

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 507705

(P2003 - 507705A)

(43)公表日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 3
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
1/34		1/34	Z 2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	G 4 B 0 2 4
21/78		21/78	C 4 B 0 2 9

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 64数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 517147(P2001 - 517147)

(86)(22)出願日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月13日(2002.2.13)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/07529

(87)国際公開番号 W001/013096

(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)

(31)優先権主張番号 1486/99

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 スイス(CH)

(71)出願人 ツェプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト

ZEPTOSENS AG

スイス国 4108 ヴィッテルスヴィル ベンケンシュトラッセ 254

(72)発明者 アーベル, アンドレアス ペー

スイス国 ツェーハー - 4054 パーゼル

ロートベルクシュトラッセ 16アー

(72)発明者 ドゥベネック, ゲルト エル

ドイツ国 デー - 79189 バート クロツィンゲン エツマッテンヴェーク 34

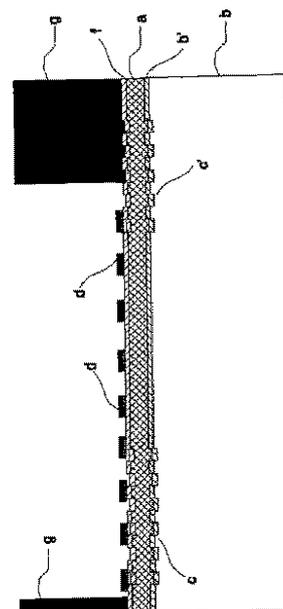
(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 複数の分析物を測定するためのデバイス及び方法

(57)【要約】

本発明は、センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層 (g) (図 1 に従う) と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を 2 次元配置で形成するデバイスであって、前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画内において 5 つ以上の離散的な測定領域 (d) (図 1 に従う) に固定化され、前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層(g) (図1に従う)と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を2次元配置で形成するデバイスであって、

前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画内の前記平面型光導波路上において2次元配列で5つ以上の離散的な測定領域(d)に固定化され、

前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、

前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動し得るデバイス。

【請求項2】 標本区画内の各々で、単一の標本区画における5つ以上の測定領域のうちの1つ以上の測定領域が、基準のために使用される請求項1のデバイス。

【請求項3】 同じ化学的又は光学的パラメータを基準とするための測定領域が、センサープラットフォームにわたって分布した複数の標本区画内で使用され、センサープラットフォームにわたって前記化学的又は光学的パラメータの横方向の分布を測定することができる請求項2のデバイス。

【請求項4】 前記測定領域は、前記平面型光導波路内において光学的に相互作用して励起光のエバネッセント場を誘導する請求項1～3のいずれかのデバイス。

【請求項5】 センサープラットフォームの一部としての光導波路が、非有機材料好ましくはガラス、又は有機材料、好ましくはポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート若しくはポリスチレンを含む群から選択されるプラスチックを含む多重モード又は単一モードの導波路であり、これらの材料は、少なくとも

励起及びルミネセンス波長において光透過性を示す請求項1～4のいずれかのデバイス。

【請求項6】 センサープラットフォームの一部としての光導波路は、自己支持する請求項1～5のいずれかのデバイス。

【請求項7】 センサープラットフォームの一部としてのフィルム光導波路が、層(a)よりも低い屈折率を有する第2の光透過層(b)(図1に従う)の上の第1の光透過層(a)(図1に従う)を有するフィルム光導波路である請求項1～4のいずれかのデバイス。

【請求項8】 第2の光透過層(b)の材料が、ガラス、石英又は好ましくはポリカーボネート、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート若しくはポリスチレンを含む群の透明な熱可塑性プラスチックを含む請求項7のデバイス。

【請求項9】 第1の光透過層(a)の屈折率が、1.8より大きい請求項7又は8のデバイス。

【請求項10】 第1の光透過層(a)が、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 、又は ZrO_2 、好ましくは Ta_2O_5 又は Nb_2O_5 を含む請求項7～9のいずれかのデバイス。

【請求項11】 第1の光透過層(a)の厚さが、40～300nm、好ましくは100～200nmである請求項7～10のいずれかのデバイス。

【請求項12】 光透過層(a)と(b)との間に、層(a)よりも低い屈折率を有しかつ層(a)に接触し、かつ、厚さが5nm～10000nm、好ましくは10nm～1000nmである付加的な光透過層(b)(図1に従う)が位置づけられている請求項7～11のいずれかのデバイス。

【請求項13】 中間層の目的は、下側に位置づけられた層に対し層(a)における微細孔を密封することにより、表面粗度を層(a)よりも小さく減少させること、下側に位置づけられた1以上の層へ層(a)内で誘導された光のエバネッセント場が進入することを減少させること、又は下側に位置づけられた1以上の層に対する層(a)の付着性を改善すること、又は光センサープラットフォーム内で熱により誘発された応力を低減すること、又は下側に位置づけられた層から光透過層(a)を化学的に分離することにある請求項12のデバイス。

【請求項14】 生物学的、生化学的又は合成の認識要素の固定化のために、付着促進層(f)が、光透過層(a)上に被着されている請求項7～13のいずれかのデバイス。

【請求項15】 付着促進層(f)(図1に従う)が、200nm未満、好ましくは20nm未満の厚さを有する請求項14のデバイス。

【請求項16】 付着促進層が、シラン、エポキシド及び「自己組織化した機能化単層」を含む群の化合物を含む請求項14～15のいずれかのデバイス。

【請求項17】 横方向に分離された測定領域(d)が、前記センサープラットフォーム上の生物学的、生化学的又は合成の認識要素を横方向に選択的に被着させることによって生成される請求項1～16のいずれかのデバイス。

【請求項18】 インクジェットスポッティング、ピン若しくはペンを用いた機械的スポッティング、マイクロ接触印刷、又は平行若しくは交差微細流路内に供給された時点、圧力差の適用時点又は電気若しくは電磁ポテンシャルの印加時点での生物学的、生化学的又は合成の認識要素と測定領域との流動的接触、を含む方法の群のうちの1以上の方法が、生物学的、生化学的又は合成の認識要素の被着のために適用される請求項17のデバイス。

【請求項19】 生物学的、生化学的又は合成の認識要素として、分子インプリントを提供すべく、核酸(DNA、RNA)、抗体、アプタマー、膜に結合した及び単離されたレセプター、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、化学合成によって生成されたキャビティなどを含む群の成分が被着させられる請求項17のデバイス。

【請求項20】 細胞の全体又は細胞の断片が、生物学的、生化学的又は合成の認識要素として被着される請求項17のデバイス。

【請求項21】 分析物に関して「化学的に中性」である化合物が、非特異的結合又は吸着を最小限にすべく、横方向に分離された測定領域(d)の間に被着されている請求項17～20のいずれかのデバイス。

【請求項22】 分析物に関して「化学的に中性」である前記化合物が、例えば、ウシ血清アルブミン、ニシンの精子又はポリエチレングリコールを含む群の中から選択される請求項21のデバイス。

【請求項23】 測定領域(d)への励起光の内部結合が、光透過層(a)に形成された1以上の格子構造(c)(図1に従う)によって実施される請求項7~22のいずれかのデバイス。

【請求項24】 光透過層(a)に誘導された光の外部結合が、光透過層(a)内に形成された格子構造(c)(図1に従う)によって実施される請求項7~23のいずれかのデバイス。

【請求項25】 光透過層(a)内に形成された格子構造(c)及び(c)が同じか又は異なる周期性を有し、かつ互いに平行にか又は非平行に配置されている請求項23及び24のデバイス。

【請求項26】 格子構造(c)及び(c)が内部結合及び/又は外部結合格子として互換性があるようにして使用することができる請求項25のデバイス。

【請求項27】 格子構造(c)と、場合によっては付加的な格子構造(c)とが、200nm~1000nmの周期、及び3nm~100nm、好ましくは10nm~30nmの格子変調深度を有する請求項7~26のいずれかのデバイス。

【請求項28】 第1の光透過層(a)の厚さに対する変調深度の比が、0.2以下である請求項27のデバイス。

【請求項29】 格子構造(c)が、直角、三角又は半円形の断面形状を有するレリーフ格子、又は実質的に平面の光透過層(a)内の屈折率の周期的変調を有する位相格子又は体積格子である請求項7~28のいずれかのデバイス。

