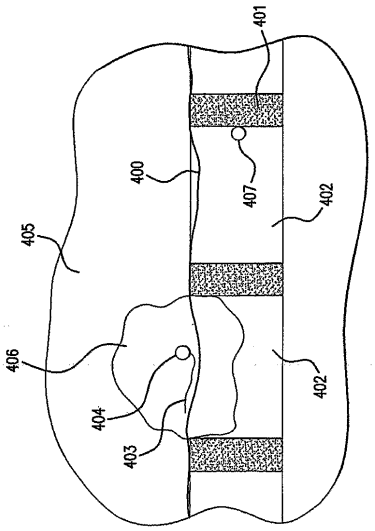


FIG.4

【図５】

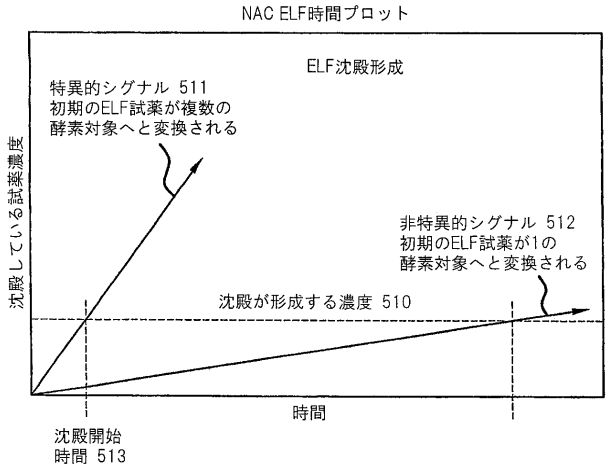


FIG.5

【図６】

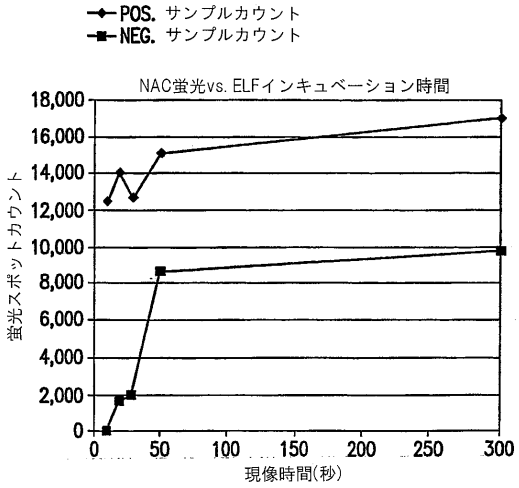


FIG.6

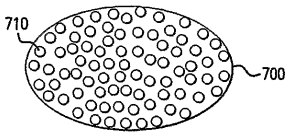


FIG.7a

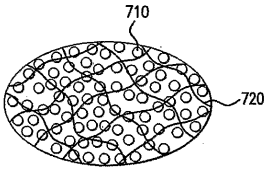


FIG.7b

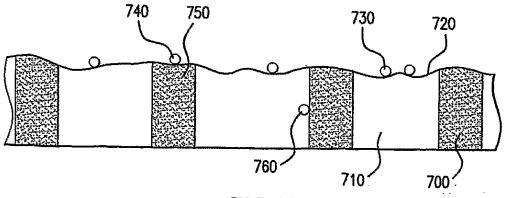


FIG.7c

【図８】

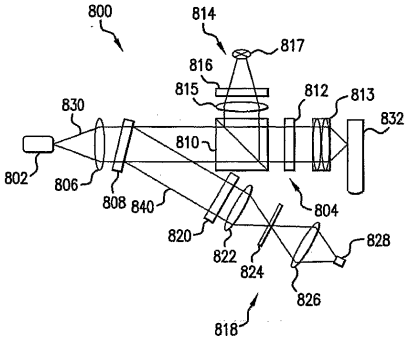


FIG.8

【図９】

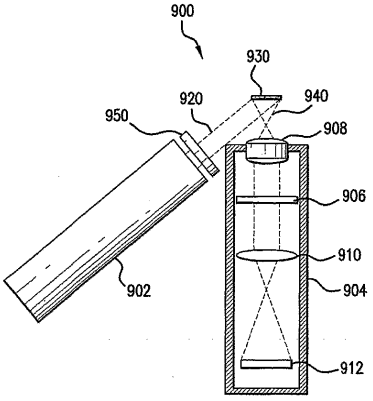


FIG.9

【図１０】

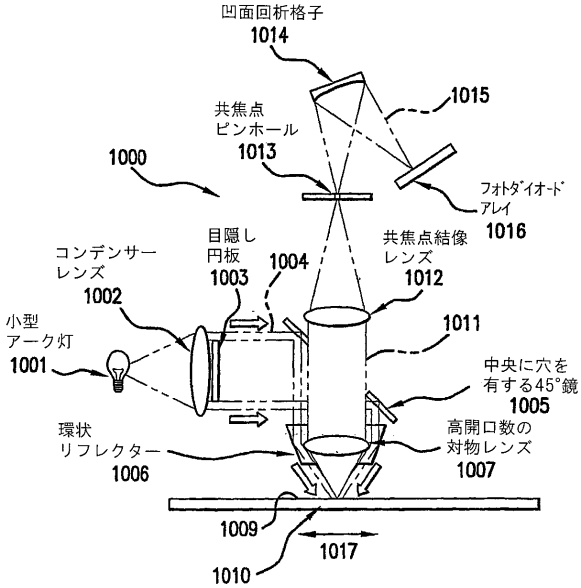


FIG.10

【図１１】

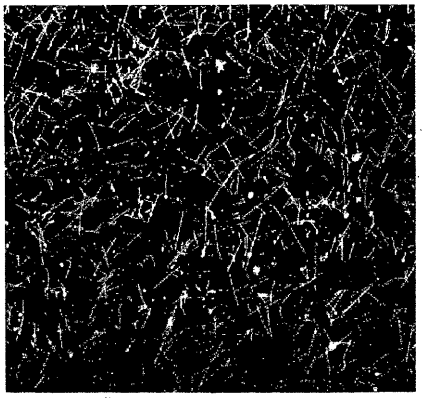
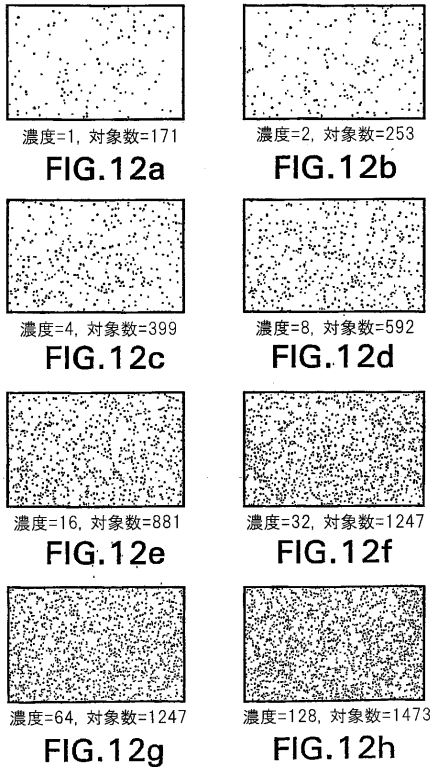


