

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6026570号
(P6026570)

(45) 発行日 平成28年11月16日(2016.11.16)

(24) 登録日 平成28年10月21日(2016.10.21)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 2 1
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 0 1

請求項の数 44 外国語出願 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2015-18327 (P2015-18327)	(73) 特許権者	507109295
(22) 出願日	平成27年2月2日(2015.2.2)		ロスアラモス ナショナル セキュリティ
(62) 分割の表示	特願2011-508502 (P2011-508502)		, エルエルシー
原出願日	平成21年5月5日(2009.5.5)		アメリカ合衆国 ニューメキシコ州 87
(65) 公開番号	特開2015-108637 (P2015-108637A)		545, ロスアラモス, メイル ストップ
(43) 公開日	平成27年6月11日(2015.6.11)		エー187, ロスアラモス ナショナル
審査請求日	平成27年2月13日(2015.2.13)	(74) 代理人	110000659
(31) 優先権主張番号	61/126,645		特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(32) 優先日	平成20年5月5日(2008.5.5)	(72) 発明者	カリ, ロバート, ビー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニューメキシコ州 87
			508, サンタ フェ, ミモサ ロード
			24
		審査官	高山 敏充
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度に単純化された側方流動ベースの核酸サンプル調製および受動的流体流動制御

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプルを処理するためのデバイスであって、
当該デバイスは1つ以上の流路を備えており、その流路は、流体の吸上げ、及び/又は、毛細管流動を支持し得る幾何学的に形作られた吸水性材料を具備してなる、デバイスにおいて、

当該デバイスは更に、
流体サンプル(当該サンプルはターゲットを含む)のアリコートを受容するためのサンプル受容ゾーンと、

前記ターゲットを結合させる及び/又は純化するための第1の捕獲ゾーンと、
前記サンプル受容ゾーンと前記第1の捕獲ゾーンとを結ぶ毛細管流動の流路と、
1つ以上の溶液供給ゾーンと、

を備えており、

前記溶液供給ゾーンの各々は、前記吸水性材料を具備する2つの溶液流路を介して前記毛細管流動の流路又は前記第1の捕獲ゾーンに接続されており、

前記2つの溶液流路は、前記サンプル受容ゾーンの下流において、前記毛細管流動の流路又は前記第1の捕獲ゾーンの両側縁にそれぞれ結合点を形成すると共に、

前記2つの溶液流路の各々は、アッセイ開始時に前記アリコート及び溶液のすべてが加えられた後で、所望の時間ないし順序で、対応する溶液を前記毛細管流動の流路又は前記第1の捕獲ゾーンに搬送するためのものである、ことを特徴とするデバイス。

【請求項 2】

前記吸水性材料が、ニトロセルロース、濾紙、又は、グラスファイバーである、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記第 1 の捕獲ゾーンは、前記ターゲットを結合させるためのリガンド、シリカ、グラスファイバー、及び/又は、ジエチルアミノエチル (DEAE) 膜を備える、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4】

前記サンプル受容ゾーンと前記第 1 の捕獲ゾーンとの間に配置されると共にこれらゾーンと毛細管流動にて接触する第 2 の捕獲ゾーンを更に備えており、

この第 2 の捕獲ゾーンは、前記ターゲットを含んでいる生物学的粒子及び/又は細胞を捕獲するためのものである、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記第 2 の捕獲ゾーンは、免疫 - 捕獲ゾーンである、請求項 4 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記第 2 の捕獲ゾーンは、目的の生物学的粒子または細胞に結合するためのリガンドを備える、請求項 4 に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記リガンドは、抗体、又は、オリゴヌクレオチドである、請求項 6 に記載のデバイス

。

【請求項 8】

前記第 2 の捕獲ゾーンと毛細管流動にて接触する溶解ゾーンを更に備え、

この溶解ゾーンは、生物学的粒子及び/又は細胞の溶解、並びに、そこからの核酸の遊離のためのものである、請求項 4 ~ 7 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記第 1 の捕獲ゾーンと毛細管流動にて接触する 1 つ以上のアッセイゾーンを更に備える、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 10】

前記 1 つ以上のアッセイゾーンは、一緒になってサンドイッチ核酸ハイブリダイゼーションアッセイのための核酸および標識構成成分を形成する、請求項 9 に記載のデバイス。

【請求項 11】

前記第 1 の捕獲ゾーンの下流にあって当該第 1 の捕獲ゾーンと毛細管流動にて接触する核酸増幅ゾーンを更に備える、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 12】

前記ゾーンの 1 つ以上が、前記吸水性材料を備える、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 13】

前記幾何学的に形作られた吸水性材料は、前記ゾーンのうちの少なくとも二つを結合する 1 つ又はそれ以上の流路を形成している、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 14】

前記溶液供給ゾーンのうちのの一つは、洗浄緩衝液、溶解緩衝液、及び、核酸増幅緩衝液からなる群から選択される溶液を含む流体を供給するものである、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 15】

前記ゾーンおよび流路は、前記吸水性材料を含む単一の膜から作られている、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 16】

前記流路の 1 つ以上は、第 2 の材料を備える、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記第2の材料は、セルロースエステル、グラスファイバー、ポリエーテルスルホン、綿、無水ポリアクリルアミド、シリカゲル、又は、ポリエチレングリコールである、請求項16に記載のデバイス。

【請求項 18】

前記吸水性材料の組成、並びにノ又は、前記流路の少なくとも一つの長さ及びノ又は幅は、前記少なくとも一つの流路における流体流動の流速を受動的に制御するように選択されている、請求項1～17のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 19】

前記ターゲットは核酸を含む、請求項1～18のいずれか一項に記載のデバイス。

10

【請求項 20】

前記流路の領域は、増幅インヒビタやその他の望ましくないサンプルマトリクス混入物の活性を除去又は減少するように改修されている、請求項1～19のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 21】

請求項1に記載のデバイスと共に使用するための幾何学的に規定されたストリップであって、吸水性材料を含むストリップ。

【請求項 22】

サンプルを処理する方法であって、当該方法は、
ターゲットを含むサンプルをサンプル受容ゾーンに配置する工程と、
前記サンプルをサンプル受容ゾーンに配置する工程と同時に、1種以上の溶液をそれぞれの溶液供給ゾーンに配置する工程と、

20

流体の吸上げ、及びノ又は、毛細管流動を支持し得る幾何学的に形作られた吸水性材料を経由する流路に沿って、流体の吸上げ、及びノ又は、毛細管流動によって前記ターゲットを捕獲ゾーンに輸送する工程と、

前記ターゲットを、前記捕獲ゾーンの第1のリガンドに結合する工程であって、それによってサンプル中における他の成分に対するターゲットの濃度を増大させる、結合工程と、

前記流路又は前記捕獲ゾーンの両側縁にそれぞれ接続されてなる、各溶液用の分離した2つの流路を経由して、前記1種以上の溶液を、所望の時間で前記捕獲ゾーンに輸送する工程と、

30

を備えており、前記分離した2つの流路の各々は、吸水性材料を含むと共に、前記サンプル受容ゾーンを回避している、ことを特徴とする方法。

【請求項 23】

前記捕獲ゾーンから前記他の成分を除去する工程を更に備える、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記結合工程は、DNAもしくはRNAをシリカもしくはオリゴヌクレオチドと結合すること、又は、核酸、プロテインもしくは低分子の陰イオンもしくは陽イオンで媒介された濃縮のための官能化された基質を提供することを含む、請求項22又は23に記載の方法。

40

【請求項 25】

前記ターゲットは、核酸を含み、
溶解物及びノ又は洗浄緩衝液を、核酸親和性マトリックスと毛細管流動性の材料を介して連結されているところの、緩衝液交換が起きる領域に加えること、そして、直接的に核酸を精製することを更に備える、請求項22～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記溶液の少なくとも一種は、緩衝液であり、
前記吸水性材料は、吸水性材料の所望のゾーンにある別の溶液またはサンプルと、所望の時間で、受動的な緩衝液交換を自動的に行うように構成されている、請求項22に記載

50

の方法。

【請求項 27】

吸収性材料の組成、及び/又は、前記流路または前記分離した流路の少なくとも一つの長さ及び/又は幅、を選択することにより、前記サンプル、ターゲット、溶解物、洗浄緩衝液、及び/又は、少なくとも一つの溶液の相対的な流速を受動的に制御することを更に備える、請求項 22 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 1 のリガンドは、前記捕獲ゾーンの吸水性材料に取り付けられている、請求項 22 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記サンプルは、核酸を含有した複数の生物学的な粒子又は細胞を含み、溶解緩衝液を含む溶液を用いて前記生物学的な粒子又は細胞を溶解すること、それにより、前記生物学的な粒子又は細胞からターゲットを解放することを更に備える、請求項 22 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記溶解の工程に先んじて、前記生物学的な粒子又は細胞の一つ以上の表面と第 2 のリガンドを反応させることにより、前記生物学的な粒子又は細胞の濃度を増大させることを更に備える、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 2 のリガンドは、抗体、オリゴヌクレオチド、ポリサッカライド(polysaccharide)、又は、炭水化物(carbohydrate)を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 2 のリガンドは、前記吸水性材料に取り付けられている、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記吸水性材料を経由する洗浄緩衝液流路に沿っての流体吸上げ及び/又は毛細管流動によって運ばれた洗浄緩衝液で、前記溶解緩衝液を除去すること、そしてそれにより、洗浄緩衝液を溶解緩衝液と受動的に交換することを更に備える請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

一種以上の溶液を用いて、欲しくない溶解物、欲しくないサンプル成分、細胞混入物、マトリックス混入物、化学的混入物、及び/又は、増幅インヒビタ(増幅阻害剤)を除去することを更に備える、請求項 22 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

少なくとも一種の溶液は、洗浄緩衝液である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記ターゲットを増幅することを更に備える、請求項 22 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記ターゲットは核酸であり、前記増幅する工程は、核酸増幅緩衝液を用いることを含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記増幅に先んじて、前記ターゲットを溶出することを更に備える、請求項 36 又は 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記増幅工程に先んじて、前記捕獲ゾーンをパンチアウトすることを更に備える、請求項 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記ターゲットは核酸を含む、請求項 22 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記第 2 の材料は、前記吸水性材料における少なくとも一種の流体の流動を制御すべく

10

20

30

40

50

選択されている、ことを特徴とする請求項 1 6 に記載のデバイス。

【請求項 4 2】

前記第 2 の材料は、前記吸水性材料の連続性を妨げるように配置されている、請求項 1 6 に記載のデバイス。

【請求項 4 3】

前記第 2 の材料は、混入物の移動を低減または不可能にする、請求項 1 6 に記載のデバイス。

【請求項 4 4】

前記第 2 の材料は、ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリビニルポリピロリドン (PVPP)、インヒビタ封鎖剤、又は、陽イオン交換リガンドを含む、請求項 1 6 に記載のデバイス。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[連邦政府が支援する研究開発のもとでなされた発明に対する権利に関する声明]

本発明は、米国エネルギー省が与えた、契約番号 DE - AC 5 2 - NA 2 5 3 9 6 のもとで政府の支援でなされた。

【0002】

[関連出願]

本出願は、2008年5月5日出願の米国仮特許出願第 6 1 / 1 2 6 , 6 4 5 号についての優先権を主張する。

20

【背景技術】

【0003】

生物学的サンプルマトリクスの多様な性質のために、証明力の無い(又は非試用の)サンプル構成(成分)の複雑な混合物中に存在する場合でさえ微量な分析物の収集を可能にする、堅調だが一般的な前段階のサンプル処理方法の必要性が示されている[非特許文献5]。これらの課題は多くの場合、有効な免疫学的または分子の分析的な技術に対して交絡している物質の存在によって悪化される。例えば、ヒトの組織由来のサンプルは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に使用されるDNAポリメラーゼに対して阻害性であることが公知の複雑なポリサッカライド、ヘモグロビン、鉄および他の物質を含む可能性が高い。同様に、環境の構成成分、例えば、土壌または植物物質が混入した環境のサンプルまたは微量のサンプルはさらに、PCRおよび徹底的な核酸分析にとって重要な他の酵素反応に対して強力に阻害性であるフミン酸などの有機物も含み得る。

30

【0004】

多様な生物学的サンプルに適用可能な信頼できる核酸単離方法は、DNAおよびRNAの両方について報告されている[非特許文献5~11]が、このような方法は、労働集約的であり、実験装置に依存し、かつ完了するのに数時間を要し、その結果サンプル処理が限定され、サンプル在庫が大きくなる[非特許文献12]。下流の酵素操作、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、酵素活性に対して阻害性のマトリクス構成成分の存在によって有害に影響される場合があり、これによって、信頼できるサンプル調製が不可欠となる[非特許文献5]。ヘモグロビン、鉄および複雑なポリサッカライドは一般に、生物学的サンプル中で遭遇されるが、追加的な阻害性化合物、例えば、フミン酸が、多くの場合、土壌、植物物質または腐敗物を含む環境的に収集されたサンプルに伴う[非特許文献13~15]。さらに、診断サンプルおよび法医学的サンプル中の多くの分析物の微量の性質、ならびに密接に関連するが証明力の無い(又は非試用の)大量の構成成分が、分析的な課題に大きく寄与する[非特許文献16~20]。

40

【0005】

側方流動イムノクロマトグラフィは十分確立されており、かつ長年にわたってタンパク質および低分子の検出のために用いられている[非特許文献21、22]。実際、側方流動の間の免疫-捕獲は、治療の現場(例えば、A型連鎖球菌抗原)、および自宅(例えば

50

、妊娠テスト)において広範な用途を見出している、迅速な携帯型のイムノアッセイ(immuno-assays)の基礎である。これらのアッセイは、検出のエンドポイントとして側方流動の間に免疫-捕獲を利用するが、本発明者らは、混合されたサンプルから少ない標的(細胞、ウイルス、孢子)を回収することを可能にするように設計されたサンプル調製戦略における最初の工程として、迅速かつ効率的な免疫-捕獲を得る手段と同じ原理を用いることを提唱する。一旦、静止期で捕獲されれば、次に、これらの標的を核酸単離のためのさらなる処理に供してもよいし、または他の分析のために収集してもよい。