【請求項30】 薄い金属層、好ましくは金又は銀の層は、場合によっては層(a)、例えばシリカ又はフッ化マグネシウムの層よりも小さい屈折率の付加的誘電層上において、光透過層(a)と固定化された生物学的又は生化学的認識要素との間に被着されており、金属層と、場合によっては付加的中間層と、の厚さは、励起波長及び/又はルミネセンス波長において表面プラズモンが励起されるように選択される請求項7~29のいずれかのデバイス。

【請求項31】 格子構造(c)が、一定の周期を有する回折格子である請求項7~30のいずれかのデバイス。

【請求項32】 格子構造(c)が、多重回折格子である請求項7~30の

いずれかのデバイス。

【請求項33】 格子構造(c)と、場合によっては付加的格子構造(c)とが、標本区画の領域の外側に位置づけられている請求項23～32のいずれかのデバイス。

【請求項34】 格子構造(c)と、場合によっては付加的格子構造(c)とが、複数の又は全ての標本区画の範囲にわたって伸長している請求項23～32のいずれかのデバイス。

【請求項35】 上に重なる表面領域でセンサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、少なくともエバネッセント場の進入深度内の励起されたルミネセンス放射及び励起放射の双方について光透過性である請求項1～33のいずれかのデバイス。

【請求項36】 層(g)が2層システムの形で設けられ、そのうちセンサープラットフォームの表面に接触する状態となる第1の層は、励起放射及び励起されたルミネセンス放射に対し透過性であり、一方センサープラットフォームからさらに離れて位置づけられる隣接層は、励起放射及び励起されたルミネセンス放射のスペクトル範囲内で吸収性である請求項35のデバイス。

【請求項37】 センサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、励起放射及び励起されたルミネセンス放射のスペクトル範囲内で吸収性である請求項34のデバイス。

【請求項38】 センサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、自己付着性である請求項1～37のいずれかのデバイス。

【請求項39】 センサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、ポリシロキサンを含む請求項1～38のいずれかのデバイス。

【請求項40】 5～1000、好ましくは10～400個の測定領域が、1つの標本区画内に位置づけられる請求項1～39のいずれかのデバイス。

【請求項41】 標本区画内の個々の測定領域が、0.001～6mm²の面積を占め、異なる測定領域が、類似の又は異なるサイズをもち得る請求項1～40のいずれかのデバイス。

【請求項42】 標本区画の各々が、100nl～1mlの容積を有する請求項

1～41のいずれかのデバイス。

【請求項43】 光透過層(a)から離れて面した側で、標本区画は、標本、又は場合によっては付加的な試薬の供給又は除去のための入口及び出口の開口部を除いて閉じられており、標本、及び場合によっては付加的な試薬の供給又は除去が、閉鎖型フロールーシステム内で実施され、かつ共通の入口及び出口の開口部を有する測定領域又はセグメントに液体を供給する場合には、前記入口及び出口の開口部が、好ましくは行毎又は列毎に指定される請求項1～42のいずれかのデバイス。

【請求項44】 標本、及び場合によっては付加的な試薬の供給が、圧力差、又は電気若しくは電磁ポテンシャルの影響を受ける平行又は交差型微細流路の中で実施される請求項1～43のいずれかのデバイス。

【請求項45】 標本区画が、光透過層(a)から離れる方に面する側で、標本又はその他の試薬の供給又は除去を局所的に指定する開口部を有する請求項1～42のいずれかのデバイス。

【請求項46】 分析中に加湿されかつ測定領域に接触される試薬のための区画が設けられている請求項1～45のいずれかのデバイス。

【請求項47】 センサープラットフォーム上に光学的又は機械的に認識可能なマークが設けられ、光学系内の調整が容易になり、かつ/又は標本区画の凹部を含む層(g)にセンサープラットフォームを組合せることが容易になる請求項1～45のいずれかのデバイス。

【請求項48】 1以上のルミネセンスを測定するための分析システムであって、

- a. 少なくとも1つの励起光源、
 - b. 請求項1～47のいずれかのデバイス、
 - c. センサープラットフォーム上の少なくとも1つ以上の測定領域(d)から発出する光を記録するための少なくとも1つの検出器、
- を含む分析システム。

【請求項49】 少なくとも1つの光源によって放射される励起光が、コヒーレント光であり、光透過層(a)内への内部結合のために、共鳴角度で1以上

の測定領域上に向けられている請求項7～47のいずれかのデバイスを有する請求項48の分析システム。

【請求項50】 少なくとも1つの光源の励起光が、拡大用光学部分により実質的に平行な光束まで広げられ、光透過層(a)内に内部結合する共鳴角度で1以上の測定領域上に向けられている請求項49の分析システム。

【請求項51】 少なくとも1つの光源からの励起光が、1つの光源の場合には1つの又は複数の光源の場合には複数の回折光学素子好ましくはダマン格子又は屈折光学素子好ましくはマイクロレンズアレイによって、共通の光源から発せられた個別ビームは可能なかぎり同じ強度で複数の個別ビームへと分割され、該個別ビームは、互いに実質的に平行に、横方向に分離された測定領域上へと向けられる請求項49の分析システム。

【請求項52】 等しいか又は異なる放射波長を有する2つ以上のコヒーレント光源が、励起光源として使用される請求項49の分析システム。

【請求項53】 少なくとも1つの横方向分解検出器が、検出のために用いられる請求項48～52のいずれかの分析システム。

【請求項54】 少なくとも1つの横方向分解検出器として、CCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャンネルプレート及びマルチチャンネル光電子増倍管で形成された群の中の少なくとも1つの検出器が使用される請求項53の分析システム。

【請求項55】 透過された光束の整形のためのレンズ又はレンズ系、
光束を偏移させるため、及び場合によっては付加的に整形するための平面又は曲面ミラー、
光束を偏移させるため、及び場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、
光束の一部分をスペクトル的に選択的に偏向するためのダイクロイックミラー、
透過された光の強度を調節するためのニュートラルフィルタ、光束の一部分をスペクトル的に選択的に透過させるための光学フィルター若しくはモノクロメータ、又は

励起光又はルミネセンス光の離散的な偏光方向を選択するための偏光選択的要素、

を含む群の光学部品が、1以上の励起光源とセンサープラットフォームとの間、及び/又は前記センサープラットフォームと1以上の検出器との間に位置づけられている請求項48～54のいずれかの分析システム。

【請求項56】 励起光が、1 fsec～10 minの持続時間のパルスの形で発射される請求項48～55のいずれかの分析システム。

【請求項57】 測定領域からの放射光が、時間分解測定される請求項48～56のいずれかの分析システム。

【請求項58】 光源の位置における励起光又は励起光の拡大の後における励起光若しくは個別ビームへ多重化した後における励起光、

1以上の横方向に分離された測定領域の位置からの励起波長の散乱光、及び格子構造(c)又は(c)により外部結合された励起波長の光、

を含む群のうちの光の信号が、基準のために測定される請求項48～57のいずれかの分析システム。

【請求項59】 放射光及び基準信号の測定のための測定領域が同一である請求項58の分析システム。

【請求項60】 励起光の発射と、1以上の測定領域からの放射光の検出とが、1以上の標本区画について逐次的に実施される請求項48～59のいずれかの分析システム。

【請求項61】 逐次的励起及び検出は、ミラー、偏向プリズム及びダイクロミックミラーを含む群の可動光学コンポーネントを用いて実施される請求項60の分析システム。

【請求項62】 逐次的励起及び検出が、実質的に焦点及び角度を保つスキャナを用いて実施される請求項61の分析システム。

【請求項63】 センサープラットフォームが逐次励起及び検出工程の間で移動する請求項60～62のいずれかの分析システム。

【請求項64】 センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層(g)

と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を2次元配置で形成するデバイスを用いて、横方向に分離した少なくとも5つの測定領域上の1以上の標本におけるルミネセンスにより1以上の分析物を測定する方法であって、

前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画内において5つ以上の離散的な測定領域(d)に固定化され、