FIG.11

【図１２】



【図１３】

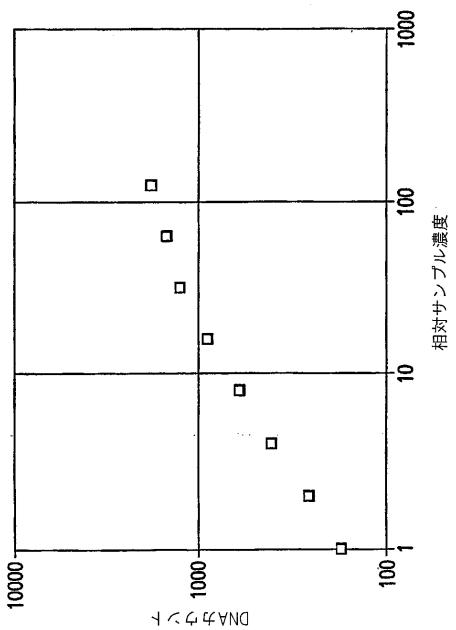


FIG.13

【図１４】

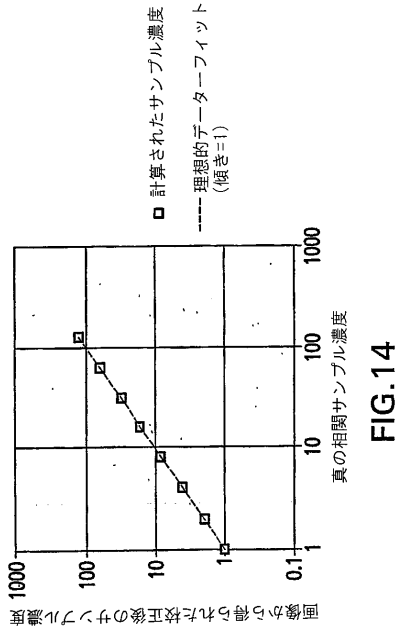


FIG.14

【図１５】

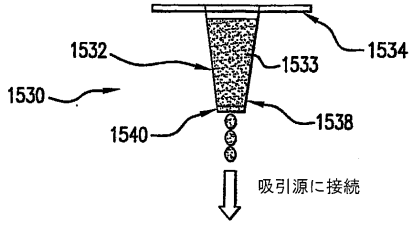


FIG.15a

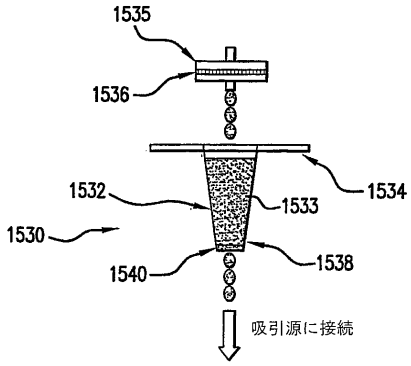


FIG.15b

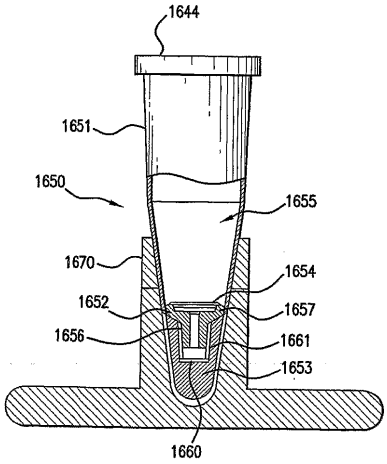


FIG.16a

【図１６ｂ－ｃ】

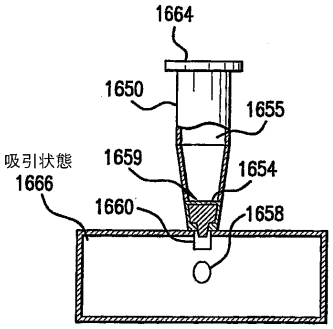


FIG.16b

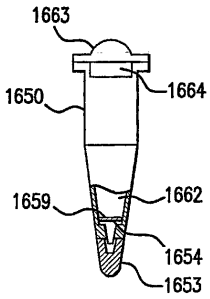


FIG.16c

【図１７】

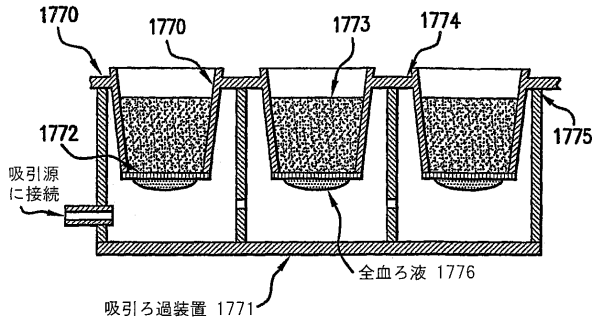


FIG.17a

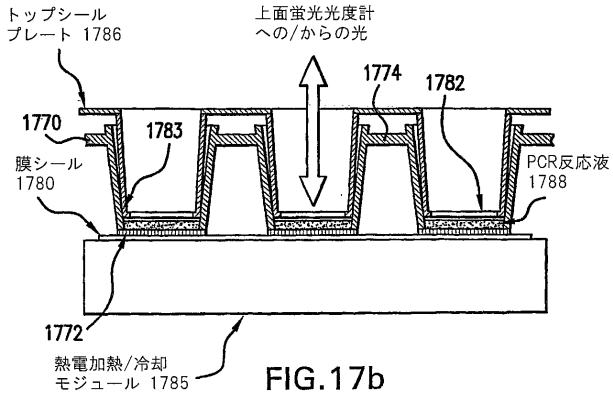


FIG.17b

【図１８】

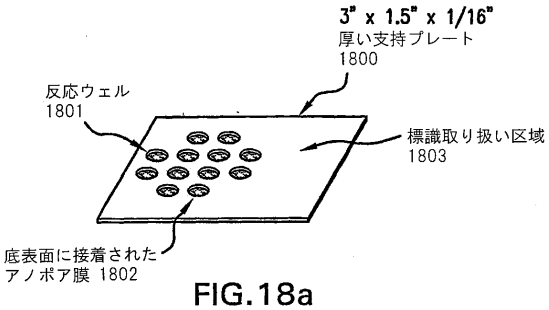


FIG.18a

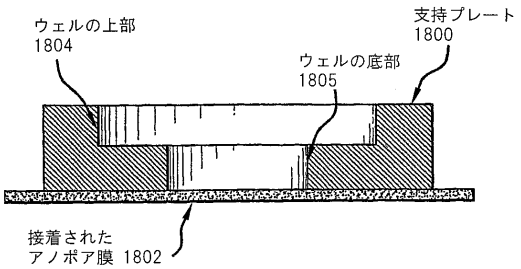


FIG.18b

【図１９】

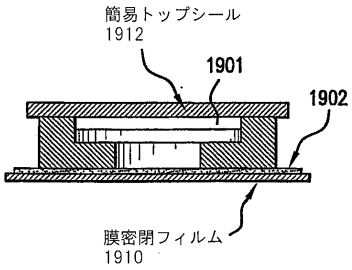


FIG.19a

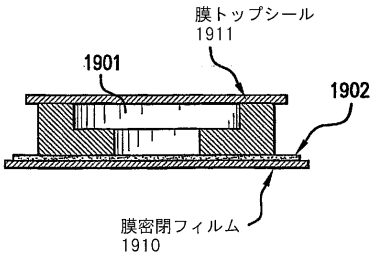


FIG.19b

【図２０】

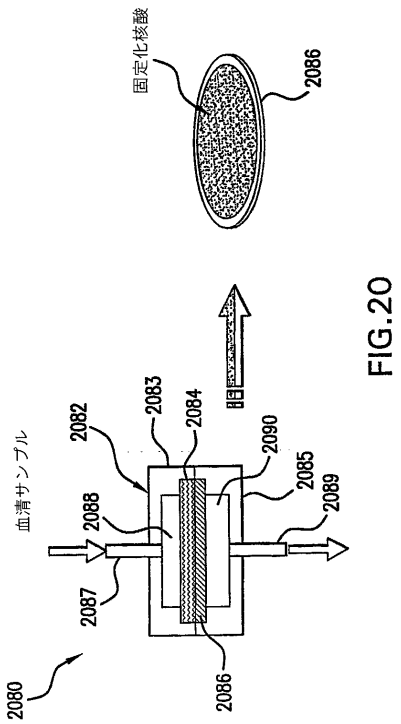


FIG.20

【図２１】

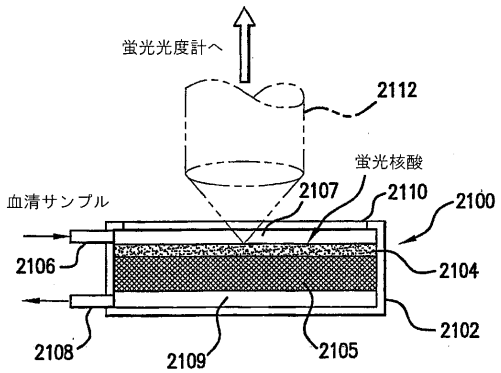


FIG.21

【図２２】

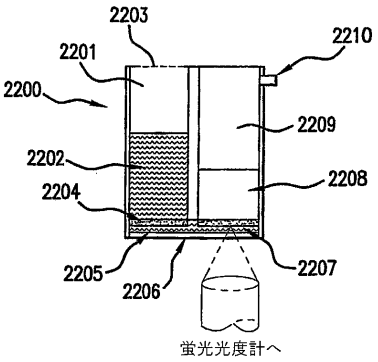


FIG.22

【図２３】

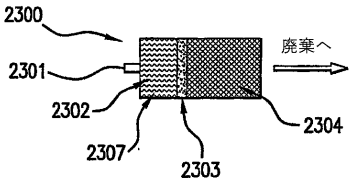


FIG.23a

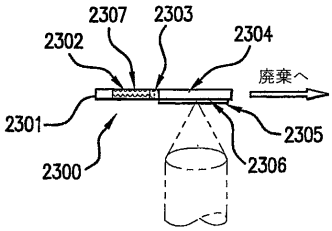