【0006】

病原体の検出および同定のための核酸ベースのアッセイは、選択性、特異性および解像をもたらす。これらの特徴によって、核酸分析は強力な診断および法医学的技術となる。それにもかかわらず、核酸調製のための多くの技術は、臨床の血液標本などの比較的豊富なサンプルからの単離に集中してきた。しかし、多くの適用では、多くの場合、多様な起源の複雑な混合サンプル中で微量の構成成分を単離および特定する必要性に取り組みなければならない。DNAベースのアッセイとは対照的に、イムノアッセイは、低コストの、容易に用いられる方式で、広範に受け入れられており、おそらくその最も顕著なのは、クロマトグラフィの側方流動イムノアッセイである[非特許文献23]。側方流動アッセイはまた、携帯型アッセイまたはディップスティックアッセイとしても公知であって、容易に用いられる低コストの方式で迅速な抗原検出が必要とされる広範な適用に用いられる。側方流動イムノアッセイは、病原の特定、診断ならびに環境および農業の調査に首尾よく使用されている[非特許文献4]。いくつかのクロマトグラフィの側方流動アッセイが、種々の検出技術を用いて核酸配列の検出について記載されている[非特許文献24~28]。早期の研究では、サンプルの導入後のディップスティックの時間浪費的な操作に依拠するやっかいな酵素検出戦略[非特許文献25、26]および多重の適用にはあまり適していない検出スキーム[非特許文献24、27]を利用した。

【0007】

さらに近年記載される、側方流動マイクロアレイ(LFM)は、多重核酸検出のための小型化側方流動ベースの方法である[非特許文献1]。このアプローチは、多数の核酸配列を単一アッセイで検出することを可能にする小型の側方流動クロマトグラフィストリップのDNAマイクロアレイ様の様式を利用する。このデバイスの表面積の減少によって伝統的な側方流動デバイス型の要因を上回るいくつかの利点を得られる。サンプル容積は10 μ Lまで低下され、その結果、試薬の消費が減り、同様にサンプル輸送時間が減る。さらに、側方流動マイクロアレイ(LFM)によって示されるハイブリダイゼーション時間は、標準的なガラス基板マイクロアレイに比較して有意に短くなり、これによって典型的には、数時間のサンプルとのハイブリダイズが可能になり、同様に、さらに迅速なハイブリダイゼーションを容易にするマイクロ流体システムを利用するさらに複雑なマイクロアレイの実行が可能になる[非特許文献1、29、30]。この側方流動基板を通じた対流の流体運動、および使用される膜基板の底の抜けた細孔によって、ピーズに基づくカラムクロマトグラフィに比較して優れたクロマトグラフィ能力が生じる[非特許文献31~34]。これらの要因によって、分析物の250 amol未満のハイブリダイゼーションに基づく検出が2分間で得られる[非特許文献1]。LFMはさらに、米国特許出願番号第11/894,910号、およびPCT国際出願番号PCT/US2007/018537に記載されている。

【0008】

LFMプラットフォームは、炭疽病の病原因子である*Bacillus anthracis*の迅速なアッセイを開発するために用いられており、かつ1 μ gの総ヒトRNAからなる複雑な核酸バックグラウンドに存在する場合、2~3個程度の少ない*B. anthracis*細胞からRNAを検出することが示されている[非特許文献1]。報告されたLFMアプローチは、RNA単離のための標準的な実験室の方法、および核酸配列ベース増幅として公知の等温RNA増幅スキーム(NASBA)を利用した[非特許文献35~37]。おそらく最も重要なことに、LFMによって例示される側方流動の最小化によ

10

20

30

40

50

て、サンプル調製指示のための流体またはマイクロ流体システムとの統合に適した物理的な構成が得られる。

【0009】

LFMベースのタンパク質および核酸の検出と簡易化サンプル処理方法との統合によって、広範なサンプルタイプの処理およびスクリーニングのためのいくつかの潜在的な利点を得られるであろうし、この統合は望ましい。同様に、分析物を追跡および/または希釈するために適用可能なさらに堅調なサンプル調製方法は一般に、治療の現場および現場に配置されたアッセイにおける核酸の増幅および検出を促進する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0010】

【非特許文献1】Carter, D. J. and R. B. Cary, Lateral flow microarrays: a novel platform for rapid nucleic acid detection based on miniaturized lateral flow chromatography. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(10): p. e74.

【非特許文献2】Baumner, A. J., Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Anal Bioanal Chem*, 2003. 377(3): p. 434-445.

20

【非特許文献3】Pristoupil, T. I., Microchromatography and microelectrophoresis on nitrocellulose membranes. *Chromatogr Rev*, 1970. 12(2): p. 109-125.

【非特許文献4】Kohn, J., An immunochromatographic technique. *Immunology*, 1968. 15(6): p. 863-865.

【非特許文献5】Yang, S. and R. E. Rothman, PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*, 2004. 4(6): p. 337-348.

30

【非特許文献6】Koch, W. H., Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(9): p. 749-761.

【非特許文献7】Mackay, I. M., Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 2004. 10(3): p. 190-212.

【非特許文献8】Cirino, N. M., K. A. Musser, and C. Egan, Multiplex diagnostic platforms for detection of biothreat agents. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004. 4(6): p. 841-857.

40

【非特許文献9】Wilson, I. G., Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 1997. 63(10): p. 3741-3751.

【非特許文献10】Akane, A., K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, and K. Kimura, Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstai

50

ns, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci*, 1994. 39(2): p. 362 - 372.

【非特許文献11】Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, and F. Megraud, Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(4): p. 995 - 998.

【非特許文献12】Wickenheiser, R. A., Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. *J Forensic Sci*, 2002. 47(3): p. 442 - 450. 10

【非特許文献13】Elliott, K., D. S. Hill, C. Lambert, T. R. Burroughes, and P. Gill, Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Sci Int*, 2003. 137(1): p. 28 - 36.

【非特許文献14】Gill, P., Application of low copy number DNA profiling. *Croat Med J*, 2001. 42(3): p. 229 - 232. 20

【非特許文献15】Gill, P., J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, and J. Buckleton, An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int*, 2000. 112(1): p. 17 - 40.

【非特許文献16】Jobling, M. A. and P. Gill, Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet*, 2004. 5(10): p. 739 - 751. 30

【非特許文献17】Lonnberg, M. and J. Carlsson, Chromatographic performance of a thin microporous bed of nitrocellulose. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001. 763(1-2): p. 107 - 120.

【非特許文献18】Tennikov, T. B. and F. Svec, High-performance membrane chromatography: highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes. *J. Chromatography*, 1993. 646: p. 279 - 288. 40

【非特許文献19】Tennikova, T. B. and R. Freitag, An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography. *J. High Resol. Chromatogr.*, 2000. 23: p. 27 - 38.

【非特許文献20】Thommes, J. and M. Kula, Membrane Chromatography - An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins. *Biotechnol. Prog.*, 1995. 11: p. 357 - 367. 50

【非特許文献21】Peytavi, R., F. R. Raymond, D. Gagne, F. J. Picard, G. Jia, J. Zoval, M. Madou, K. Boissinot, M. Boissinot, L. Bissonnette, M. Ouellette, and M. G. Bergeron, Microfluidic device for rapid (<15 min) automated microarray hybridization. Clin Chem, 2005. 51(10): p. 1836 - 1844.

【非特許文献22】Wei, C. W., J. Y. Cheng, C. T. Huang, M. H. Yen, and T. H. Young, Using a microfluidic device for 1 microl DNA microarray hybridization in 500 s. Nucleic Acids Res, 2005. 33(8): p. e78.

10

【非特許文献23】Compton, J., Nucleic acid sequence-based amplification. Nature, 1991. 350(6313): p. 91 - 92.

【非特許文献24】Kievits, T., B. van Gemen, D. van Strijp, R. Schukkink, M. Dircks, H. Adriaanse, L. Malek, R. Sooknanan, and P. Lens, NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. J Virol Methods, 1991. 35(3): p. 273 - 286.

20

【非特許文献25】Malek, L., R. Sooknanan, and J. Compton, Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Methods Mol Biol, 1994. 28: p. 253 - 260.

【非特許文献26】Wetzels, T., T. Candresse, G. Macquaire, M. Ravelonandro, and J. Dunez, A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. J Virol Methods, 1992. 39(1-2): p. 27 - 37.

30

【非特許文献27】Leone, G., H. B. van Schijndel, B. van Gemen, and C. D. Schoen, Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. J Virol Methods, 1997. 66(1): p. 19 - 27.

【非特許文献28】Romero, A., B. Blanco-Urgoiti, and F. Ponz, Amplification and cloning of a long RNA virus genome using immunocapture-long RT-PCR. J Virol Methods, 1997. 66(1): p. 159 - 163.

40

【非特許文献29】Chanteau, S., L. Rahalison, M. Ratsitorahina, Mahafaly, M. Rasolomaharo, P. Boisiere, T. O'Brien, J. Aldrich, A. Keleher, C. Morgan, and J. Burans, Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick. Int J Med Microbiol, 2000. 290(3): p. 279 - 283.

50

【非特許文献30】Fukuta, S., K. Ohishi, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, and M. Kanbe, Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *J Virol Methods*, 2004. 121(1): p. 49-55.

【非特許文献31】Young, C.C., R.L. Burghoff, L.G. Keim, V. Minak-Bernero, J.R. Lute, and S.M. Hinton, Polyvinylpyrrolidone-Agarose Gel Electrophoresis Purification of Polymerase Chain Reaction-Amplifiable DNA from Soils. *Appl Environ Microbiol*, 1993. 59(6): p. 1972-1974.

10

【非特許文献32】Koonjul, P.K., W.F. Brandt, J.M. Farrant, and G.G. Lindsey, Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Res*, 1999. 27(3): p. 915-916.

20

【非特許文献33】Berthelet, M., L.G. Whyte, and C.W. Greer, Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiol Lett*, 1996. 138(1): p. 17-22.

【非特許文献34】Tsai, Y.L. and B.H. Olson, Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1992. 58(7): p. 2292-2295.

30

【非特許文献35】Jacobi, V., G.D. Bachand, R.C. Hamelin, and J.D. Castello, Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *J Virol Methods*, 1998. 74(2): p. 167-178.

【非特許文献36】Sterne, M., The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind*, 1939. 13: p. 307-312.

40

【非特許文献37】Loens, K., K. Bergs, D. Ursi, H. Goossens, and M. Leven, Evaluation of NucliSens easy MAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2007. 45(2): p. 421-425.

【非特許文献38】Biagini, R.E., D.L. Sammons, J.P. Smith, B.A. MacKenzie, C.A. Striley, J.E. Snawder, S.A. Robertson, and C.P. Quinn, Rapid, sensitive, and specific lateral-flow immunoch

50

romatographic device to measure anti-anthrax protective antigen immunoglobulin g in serum and whole blood. Clin Vaccine Immunol, 2006. 13(5): p. 541-546.

【非特許文献39】Singh, S. K., P. Nielsen, A. Koshkin, and J. Wengel, LNA (locked nucleic acids): Synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. Chem. Commun., 1998. 4: p. 455-456.

【非特許文献40】Jacobsen, N., P. S. Nielsen, D. C. Jeffares, J. Eriksen, H. Ohlsson, P. Arctander, and S. Kauppinen, Direct isolation of poly(A)+ RNA from 4 M guanidine thiocyanate-lysed cell extracts using locked nucleic acid-oligo(T) capture. Nucleic Acids Res, 2004. 32(7): p. e64.

10

【非特許文献41】Lockley, A. K., C. G. Jones, J. S. Bruce, S. J. Franklin, and R. G. Bardsley, Colorimetric detection of immobilised PCR products generated on a solid support. Nucleic Acids Res, 1997. 25(6): p. 1313-1314.

20

【非特許文献42】Pemov, A., H. Modi, D. P. Chandler, and S. Bavykin, DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. Nucleic Acids Res, 2005. 33(2): p. e11.

【非特許文献43】Pannucci, J., H. Cai, P. E. Pardington, E. Williams, R. T. Okinaka, C. R. Kuske, and R. B. Cary, Virulence signatures: microarray-based approaches to discovery and analysis. Biosens Bioelectron, 2004. 20(4): p. 706-718.

30

【非特許文献44】Pastinen, T., M. Raitio, K. Lindroos, P. Tainola, L. Peltonen, and A. C. Syvanen, A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. Genome Res, 2000. 10(7): p. 1031-1042.

【非特許文献45】Huber, M., A. Mundlein, E. Dornstauder, C. Schneeberger, C. B. Tempfer, M. W. Mueller, and W. M. Schmidt, Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays. Anal Biochem, 2002. 303(1): p. 25-33.

40

【非特許文献46】Wahlestedt, C. P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hokfelt, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K. Ren, M. Ossipov, A. Koshkin, N. Jakobsen, J. Skouv, H. Oerum, M. H. Jacobsen, and J. Wengel, Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nuc

50

leic acids. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(10): p. 5633 - 5638.

【非特許文献47】Braasch, D. A. and D. R. Corey, Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. Chem Biol, 2001. 8(1): p. 1 - 7.

【非特許文献48】Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa, Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol, 1990. 28(3): p. 495 - 503.

10

【非特許文献49】Boom, R., C. J. Sol, R. Heijtkink, P. M. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa, Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum. J Clin Microbiol, 1991. 29(9): p. 1804 - 1811.

【非特許文献50】Cheek, B. J., A. B. Steel, M. P. Torres, Y. Y. Yu, and H. Yang, Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip. Anal Chem, 2001. 73(24): p. 5777 - 5783.

20

【非特許文献51】Cook, A. F., E. Vuocolo, and C. L. Brakel, Synthesis and hybridization of a series of biotinylated oligonucleotides. Nucleic Acids Res, 1988. 16(9): p. 4077 - 4095.

【非特許文献52】Dineva, M. A., D. Candotti, F. Fletcher-Brown, J. P. Allain, and H. Lee, Simultaneous visual detection of multiple viral amplicons by dipstick assay. J Clin Microbiol, 2005. 43(8): p. 4015 - 4021.

30

【非特許文献53】Capaldi, S., R. C. Getts, and S. D. Jayasena, Signal amplification through nucleotide extension and excision on a dendritic DNA platform. Nucleic Acids Res, 2000. 28(7): p. E21.

【非特許文献54】Lowe, M., A. Spiro, Y. Z. Zhang, and R. Getts, Multiplexed, particle-based detection of DNA using flow cytometry with 3DN A dendrimers for signal amplification. Cytometry A, 2004. 60(2): p. 135 - 144.