前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、

前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動し得、

励起光が測定領域へと誘導され、標本中又は測定領域上の発光し得る物質を励起してルミネセンスを放射せしめ、発生されたルミネセンスを測定する方法。

【請求項65】 前記測定領域が、平面型光導波路内で誘導される励起光のエバネッセント場と光学的に相互作用する請求項64の方法。

【請求項66】 (1) 等方的に放射されたルミネセンス、又は(2) 光透過層(a)内に内部結合された格子構造(c)により外部結合されるルミネセンス、又は(1)及び(2)の両方の部分を含むルミネセンスが同時に測定される請求項65の方法。

【請求項67】 前記ルミネセンスを生成すべく、300nm~1100nmの波長で励起されることができ放射する発光染料又は発光ナノ粒子が、ルミネセンス標識として使用される請求項64~66のいずれかの方法。

【請求項68】 ルミネセンス標識が、分析物に結合されるか、又は競合分析においては分析物類似体に結合されるか、多工程分析においては固定化された生物学的、生化学的若しくは合成の認識要素の結合パートナーの1つに結合されるか、又は生物学的、生化学的若しくは合成の認識要素に結合される請求項67の方法。

【請求項69】 第1のルミネセンス標識と類似の又は異なる励起波長及び類似の又は異なる放射波長の第2の又はそれ以上のルミネセンス標識が使用される、請求項67～68のいずれか1項の方法。

【請求項70】 第2の又はそれ以上のルミネセンス標識が、第1のルミネセンス標識と同じ波長で励起され、別の波長で放射する請求項69の方法。

【請求項71】 適用される発光染料の励起及び放射スペクトルが、重複しないか又は部分的にのみ重複する請求項69の方法。

【請求項72】 供与体として作用する第1の発光染料から受容体として作用する第2の発光染料への電荷又は光学エネルギーの伝達が、分析物の検出のために使用される請求項69の方法。

【請求項73】 1以上のルミネセンスの測定以外に、測定領域上の有効屈折率の変化が、測定される請求項64～72のいずれかの方法。

【請求項74】 1以上のルミネセンス、及び/又は励起波長での光信号の測定が、偏光選択的に実施される請求項64～73のいずれかの方法。

【請求項75】 1以上のルミネセンスが、励起光のものとは異なる偏光で測定される請求項64～74のいずれかの方法。

【請求項76】 抗体又は抗原、レセプター又はリガンド、キレート剤又は「ヒスチジン - タグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA又はRNAストランド、DNA又はRNA類似体、酵素、酵素コファクター又は阻害物質、レクチン、及び炭水化物を含む群の中の1以上の分析物を同時に又は逐次的に、定量的に又は定性的に測定する請求項64～75のいずれかの方法。

【請求項77】 検査対象標本が、血液、血清、血漿、リンパ液、尿又は卵黄の如き天然に生ずる体液である請求項64～76のいずれかの方法。

【請求項78】 検査対象標本が、光学的に濁った液体、又は表面水、土壌若しくは植物抽出物、又は生体ブロス若しくはプロセスブロスである請求項64～76のいずれかの方法。

【請求項79】 検査対象標本が、生物学的組織から採取される請求項64～76のいずれかの方法。

【請求項80】 薬学研究、コンビナトリアル化学、臨床及び前臨床開発に

おけるスクリーニング方法の化学的、生化学的又は生物学的分析物を定量的又は定性的に測定するための、

親和性スクリーニング及び調査におけるリアルタイム結合性研究及び動態パラメータの測定のための、

分析物、特にDNA及びRNA分析物の定性的及び定量的測定のため、及び単一ヌクレオチド多形現象の如きゲノム内のゲノミック又はプロテオミック差を測定するための、

タンパク質 - DNA相互作用を測定するための、

mRNA発現及びタンパク質(生)合成についての制御メカニズムを測定するための、

毒性研究の発生のため及び発現プロファイルの測定のため、特にmRNA、タンパク質、ペプチド又は小分子有機(メッセンジャー)化合物の如き生物学的及び化学的マーカー化合物を測定するための、及び医薬品の開発研究、人間及び獣医学診断、農業化学製品の開発研究における抗体、抗原、病原体又は細菌を測定するための、

症候性及び前症候性の植物診断のための、

医薬品開発における患者の層別化のため及び治療薬選択のための、

食品及び環境分析における病原体、有害物質及び有害細菌、特にサルモネラ、プリオン及び細菌の測定のための請求項64~79のいずれかの方法の使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、複数の標本区画を含むデバイスであって、前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画において5つ以上の離散的な測定領域に固定化され、前記測定領域におけるこれらの生物学的又は生化学的認識要素は、直接的に、又は付着促進層と場合によってはさらなる層とによって、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光導波路の表面上に固定化されている。かくしてセンサープラットフォームは、異なる実施形態で提供することができる。

【0002】

本発明は、前記センサープラットフォームの異なる実施形態を有する本発明によるデバイスと、少なくとも1つの励起光源と測定領域から発せられる光を検出する少なくとも1つの検出器とを有するルミネセンスの測定のための光学系と、センサープラットフォーム上の測定領域と1以上の標本を接触せしめる供給手段と、を含む分析システムにも関する。本発明のさらなる目的は、本発明によるセンサープラットフォームと、光学系と、分析システムとを用いたルミネセンスの検出のための方法、及び定量的親和力の検知やその他の利用分野のためのこれらの方法の使用である。

【0003】

本発明の目的は、複数の分析物を同時に高感度で測定することを可能にするものであり、複数の少量標本区画を有する測定構成を提供することにある。

【0004】

複数の分析物を測定するためには、異なる分析物の測定が、別個の標本区画やいわゆるマイクロタイタープレートの「ウェル」内で実施されるような方法が主として現在用いられている。最も一般的には、単一のウェルを満たすのに数百マイクロリットルの量が必要とされる標準的に約8 cm × 12 cmの占有面積に対し8 × 12ウェルのピッチ（幾何上の行と列の配置）を有するプレートである。しかしながら、数多くの応用分野において、できるかぎり少ない標本量を用いて単一

の標本区画内の多くの分析物を測定できることが望ましい。

【0005】

米国特許第5,747,274号においては、少なくとも3つの梗塞マーカーから複数のマーカーを測定することに基づき心筋梗塞を早期認識するための測定用配置及び方法が記述されており、ここでは、これらのマーカーの測定は、個別標本区画内又は共通の標本区画内で実施でき、単一の(共通の)標本区画は、後者のケースについての開示に従うと、連続した流路として具備され、その1つの境界は例えば、3つの異なるマーカーについての抗体が上に固定化されている膜によって形成されている。しかしながら、共通の支持体上にこのタイプの複数の標本区画又は流路の配置についての提案は全く存在しない。さらに、測定領域のサイズに関する幾何学的情報も全く存在しない。

【0006】

WO84/01031、米国特許第5,807,755号、米国特許第5,837,551号及び米国特許第5,432,099号においては、固体支持体上において、部分的に1mm²を大きく下回る小さな「スポット」の形状における分析物についての特異的認識要素を固定化することが提案されている。この固定化した形状の目的は、インキュベーション時間のみに依存し、絶対的標本量(連続流がない状態で)とは基本的に無関係であるようなやり方で、存在する分析物分子のわずかな部分のみを結合させながら、分析物の濃度を測定できるということにある。関連した例で開示されている測定用配置は、従来のマイクロタイタープレート内での蛍光測定による測定に基づいている。そのために、最高3つの異なる蛍光標識づけされた抗体のスポットが共通のマイクロタイタープレートウェル内で測定されるような配置も記述されている。これらの特許明細書において理論的論証に従って、スポットサイズを最小限にすることが望ましいと思われる。しかしながら、背景信号から区別しなければならない最低の信号の大きさのために、スポットサイズについてさらに低い限界が設定されることになる。