FIG.23b

【図２４ａ】

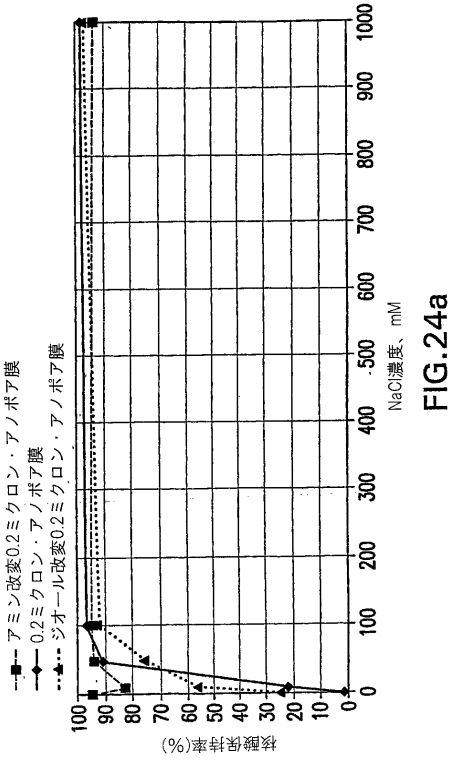


FIG.24a

【図２４ｂ】

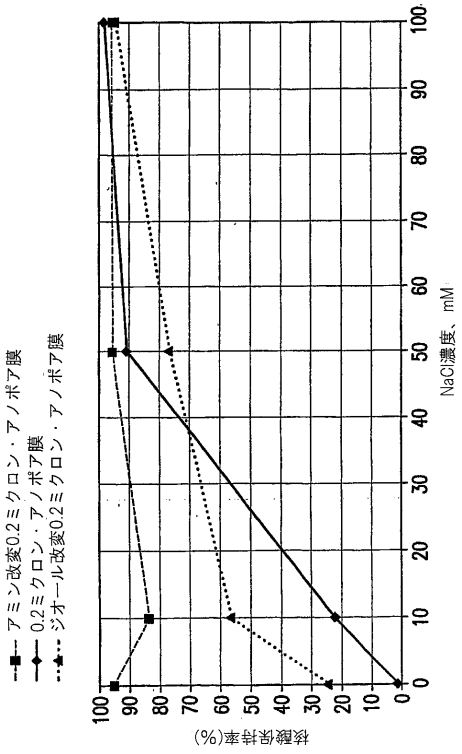


FIG.24b

【図２５ａ】

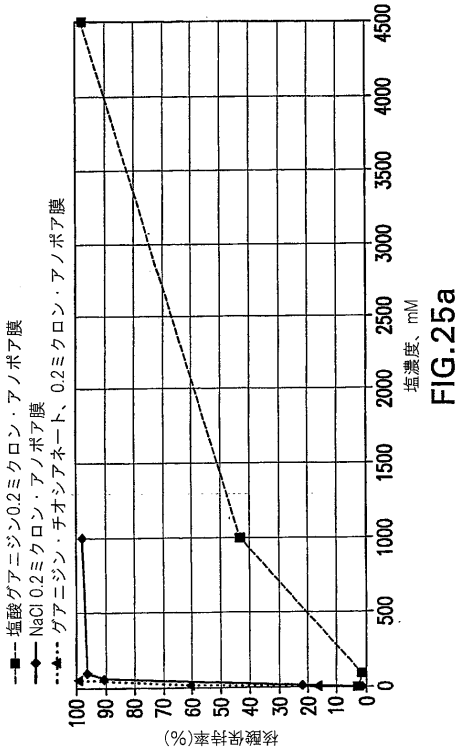


FIG.25a

【図２５ｂ】

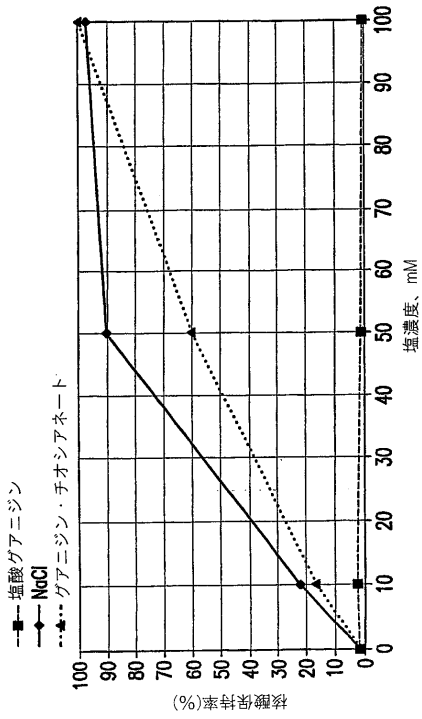


FIG.25b

【図２６】

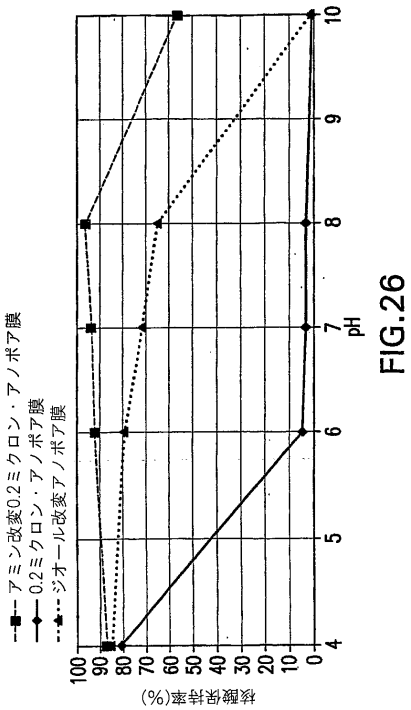


FIG.26

【図２７】

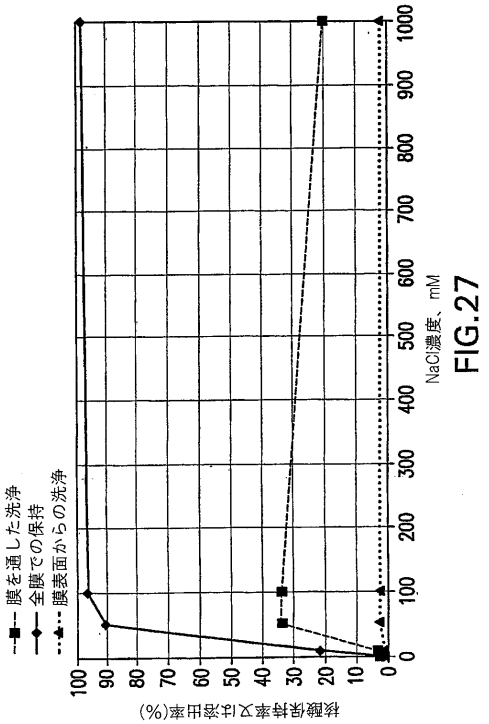


FIG.27

【図２８】

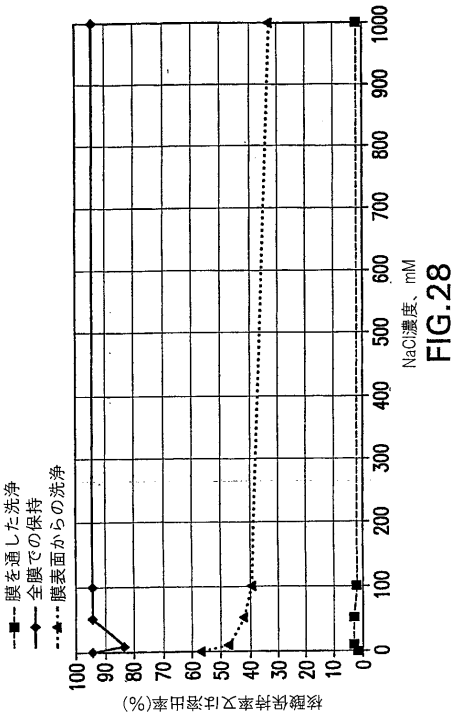


FIG.28

【図２９】

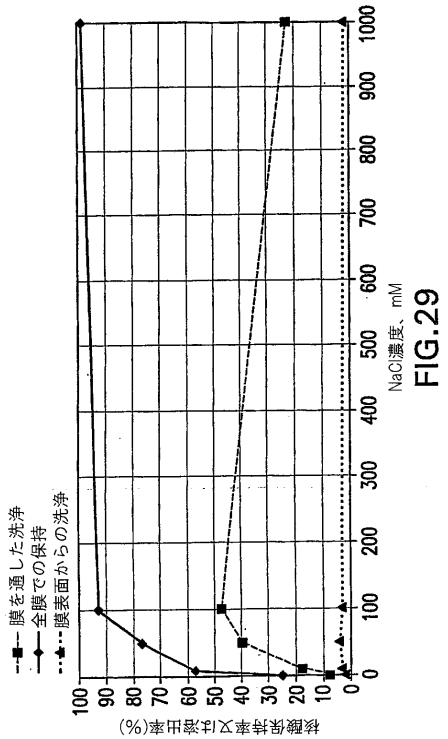


FIG.29

【図３０】

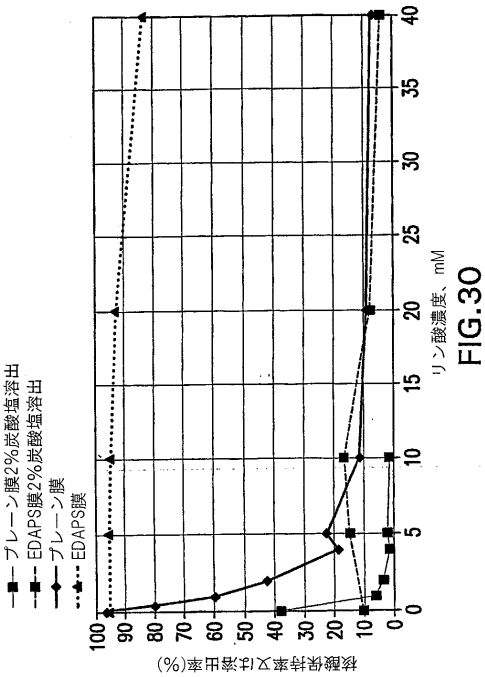


FIG.30

【図３１】

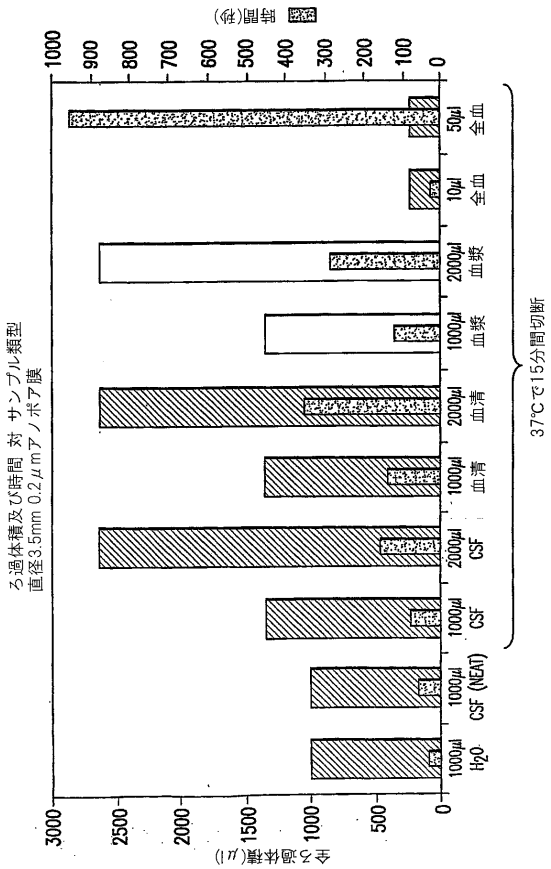


FIG.31

【図３２】

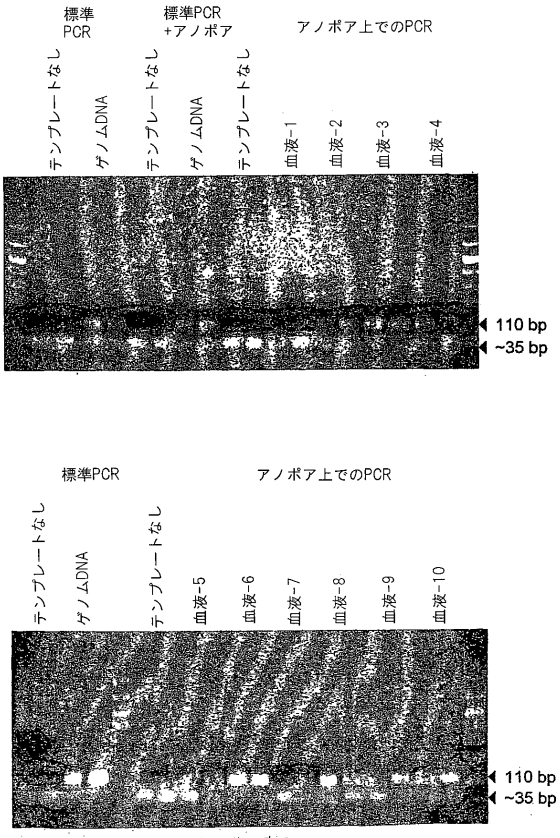


FIG.32

【図３３】

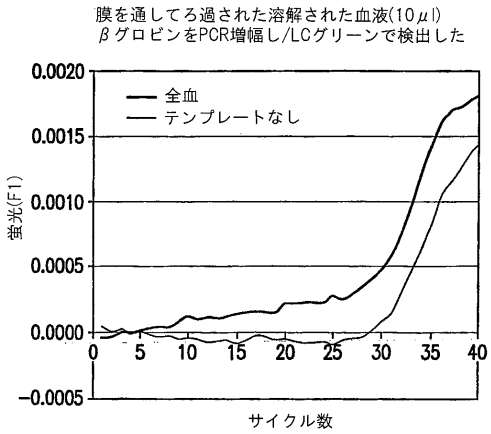


FIG.33

【図３４】

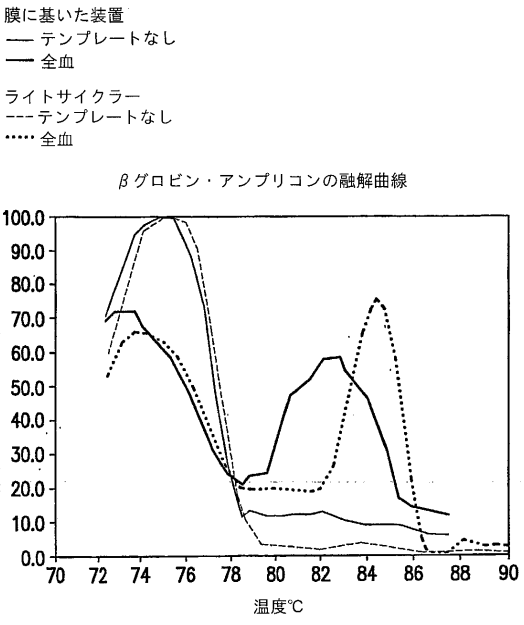


FIG.34

【図３５】

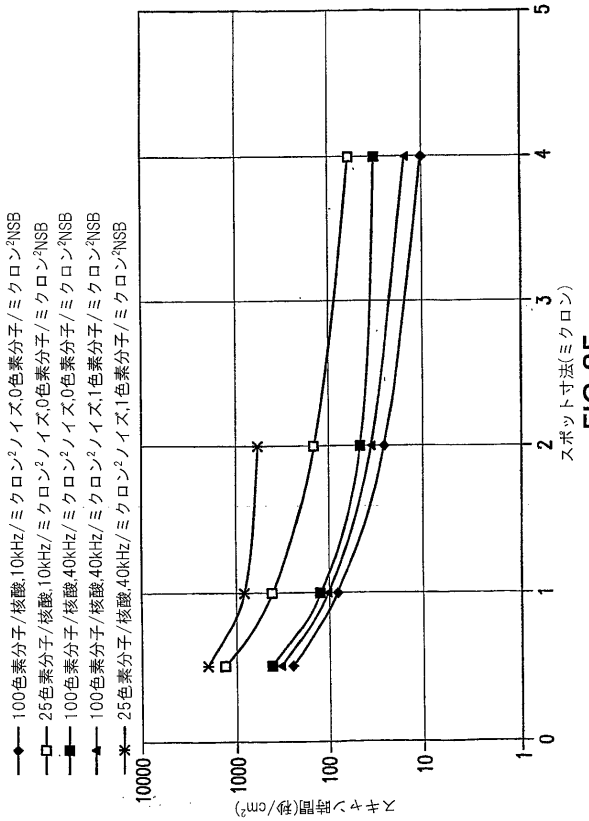


FIG.35

【図３６】

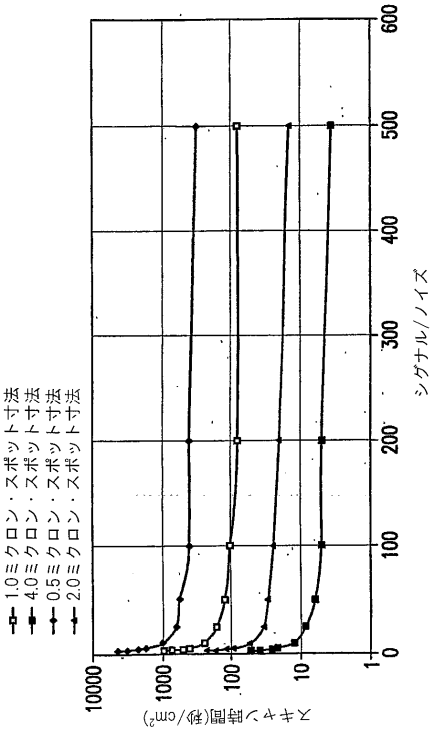


FIG.36

【図３７】

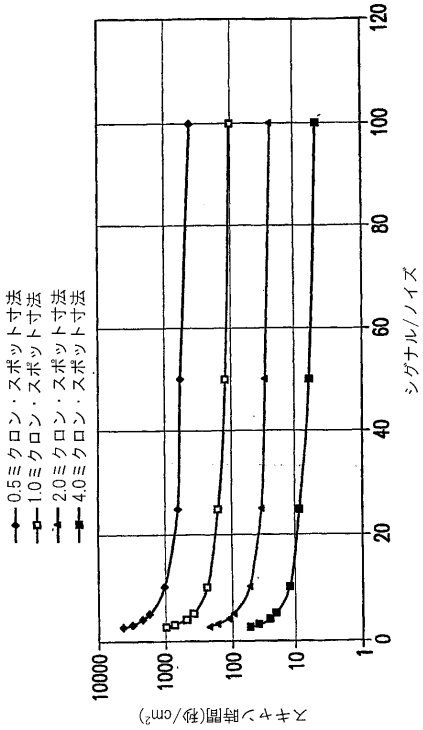


FIG.37

【図３８】

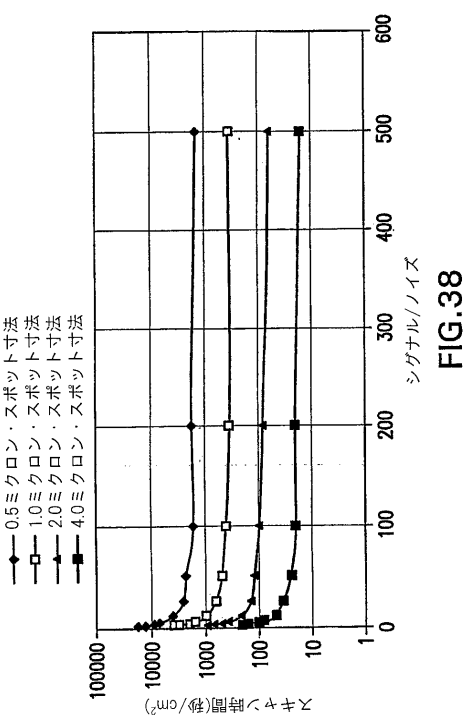