40

【非特許文献55】Stears, R. L., R. C. Getts, and S. R. Gullans, A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology. Physiol Genomics, 2000. 3(2): p. 93 - 99.

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、効率的な濃度の微量サンプルおよび核酸増幅インヒビタの除去のための、極

50

めて単純化された側方流動クロマトグラフィ核酸サンプル調製の方法、デバイスおよび統合システムを提供する。本発明は、(a)真核生物細胞および原核生物細胞、ウイルスおよび植物の細胞および物質を含む分析物の急速なイムノアフィニティ捕獲と、(b)細胞/ウイルスの溶解後に、混入するタンパク質および他のマトリクス由来成分なしに濃縮され且つ洗浄されるべき特定のDNAまたはRNA配列のハイブリダイゼーションベースのアフィニティ捕獲との組み合わせを可能にする、LFM技術および受動的流体流動制御システムを利用する。本発明はまた、側方流動デバイスの状況では核酸増幅反応(すなわち、PCR)のインヒビタを除去するための手段を提供する。

【0012】

本発明はまた、側方流動アッセイで、およびその反応順序で用いられる、種々のかつ複数の溶液の流れを受動的に制御するための側方流動構造を提供する。一実施形態では、LFS Pデバイスの少なくともサンプル受容ゾーンは、流体の吸上げ、およびその中の少なくとも1つの流体流動の受動的制御を支持し得る幾何学的に規定された吸収材料、例えばニトロセルロースを備える。一実施形態では、本発明は、流路を規定し、かつ流体の吸上げ、およびその中の少なくとも1つの流体流動の受動的制御を支持し得る幾何学的に規定された吸収材料を備える、側方流動マトリクスを備えるデバイスを提供する。本明細書に記載される他の実施形態では、幾何学的に規定されたニトロセルロースストリップは、図5、6、7、8、9または14Aに本質的に示されるような構成を有する。

【0013】

本発明のデバイスおよびシステムは容易に製造され、かつ生物学的サンプル由来の核酸の効率的な低容積のアフィニティ精製のための支持体として側方毛細管流動クロマトグラフィ基板を用いる。サンプル調製に対する本発明のアプローチによって、側方流動サンプル調製(LFS P)デバイスでの空間的に規定された領域での微量分析物の極めて効率的な捕獲が可能になる。この結果、基板上に固定された標的分析物の高い局所濃度が生じ、これによって広範な洗浄、および使用者の介入なしの増幅または追加のサンプル取り扱いを含む追加の操作が極めて容易になる。これらの特徴を、リアルタイムPCR、MLVA、遺伝子型決定および他の核酸ベースの方法などの確立された分子分析技術との互換性と一緒すれば、側方流動サンプル濃度および処理は、環境の調査、疾患の診断およびバイオ法医学の検討のために適切な核酸を得る魅力的な手段となる。

【0014】

一実施形態では、LFS Pデバイス(LFS P装置)は、側方流動マトリクスを備え、この側方流動マトリクスは、流路を規定し、かつ連続して(又は直列的に)以下の要素:(a)流体サンプルのアリコート(試料の分割単位)を受容するためのサンプル受容ゾーン、及び、(b)目的の生物学的粒子または細胞上に存在するリガンド(又は配位子)と反応性である固定された抗体を含む、このサンプル受容ゾーンと側方流動接触する免疫捕獲ゾーン、を備える。別の実施形態はさらに、連続して(又は直列的に):(c)目的の生物学的粒子または細胞の溶解が達成され、それによってそれからの核酸が遊離する、この免疫捕獲ゾーンと側方流動接触する溶解ゾーン、を備える。さらに別の実施形態では、LFS Pデバイスはさらに、連続して(又は直列的に):(d)一緒になってサンドイッチ核酸ハイブリダイゼーションアッセイのための核酸および標識構成成分を形成する、溶解ゾーンと側方流動接触する、1つ以上のアッセイゾーン、を備える。さらに別の実施形態では、LFS Pデバイスは、上記溶解ゾーンの下流にあってかつ上記溶解ゾーンと側方流動接触し、かつ上記アッセイゾーン(単数または複数)の上流にあって上記アッセイゾーンと側方流動接触する、核酸増幅ゾーンをさらに備える。本発明のこの態様は、後述の実施例によってさらに説明される。

【0015】

本発明のLFS Pデバイスはまた、側方流動デバイスのポリビニルピロリドン処理要素を用いて、フミン酸などの核酸増幅反応のインヒビタを捕獲および減少するための本発明の方法を組み込んでよい。従って、上記の実施形態を参照すれば、LFS Pデバイスのさらなる実施形態は、隣接されるそのデバイスの要素(単数または複数)と側方流動接触

10

20

30

40

50

するポリビニルピロリドンを含む前処理ゾーンをさらに備える。例えば、処理ゾーンは、免疫 - 捕獲ゾーンの上流でかつ免疫 - 捕獲ゾーンと側方流動接触する位置に配置されてもよいし、サンプルゾーンの下流でかつサンプルゾーンに側方流動接触する位置に配置されてもよい。関連の実施形態では、ポリビニルピロリドン以外のまたはそれに追加の物質が、増幅および/またはアッセイの前にサンプルマトリクスから望ましくないインヒビタまたは他の混入物を捕獲または減少するために前処理ゾーン中に組み込まれてもよい。本発明のこの態様は、後述の実施例にてさらに説明される。

【0016】

本発明のLFSPデバイスはまた、本発明の受動的流体制御方法およびシステムを組み込んでよい。要するに、受動的な溶液または緩衝液の流動制御は、種々の長さおよび/または幅の個々の流路がこのデバイスを用いて行われるアッセイ中で使用されるべき緩衝液の各々について規定されるが、単一の膜内に組み込まれるように、側方流動膜（例えば、ニトロセルロース膜）、または毛細管流動/流体の吸上げを支持し得る濾紙などの他の吸湿性材料を別個の形状に切断することによって達成される。本発明のこの態様は、後述の実施例にてさらに説明される。

【0017】

本発明のLFSPデバイスは、任意のLF方式で用いられてもよいが、LFMの方法、デバイスおよびシステムでの使用のために特に適合化されてもよい。LFMと統合されたLFSPを備える完全に統合されたサンプル - 回答 (Sample - to - answer) 型のアッセイデバイスが構想される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】側方流動マイクロアレイ (LFM) は、示した数の *E. coli* 細胞由来の粗溶解液でプログラムされたNASBA反応で試された。陽性のハイブリダイゼーションコントロールで、LFM上の各々のスポットの列にマークして (LFMの左側のカラムの5つのスポット)、1セットの二連のスポットが *E. coli* の陽性の検出を示す (右側、底から2番目の列)。「陰性」はプレートコントロールなしである。「陽性」は、Qiagen RNeasyキットを用いて単離された6ngの *E. coli* RNAを含む。細胞 - cDNA型 (cell - to - cDNA) の緩衝液 (Ambion) 中で細胞を加熱することによって調製した粗溶解液を用いて2000個程度の少ない細胞が検出できた。後述の実施例1を参照のこと。

【図2】側方流動は、免疫 - 捕獲を容易にした。(A) : Agdia TMV イムノアッセイ・ストリップを、SEB1抽出緩衝液 (Agdia, Inc. 製) 中で乾燥粗タバコ葉抽出物 (DCTLE) の示した希釈の200 μ Lを用いて流した。DCTLEは、摩耗メッシュ (Agdia, Inc. 製) を含むプラスチックバッグ中で3mlのSEB1抽出緩衝液 (Agdia, Inc. 製) 中で100mgの乾燥した粗タバコ葉を粉碎することによって作製した。1 : 200以上の希釈は、イムノ - アッセイでは陰性であった。(B) : リアルタイム逆転写酵素PCR (RT - PCR) を用いて、TMV捕獲ゾーン (CZ) の下、TMV捕獲ゾーン (CZ) における、およびTMV捕獲ゾーン (CZ) の上の領域を検査した。200 μ Lの未希釈の抽出物を側方流動に供して、引き続き、捕獲ゾーンの下、捕獲ゾーンにおける、および捕獲ゾーンの上のストリップ領域のリアルタイムRT - PCRを行った。CZから下のストリップ領域は、29.7というサイクル閾値 (Ct) で検出可能な増幅をほとんどまたは全く示さなかった。CZから採取したサンプルは、26.3というCt値でTMVについて強力に正のシグナルを生じた。捕獲ゾーンの上の領域はまた、27.1というCt値で陽性の検出を生じた。従って、ニートな抽出物は、CZでおよびCZ上でのみ明確に陽性のPCR反応を生じたが、CZより下の領域はPCR増幅を阻害した。これらのデータによって、洗浄もさらなる操作もない単純な側方流動免疫 - 捕獲が、標的粒子の濃縮、および阻害性マトリクス構成成分の物理的隔離の両方を通じてPCR阻害を軽減し得ることが示される。重要なことに、ニートな抽出物中のCZ上の領域は明らかにCZから遊離されたウイルス粒子の結果として陽性のPCR反応

10

20

30

40

50

を生じ、それに伴ってインヒビタのみかけ上の減損を生じる。(C) :リアルタイム逆転写酵素PCR(RT-PCR)を用いて、TMVイムノアッセイ試験ストリップのTMV捕獲ゾーン(CZ)の下、TMV捕獲ゾーン(CZ)における、およびTMV捕獲ゾーン(CZ)の上の領域を検査し、続いて、サンプル緩衝液中のDCTLEの200 μ Lの1:2000希釈で試した。CZの下のストリップ領域は、弱い増幅しか示さず、このことはこの希釈のインヒビタがある程度の増幅を生じることを可能にするのに十分に薄くなったことを示唆した(Ct=28.9)。CZから採取されたサンプルは、22.4というCt値でTMVの強力に正のシグナルを生じたが、このことはインヒビタ希釈と免疫-捕獲の仲介によるウイルス濃縮との複合効果が、ニートな抽出物の実験に対してさらに堅調な増幅を可能にするに至ることを示唆する(A部分との比較)。捕獲ゾーン上の領域はまた、28.0というCt値で陽性の検出を生じた。

10

【図3】PVPサンプルパッドは、外因的に添加されたフミン酸から生じるPCR阻害を軽減する。DCTLEは図2と同様に生成した。抽出物の200 μ Lのアリコートをも、12、25ngのフミン酸を用いてスパイクし、標準的なサンプルパッド(未処理のパッド)または10%のポリビニルピロリドン(分子量360,000)で処理されたサンプルパッド(PVPSamp Pad)のいずれかを用いてTMVの側方流動免疫-捕獲に供した。捕獲ゾーンを収集して、RT-PCRに供した。12ngおよび25ngのフミン酸を追加した抽出物は、未処理のサンプルパッドでの側方流動ストリップを用いたTMV捕獲後に検出可能なPCR産物を生じることができなかったが、全てのサンプルが、PVP処理したサンプルパッドを用いた免疫-捕獲に供された場合、検出可能なPCR産物を示した。興味深いことに、PVP処理したサンプルパッドで流した0、12および25ngのフミン酸サンプルは、未処理のパッドで行った0ngのコントロールに対して改善したPCR増幅を呈した。「RNA」と記したレーンは、RNeasy(Qiagen)を用いて作成された総タバコRNA調整物を利用する陽性コントロールである。

20

【図4】プロトタイプの前方流動基板の上の受動的緩衝液流動制御。(A) :サンプル(紫色)および洗浄緩衝液(ピンク色)をこのデバイスに導入したが、この基板の上では依然として可視ではない。(B) :サンプル溶液がそのデバイス(フレームの上に位置する)の捕獲ゾーンに達する。(C) :サンプル通路に用いられるのよりも長くかつ狭い通路を通る毛細管流動によって、洗浄緩衝液が主要なストリップ接合部へ移動するにつれ、サンプルは捕獲ゾーンの上を流れ続ける。(D) :サンプルが消費されるにつれ、洗浄緩衝液が、サンプル緩衝液を置き換え始める。(E) :サンプルはここで捕獲ゾーンを完全に横切り、そして洗浄緩衝液は、捕獲ゾーンをあふれさせ始める。(F) :5分以内に、洗浄緩衝液は完全にサンプル緩衝液を置換した。

30

【図5】ニトロセルロースまたは濾紙などの吸収性物質からビニルカッターまたはレーザーカッターを用いてカットされ得る、緩衝液交換構造の例。示された構造は、2つの液体を利用するシステムを支持(サポート)する。(A) :2つの流体流動のチャンネルは、緩衝液交換または試薬の導入を支持する。サンプルは、実施例8に記載のような流体デバイスを使用することによって導入され得る。中央のタブは、一次溶液の取り込みに適合するようにリザーバ・チャンバ中へ降下する。第二の溶液を、この構造の一番左にある吸収領域を介して導入する。第二のリザーバ中の溶液の容積の方が大きければ、この第二の流体がこの基板の下流領域で第一の溶液を置換することが保証される。(B) :核酸またはタンパク質の捕獲のためのアフィニティマトリクスの環状のパンチに適合するように用いた幾何形状の例。(C) :より大きい流体の容積に適合するように流体システムを支持することを可能にする延長された第二の流体通路を有する幾何形状の例。

40

【図6】ニトロセルロースまたは濾紙などの吸収性物質からビニルカッターまたはレーザーカッターを用いてカットされ得る、緩衝液交換構造の例。示された構造は、3つの液体を利用するシステムを支持(サポート)する。(A) :3つの流体インプットパッドを有する構造。一番右にあるパッドをサンプル適用のために用い、真ん中は第一緩衝液交換、例えば、染色または洗浄緩衝液に用い、一番左にあるパッドは、例えば、洗浄緩衝液または増幅試薬に適合するために最終緩衝液交換に用いる。この構造は、コンパクトな流体シ

50

ステム中で、第一の交換緩衝液としてコロイド金コンジュゲート抗体、および第二の交換緩衝液としてバックグラウンドを低下させる洗浄を利用するイムノ・アッセイに使用される(図14も参照のこと)。(B):96ウェルプレート中に溶液を導入することを可能にするように隔てられた3つの流体投入タブを有する構造。(C):単純なポリカーボネート流体システムでの組み込みに適切な3つの流体インプットを有する構造。