【0007】

より低い検出限界を達成するために、近年、分析物の測定がエバネッセント場とのその相互作用に基づき、これが光導波路内の光の誘導と結びつけられており

、又ここで、分析物分子の特異的認識及び結合のための生化学又は生物学的認識要素が導波路の表面上に固定化されているような数多くの測定用配置が開発されてきた。

【0008】

光波は、光学的により稀な媒質つまりより低い屈折率の媒質によって囲まれている平面の薄膜導波路内に結合されている場合、導波層の界面での全反射によって誘導される。この配置では、わずかな電磁エネルギーが、より低い屈折率の媒質内に進入する。この部分はエバネッセント（減衰）場と呼ばれる。エバネッセント場の強度は、導波層自体の厚さ及び導波層とそれを取り囲む媒質の屈折率の比によって大幅に左右される。薄い導波管の場合、すなわち層厚さが誘導すべき光の波長と同じか又はそれよりも小さい場合、誘導される光の離散的モードを区別することができる。かかる方法の利点は、分析物との相互作用が、およそ数百ナノメートルにある隣接媒質内へのエバネッセント場の進入深度に制限され、（バルク）媒質の深いところからの干渉信号を主として回避できる点である。このタイプの第1の提案されている測定用配置は、数百マイクロメートルから数ミリメートルまでの厚さをもつ透明なプラスチック又はガラスの繊維又はプレートの如ききわめて多モードの自立式単層導波路を基礎とするのであった。

【0009】

米国特許第4,978,503号においては、液体標本が毛管力によりキャビティ内に引き込まれ、光透過性の側壁が自立式多重モード導波路として設けられ、少なくともキャビティに面するこの側壁（「パッチ」）の一部の表面上において、標本からの分析物の認識及び結合のための生化学認識要素が固定化されている測定用配置が開示されている。複数の離散的なパッチの配置を有するアレイの製造について記述されているが、さらなる説明によると、パッチが、毛細管のカバプレートとベースプレートの組合せのために設けられた連結用リンクによって互いに横方向に分離されており、このため、アレイの分離後に、毛細管の各々が、固定化された認識要素の1つのパッチのみを収納することが教示されている。さらに、この配置の欠点は、毛細管内に引き込まれた液体の交換が用意されておらず、例えば多重工程分析試験にはかかる交換が望ましいという点である。

【0010】

WO94/27137においては、異なる分析物を測定するための異なる認識要素を有する「パッチ」が自立式光学基板導波路（単層導波路）上に固定化され、励起光は末端表面で内部結合し（「前面」又は「末端端部」結合）、横方向に選択的な固定化が光活性化可能な架橋剤を用いて実施される測定用配置が開示されている。開示によると、いくつかのパッチを共通の平行な流路又は標本区画内に行の形のように配置することができ、平行な流路又は標本区画は、導波路内の光誘導を損なうことがないようにするため、センサーとして使用される導波路上の範囲の全長にわたり伸長している。しかしながら、比較的小さいサイズ、即ち、 1 cm^2 のベース面積よりも著しく小さいサイズの標本区画内に複数のパッチを2次元に集積することについての示唆は全くない。WO97/35203に開示されている類似の配置においては、配置についてのいくつかの実施形態が開示されており、これは、異なる分析物を測定するための異なる認識要素が、低い分析物濃度、場合によっては高い分析物濃度の検量用溶液のため及び標本のための分離した平行流路又は標本区画の中に固定化されているものである。ここでも、標本収容用の共通区画内で異なる認識要素に高い集積密度をいかに達成するかについての示唆は全く示されていない。さらに、非常に多モードの自立式単層導波路の感度は、非常に低い検出限界を達成する必要がある数多くの利用分野にとって十分なものではない。

【0011】

感度を改善して同時に大量生産でより容易に製造すべく、平面型薄膜導波路が提案されてきた。最も単純なケースでは、平面型薄膜導波路は、支持部材（基板）、導波層、上層（それぞれ分析すべき標本）といった3層系から成り、導波層は最も高い屈折率を有している。付加的な中間層がさらに、平面型導波路の作用を改善することができる。

【0012】

平面型導波路に励起光を内部結合するためのいくつかの方法が知られている。最も早期に使用されていた方法は、前面結合又はプリズム結合に基づくものであり、エアギャップに起因する反射を低減すべくプリズムと導波路との間に液体を

一般に採り入れたものであった。これら2つの方法は主として、比較的厚い層厚の導波路、すなわち特に自立式導波路と、屈折率が2よりも極めて小さい導波路と、に適している。しかしながら、高屈折率の非常に薄い導波層に励起光を内部結合するためには、結合格子を使用することがはるかに簡潔な方法である。

【0013】

光フィルム導波路の中で誘導される光波のエバネッセント場内での分析物の測定の異なる方法を区別することができる。適用される測定原理に基づいて、例えば、一方では蛍光やより一般的なルミネセンス方法、そして他方では屈折方法を判別することができる。このため、表面プラズモン共鳴を生成するための発射された励起光の共鳴角を測定対象量とした場合には、屈折率がより低い誘電層上における薄い金属層内での表面プラズモン共鳴の生成方法を屈折方法の群内に含めることができる。表面プラズモン共鳴も同様に、ルミネセンスの増幅のためや、ルミネセンス測定における信号対バックグラウンドの比の改善のために使用可能である。表面プラズモン共鳴の生成のための条件と、導波構造だけでなくルミネセンス測定との組合せと、については、文献、例えば米国特許第5,478,755号、5,841,143号、5,006,716号及び4,649,280号の中で記述されている。

【0014】

本出願においては、「ルミネセンス」という語は、光励起や、電気又は化学又は生化学又は熱励起の如き光励起以外の励起の後に、紫外線から赤外線までの範囲内の光子の自然発出を意味する。例えば、化学ルミネセンス、生物ルミネセンス、電気ルミネセンス、さらに、特に蛍光及びリン光が「ルミネセンス」という語の中に内含される。

【0015】

屈折測定方法の場合において、導波路に対する分子吸着又は導波路からの脱着の結果としてもたらされる有効屈折率の変化が、分析物検出のために使用される。有効屈折率のこの変化は、格子結合器センサーの場合には格子結合器センサー内へ又は外への内部結合又は外部結合のための結合角度の変化から測定され、干渉計センサーの場合には検知用分岐及び干渉計の基準用分岐の中に誘導された測

定光の間の位相差の変化から測定される。

【0016】

誘導された波の内部及び/又は外部結合用として1以上の結合格子を使用するための技術的現状は、例えば、K.Tiefenthaler, W.Lukosz, 「集積光化学センサーとしての格子結合器の感度」、J. Opt. Soc. Am. B6、209(1989); W.Lukosz, Ph.M.Nellen, Ch.Stamm, P.Weiss 「集積光化学センサーとしての平面導波路上の出力格子結合器」、Sensors and Actuators B1、585(1990); 及びT. Tamir, S.T.Peng, 「格子結合器の分析と設計」Appl. Phys. 14、235-254(1977)の中で記述されている。

【0017】

米国特許5,738,825号では、全てプレート内に伸長する孔を有するマイクロタイタープレートと、ベースプレートとしての薄膜導波路と、から成る配置が開示されており、後者の薄膜導波路は、透明な自立式基板上の薄い導波フィルムで構成されている。観察された結合角度の変化の結果から、測定すべき分析物分子の吸着又は脱着に起因する有効屈折率の変化を測定するために、励起光の内部及び外部結合のための回折格子は、孔を有するマイクロタイタープレートとベースプレートとしての薄膜導波路とによって形成された開放標本区画に接触した状態で設けられている。格子構造上で標本区画内に認識要素を結合すると、1つの標本区画内で複数の分析物を測定することに注意が払われておらず、屈折測定原理、すなわち結合角度の相対的な変化の測定のため、ほとんど実施できないものと思われる。

【0018】

前述の屈折方法は、それらがいわゆる分子標識である付加的なマーカ分子を使用することなく適用できるという利点を有している。しかしながら、これらの無標識方法の欠点は、測定原理の選択性がさらに低いことに起因して、達成可能な検出限界が、分析物の分子量に応じてピコないしはナノモル濃度範囲に制限されており、例えば診断の応用分野といったような近代の微量成分分析の数多くの応用分野にとって不十分であるという点にある。