FIG.38

【図３９】

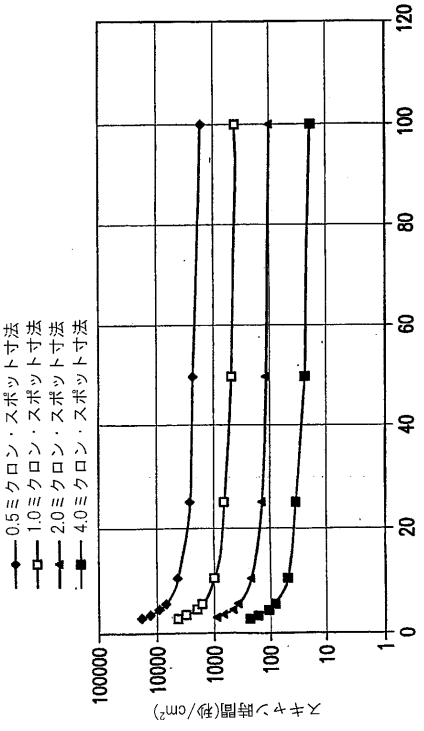


FIG.39

【図４０】

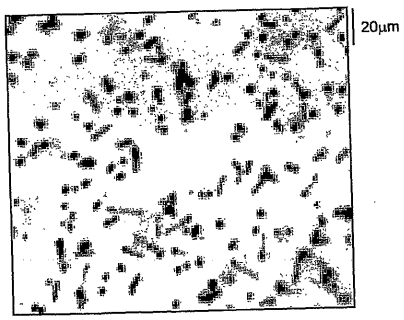


FIG.40

【図４１】

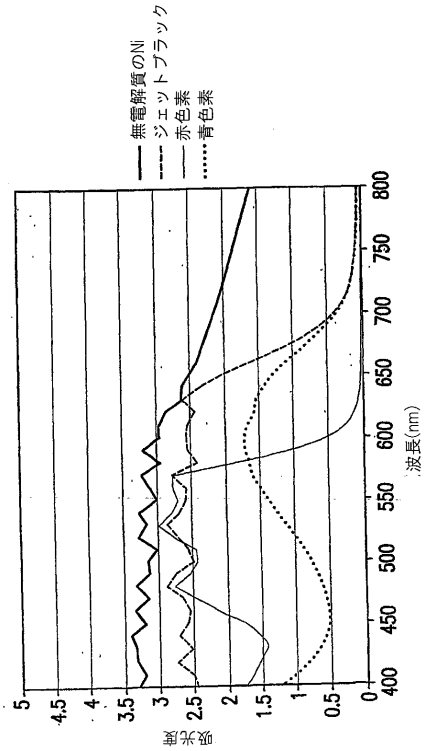


FIG.41

【図４２】

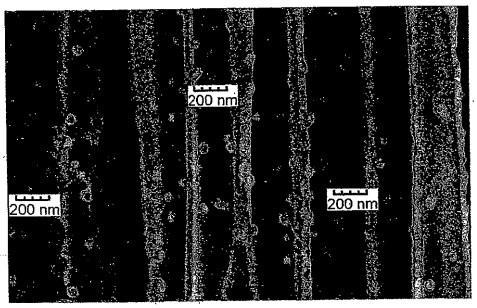


FIG.42

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/37598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 27/26; C12M 1/00; H01B 1/00
US CL : 436/6; 204/400, 403.1, 409; 252/500
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 436/6; 204/400, 403.1, 409; 252/179, 184; 502/158, 401

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3,632,417 (Brason) 4 Jan. 1972 (04.01.1972), column 2, line 73 to column 3, line 1.	1, 12, 14, 23, 25, 27
X	US 6,649,083 B1 (Pinnavaia et al) 18 Nov. 2003 (18.11.2003), column 16, lines 8-33	2-11, 13, 24, 26
Y	US 4,110,079 (Schaeffer et al) 29 Aug. 1978 (29.08.1978), abstract	15-22, 28-131
Y	US 5,643,721 (Spring et al) 1 Jul. 1997 (01.07.1997), abstract	15-22, 28-131