【図7】背後にニトロセルロースのあるニトロセルロース層のレーザーアブレーション(レーザー切断)を用いて、切断法によって製造される構造と同様の緩衝液交換構造を作製してもよい。(A):アブレーションによって2つの流体インプットエクステンジヤを作製するために用いられるパターン。(B):2つの溶液エクステンジパターンの別の例。(C):背後のニトロセルロース(HF-135、Millipore, Inc.)を、両面接着テープを用いて、ポリカーボネートのシートに重層して、(B)部分で示されるパターンを用いるレーザーアブレーションに供した。

【図8】精製されたマイクロ流体ニトロセルロース膜基板の上の受動的緩衝液流動制御。(A):受動的だが迅速かつ完全な緩衝液交換を達成するためのマイクロ流体ニトロセルロース構造の有用性を実証するため、サンプルを示す容易に可視化される色素を担持する緩衝液(青色)、溶解緩衝液(赤色)および増幅緩衝液(黄色)をこのデバイスに導入した。(B):サンプルは広い膜通路を通じた免疫-捕獲ゾーン上を流れて、サンプル流動が消費されるまで基板壁に近位の膜領域に対して溶解緩衝液および増幅緩衝液を置き換える。(C):サンプルが消費されるにつれて、溶解緩衝液は、免疫捕獲ゾーンに侵入し、このゾーンが捕獲された粒子を分離して、下流の「LNA-捕獲ゾーン」(A部分に示される)に固定されたLNAプローブ上のハイブリダイゼーションベースの捕獲のための核酸を遊離する。(D):溶解緩衝液の消費後、NASBA増幅と適合する緩衝液がLNA-捕獲ゾーンを洗浄して、残留の溶解緩衝液を除去し、プライマーのハイブリダイゼーションを容易にする。10 μ Lというサンプル、溶解および増幅の緩衝液の容積を用いて、3分以内に3つの緩衝液交換が達成される。免疫およびLNA-捕獲ゾーンの計算されたベッド容積は約250nLであり、従って各々の緩衝液交換は、約40のベッド容積で捕獲ゾーンを洗浄する。さらなる流動の調節は、さらなる緩衝液の洗浄および交換が可能になるように種々の長さおよび幅の追加の流路を用いて実現され得る。同様に、緩衝液の粘度を調節することは、溶解緩衝液中でインキュベーション時間などのアッセイパラメータをさらに精緻にするために用いられる場合がある。最も重要なことにはデバイスのサイズは、より大きいサンプル容積の処理に適合するように変更されてもよい。各々のパネルの右側の定規部分は1mmである。(E):ブレッドボードの3つの流体緩衝液交換システムであって、イムノ・アッセイ・ストリップを有する緩衝液交換ニトロセルロース構造の統合を示す、緩衝液交換システム。このデバイスは免疫-捕獲および実施例5に記載の洗浄実験のために使用された。

【図9】384ウェルのタイタープレートでの使用のために設計された受動的緩衝液交換構造。(A):384ウェルのタイタープレートの5つのウェルを利用する3つの流体エクステンジヤ。中央流体インプットは、1つのウェルを占有するが、第二および第三の流体は、対称の中央軸に隣接するウェルの対に入れられる。この構造は実施例7に記載のようにイソチオシアン酸グアニジウム溶解液からの核酸捕獲のために使用された。(B):384ウェル適合性緩衝液交換構造の別の例。(C):実施例6に記載される実験のために用いられる緩衝液交換構造。

【図10】SEB1サンプル緩衝液中のタバコ抽出物の希釈後のTMVのLFM検出。DC-TLE(3mLのSEB1中の100mgのタバコ)を、示されたような追加のSEB1中に希釈した。(A):100 μ Lのサンプル容積を側方流動免疫-捕獲に供し、受動的な緩衝液交換を用いて、25 μ LのH₂Oを用いてニトロセルロースマトリクスから残留のSEB1をリンスした(洗浄なし)。捕獲ゾーンを回収して、NASBA増幅およびLFM媒介性の比色検出に供した。これらの条件下のニートなタバコ抽出物は、サンプル中の高濃度のインヒビタに起因して偽陰性のLFM結果を生じた。これらの条件下での検出を可能にするために1:2000~1:8000の希釈でインヒビタの濃度を十分に下

10

20

30

40

50

げた。1 : 16, 000希釈では、クロマトグラフィマトリクス中での残留のSEB1緩衝液から生じる阻害と一緒に低ウイルス力価におそらく起因して、検出可能なLFMシグナルを生じなかった。無テンプレート陰性コントロール(NTC)を示す。TMV-2捕獲プローブは、TMV由来のアンプリコンの最も鋭敏な検出をもたらした。(B) : 100 μ Lのサンプル容積を側方流動免疫-捕獲に供して、受動的な緩衝液交換を用いて、捕獲されたウイルスを50 μ LのNME緩衝液(50mMのMOPS、pH7、0.5MのNaCl、15%のエタノール)を用いて洗浄し、25 μ LのH₂Oという最終リンスを用いてニトロセルロースマトリクスから残留の緩衝液をリンスした。捕獲ゾーンを回収して、NASBA増幅およびLFM媒介の比色検出に供した。これらの条件下のニートなタバコ抽出物は、LFMによって堅調な陽性の結果を生じた。1 : 2000 ~ 1 : 16, 000という希釈もこれらの条件下で陽性であった。A部分に示される洗浄なしの処理に対する検出限界の増大は、ニトロセルロース基板からの残留のSEB1緩衝液のさらに完全な除去の結果である可能性が高い。いくつかのSEB1媒介性の阻害が他の研究で注目されていた。無テンプレート陰性コントロール(NTC)を示す。

【図11】免疫捕獲されたおよび受動的な緩衝液交換洗浄のTMVのリアルタイムRT-PCR。1 : 2000または1 : 4000の最終希釈でDCTLEでスパイクされた土壌抽出物を、384ウェルプレート形式でサンプル、洗浄緩衝液および最終H₂Oリンスに適合するように設計された緩衝液交換ニトロセルロース構造を担持するように改変されたTMVイムノ-アッセイ・ストリップを用いて、免疫-捕獲および洗浄に供した(図8Eおよび図9Cを参照のこと)。土壌抽出物は、30mLのSEB1抽出緩衝液中で3gの土壌を用いて生成した。サンプル容積は100 μ Lであった。洗浄は、50 μ LのNME緩衝液を用いて、続いて25 μ LのH₂O平衡を用いて行った。Qiagen(製の)RNeasyキットを用いて単離された土壌RNAを陰性コントロールとして含んだ。洗浄工程なしで、ただし、25 μ LのH₂Oリンス、1 : 2000および1 : 4000希釈を用いて、それぞれ28.2および28.3という高いCt値を得た。75 μ LのNME緩衝液洗浄を含むことで、TMVの陽性の検出が生じ、ここでは1 : 2000のサンプルが26.2というCt値を、そして1 : 4000のサンプルが27.2というCt値を示した。

【図12】極めて阻害性の土壌抽出物からのTMV免疫捕獲の受動的な緩衝液交換洗浄後のPCR阻害の軽減。土壌抽出物をDCTLEを用いてスパイクして、1 : 2000という最終希釈を得た。サンプルの容積は、100 μ Lであったが、NME洗浄は50 μ Lであって、最終のH₂Oリンスは25 μ Lであった。最終のH₂O平衡によって、残留の洗浄緩衝液がその後のPCR反応に持ち越す可能性を低下させた。50 μ Lの水に続いて25 μ Lの水リンスを用いる洗浄(75 μ LのH₂Oと表示)によってかすかなPCR産物が生成された。NME洗浄緩衝液の使用によって、堅調なPCR増幅(NME)が生成された。Qiagenのグアニジウムベースの溶解緩衝液であるRLTを用いる洗浄では、検出可能なPCRアンプリコン(RLT)を生成できなかった。50 μ Lの洗浄を排除し、ただし25 μ Lのリンスを保持すれば、これらのサンプル中の検出可能なアンプリコンの欠失によって証明されるとおりインヒビタ濃度を有意に低下させることはできなかった(25 μ L H₂O)。NME洗浄に供された追加のTMVなしの土壌抽出サンプルは、検出可能なTMVアンプリコンを生じなかった(土壌のみ(NME洗浄))。SEB1抽出緩衝液単独を、さらなる陰性のコントロールとしてアッセイした(SEB1)。さらに、陰性コントロールの免疫-捕獲実験を、未使用の土壌抽出物およびNME緩衝液洗浄を用いて行い、この用いられた土壌からTMVがないことをさらに確認した。このTMVレーンは、Qiagen(製の)RNeasyキットを用いてタバコから単離されたRNAを用いてプログラムされた陽性コントロールPCR反応である。

【図13】RLTグアニジウムイソチオシアネートベースの溶解緩衝液(Qiagen, Inc.製)中で22 μ g/ μ Lのタバコを粉碎することによって生成した乾燥硬化タバコ葉溶解物で試されたRNA結合マトリクスのリアルタイムRT-PCR分析。タバコ葉溶解物を、RNeasyカラムシリカRNA結合マトリクスの3mmの生検パンチに対し

10

20

30

40

50

て重層された図9Aに示される構造のニトロセルロース緩衝液交換デバイスを用いて側方流動媒介の核酸捕獲に供した。10 μ LのRLTタバコ抽出物をサンプルとして用いた。40 μ L洗浄を、洗浄なしのコントロール以外は全ての実験についてNME緩衝液を用いて行った。最初のNME洗浄後は、80 μ LのNME(NMEのみ)、または示したとおり0~1Mに変化する濃度におけるNaClが続いた。本発明のこの態様は、実施例7にて更に説明される。

【図14】内蔵型の受動的な緩衝液交換デバイスの構成要素。(A):流体システムの簡易支持と統合するのに適切な3流体エクステンジャの例。(B):(A)部に示されるエクステンジャの流体インプットタブに適合するようにポリカーボネートを切断するためのパターン。(C):ポリカーボネートシートを切断するためのパターンを形成する流体リザーバ。挿入された交換構造を担持する(B)部に示される層に対して、および(D)部に示される底の層に対する積層(ラミネーション)が、統合された緩衝液交換デバイスを形成し、これによって3つの溶液は溶液インプットポートを介して導入されることが可能になる。(D):デバイスの底のピースを切断するためのパターン。(E):ここで示される組立てられたデバイスのスキャンは、イムノ-アッセイ・ストリップに対して接触された緩衝液交換構成要素のための3MMの濾紙を利用している。示されるデバイスでは、イムノ-アッセイは、一番右側のポートに対してサンプルを、真ん中のポートに対して染色試薬(抗体コンジュゲートされたコロイド性の金)を導入することによって行われ、そしてバックグラウンドを低減するための最終の洗浄緩衝液を一番左側のポートに添加する。全ての溶液をアッセイ開始時に添加する。このデバイスのサイズは、標準的な顕微鏡スライドと同様に25mm \times 75mmである。

【図15】提唱された統合型サンプル調製デバイスの1つの可能性のある実施形態の画家による表現(完成予想イラスト)。このデバイスの使い捨て可能な構成要素の種々のサブシステムを、示されたとおりここに示す。安価なプラスチックハウジングおよび支持された大きい細孔のニトロセルロースから製造された、このシステムは毛細管側方流動および受動的な流動調節を利用して、分析物親和性およびハイブリダイゼーションベースの捕獲、ならびにその後のNASBAによる溶解、洗浄および等温増幅に必要な緩衝液交換を可能にする。サンプル容積の10%が、イムノ-アッセイLFMを用いてサンプル添加直後に問い合わせられる。その後の細胞分離および溶解の結果、細胞のRNAの遊離およびグアニジウムベースの緩衝液による安定化が生じる。目的のRNA配列を、LNA捕獲オリゴヌクレオチドに対するグアニジウム緩衝液中のハイブリダイゼーションによって収集する。サンプル中に存在する細胞外RNAはまた、LNAオリゴヌクレオチド上で捕獲されなければならない。スワブ溶出緩衝液はまた、溶出効率、イムノ-アッセイ適合性およびRNA安定化特性について最適化され得る。デバイスから離れた分析のために、単純なパンチ-アウトシステムを組み込んで、細胞分離またはLNA捕獲ゾーンの手軽な収集を可能にしてもよい(図示せず)。

【図16】陰イオン/陽イオン交換を利用する、別の統合型デバイスのレイアウトの略図。側方流動ストリップは、固定された抗体リガンド(Cell/Particle Capture)を用いて細胞およびウイルス標的のイムノ-アフィニティ精製のための未変性の緩衝液中で、または陰イオン交換による核酸のアフィニティ精製のための溶解液として(Anion Exchange Ligand)サンプルを受容する。インプットのサンプル次第で、洗浄緩衝液または溶解緩衝液を、Wash/Lysisゾーンに対してプロトコール開始時点で導入し、ここでは液は、その吸収パッド(図示せず)から主要な基板へ、狭いニトロセルロース通路を介して流れ、サンプル溶液の完全な輸送後にのみ主要なストリップに達する。サンプル通路処理、例えば、PVP、PVPPまたは陽イオン交換リガンドが、増幅インヒビタ除去のために含まれてもよい。高イオン強度洗浄緩衝液は、陰イオン交換リガンドから核酸を溶出して、シリカマトリクスに対する効率的な結合を支持する静電的な環境をもたらす。得られた精製核酸を、フリットを担持する微小遠心管中へのシリカマトリクスの溶出または収集によって回収してもよく、ここでは核酸は、少なくとも2ベッド容積(0.8 μ Lを超える)の低イオン強度の緩衝液(水、TEな

10

20

30

40

50

ど)を用いて溶出され得る。

【発明を実施するための形態】

【0019】

別段の規定がない限り、当該分野の全用語、表記法および本明細書で用いられる他の科学的用語法は、別段の規定がない限り、本発明が属する当該分野の当業者によって通常理解される意味を有するものとする。ある場合には、通常理解される意味を有する用語は、明確さのため、および/または、すぐ参照できるように本明細書に規定されているのであって、本明細書におけるこのような定義の包含は、当該分野で通常理解されるものを上回る実質的な相違を示すと解釈されるべきではない。本明細書に記載されるかまたは引用される技術および手順は一般に十分理解されており、かつ当業者によって従来の方法論、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. および Current Protocols in Molecular Biology (Ausbelら、編、John Wiley & Sons, Inc. 2001)に記載される広範に利用されている分子クローニングの方法論などを用いて通常使用される。必要に応じて、市販のキットおよび試薬の使用を含む手順は一般には、別段の注記がない限り、製造業者の規定するプロトコールおよび/またはパラメータに従って行われる。