【0019】

より低い検出限界を達成するためには、ルミネセンスベースの方法は、信号生成の選択性がより高いものであるために、より適切なものと思われる。この配置では、ルミネセンス励起は、より屈折率の低い媒質内へのエバネッセント場の進入深度、すなわち、媒質内への進入深度が約数百ナノメートルの導波領域のすぐ近傍に制限される。この原理は、エバネッセントルミネセンス励起と呼ばれている。

【0020】

透明な支持材料上のわずか数百ナノメートルの薄い導波フィルムに基づくきわめて屈折性の高い薄膜導波路を用いることにより、近年、感度を著しく増大させることができた。例えば、WO95/33197では、回折光学素子としてのレリーフ格子によって励起光が導波フィルム内に結合される。センサープラットフォームの表面は、分析物を含有する標本に接触し、エバネッセント場の進入深度内に位置づけられたルミネセンス能力をもつ物質から等方発出されたルミネセンスは、フォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラの如き適切な測定用配置によって測定される。導波路内にバック結合されたエバネッセント励起された放射の一部も同様に、格子のような回折光学素子によってアウト結合され測定され得る。この方法は、例えばWO95/33198号の中で記述されている。

【0021】

特に明細書WO95/33197及びWO95/33198号内に技術的現状として記述されたエバネッセンス励起されたルミネセンスの検出のための全ての方法の欠点は、均質なフィルムとして層が形成されたセンサープラットフォームの導波層上ではつねに1つの標本しか分析できないという点にある。同じセンサープラットフォーム上でさらなる測定を行うためには、単調で退屈な洗浄又は清浄工程を連続して必要とする。このことは、特に第1の測定における分析物とは異なる分析物を測定しなくてはならない場合に当てはまる。免疫検定においては、これは一般に、センサープラットフォーム上に固定化された層全体を交換しなければならないこと、さらには丸ごと新しいセンサープラットフォームを使用しなければならないことを意味している。

【0022】

例えば、明細書WO96/35940では、基本的に単モードの平面型非有機導波路で同時に又は逐次的にルミネセンススペースの複数の測定を専ら実施するために、励起光が別々に発射される少なくとも2つの離散的な導波領域が1つのセンサープラットフォーム上に設けられた配置(アレイ)が提案されてきた。しかしながら、離散的な導波領域へのセンサープラットフォームの分割が結果としてもたらす欠点は、共通のセンサープラットフォーム上における離散的な導波領域内に離散的な測定領域を備えるためには比較的広いスペースが必要となり、そのため再び比較的低い密度の異なる測定領域(つまりいわゆる「特徴」)しか行えない点にある。

【0023】

本発明の精神では、液体標本内の1つ以上の分析物の認識のため、生物学的又は生化学的又は合成の認識要素により占有されている領域によって、空間的に分離した測定領域(d)が画定されることになる。これらの領域は、例えば、点、円、矩形、三角形、楕円又は線といった形のあらゆる幾何形状を有することができる。

【0024】

平面型導波路のエバネッセント場内で励起されたルミネセンスの測定用の測定用配置のための標本区画の設計のための数多くのその他の配置に加えて、WO98/22799では、既知のマイクロタイタープレートの形状を有する配置も提案されている。しかしながら、単一の標本区画内で固定化された異なる認識要素に結合された複数の分析物の測定は、この開示中においても同様に扱われていない。

【0025】

従って、非常に感度の高い分析方法で多大な労力を費やすことなく、複数の分析物を同様に測定することができ、適切なセンサープラットフォームと組み合わせられた小容積の標本区画を提供する必要性が存在する。

【0026】

驚くべきことに、現在、共通のセンサープラットフォーム上の標本区画の2次元アレイの一部として単一の標本区画内の異なる生物学的又は生化学的認識要素

を有する複数の測定領域の配置によって、特に薄膜導波路である適切な導波路のエバネッセンスフィールドの非常に効率の良い蛍光励起の選ばれた組合せに基づいて、（従前のマイクロタイタープレート上でのELISA試験といったような）既知の古典的配置及び方法に比べて著しく低い検出限界及び高い測定領域集積密度を達成することができることが発見された。これにより、分析を単純化すべく付加的な洗浄工程なく実際の生物学的親和性分析のためにルミネセンス標識付けされた結合パートナーを添加した上で、ある一定の分析の検出工程中のルミネセンスによる分析物の測定を実施することができる。

【0027】

驚くべきことに、例えば分析の再現性に関して統計的に関連性ある情報はすでに、単一の標本区画内に異なる生物学的又は生化学的認識要素及び複数の測定領域を配置することに基づいて、単一の標本の添加後に単一の測定において生成可能である。それによって生成されたデータは、離散的な標本区画内の対応する数の単一の測定の結果よりも低い変動性によって特徴づけられており、これは互いに独立した測定値の変動性及び誤差の数多くの潜在的な付加的な原因が同時測定においては除外され得るからである。かくして、上述の既知の分析方法（例えばELISA）と比較して、分析時間及び標本及び試薬の所要量の著しい削減を達成することができる。特に、非特異的結合、交差反応性、標本溶液のpH又は PO_2 の測定といったような化学パラメータの測定のための基準用測定は、かかる基準用測定のための標本区画内に1以上の測定領域を設けると、あらゆる単一標本区画内で実施することができる。かくして、かかる測定が異なる標本区画内で実施される従来の方法と比べて、これらの基準用測定の信頼性を著しく改善し得る。

【0028】

デバイス及びそれを用いて実施される分析方法では、プレートあたりの測定回数及び処理量を著しく改善することができる。かくしてプレート間における標準的に大きい変動を除去することによる他のものに加えて、測定の再現性と異なる標本での結果の比較可能性とを著しく改善することができる。例えば、単一のセンサープラットフォーム上の400個の測定領域の各々を含む96個の標本区画

の場合、標準的に400個のマイクロタイタープレートを必要とする例えば薬品開発用の広範な連結した測定を単一のセンサープラットフォーム上で実施することができる。標本及び試薬の量の著しい削減及びそれに付随する標本調製のための労力の削減に加えて、結果の信頼性及び精度は、上述の理由から著しく改善される。

【0029】

かくして、本発明に従ったデバイス及び方法は、従来の既知の分析システム及び方法では提供できない次のような機能を提供する：

- 単一のセンサープラットフォーム/デバイス上での高速分析の展開；
- 単一のセンサープラットフォーム/デバイス上での未知の標本の用量応答曲線の測定、クロストーク及び分析；
- 単一で少量の標本内でのきわめて感度の高い多重分析物測定；
- 単一のセンサープラットフォーム上での広範な測定セットの実行。

【0030】

本発明の対象は、センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層(g) (図1に従う)と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を2次元配置で形成するデバイスであって、前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画において5つ以上の離散的な測定領域(d) (図1に従う)に固定化され、前記測定領域は、前記標本区画の境界表面を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動し得るデバイスである。

【0031】

標本区画内の各々で、単一の標本区画における5つ以上の測定領域のうちのも

のが、基準のために使用することができる。

【0032】

同じ化学的又は光学的パラメータを基準とするための測定領域が、センサープラットフォームにわたって分布した複数の標本区画内で使用され、センサープラットフォームにわたって前記化学的又は光学的パラメータの横方向の分布を測定することができるときに、有利となる。例えば、利用できる励起光の強度は、測定されるべき光学パラメータとして理解されるべきものである。このようにして測定された化学パラメータの分布から、特に、異なる標本、例えば、標本の準備の結果として異なる標本区画に加えられる標本の組成、濃度又は体積の相違を考慮に入れることができる。

【0033】

デバイスの実施例として好ましいものは、測定領域が、平面型光導波路内において光学的に相互作用して励起光のエバネッセント場を誘導するものである。

【0034】

センサープラットフォームの一部としての光導波路が、非有機材料好ましくはガラス、又は有機材料、好ましくはポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート若しくはポリスチレンを含む群から選択されるプラスチックを含む多重モード又は単一モードの導波路であり、これらの材料は、少なくとも励起及びルミネセンス波長において光透過性を示す。この場合に、センサープラットフォームの一部としての光導波路は、自己支持するものでよい。

【0035】

好ましいデバイスは、センサープラットフォームの一部としてのフィルム光導波路が、層(a)よりも低い屈折率を有する第2の光透過層(b)(図1に従う)の上の第1の光透過層(a)(図1に従う)を有するフィルム光導波路であるものである。