Y	US 4,042,335 (Clement) 16 Aug. 1977 (16.08.1977), column 10, line 66 to column 11, line 40	1-131
Y	US 5,213,964 (Jones) 25 May 1993 (25.05.0993), column 7, line 67 to column 8, line 42.	1-131
Y	US 5,807,756 (Bauman et al) 15 Sep. 1998 (15.09.1998), column 2, lines 7-15; column 14, line 58 to column 15, line 10.	1-131
Y	US 6,428,748 B1 (Wallach) 6 Aug. 2002 (06.08.2002), column 1, lines 48-65.	1-131

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 August 2005 (20.08.2005)

Date of mailing of the international search report
20 SEP 2005

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
Victor S. Chang
Telephone No. 571-272-1414

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/37598

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US03/37598

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1, 12, 14, 23, 25, 27, drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment.

Group II, claims 2-7, 24, 26, drawn to a composite comprising a microporous material and a covalently attached pigment.

Group III, 8-11, 13, claims drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment, the microporous material comprises an inorganic material.

Group IV, claims 15-17, drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment, the pigment comprises an elemental metal, a metal oxide, a metal alloy, or a combination thereof.

Group V, claims 18 and 19, drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment, the microporous material comprises aluminum oxide, the pigment comprises an elemental transition metal.

Group VI, claims 20-22, 118-125, 127, 128, 130, drawn to a modified microporous material.

Group VII, claims 28, 29, drawn to a use of a composite in detection of an analyte.

Group VIII, claim 30, drawn to a use of a composite as a bioreactor.

Group IX, claim 31, drawn to a method of localizing an analyte.

Group X, claim 32, drawn to a method of separating an analyte.

Group XI, claim 33-61, drawn to a method for quantifying an analyte.

Group XII, claims 62 and 63, drawn to a method for amplifying a nucleic acid.

Group XIII, claims 64 and 65, drawn to a method for hybridizing a nucleic acid.

Group XIV, claims 66 and 67, drawn to a method for identifying a nucleic acid.

Group XV, claims 68-78, 126, 129, drawn to a filtration device.

Group XVI, claims 79-117, drawn to a method for separating analytes.

Group XVII, claim 131, drawn to a kit comprising a membrane comprising a microporous membrane.

Additionally, this application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

Species A: a ceramic, a metal, carbon, or glass.
Species B: a metal oxide.
Species C: a pigment comprises an elemental transition metal.
Species D: a pigment comprises a metal oxide.
Species E: a pigment comprises a metal alloy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/37598

Species F: a suspension polymer comprises a nucleic acid.
Species G: a suspension polymer comprises a polysaccharide.
Species H: a suspension polymer comprises a protein.