10

【0020】

[側方流動サンプル調製方法およびシステム]

20

本発明は、効率的な濃度の微量サンプルおよび核酸増幅インヒビタの除去のための、極めて単純化された側方流動クロマトグラフィ核酸サンプル調製の方法、デバイスおよび統合システムを提供する。LFSPデバイスは、本明細書に開示される本発明の種々の要素からなってもよく、この要素としては、生物学的粒子または細胞の側方流動免疫-捕獲、側方流動マトリクス内の直接的な溶解、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイを構成する種々の要素、能動的流体/緩衝液制御システム、および核酸増幅インヒビタの活性を封鎖または軽減し得る組成物での前処理が挙げられる。

【0021】

例えば、LFSPデバイスは、流体サンプルのアリコート(試料の分割単位)を受容するためのサンプル受容ゾーンを、このサンプル受容ゾーンと接触した側方流動中の免疫-捕獲ゾーンと一緒に備えてもよく、このゾーンは目的の生物学的粒子または細胞上に存在するリガンドと反応性の固定された抗体を含む。このようなデバイスは、目的の生物学的粒子または細胞を捕獲するために用いられてもよく、また粒子もしくは細胞を溶解するため、およびそれから遊離された核酸を増幅するための手段を備えてもよい。このデバイスは、サンドイッチハイブリダイゼーション核酸アッセイなどの側方流動アッセイと連結されてもよいし、または統合されてもよい。好ましい実施形態では、このLFSPデバイスは、LFMデバイスまたはアッセイに連結されてもよいし、または統合されてもよい。LFMデバイスおよびアッセイは、米国特許出願第11/894,910号に記載されている。

30

【0022】

40

免疫-捕獲ゾーンは、例えば、以下のように調製されてもよい。リガンド(すなわち、抗体)が固定されて基板上に免疫-捕獲ゾーンが形成されるように、側方流動基板(すなわち、ニトロセルロース)を処理する。詳細には、抗体溶液を生理学的なイオン強度の緩衝液中で、経験的に見出された濃度で調製して、抗原に対する特異的な結合を得る(代表的には、0.01 mg/ml ~ 1 mg/ml)。大きい細孔のニトロセルロース膜上への抗体の沈着は、多数の手段によって達成され得る。こうした手段は、手動的な適用、エアブラシ沈着、ロボット流体取り扱いシステム、または基板へのリガンドの制御され、かつ再現性の容積を沈着する同様の方法を包含するが、これらに限定されない。適切な基板としては、HiFlow 135 (Millipore, Inc. 製)および種々の商業的供給業者から入手可能な類似の生成物が挙げられる。一旦基板上に沈着されれば、リガ

50

ドは乾燥によっておよび/または5000マイクロジュールの線量でのUV照射によって固定される(核酸/LNA固定の場合)。

【0023】

本発明の側方流動免疫-捕獲の態様によって、広範な範囲の薄いサンプル容積から標的分析物を濃縮する能力が得られる。一旦デバイス捕獲ゾーンで固定されれば、標的は検出され得、そして引き続き洗浄され、溶解され、任意の遊離された核酸が増幅され得る。各々が異なる分析物に対するリガンドを担持する複数の捕獲ゾーンを組み込むことで、その後のデバイスでの分析またはデバイスを離れての分析のための目的の複数のサンプル構成要素の分離および収集が可能になる。このアプローチの多重の能力によって、複数のタンパク質性の分析物および核酸分析物を、最低限度のユーザ介入で迅速に収集する(望ましい場合には検出する)ことが可能になり、必要な時間はイムノアッセイの結果を得るためには2分未満であり、そして鋭敏な配列特異的な核酸増幅および検出を得るには60分未満であろう。

10

【0024】

免疫-捕獲およびその後の化学的および/または熱媒介性の溶解に基づく、単純化されたサンプル調製スキームでは、いくつかの要因が考慮されなければならない、これには可能性のある酵素インヒビタの除去および増幅効率に対する残留サンプル物質の影響が挙げられる。適切に調製された粗細胞溶解液がNASBAについて用いられ得るが(以下の実施例1を参照のこと)、出願人は、イムノアフィニティ捕獲によって複雑な混合物から分析物粒子を同時に濃縮しながら、細胞およびマトリクスの混入物をさらに減らすために工夫された方法を使用することによって、改善された感度が達成され得ると仮定した。これによって、複雑なサンプルマトリクスからウイルス粒子を隔離し得る、LFSPの方法およびデバイスの開発がもたらされ、これによって、浄化されたウイルスサンプルが得られ、これがさらなる精製なしでその後の増幅のために適切な核酸を得るために溶解され得る。本発明のこの態様は、以下の実施例2にさらに詳細に記載されており、ここではTMV粒子が、ニトロセルロース膜の状況内でイムノアフィニティ・クロマトグラフィによって粗温浸乾燥タバコ葉から分離された。実施例2に記載される研究では、側方流動を用いて薄い分析物を部分的に規定された捕獲ゾーンに対して濃縮され得るだけでなく、捕獲ゾーンの下流のデバイスの領域が捕獲された種に対して枯渇されることが実証される。これらのデータによって、単純な側方流動イムノアッセイ法が複雑な生物学的サンプルの分離および調製についての迅速かつ費用効果的なイムノアフィニティ精製システムの基礎を形成し得るといふ仮説、ならびに、適切に処理された基板を用いて、下流の捕獲ゾーンで望ましくない構成成分のサンプルを枯渇し得るといふ主張が支持される。

20

30

【0025】

実施例2に記載される実験で利用されるサンプルは、PCR, およびNASBA増幅などのような、複雑なポリサッカライド、有機物および酵素的な操作に対して強力に阻害性である他の構成成分の存在のおかげで極めてチャレンジングなマトリクスであり、同様に、潜在的に交絡している、証明力のない核酸(植物由来のDNAおよびRNA)である。従って、実施例2に記載される結果によって、複雑な生物学的サンプルの分析における前述の側方流動媒介性免疫捕獲工程の有用性が実証され、ここでは標的の分析物は少数派の種であり、そして予備的な処理がなければ標的の直接的な増幅を妨げるPCRおよびNASBAのインヒビタが存在する。さらに、実施例2の実験で得られる結果によって、単純な側方流動イムノ-アッセイ方法が複雑な生物学的サンプルの分離および調製のための迅速かつ費用効果的なイムノアフィニティ精製システムの基礎を形成し得るといふ仮説、ならびに適切に処理された基板を用いて下流の捕獲ゾーンで望ましくない構成成分のサンプルを枯渇し得るといふ主張が支持される。

40

【0026】

[受動的なLF緩衝液交換システム]

電子的な制御システム、パルプ、および動く部分を要する他の流動制御スキームの必要性を排除するため、出願人(ら)は、側方流動基板の上の緩衝液およびサンプルの流れの

50

受動的な制御を媒介するために種々のニトロセルロース構造を開発した。ニトロセルロースまたは濾紙などの、単一の統合された側方流動膜における幾何学的に規定された流路の使用を通じて、複数の溶液/緩衝液の流速は、受動的に制御され得る。以下の実施例4に提示される実施例によってさらに説明される1つの方法論では、ニトロセルロース膜を切断して異なる溶液のための個々の流路を形成し、この流路はその膜の長さおよびまたは幅によって変化する(例えば、図4~図9を参照のこと)。図7、8および14に示されるプロトタイプのデバイスによって例示される幾何学的形状に加えて、当業者は、容易にしたいと意図する、アッセイにとって必要とされる複数の溶液の流路の所望の調節を、多くの他の形状が達成できることを容易に理解する。さらに、本発明のこの態様は、全ての流路が途切れることなく組み込まれている単一のニトロセルロース膜によって例示されるが、他のシステムも明白であり、このシステムとしては、流路が膜流路の長さおよび/または幅によって調節されるだけでなく、セルロースエステル、グラスファイバー、ポリエーテルスルホン、綿、無水ポリアクリルアミド、シリカゲル、およびポリエチレングリコールなどの膜物質以外の物質の配列を中断することによっても調節されるシステムが挙げられるが、これらに限定されない。正確に制御された流路および反応順序を規定することは、アッセイのタイプおよび複雑性に依拠して変化的に理解されるであろう。しかし、本明細書に提供される教示に基づいて、当業者は、通常の実験を用いて特定のアッセイについて必要な制御を経験的に導くことができるであろう。

【0027】

[統合型のシステム]

また、本発明の1つ以上の要素を組み込む完全統合型のサンプル-回答(sample-to-answer)型の側方流動アッセイデバイスも想定される。例示的な統合型システムは図15および図16に模式的に示される。例えば、一実施形態では、LFSPデバイスは、イムノアッセイ・スクリーニングおよびNASBA増幅の両方と、続いて下流の側方流動サンドイッチハイブリダイゼーション核酸アッセイと統合される。このようなデバイスの模式的な提示は図15に示される。

【0028】

このようなデバイスは、側方流動適合性クロマトグラフィ支持体、例えば、HiFlow 135大型細孔支持性ニトロセルロース(Millipore)を備えてもよい。この基板は、サンプル流動における所望の位置で特定の特性を付与するために、圧電作動性ピコリットル沈着システム(piezo-actuated picoliter deposition system)(NanoPlotter 2.0, GeSim)などの流体沈着システムを用いてパターンを付けられる。例えば、免疫-捕獲ゾーンの逆流の領域は、増幅インヒビタまたは他の望ましくないサンプルマトリクス混入物の活性を除去または軽減できる変更を付与するように処理される。目的の病原体に対する抗体は、毛細管側方流動の間に標的粒子がサンプル溶液から捕獲されるように配置される。さらに、受動的な流路制御を組み込むことによって、捕獲された細胞またはウイルスを溶解して、下流基板ゾーンでアフィニティ捕獲および精製のために核酸を遊離してもよい。いくつかの実施形態では、上昇した温度で溶解緩衝液中においてサンプルをインキュベートするために、USBインターフェースまたは内部もしくは外部の電源もしくはバッテリーで電力を供給される加熱要素を装備してもよい[非特許文献49]。次いで、溶解の間に遊離される核酸は、固定、洗浄および収集のために下流のアフィニティ捕獲ゾーンに流れる。このデバイスの捕獲ゾーンは、PCR、RT-PCR、NASBAまたは等温性核酸増幅反応を組み込んでよい。

【0029】

プロトコールの複雑さを有意に増大することなく、よりストリンジェントな洗浄条件の組み込みを可能にするために、本発明はまた、LNA二重鎖の安定性増大を開拓するアプローチを提供する[非特許文献39]。このスキームでは、サンプル調製デバイスは、固定されたLNAオリゴヌクレオチドを担持する。これらの固定されたプローブは、グアニジンベースの溶解緩衝液によって課される変性条件下で、標的RNAの配列特異的な八

10

20

30

40

50

イブリダイゼーション媒介性の捕獲を可能にすると予測される。他者による以前の研究では、LNAオリゴヌクレオチドが、4 Mのグアニジウムを含む粗細胞溶解液中に存在するRNA分子のハイブリダイゼーションによる捕獲に用いられ得ることが示されている〔非特許文献40〕。LNA捕獲プローブは、NASBA増幅プライマー結合部分と近いが重複はしていない領域にハイブリダイズするように設計される。

【0030】

支持（サポート）されたニトロセルロースシステムの1つの利点は、その膜に対して化学的修飾を容易に行えることである。先行技術の報告では、陽イオン交換および陰イオン交換クロマトグラフィの両方について固定された官能基を導入するためにニトロセルロースの共有結合的および吸着性の改変の詳細な方法がある〔非特許文献17〕。複数の膜システムの規定されたゾーンまたは構成要素の膜で固定された陰イオン交換リガンドを生じる処理がまた、核酸の結合および精製のために含まれてもよい。これには、ポリエチレンイミン（PEI）およびジエチルアミノエチル（DEAE）官能基が挙げられるが、これらに限定されない。この両方ともイオン交換クロマトグラフィに基づいて膜に用いられている〔非特許文献17〕。さらに、一般的な核酸サンプル混入物の輸送を軽減または防止するために核酸親和性リガンドの上流の領域を処理してもよい。このような改変としては、例えば、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリビニルポリピロリドン（PVPP）〔非特許文献31~33〕、新規なインヒビタ封鎖剤（inhibitor sequestering agents）（例えば、PIR, J. Dunbar, LANL, pers. comm.）および陽イオン交換リガンドを挙げることができる。

【実施例】

【0031】

〔実施例1〕 粗細菌細胞溶解液由来のRNAのNASBA増幅

増幅のためにテンプレートRNAを供給するための粗溶解液を用いる実現可能性を評価するために、E. coli溶解液由来のNASBA増幅の有効性を検査した。細胞-cDNA（cell-tocDNA）型の緩衝液（Ambion）に対して種々の量のE. coli液体培養物の量を添加すること、および10分間75℃まで加熱することによって、溶解液を調製した。この方法は、粗L. monocytogenesの溶解液からのRT-PCR（逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応）のための適切なテンプレートを生成することが報告された〔非特許文献49〕。溶解液を1:5希釈して、2μLの得られた物質を10μLのNASBA反応に用いた。

【0032】

構成的に発現されたmRNA, rplVを、NASBA標的として用いた〔非特許文献50〕。NASBA P1およびP2プライマー配列は以下のとおりであった：

EC-rplV-P1:

5'-aatctctaatacgaactcactataggagaggCCATCGTTGTGTTTCAGCGTTA-3'〔配列番号1〕

および

EC-rplV-P2:

5'-gatgcaaggctcgcatatgagAACTATCGCTAAACATCGCCA-3'〔配列番号2〕。

【0033】

P1配列における小文字は、T7 RNAポリメラーゼプロモータ配列を示す。P2配列の小文字は、ハイブリダイゼーション・サンドイッチ・アッセイ媒介性検出のために用いられるタグ配列を表す。LFMでのrplV捕獲および検出について用いられる配列は捕獲プローブであった：

rplV-cap: 5'-CTGCTCAGAAAGGTTTCGCCCTT-3'〔配列番号3〕

および検出プローブ:

UNI-det-5Tbio: 5'-TT-U-biotin-TTTT-U-biot

10

20

30

40

50

in - T T T T - U - b i o t i n - T T T T T T T g a t g c a a g g t c g
c a t a t g a g - 3 ' [配列番号 4] 。