【0036】

第2の光透過層(b)の材料が、ガラス、石英又は好ましくはポリカーボネート、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート若しくはポリスチレンを含む群の透明な熱可塑性プラスチックを含むこととしてもよい。

【0037】

光透過層(a)の表面上で可能な限り強いエバネッセント場を生成するためには、導波性光透過層(a)の屈折率が、隣接する層の屈折率よりも極めて大きいものであることが望ましい。第1の光透過層(a)の屈折率が、1.8より大きいときには、特に有利となる。

【0038】

例えば、第1の光透過層(a)が、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 、又は ZrO_2 を含むことが好ましい。特に、第1の光透過層(a)が、 Ta_2O_5 又は Nb_2O_5 を含むことが好ましい。

【0039】

導波性光透過層(a)の屈折率以外には、その厚さが、より低い屈折率を有する隣接層と層(a)との間の界面で可能なかぎり強いエバネッセント場を生成するための第2の制御パラメータである。層厚さが、励起波長の少なくとも1つのモードにおける誘導にとって充分であるかぎり、導波層(a)の厚さが減少するに従って、エバネッセント場の強度は増大する。このようにして、1つのモードを誘導する最小の「カットオフ」層厚さは、このモードの波長に依存する。「カットオフ」層厚さは、より短い波長の光の場合よりも長い波長の光の場合の方が大きい。しかしながら、「カットオフ」層厚さに近づくとつれて、同様に望ましくない伝搬損失も強く増大し、かくして、好ましい層厚さを選択するための下限が更に設定される。好ましいのは、所定の励起波長において1モードから3モードまでのもののみを誘導することができる光透過層(a)の層厚さである。特に、好ましいのは、この所定の励起波長について単一モード導波路に至らしめる層厚さである。誘導された光の離散的なモードの特性が、横方向モードを基準とするもののみであることがわかる。

【0040】

これらの必要条件の結果として、第1の光透過層(a)の厚さは、40~300nm、好ましくは100~200nmである。第1の光透過層(a)の厚さが100~200nmの間にあるときに、特に有利となる。

【0041】

光導波性層 (a) に誘導された 1 つのモードの伝搬損失の量は、下にある支持層の表面粗さによって、及びこの支持層中に含まれ得る発色団の吸収によって大きく決定され、これは、(この支持層内への) 層 (a) で誘導されたモードのエバネッセント場の進入したときにおけるこの支持層内の望ましくないルミネセンスの励起の危険性と付加的に結びつけられる。さらには、光透過層 (a) 及び (b) の異なる熱膨張率に起因して、熱応力が発生しうる。化学的に感応性ある光透過層 (b) の場合、例えば、透明な熱可塑性プラスチックからなる層の場合には、層 (b) を侵し得る溶剤が進入するのを防ぐ、例えば、光透過層 (a) 中の微細孔を通して防ぐことが望ましい。

【 0 0 4 2 】

従って、光透過層 (a) と (b) との間に、層 (a) よりも低い屈折率を有しかつ層 (a) に接触し、かつ、厚さが 5 nm ~ 1 0 0 0 0 nm、好ましくは 1 0 nm ~ 1 0 0 0 nm である付加的な光透過層 (b) (図 1 に従う) が位置づけられているときには、有利となる。この中間層の目的は、下側に位置づけられた層に対し層 (a) における微細孔を密封することにより、表面粗度を層 (a) よりも小さく減少させること、又は下側に位置づけられた 1 以上の層へ層 (a) 内で誘導された光のエバネッセント場が進入することを減少させること、又は下側に位置づけられた 1 以上の層に対する層 (a) の付着性を改善すること、又は光センサープラットフォーム内で熱により誘発された応力を低減すること、又は下側に位置づけられた層から光透過層 (a) を化学的に分離することにある。

【 0 0 4 3 】

光透過層 (a) 上に生物学的、生化学的又は合成の認識要素を被着させるための方法は数多く存在する。例えば、物理的吸着又は静電的相互作用により被着をなし得る。更に一般には、認識要素の配向性は、統計的なものである。さらに、分析プロセス内で用いられた試薬及び分析物を含む標本が、異なる組成を有するときには、固定化された認識要素の一部が洗い流される危険性が存在する。従って、生物学的、生化学的又は合成の認識要素の固定化のために、付着促進層 (f) が、光透過層 (a) 上に被着されているときには、有利なものとなる。この付着促進層も透明であるべきである。特に、付着性促進層の厚さは、導波層 (a

)から上に位置付けられた媒質内へのエバネッセント場の進入深度を上回ってはいかならない。従って、付着促進層(a)は、200nm未満、好ましくは20nm未満の厚さを有するべきである。付着促進層は、シラン、エポキシド及び「自己組織化した機能化単層」を含む群の化合物を含むことができる。

【0044】

測定領域の定義で記されたように、横方向に分離された測定領域(d)が、センサープラットフォーム上の生物学的、生化学的又は合成の認識要素を横方向に選択的に被着させることによって生成され得る。ルミネセンス能力を有する分析物に接触せしめられたとき、又は固定化された認識要素に対する結合のため分析物と競合する分析物のルミネセンスによりマーキングされた類似体に接触せしめられたとき、又は多工程分析においてルミネセンスによりマーキングされた結合パートナーに接触せしめられたときに、ルミネセンス能力を有するこれらの分子は、固定化された認識要素によって占有された領域によって画定される測定領域内でのみ選択的にセンサープラットフォームの表面に結合する。

【0045】

生物学的、生化学的又は合成の認識要素の被着のためには、インクジェットスポッティング、ピン若しくはペンによる機械的スポッティング、マイクロ接触印刷、又は平行若しくは交差微細流路内に供給された時点、圧力差の適用時点又は電気若しくは電磁ポテンシャルの印加時点での生物学的又は生化学的又は合成の認識要素と測定領域との流動的接触、を含む方法の群のうちの1以上の方法が、適用され得る。

【0046】

生物学的又は生化学的又は合成の認識要素として、分子インプリントを提供すべく、核酸(DNA、RNA)、核酸疑似体(ペプチド核酸、PNA)、抗体、アプタマー、膜に結合した及び単離されたレセプター、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、化学合成によって生成されたキャビティなどを含む群の成分が被着させら得る。

【0047】

最後に挙げたタイプの認識要素は、「分子インプリンディング」として文献中

に記載されている方法によって生成されるキャビティのことである。この手順においては、大部分が有機溶液中にある分析物又は分析物 - 類似体は、重合体構造の中に封入されている。このため、それは「インプリント」と呼ばれる。次に分析物又はその類似体は、適切な試薬の添加時点で重合体構造から溶解させられ、重合体構造内に空のキャビティを残す。この空のキャビティは次に、分析物の測定のためのその後のプロセスにおいて高い立体選択性を有する結合箇所として使用され得る。

【0048】

同様に、細胞の全体又は細胞の断片が、生物学的又は生化学的な認識要素として被着され得る。

【0049】

いわゆる非特異的結合によって生ずる信号による、すなわち、分析物の測定に利用される分析物又はその他の成分の結合によって引き起こされる信号による分析方法の検出限界の多くの場合において、生物学的、生化学的又は合成の認識要素が設けられた領域に結合されているのみならず、これらの認識要素によって占有されていない、例えば、疎水性吸着又は静電相互作用の時点でセンサープラットフォームの領域内でも結合されている。従って、分析物に関して「化学的に中性」である化合物が、非特異的結合又は吸着を低減すべく、横方向に分離された測定領域 (d) の間に被着されているときに、有利なものとなる。それ自体分析物又は分析物の類似体又は多工程分析内のさらなる結合パートナーの認識及び結合のための特異的結合箇所をもたず、その存在のために分析物又はその類似性又はさらなる結合パートナーがセンサープラットフォームの表面にアクセスするのを妨げているような化合物が、「化学的に中性の」化合物と呼ばれる。