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

Claims 8-10 (inorganic microporous materials): Species A and B.
Claims 15-17 (pigments): Species C-E.
Claims 20-22, 118-125, 127, 128, 130 (modified microporous materials): Species F-H

The following claim(s) are generic: 1-7, 11-14, 18, 19, 23-117, 126, 129 and 131.

The inventions listed as Groups I-XVII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: It is noted that Group I is extremely broad and in excess of disclosure, for example, it is well known that numerous microporous polymer foam contains pigments for aesthetic purpose, whereas the instant invention is directed to inorganic microporous materials only. Note also as evidence of the state of the art Brasen (US 3632417) which teaches that "Any of the well-known pigments, extender pigments, and dyes can be added to the novel finish composition used to form the novel microporous sheet material of this invention to give the desired color to the product." (column 2, line 73 to column 3, line 1). For Groups II and III, Pinnavania et al. (US 6649083) teaches a microporous inorganic oxide composition containing organic silane linking pore surfaces to a dye composition (column 16, lines 8-33). For groups VI-XVII, Schaeffer et al. (US 4110079) teaches an analytical element for use in the clinical assay of an analyte contained in a biological liquid sample which is applied from an external source to a substantially planar sample receiving suface of the element. The analytical element comprises a porous layer bearing the aforementioned sample receiving surface; at least one dry reagent material for use in the assay; and one or more associated rupturable pod-like member(s) containing a liquid reagent for the assay, such liquid reagent, upon rupture of the pod-like member(s), being released into the element (Abstract); and Spring et al. (US 5643721) teaches an invention which provides an immobilization medium which can immobilize bioreagents to support materials and which dries to a water resistant layer or film. The immobilization medium comprises (i) a liquid or fluid binding reagent and (ii) complexes of a bioreagent immobilized to a solid phase which are evenly dispersed within the binding reagent. The suspension can further include supplemental ingredients evenly dispersed throughout the medium which can provide the medium with electrochemical properties, enhance the stability of the immobilized bioreagent and/or improve the medium's capability of drying to a substantially water resistant or insoluble layer. The immobilization medium provided by the instant invention is in the form of a homogeneous liquid suspension Abstract). As such, each of afore mentioned groups appears to be known art, and does not make a contribution over the prior art. The unity of invention is lacking and restriction is appropriate.

Additionally, the species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: clearly each species has patentably distinct composition.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
G01N 30/74	***(2006.01)***	G01N 30/48	C	
G01N 33/48	***(2006.01)***	G01N 30/48	G	
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N 30/74	F	
G01N 33/566	***(2006.01)***	G01N 33/48	E	
C12N 15/09	***(2006.01)***	G01N 33/53	M	
		G01N 33/566		
		C12N 15/00	F	

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

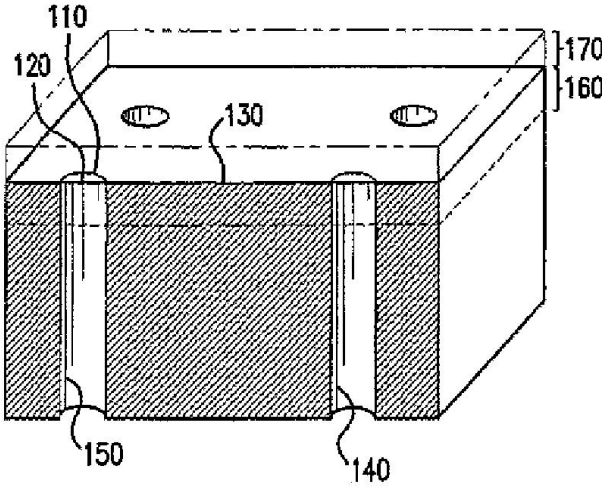
(74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 スミス, ロジャー イー.
アメリカ合衆国, ユタ ８４７３８, アイビンス, ノース ３２５ ウエスト ６１０

Ｆターム(参考) 2G045 BB06 BB51 CA25 CA26 CB01 CB03 CB04 CB07 CB08 CB14
CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 FA11 FB02 FB07 FB12
4B024 AA11 CA01 CA09 HA12
4B029 AA07 BB01 BB15 BB20 CC03 FA01 FA09 FA11 FA12 FA15
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR55 QR82 QS34 QX02

专利名称(译)	用于分析物定位和定量的微孔物质，分析物和物品的定位和定量方法		
公开(公告)号	JP2006511792A	公开(公告)日	2006-04-06
申请号	JP2004555704	申请日	2003-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	犹他大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	犹他州研究基金会大学		
[标]发明人	スミスロジャーイー		
发明人	スミス,ロジャー イー.		
IPC分类号	G01N30/88 C12M1/00 C12M1/40 C12Q1/68 B01J20/281 G01N30/74 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/09 B01D67/00 B01D71/02 B01J19/00 B01L3/00 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 C40B70/00 G01N21/64		
CPC分类号	B01D67/0088 B01D67/0065 B01D67/0093 B01D71/022 B01D71/025 B01J2219/00286 B01J2219/00545 B01J2219/00572 B01J2219/00641 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01L3/50255 B01L2300/0829 B82Y10/00 B82Y30/00 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 C40B70/00 G01N21/6428 G01N33/551 Y10T428/249953 Y10T428/249978 Y10T428/249986		
FI分类号	G01N30/88.E G01N30/88.J C12M1/00.A C12M1/40 C12Q1/68.A G01N30/48.C G01N30/48.G G01N30/74.F G01N33/48.E G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/BB06 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB14 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB07 2G045/FB12 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/BB01 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA01 4B029/FA09 4B029/FA11 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 中村弘 西山雅也		
优先权	60/429093 2002-11-26 US 60/429259 2002-11-26 US		
其他公开文献	JP4824312B2 JP2006511792A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了用于分离流体样品中存在的一种或多种分析物的方法。该方法包括使流体通过具有微孔材料的过滤器，其中分析物位于微孔材料表面附近。一旦分析物定位，可以执行额外的处理步骤，例如杂交和扩增。在一种方法中，一旦分析物被定位，就可以检测，计数和关联分析物，以确定样品中分析物的浓度。还公开了改性的微孔材料和复合材料，其可用于本文所述的任何方法和制品中。该复合材料由微孔材料和颜料组成，其中颜料掺入微孔材料中。颜料改变微孔材料的光学性质，一旦局部化，就增强了分析物的检测。在另一方面，提供了各种试剂盒和制品，例如含有本文所述的任何微孔材料的过滤装置。


110
120
130
170
160
150
140