【 0 0 3 4 】

N A S B A 反応は 4 1 で 6 0 分間進行され、その後 4 μ L を取り出して、ストレプトアビジンにコンジュゲートされた染色されたポリスチレンマイクロスフェアによって媒介される比色検出を用いて L F M により r p l V アンプリコンについてアッセイした。

【 0 0 3 5 】

図 1 に示される結果は、示された細胞数由来の粗溶解液を有する N A S B A 反応に対する曝露後の L F M 膜を示す。2 0 0 0 個程度の少ない細胞を、L F M によって、その後の N A S B A 増幅によって、テンプレートを供給するために粗全細胞溶解液を用いて検出し得る。この実験によって、グアニジウムの存在下において変性条件下で調製された粗溶解液を N A S B A テンプレートとして首尾よく用い得ることが示される。サンプル調製のための 1 つの提唱された側方流動方法がグアニジウム緩衝液中で標的 R N A の配列特異的な捕獲およびストリンジェントな洗浄を可能にすることを考慮すれば、粗溶解液で得られた 2 0 0 0 個の細胞の検出限界は有意に改善され得る可能性が高い。

【 0 0 3 6 】

[実施例 2] 葉の組織内に含まれる T M V 粒子由来の分析物の側方流動濃縮、およびその後の増幅

本実施例では、核酸の単離または増幅の前の分析物を濃縮する手段としての側方流動が促進する免疫 - 捕獲の有用性を、タバコ・モザイク・ウイルス (T M V) で検討した。

【 0 0 3 7 】

図 2 A ~ 図 2 C は、免疫捕獲ゾーン (図 2 A に示される) の下 (サンプルパッドに近位) 、免疫捕獲ゾーンにおいて、および免疫捕獲ゾーンの上 (サンプルパッドに遠位) の側方流動基板の領域でプログラムされた 2 0 0 μ L の粗温浸タバコの側方流動およびその後の増幅 (逆転写酵素 P C R) 反応の間のタバコ・モザイク・ウイルス (T M V) 粒子のイムノアフィニティ捕獲および濃縮の結果を示す。この捕獲ゾーンはウイルス粒子が極めて豊富であるが、阻害性構成成分の相対濃度が低下している。ここで示された、捕獲ゾーンの算出されたベッド容積に基づいて、2 0 0 μ L ~ 2 0 0 n L のサンプル容積の 1 0 0 0 倍の低下によってまた、その後の洗浄を容易にしてさらにインヒビタの濃度を低下させる。

【 0 0 3 8 】

側方流動を用いて、薄い分析物を空間的に規定された捕獲ゾーンへ濃縮することができるだけでなく、捕獲ゾーンの下流のデバイスの領域が捕獲された種に対して枯渇されることもこれらのデータによって示される。これらのデータによって、単純な側方流動イムノアッセイ方法が、複雑な生物学的サンプルの分離および調製のための迅速かつ費用効果的なイムノアフィニティ精製システムのための基礎を形成し得るという出願人らの仮説、ならびに、適切に処理された基板を用いて下流の捕獲ゾーンで望ましくない構成成分のサンプルを枯渇し得るという主張が支持される。

【 0 0 3 9 】

[実施例 3]

ポリビニルピロリドンを用いる増幅インヒビタの側方流動減少

本実施例によって、ポリビニルピロリドン処理されたサンプルパッドが、側方流動を介して P C R インヒビタを枯渇し得ることが示される。

【 0 0 4 0 】

P C R に対して阻害性の粗サンプル構成成分が側方流動の間に枯渇され得るという、出願人らの予備的研究の経過中になされた観察では、特定の基板処理が、捕獲された標的細胞または粒子からの核酸の増幅をさらに容易にし得るということが示唆された。この仮説を試験するために、吸収性のサンプルパッドをポリビニルピロリドン (M W = 3 6 0 , 0 0 0) の 1 0 % 溶液で処理して [非特許文献 3 1 ~ 3 3] 、 P V P 処理されたまたは未処理のサンプルパッドのいずれかを担持するデバイス上で側方流動免疫 - 捕獲後 (実施例 2

10

20

30

40

50

、上記) 温浸された葉の組織から濃縮されたTMVのRT-PCR増幅を評価した。

【0041】

これらの反応は、TMV検出について以前に報告されたプライマーセットを利用した[非特許文献35]。RT-PCR反応に直接添加されたニートなタバコ抽出物は、インヒビタを枯渇するための事前の免疫-捕獲なしにTMVに陰性であった。この解釈と一致して、抽出物の1:50希釈は、さらに低いインヒビタ濃度におそらく起因してPCRで陽性であった。

【0042】

図3に示されるとおり、PVPサンプルパッドは、強力なPCRインヒビタである、外因性に添加されたフミン酸からの阻害を軽減したが[非特許文献9, 34]、未処理のサンプルパッドは阻害を軽減しなかった。おそらく最も重要なことには、PVP処理されたサンプルパッドの使用によって、外因性に添加されたインヒビタが存在しなくても未処理のサンプルパッドに対して増幅が有意に改善される結果となった。12ngおよび25ngのフミン酸補充抽出物は、未処理のサンプルパッドでの側方流動ストリップを用いてTMV捕獲後に検出可能なPCR産物を生じることができなかったが、全てのサンプルが、PVP処理されたサンプルパッドを用いて免疫-捕獲に供された場合、検出可能なPCR産物を示した(図3)。興味深いことに、PVP処理されたサンプルパッド上を流された0、12および25ngのフミン酸サンプルは、未処理のパッドで処理された0ngのコントロールに対して改善されたPCR増幅を示した(図3)。

【0043】

[実施例4] 側方流動システム中の複数の溶液の流動を受動的に制御するための幾何学的な構造

本実施例は、流体流動の速度および容積を制御する幾何学的に規定されたニトロセルロースストリップの特性を利用する、受動的側方流動緩衝液制御システムのプロトタイプ(試作品)を示す。プロトタイプのニトロセルロースまたは他の吸収材料ベースのデバイスを迅速に作製するために、ビニルカッター(Roland GX-24 CAMM-1)またはレーザーの切断/彫刻システム(30W CO2レーザーを装備したVersaLaser VL-300(Universal Laser Systems, Inc.))を用いて吸収物質のシートから小型の構造を切り出すための方法が開発された(図4~図9)。さらに、背後にあるニトロセルロースシートからのニトロセルロースのレーザーアブレーション(レーザー切断)によって、流動制御および緩衝液交換構成要素としての使用に適切な平坦なニトロセルロース構造の製造が可能になる(図7)。多数の異なる形状のニトロセルロース構造を、側方流動方式の受動的毛細管吸上げによって2つの流体(図4、図5および図7)および3つの流体(図6、8および9)を交換する際のその有用性について評価した。

【0044】

プロトタイプデバイスを用いる流体流動制御を図4に示す。この初期型プロトタイプでは、2つの異なる緩衝液が、ニトロセルロースストリップに切断される幾何的特性を変えることによって規定される種々の経路を通じた毛細管流によって種々の速度で移動する。

【0045】

さらに洗練されたプロトタイプのデバイスを、ビニルカッターを用いて製造して、図8A~図8Dに示した。異なる溶液について規定されたニトロセルロース通路の長さおよび幅を変化させることによって、このデバイスは、デバイス上の規定された反応ゾーンに対して3つの異なる溶液の一時的制御を管理することができた。図8に示されるとおり、サンプル、溶解緩衝液および増幅緩衝液をデバイスに導入する(図8A)。サンプル緩衝液は、広い膜通路を通じて免疫-捕獲ゾーンの上を流れて、サンプル流が消費されるまで、溶解緩衝液および増幅緩衝液を基板壁に近位の膜領域へ置き換える(図8B)。サンプルが消費されるにつれて、溶解緩衝液は、免疫-捕獲ゾーンに侵入して、下流の「LNA-捕獲ゾーン」で固定されたLNAプローブ上のハイブリダイゼーションベースの捕獲のために、捕獲された粒子を破壊して核酸を遊離する(図8Aに示される)。溶解緩衝液の消

10

20

30

40

50

費後、N A S B A 増幅に適切な緩衝液は、L N A - 捕獲ゾーンを洗浄して、残留の溶解緩衝液を除去し、プライマーのハイブリダイゼーションを容易にする。3分以内に、10 μ L のサンプル、溶解緩衝液および増幅緩衝液の容積を用いて3つの緩衝液交換が達成される。免疫 - 捕獲ゾーンおよびL N A - 捕獲ゾーンの算出されたベッド容積は約250 nL であり、従って各々の緩衝液交換は、約40ベッド容積で捕獲ゾーンを洗浄する。さらに流体流動調節は、種々の長さおよび幅の追加の流路を用いて実現されて、さらなる緩衝液の洗浄および交換が可能になり得る。同様に、緩衝液の粘度の調節を用いて、溶解緩衝液中におけるインキュベーション時間のようなアッセイパラメータをさらに洗練してもよい。最も重要なことに、デバイスサイズは、より大きいサンプル容積の処理に適合するように変更され得る。各パネルの右側の定規部分は1 mmである。

10

【0046】

[実施例5] 増幅有効性を増大するために免疫捕獲された標的を受動的に洗浄するための幾何学的構造

R T - P C R アンプリコンのリアルタイム検出およびN A S B A 反応産物のL F M 検出を使用する実験から得た結果によって、サンプルマトリクスの残留の障害性構成成分が、免疫捕獲されたウイルスと会合して残るか、またはクロマトグラフィ基板の含まれたベッド容積に残ることが示された。これらのデータによって、側方流動免疫 - 捕獲後の緩衝液洗浄が複雑なサンプルマトリクスからの増幅効率を増大する簡易だが有効な手段を提供し得ることが示唆された。この仮説を試験するために、側方流動ストリップを、捕獲ゾーンラインに抗T M V 抗体を、およびコントロールラインにコロイド金コンジュゲートされた検出抗体に結合し得るコントロール抗体を担持するニトロセルロースイムノアッセイストリップ上へ受動的緩衝液交換を媒介するように設計されたニトロセルロース構造を積層することによって、捕獲ゾーンの回収および核酸増幅の前に緩衝液洗浄に供した。

20

【0047】

側方流動基板の緩衝液洗浄を達成するのに必要な使用者の介入のレベルを最小限にするために、側方流動ストリップを、受動的な緩衝液交換を達成するように設計された形状へ背景のニトロセルロース切断に積層した。これらのデバイスによって、洗浄緩衝液でのサンプルの迅速な交換およびP C R の前に超純粋H₂O中での最終の平衡化によって、P C R の能力に対する残留の洗浄緩衝液の潜在的な影響を減じることが可能になった。用いられるデバイスは図8 E に示される。100 μ L のサンプル容積を用いた。洗浄緩衝液の容積は50 μ L であって、その後の最終リンスは25 μ L のH₂Oを用いて残留の緩衝液構成成分を除去した。サンプル、洗浄緩衝液およびH₂Oを、アッセイ開始時点で384ウェルのプレートの対応するウェルに添加した。毛細管輸送の終了後、捕獲ゾーンを回収して、リアルタイムR T - P C R による分析に供した。

30

【0048】

側方流動ストリップの捕獲ゾーンでウイルスのイムノアフィニティ固定と適合した組成物を用いて緩衝液を特定するために、ニートなタバコ抽出物を用いて生成されたT M V 免疫 - ストリップ捕獲ゾーンシグナルに対する種々の洗浄緩衝液の効果を評価した。これらの研究によると、ここでN M E (0.5 M のN a C l、50 m M のM O P S p H 7.0、15%のエタノール)と呼ばれる、200 μ L のエタノール含有洗浄緩衝液の毛細管吸上げ後、捕獲ゾーンから隔離された金粒子の視覚的に検出可能な溶出は現れなかった。捕獲ゾーンシグナルに対するN M E の効果とは対照的に、グアニジウムイソチオシアネート含有緩衝液R L T (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) では、検出粒子の捕獲ゾーンを急速に浄化した。

40

【0049】

S E B 1 中のD C T L E の種々の希釈での受動的な緩衝液交換構造に対して積層されたT M V イムノ - アッセイ・ストリップのチャレンジ(試み)後、50 μ L のN M E 洗浄を用いて、捕獲ゾーンを回収して、N A S B A 増幅およびL F M によるアンプリコン検出に供した。これらの研究によって、未希釈のD C T L E に曝されたストリップから回収された捕獲ゾーン物質でプログラムされた反応物中において以前に観察されたN A S B A 増幅

50

の軽減が明らかになった(図10Aと図10Bを比較のこと)。さらに、NME緩衝液洗浄の結果、少なくとも1:16,000というDCTLE希釈でのTMVの検出が得られ、これによってクロマトグラフィ基板からのDCTLE希釈に使用されるSEB1抽出緩衝液のさらに完全な除去が、増幅効率をさらに増大することが示唆された。

【0050】

TMVアンプリコンのLFM検出は、LFM基板上に固定された捕獲プローブTMV-1およびTMV-2(を利用し)、

TMV-1:

5' TTATGCTATAACCCACCCAGG3' [配列番号5]

TMV-2:

5' TTATGCTATAACCCACCCAGGACGCGATGAAAAACGTCTGGCAA3' [配列番号6]

ならびに検出プローブ:

UNI-det-5Tbio:

5' -TT-U-biotin-TTTT-U-biotin-TTTT-U-biotin-TTTTTTT gat gca agg tcg cat atg ag-3'

[配列番号7]

を利用し、これは、ストレプトアビジンコンジュゲートされ染色されたポリスチレンマイクロスフェア(Spherotech)捕獲によって可視化された。

【0051】

TMV診断配列のNASBA増幅は以下を用いて達成された:

TMV-P1: 5' aat tct aat acg act cac tat agg g aga GAA AGC GGA CAG AAA CCC GCT Ga 3'

[配列番号8]

TMV-P2: 5' gat gca agg tcg cat atg ag GAC CTG ACA AAA ATG GAG AAG ATC T3' [配列番号9]