【0050】

例えば、アルブミン、特にウシ血清アルブミン、ニシン精子又は同様にポリエチレングリコールを含む群の化合物を、「化学的に中性の」化合物として利用することができる。

【0051】

測定領域 (d) への励起光の内部結合が、光透過層 (a) に形成された 1 以上

の格子構造(c)(図1に従う)によって実施されることが好ましい。

【0052】

1つの測定領域から他の測定領域への光学的クロストークは、導波路内に内部結合された光、特にバック結合されたルミネセンス光が広がったときに発生する。かかるクロストークを防止するためには、光透過層(a)に誘導された光の外部結合が、光透過層(a)内に形成された格子構造(c)(図1に従う)によって実施されるときに有利となる。その結果、光透過層(a)内に形成された格子構造(c)及び(c)が同じか又は異なる周期性を有し、かつ互いに平行にか又は非平行に配置され得る。

【0053】

特に、格子構造(c)及び(c)が内部結合及び/又は外部結合格子として互換性があるようにして使用することができる。

【0054】

格子構造(c)と、場合によっては付加的な格子構造(c)とが、200nm~1000nmの周期、及び3nm~100nm、好ましくは10nm~30nmの格子変調深度を有するときには、有利となる。

【0055】

第1の光透過層(a)の厚さに対する変調深度の比が、0.2以下であることが好ましい。

【0056】

格子構造(c)が、直角、三角又は半円形の断面形状を有するレリーフ格子、又は実質的に平面の光透過層(a)内の屈折率の周期的変調を有する位相格子又は体積格子であってもよい。

【0057】

ルミネセンスの増強又は信号対雑音比を改善すべく、薄い金属層、好ましくは金又は銀の層は、場合によっては層(a)、例えばシリカ又はフッ化マグネシウムの層よりも小さい屈折率の付加的誘電層上において、光透過層(a)と固定化された生物学的又は生化学的認識要素との間に被着されており、金属層と、場合によっては付加的な中間層と、の厚さは、励起波長及び/又はルミネセンス波長に

において表面プラズモンが励起されうるように選択されるときには、さらに有利となり得る。

【0058】

多くの利用分野について、格子構造(c)が、一定の周期を有する回折格子であることが有利となる。このとき、格子構造(c)による励起光の内部結合の測定領域に対する共鳴角度は、格子構造の全領域で均等である。しかしながら、極めて異なる波長を有する異なる光源からの励起光を内部結合することが意図されている場合には、内部結合のための対応する共鳴角度は、極めて異なるものであり得、このためセンサープラットフォームを収納する光学系における調整のため、又は不利な結合角度を空間的に変動させるための付加的なコンポーネントに対する必要性を招く可能性がある。例えば、結合角度の大きい差を減少させるべく、格子構造(c)が、多重回折格子であることが有利であり得る。標本との接触に起因する内部及び外部結合角度の変化を回避しなければならない利用分野については、格子構造(c)と、場合によっては付加的格子構造(c')とが、標本区画の領域の外側に位置づけられていることが有利となり得る。

【0059】

一方、その他の利用分野、特に、広き領域の励起のためには、格子構造(c)と、場合によっては付加的格子構造(c')とが、複数の又は全ての標本区画の範囲にわたって伸長していることが好ましい。

【0060】

格子構造(c)により内部結合された励起光が、複数の標本区画の上に伸長する範囲にわたって、光透過層(a)に伝搬し得る場合には、上に重なる表面領域でセンサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、少なくともエバネッセント場の進入深度内の励起されたルミネセンス放射及び励起放射の双方について光透過性であることが必要である。

【0061】

このとき、反射光又は散乱光を減少させるためには、層(g)が2層システムの形で設けられ、そのうちセンサープラットフォームの表面に接触する状態となる第1の層は、励起放射及び励起されたルミネセンス放射に対し透過性であり、

一方センサープラットフォームからさらに離れて位置づけられる隣接層は、励起放射及び励起されたルミネセンス放射のスペクトル範囲内で吸収性であることが有利となる。

【0062】

一方、励起光、及び場合によっては導波性光透過層(a)内にバック結合されて生成されたルミネセンス光の伝搬が、層(a)内で単一の標本区画の範囲に制限され得る利用分野のためには、センサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、励起放射及び励起されたルミネセンス放射のスペクトル範囲内で吸収性であることが有利となる。

【0063】

センサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、自己付着性であるときには、有利となる。

【0064】

従って、センサープラットフォームに接触する緊密封止層(g)の材料が、ポリシロキサンを含むことが特に好ましい。

【0065】

5~1000、好ましくは10~400個の測定領域が、1つの標本区画内に位置づけられることが好ましい。

【0066】

さらに、標本区画内の個々の測定領域が、0.001~6mm²の面積を占め、異なる測定領域が、類似の又は異なるサイズをもち得ることが好ましい。

【0067】

好ましくは、標本区画の各々が、100nl~1mlの容積を有する。

【0068】

本発明に従ったデバイスは、閉鎖流システムとして及び開放システムとしての双方で作動できる。第1の場合には、デバイスは、光透過層(a)から離れて面した側で、標本区画は、標本、又は場合によっては付加的な試薬の供給又は除去のための入口及び出口の開口部を除いて閉じられており、標本、及び場合によっては付加的な試薬の供給又は除去が、閉鎖型フローシステム内で実施され

、かつ共通の入口及び出口の開口部を有する測定領域又はセグメントに液体を供給する場合には、前記入口及び出口の開口部が、好ましくは行毎又は列毎に指定される。

【0069】

かくして、標本、及び場合によっては付加的な試薬の供給が、圧力差又は電気又は電磁ポテンシャルの影響を受ける平行又は交差型微細流路の中で実施される。

【0070】

開放システムの場合には、本発明に従ったデバイスは、標本区画が、光透過層(a)から離れる方に面する側で、標本又はその他の試薬の供給又は除去を局所的に指定する開口部を有するようになされている。さらに、分析中に加湿されかつ測定領域に接触される試薬のための区画が設けられていてもよい。

【0071】

センサープラットフォーム上に光学的又は機械的に認識可能なマークが設けられ、光学系内の調整が容易になり、かつ/又は標本区画の凹部を含む層(g)にセンサープラットフォームを組合せることが容易になると有利である。

【0072】

本発明のさらなる対象は、1以上のルミネセンスを測定するための分析システムであって、

- 少なくとも1つの励起光源、
 - 上に開示した実施例の1つのデバイス、
 - センサープラットフォーム上の少なくとも1つ以上の測定領域(d)から発出する光を記録するための少なくとも1つの検出器、
- を含む分析システムである。

【0073】

かくして、少なくとも1つの光源によって放射される励起光が、コヒーレント光であり、光透過層(a)内への内部結合のために、共鳴角度で1以上の測定領域上に向けられているときには、有利となる。

【0074】

複数の測定領域又は全ての測定領域を同時に励起するためには、少なくとも1つの光源の励起光が、拡大用光学部分により実質的に平行な光束まで広げられ、光透過層(a)内に内部結合する共鳴角度で1以上の測定領域上に向けられていることが好ましい。

【0075】

しかしながら、測定領域の外側でルミネセンス信号を減少させるためには、同様に、少なくとも1つの光源からの励起光が、1つの光源の場合には1つの又は複数の光源の場合には複数の回折光学素子好ましくはダマン格子又は屈折光学素子好ましくはマイクロレンズアレイによって、共通の光源から発せられた個別ビームは可能なかぎり同じ強度で複数の個別ビームへと分割され、該個別ビームは、互いに実質的に平行に、横方向に分離された測定領域上へと向けられるときにも、有利となり得る。

【0076】

単一の光源の強度が不十分である場合、又は異なる発出波長の光源が必要である場合、例えば、生物学的利用分野の場合には、等しいか又は異なる放射波長を有する2つ以上のコヒーレント光源が、励起光源として使用されるときには、有利となる。

【0077】

複数の測定領域からの信号を別々に記録するためには、少なくとも1つの横方向分解検出器が、検出のために使用されることが好ましい。かくして、少なくとも1つの横方向分解検出器として、CCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャンネルプレート及びマルチチャンネル光電子増倍管で形成された群の中の少なくとも1つの検出器が使用され得る。