【0052】

TMV-P2プライマーは、NASBA産物中にタグ配列を組み込み、このNASBA産物がUNI-det-5Tbioにハイブリダイズされて検出を媒介し得る。

【0053】

[実施例6] 複雑かつ阻害性のサンプルマトリクスにおいて微量のウイルスを検出するための受動的な緩衝液交換の使用

タバコ抽出物を利用する研究によって、これらのサンプル中の高いウイルス力価は、TMVのPCRベースの検出を、粗溶解物中のインヒビタを境界濃度未満まで下げるのに十分な程度まで、単に抽出物を希釈することによって達成可能とすることが明らかになった。低力価の標的ウイルスを含むインヒビタ含有サンプルを増幅しやすくする側方流動免疫捕獲工程の有用性をさらによく評価するため、土壌抽出物を利用するサンプルを、サンプル処理手順を干渉することなくTMV診断配列のPCR増幅を完全に無効にするのに十分な酵素インヒビタ濃度を含むように工夫した。これらのサンプルによって、PCRベースの検出スキームに対する側方流動免疫捕獲の影響の評価が可能になり、増幅阻害のレベルに対する緩衝液洗浄の影響を評価するアプローチが得られる。チャレンジングなインヒビタ含有サンプルを提供するため、DCTLEを、図11に示されるとおり、50mLのポリプロピレン遠心管中へ測定した3gの局地的に集めた土壌を用いて調製したPCR阻害性の土壌抽出物へ、1:2000または1:4000希釈して、30mLのSEB1抽出緩衝液(Agdia, Inc.製)中に激しくボルテックスして、室温で一晩回転させた。得られた土壌スラリーを、RNA単離、TMVのためのPCR試験、またはDCTLEでスパイクされた土壌抽出物の調製のためのアリコート回収の前に3分間落ち着かせた。

【0054】

捕獲ゾーンを、サンプルおよび洗浄緩衝液の輸送の完了後に収集して、逆転写酵素反応

10

20

30

40

50

に導入し、続いて1 μ LのRT反応をテンプレートとして用いるリアルタイムPCRに導入した。土壤抽出物を特徴付けるため、土壤抽出物の総RNAを、Qiagen RNeasyプロトコルを用いて単離し、リアルタイムRT-PCRによってTMVについてアッセイして、そのマトリクスがTMVについて陰性であることを確認した。さらに、DCTLEスパイクした土壤由来のサンプルマトリクスは、1:2000または1:4000のいずれかのDCTLEを含んでいる100 μ Lの土壤抽出物をチャレンジされたTMVアッセイストリップから回収された捕獲ゾーンを用いて、偽陰性のリアルタイムRT-PCR結果を生じた(図11)。50 μ LのNME緩衝液を用いて1:2000という最終希釈でタバコ抽出物を含有する土壤抽出物でチャレンジされたTMVアッセイストリップの受動的な毛細管流動によって媒介される洗浄では、陽性のリアルタイムRT-PCRの結果($Ct = 26.2$)(図11)、およびアガロースゲル中の明確に特定可能なバンドが生じた(図12、NME)。50 μ LのRLT緩衝液での洗浄は、RT-PCRおよびゲル分析(図12、RLT)、またはリアルタイムRT-PCR(図示せず)のいずれでもTMV検出には成功しなかった。さらに、土壤抽出物中のDCTLEのさらに薄い溶液、1:4000も、リアルタイムRT-PCRによってTMV検出が陽性であって(図11)、ここで50 μ LのNME緩衝液洗浄を捕獲ゾーン回収の前に使用した場合、27.2という Ct 値であった。

【0055】

[実施例7] アフィニティマトリクスに対して結合された核酸を受動的に洗浄するための幾何学的構造

核酸がグアニジン溶解液から直接捕獲されることを可能にする受動的緩衝液交換アプローチの能力を評価するため、1 μ LのRLTあたり22 μ gのタバコを用いて、Qiagen RLTグアニジウムイソチオシアネート溶解緩衝液中で乾燥硬化させたタバコの葉を浸軟することによって、タバコ溶解液を調製した。側方流動クロマトグラフィおよび緩衝液交換のためのデバイスは、レーザーカッター(VersaLaser VL-300, 30W CO2レーザー, Universal Laser Systems)を用いて製造した。このデバイスは、緩衝液交換構成要素のインพุットテールが4.5mmの間隔を隔てており、サンプルおよび緩衝液が384ウェルのプレートのウェルから吸収されることを可能にするように設計された。緩衝液エクステンジャの遠位端は、Qiagen RNeasyカラムからとった3mm径のパンチに積層された。このシリカRNA結合マトリクスを用いて、毛細管流動媒介性の緩衝液交換がウイルスRNA捕獲を支持する適切性を評価した。他の材料、例えば、ガラス・ファイバー・フィルター材料も使用され得る。同様に、他の緩衝液システムを用いて、DEAE膜が、同様のシステムに組み込まれてもよい。

【0056】

10 μ LのRLTタバコ抽出物をサンプルとして用いた。40 μ Lの洗浄を、洗浄なしのコントロール以外は全ての処理についてNME緩衝液を用いて行い、続いて80 μ LのNME、またはNaClを0~1Mにわたる濃度で図13に示されるとおり用いて行った。これらのデータによって、NME洗浄とその後の0.5MのNaCl洗浄で、試験された条件の最高の増幅が提供されたことが示される。洗浄しなかったサンプルは、検出可能なリアルタイムRT-PCR産物を生じることができなかった。

【0057】

[実施例8] 容易な標的富化ならびに増幅および検出の前の洗浄を支持する流体システムへの受動的緩衝液交換幾何学的構造の組み込み

コンパクトでかつ内蔵型のハウジングへ側方流動捕獲および緩衝液交換システムを組み込むために、支持的な流体システムを工夫した。この流体システムは、図14B~図14Dに示される幾何形状へ、レーザーカッターを用いてポリカーボネートのシートを切断することによって、図14Aに示されるようなニトロセルローズまたは濾紙緩衝液エクステンジャを収容するように製造された。適切に切断されたポリカーボネートのシートを積層して、UV硬化接着剤または防水両面テープ(ACE両面カーペットテープ50106

)を用いてサンプルおよび緩衝液のウェルを形成した。得られたデバイスによって、サンプルおよび洗浄緩衝液がアッセイ開始時点で導入されることを可能になったと共に、さらに使用者が介入することなくサンプルのクロマトグラフィおよび洗浄を支持した。

【 0 0 5 8 】

[むすび]

本明細書に引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、あたかも個々の刊行物または特許出願が参照によって援用されるものと具体的且つ個別的に示されているかのように、参照によって本明細書に援用される。

【 0 0 5 9 】

本発明は、本発明の個々の態様の単一の例示として意図され、そのいずれもが本発明の範囲内で機能的に等価である、本明細書に開示される実施形態によって範囲を限定されるものではない。本明細書に記載されるモデルおよび方法に加えて、本発明のモデルおよび方法に対する種々の改変が、前述の説明および教示から当業者に明らかになり、そして同様に本発明の範囲内におさまるものとする。このような改変または他の実施形態は、本発明の真の範囲および趣旨から逸脱することなく実施され得る。

10

【 0 0 6 0 】

[文献の引用]

(文献 1 ~ 5 5 は、非特許文献 1 ~ 5 5 として「先行技術文献」の欄に記載した。)

【 0 0 6 1 】

[付記] 原出願の P C T 出願時のオリジナルクレーム

20

(項目 1)

側方流動マトリクスを備える側方流動サンプル調製 (L F S P) デバイスであって、前記側方流動マトリクスは、流路を規定し、且つ連続して以下の要素、即ち、
(a) 流体サンプルのアリコートを受容するためのサンプル受容ゾーンと、
(b) 前記サンプル受容ゾーンと側方流動的に接触すると共に、目的の生物学的粒子または細胞上に存在するリガンドと反応性を有する固定された抗体を含む、免疫 - 捕獲ゾーンと、を備える、
ことを特徴とする L F S P デバイス。

(項目 2)

側方流動マトリクスを備える側方流動サンプル調製 (L F S P) デバイスであって、前記側方流動マトリクスは、流路を規定し、且つ連続して以下の要素、即ち、
(a) 流体サンプルのアリコートを受容するためのサンプル受容ゾーンと、
(b) 前記サンプル受容ゾーンと側方流動的に接触すると共に、目的の生物学的粒子または細胞上に存在するリガンドと反応性を有する固定された抗体を含む、免疫 - 捕獲ゾーンと、
(c) 前記免疫 - 捕獲ゾーンと側方流動的に接触すると共に、生物学的粒子または細胞の膜の溶解およびそれからの核酸の遊離を達成し得る、溶解ゾーンと、を備える、
ことを特徴とする L F S P デバイス。

30

(項目 3)

側方流動マトリクスを備える側方流動サンプル調製 (L F S P) デバイスであって、前記側方流動マトリクスは、流路を規定し、且つ連続して以下の要素、即ち、
(a) 流体サンプルのアリコートを受容するためのサンプル受容ゾーンと、
(b) 前記サンプル受容ゾーンと側方流動的に接触すると共に、目的の生物学的粒子または細胞上に存在するリガンドと反応性を有する固定された抗体を含む、免疫 - 捕獲ゾーンと、
(c) 前記免疫 - 捕獲ゾーンと側方流動的に接触すると共に、生物学的粒子または細胞の膜の溶解およびそれからの核酸の遊離を達成し得る、溶解ゾーンと、
(d) 前記溶解ゾーンと側方流動的に接触する 1 つ以上のアッセイゾーンであって、一緒になってサンドイッチ核酸ハイブリダイゼーションアッセイのための核酸および標識構成成分を形成する、 1 つ以上のアッセイゾーンと、を備える、

40

50

ことを特徴とする L F S P デバイス。

(項目 4)

前記溶解ゾーンの下流にあって該溶解ゾーンと側方流動的に接触し、且つ、前記アッセイゾーンの上流にあって該アッセイゾーンと側方流動的に接触する、核酸増幅ゾーンを更に備える、項目 2 または 3 に記載の L F S P デバイス。

(項目 5)

前記免疫 - 捕獲ゾーンが微小孔性の膜を備える、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。

(項目 6)

前記溶解ゾーンが微小孔性の膜を備える、項目 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。 10

(項目 7)

前記アッセイゾーンが微小孔性の膜を備える、項目 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。

(項目 8)

前記微小孔性の膜がニトロセルロースである、項目 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。

(項目 9)

少なくとも前記サンプル受容ゾーンが、流体の吸上げ、及び、そこでの少なくとも 1 つの流体流動の受動的制御を支持し得る幾何学的に規定された吸収材料を備える、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。 20

(項目 10)

少なくとも前記サンプル受容ゾーンおよび前記免疫 - 捕獲ゾーンが、流体の吸上げ、及び、そこでの少なくとも 1 つの流体流動の受動的制御を支持し得る幾何学的に規定された吸収材料を備える、項目 9 に記載の L F S P デバイス。

(項目 11)

少なくとも前記サンプル受容ゾーン、前記免疫 - 捕獲ゾーンおよび前記溶解ゾーンが、流体の吸上げ、及び、そこでの少なくとも 1 つの流体流動の受動的制御を支持し得る幾何学的に規定された吸収材料を備える、項目 10 に記載の L F S P デバイス。

(項目 12)

前記溶解ゾーンと側方流動的に接触する核酸結合マトリクスを更に備える、項目 2 ~ 11 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。 30

(項目 13)

前記溶解ゾーンと前記アッセイゾーンとの間にあって、その両方と側方流動的に接触する核酸結合マトリクスを更に備える、項目 3 ~ 12 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。

(項目 14)

前記核酸結合マトリクスが、シリカ、グラスファイバーおよび D E A E 膜からなる群から選択される、項目 12 又は 13 に記載の L F S P デバイス。

(項目 15)

側方流動マトリクスを備えるデバイスであって、前記側方流動マトリクスは、流路を規定し、且つ、流体の吸上げ、及び、そこでの少なくとも 1 つの流体流動の受動的制御を支持し得る幾何学的に規定された吸収材料を備えている、

ことを特徴とするデバイス。

(項目 16)

前記幾何学的に規定された吸収材料が、そこでの複数の流体流動の受動的制御を可能にする、項目 15 に記載のデバイス。

(項目 17)

前記幾何学的に規定された吸収材料と側方流動的に接触する核酸結合マトリクスを更に 50

備える、項目 1 5 又は 1 6 に記載のデバイス。

(項目 1 8)

前記核酸結合マトリクスが、シリカ、グラスファイバーおよび D E A E 膜からなる群から選択される、項目 1 7 に記載のデバイス。

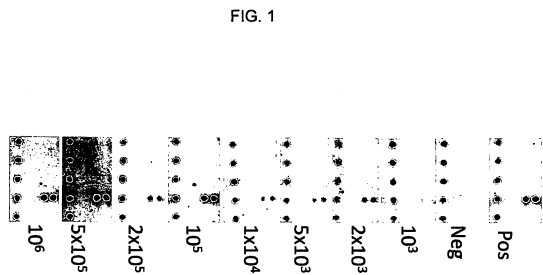
(項目 1 9)

図 5、6、7、8、9 または 1 4 A に本質的に示されるとおりの構成を有する幾何学的に規定されたニトロセルロース製ストリップ。

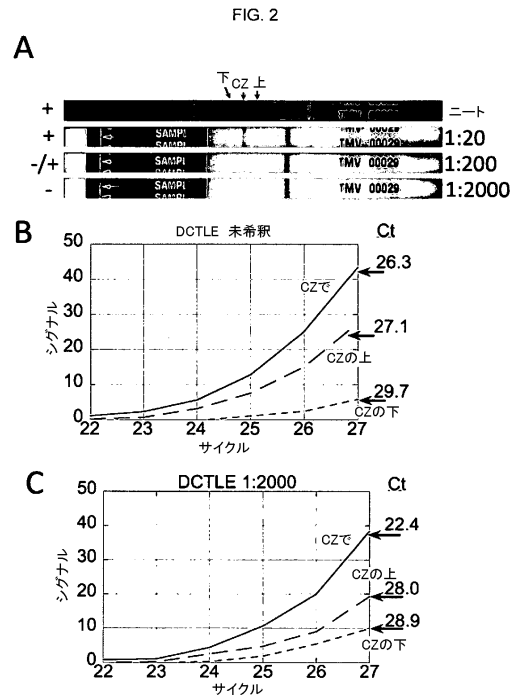
(項目 2 0)

前記吸収材料がニトロセルロースを含む、項目 9 ~ 1 1、および 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の L F S P デバイス。

【 図 1 】

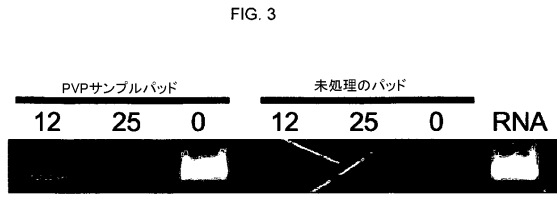


【 図 2 】

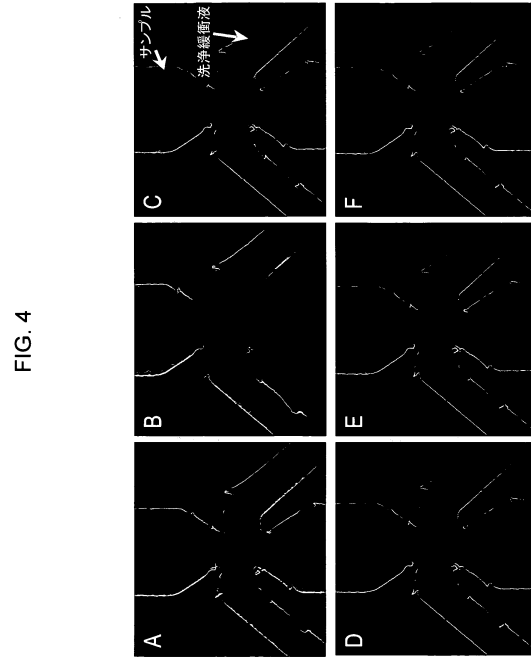


CZとは、捕獲ゾーンのこと。

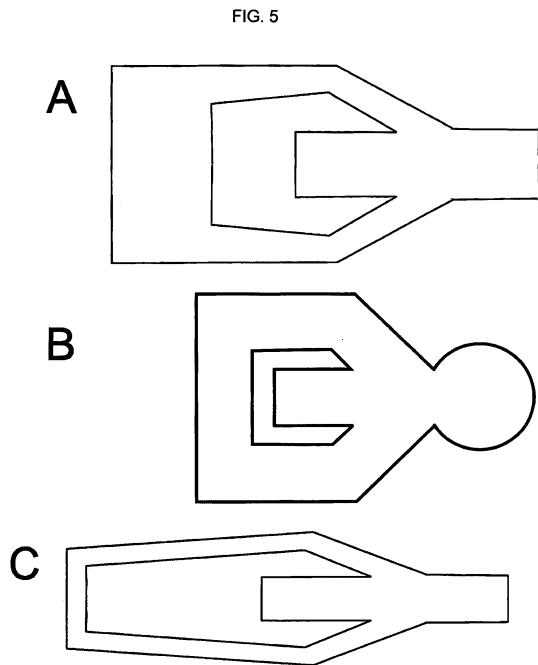
【 図 3 】



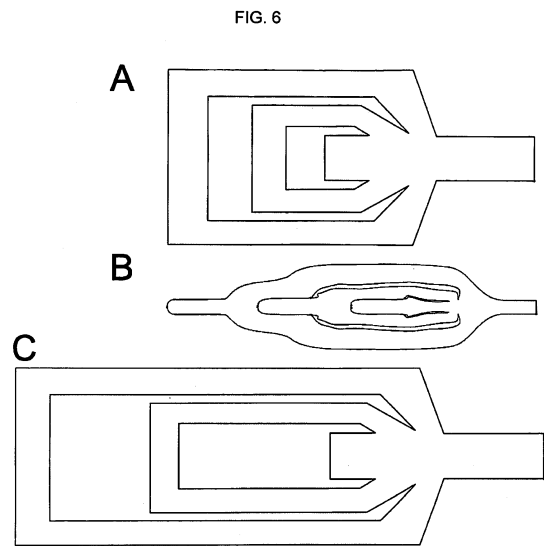
【 図 4 】



【 図 5 】

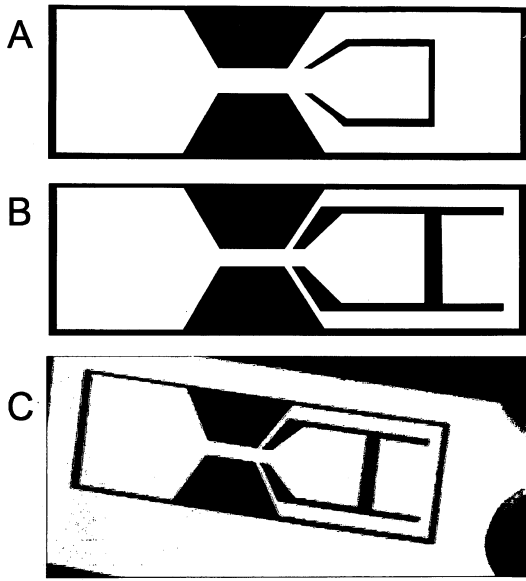


【 図 6 】



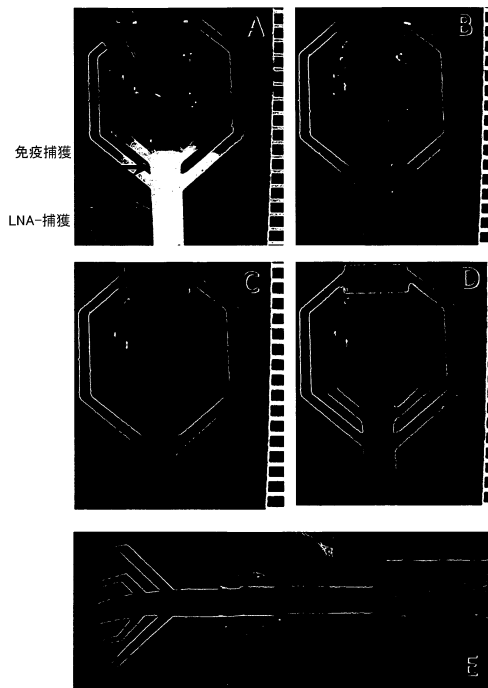
【図7】

FIG. 7



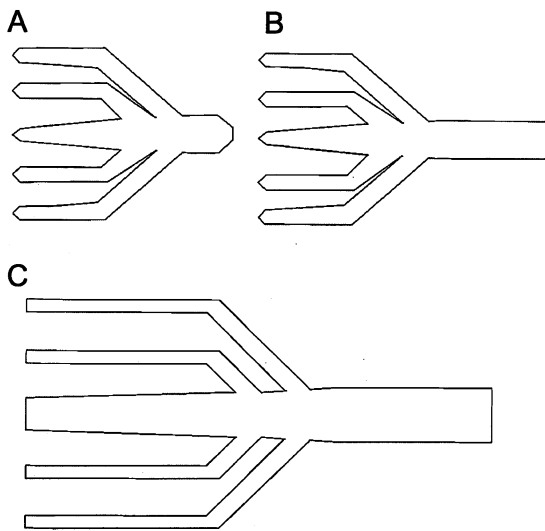
【図8】

FIG. 8



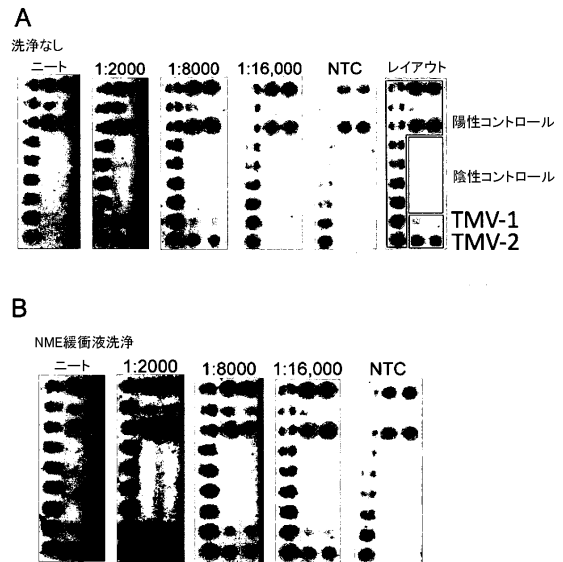
【図9】

FIG. 9



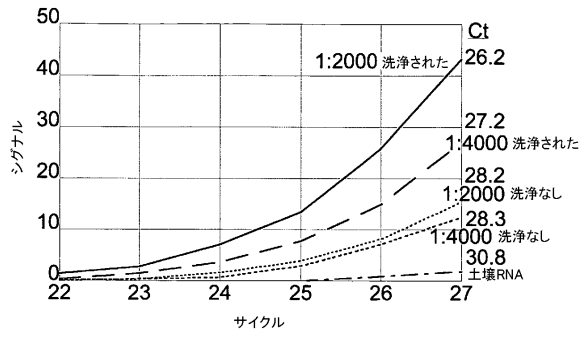
【図10】

FIG. 10



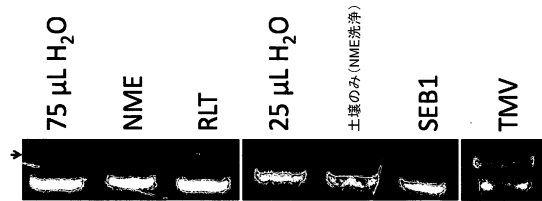
【 図 1 1 】

FIG. 11



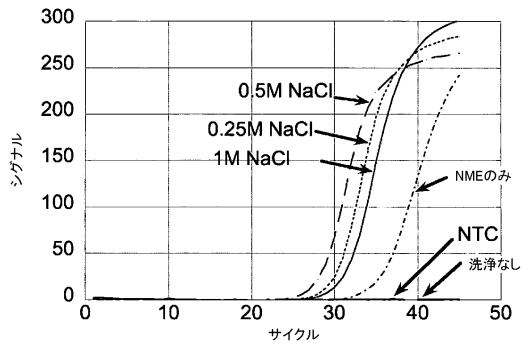
【 図 1 2 】

FIG. 12



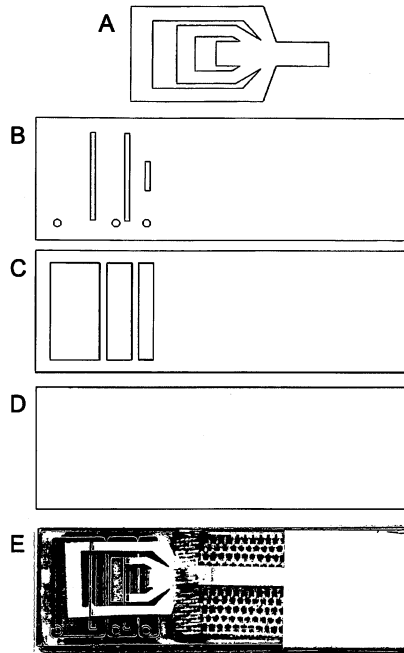
【 図 1 3 】

FIG. 13



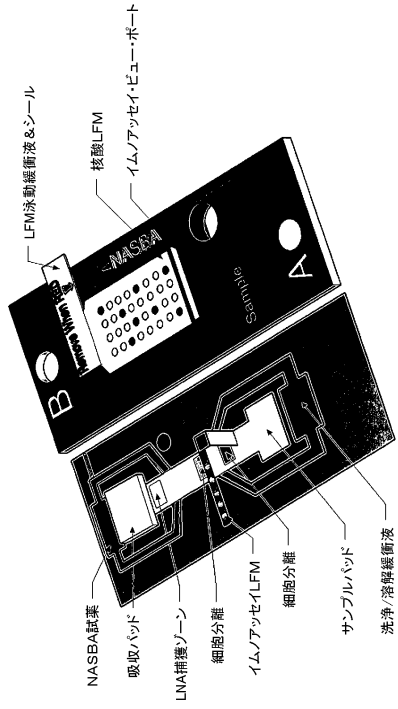
【 図 1 4 】

FIG. 14



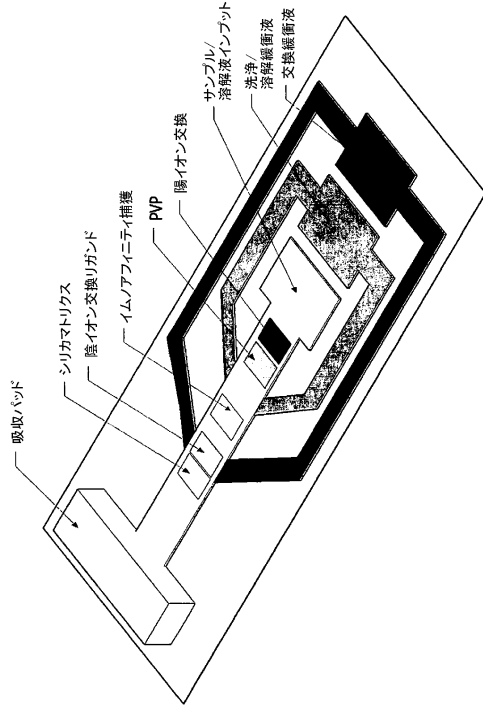
【 図 15 】

FIG. 15



【 図 16 】

FIG. 16



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平05 - 240872 (JP, A)
特開2005 - 185972 (JP, A)
特表2005 - 532827 (JP, A)
特表2007 - 503958 (JP, A)
特表2006 - 520190 (JP, A)
特開2007 - 071711 (JP, A)
特開平6 - 094724 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10
G01N 33/00 - 37/00

专利名称(译)	基于横向流动的高度简化的核酸样品制备和被动流体流动控制		
公开(公告)号	JP6026570B2	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	JP2015018327	申请日	2015-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	洛斯阿拉莫斯国家安全有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	洛斯阿拉莫斯国家安全, 有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛斯阿拉莫斯国家安全, 有限责任公司		
[标]发明人	カリー口パートビー		
发明人	カリー,口パート,ビー.		
IPC分类号	C12M1/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	C12N15/101 G01N1/405 G01N33/558		
FI分类号	C12M1/00.A G01N33/53.M G01N33/543.521 G01N37/00.101		
F-TERM分类号	4B029/AA23 4B029/FA01		
审查员(译)	高山俊光		
优先权	61/126645 2008-05-05 US		
其他公开文献	JP2015108637A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，装置和集成系统，用于高度简化的侧向流动色谱核酸样品制备，以去除有效浓度的微量样品和核酸扩增抑制剂。 解决方案：快速免疫亲和捕获真核细胞和分析物，包含原核细胞，病毒和植物细胞和物质，以及细胞/病毒溶解，无蛋白质污染和其他基质衍生成分利用LFM技术和被动流体流动控制系统的装置和方法能够与特定DNA或RNA序列的特异性杂交亲和捕获相结合以进行浓缩和洗涤。 .
The 15