【0078】

本発明による分析システムにおいて、上で開示した実施形態のいずれかに従うと、透過された光束の整形のためのレンズ又はレンズ系、光束を偏移させるため、及び場合によっては付加的に整形するための平面又は曲面ミラー、光束を偏移させるため、及び場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の一

部分をスペクトル的に選択的に偏向するためのダイクロイックミラー、透過された光の強度を調節するためのニュートラルフィルタ、光束の一部をスペクトル的に選択的に透過させるための光学フィルタ若しくはモノクロメータ、又は励起光又はルミネセンス光の離散的な偏光方向を選択するための偏光選択的要素、を含む群の光学部品が、1以上の励起光源とセンサプラットフォームとの間、及び/又は前記センサプラットフォームと1以上の検出器との間に位置づけられている。

【0079】

数多くの利用分野において、励起光が、1 fsec ~ 10 minの持続時間のパルスの形で発射されると有利である。

【0080】

動力学的な測定のため、又は分析システムのコンポーネント又はセンサプラットフォーム自体の材料又は標本中の蛍光汚染と高速崩壊蛍光の弁別のためには、測定領域からの発出光が、時間分解測定されることが有利である。

【0081】

本発明による分析システムが、光源の位置における励起光又は励起光の拡大の後における励起光若しくは個別ビームへ多重化した後における励起光、1以上の横方向に分離された測定領域の位置からの励起波長の散乱光、及び格子構造(c)又は(c')により外部結合された励起波長の光、を含む群のうちの光の信号を、基準のために測定するための専用コンポーネントを含むことがさらに好ましい。かくして、放射光及び基準信号の測定のための測定領域が同一であることが特に有利となる。

【0082】

励起光の発射、及び単数又は複数の測定領域からの発出光の検出も同様に、単数又は複数の標本区画について逐次的に実施され得る。かくして、逐次的励起及び検出を、ミラー、偏向プリズム及びダイクロイックミラーを含む群の中の可動光学コンポーネントを用いて実施することができる。標準的には、市販のいわゆるスキャナが、逐次的励起のため及び生物分析アレイシステムのために使用され、これは、励起光ビームを、通常は可動ミラーを用いて、調査すべき領域にわた

り逐次的に走査させるものである。かくして、大部分のスキナシステムの場合には、照射された表面と励起光ビームとの間の角度は変更される。しかしながら、本発明によるセンサープラットフォームの導波層内への励起光の内部結合のための共鳴条件を満たすためには、この角度は基本的に一定に保たなければならず、すなわち、本発明による光学系内で実現すべきスキナは、角度保持機能を有しなければならない。しかしながら、同時に、センサープラットフォーム上の励起された領域の大きさも変化してはならない。従って、本発明のもう1つの対象は、逐次的励起及び検出が、実質的に焦点及び角度を保つスキナを用いて実施される光学系にある。

【0083】

もう1つの実施形態では、センサープラットフォームが逐次励起及び検出工程の間で移動する。この場合、1以上の励起光源と、検出のために使用されるコンポーネントとは、空間的に固定された位置に位置づけされ得る。

【0084】

本発明のもう1つの対象は、センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層(g)と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を2次元配置で形成するデバイスを用いて、横方向に分離した少なくとも5つの測定領域上の1以上の標本におけるルミネセンスにより1以上の分析物を測定する方法であって、前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画内において5つ以上の離散的な測定領域(d)に固定化され、前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動可能し得て、励起光が測定領域へと誘導され、標本中又は測定領域上の発光し得る物質を励起してルミネセンスを放射せ

しめ、発せられたルミネセンスを測定する方法である。

【0085】

従って、前記測定領域が、平面型光導波路内で誘導される励起光のエバネッセント場と光学的に相互作用することが好ましい。

【0086】

以上に開示した方法においては、(1)等方的に放射されたルミネセンス、又は(2)光透過層(a)内に内部結合された格子構造(c)により外部結合されるルミネセンス、又は(1)及び(2)の両方の部分を含むルミネセンスが同時に測定される。

【0087】

本発明による方法におけるルミネセンス又は蛍光の生成のためには、300nm～1100nmの波長で励起されることができ放射するルミネセンス又は蛍光標識を使用することができる。

【0088】

ルミネセンス又は蛍光標識は、従来のルミネセンス又は蛍光染料、又は半導体に基づくいわゆる発光又は蛍光ナノ粒子であってもよい(W.C.W.Chan and S.Nie「超感応性非等方性検出のための量子ドット生物接合体」Science 281 (1998) 2016-2018)。

【0089】

ルミネセンス標識が、分析物に結合され得るか、又は競合分析においては分析物類似体に結合され得るか、多工程分析においては固定化された生物学的、生化学的若しくは合成の認識要素の結合パートナーの1つに結合され得るか、又は生物学的、生化学的若しくは合成の認識要素に結合され得る。

【0090】

さらに、第1のルミネセンス標識と類似の又は異なる励起波長及び類似の又は異なる放射波長の第2の又はそれ以上のルミネセンス標識を使用することもできる。かくして、第2の又はそれ以上のルミネセンス標識が、第1のルミネセンス標識と同じ波長で励起され、別の波長で放射することと有利となり得る。

【0091】

その他の利用分野については、適用される発光染料の励起及び放射スペクトルが、重複しないか又は部分的にのみ重複すると有利となる。

【0092】

本発明による方法では、供与体として作用する第1の発光染料から受容体として作用する第2の発光染料への電荷又は光学エネルギーの伝達が、分析物の検出のために使用されることも有利となる。

【0093】

さらに、1以上のルミネセンスの測定以外に、測定領域上の有効屈折率の変化が、測定されると有利となり得る。さらに、1以上のルミネセンス、及び/又は励起波長での光信号の測定が、偏光選択的に実施されると有利となり得る。この方法は、同様に、1以上のルミネセンスが、励起光のものとは異なる偏光で測定されることをも可能にしている。

【0094】

上で開示された実施形態のうちいずれか1つに従った本方法に基づく方法は、抗体又は抗原、レセプター又はリガンド、キレート剤又は「ヒスチジン-タグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA又はRNAストランド、DNA又はRNA類似体、酵素、酵素コファクター又は阻害物質、レクチン、及び炭水化物を含む群の中の1以上の分析物を同時に又は逐次的に、定量的に又は定性的に測定することを可能にする。

【0095】

上で開示した方法は、(ポリメラーゼ連鎖反応、PCRといったような)生物学的又は生化学的増殖メカニズムを用いることなく、生体材料を直接測定することを可能にする。アプローチの単純化以外に、ここでは、mRNAと観察されたシグナルとの間の線形相関が達成される；すなわち(非常に低い濃度で生ずる生物学的に関連性あるmRNAである) *aks i* いわゆる「稀少メッセージ」を定量的にかつ高感度で測定できる。96個のウェルのプレートプラットフォーム上の測定を並列に実施することにより、これまでにはない品質及び処理量を得る結果(例1. e参照)に至ることが可能になる。その結果として、前臨床及び臨床研究によって生成される複数の標本を、手操作による現行の方法に比べてはるかに

高速でかつより精確に分析することができる。

【0096】

さらに、1つの物質のスポット上の2つの蛍光マーカを検出することにより、単一の実験内で相対的誘発を直接測定することが可能となる(例2 . e参照)。従って、チップからチップの参照は必要とされない。従って、センサープラットフォームの一括処理から一括処理の再現性について必要とされる質は、十分に低くすることができる。

【0097】

検査対象標本が、血液、血清、血漿、リンパ液、尿又は卵黄の如き天然に生ずる体液でもよい。

【0098】

検査対象標本が、光学的に濁った液体、又は表面水、土壌若しくは植物抽出物、又は生体ブロス若しくはプロセスブロスでもよい。

【0099】

検査対象標本は、生体組織から採取することもできる。

【0100】

本発明のさらなる主題は、薬学研究、コンビナトリアル化学、臨床及び前臨床開発におけるスクリーニング方法の化学的、生化学的又は生物学的分析物を定量的又は定性的に測定するための、親和性スクリーニング及び調査におけるリアルタイム結合性研究及び動態パラメータの測定のための、分析物、特にDNA及びRNA分析物の定性的及び定量的測定のため、及び単一ヌクレオチド多形現象の如きゲノム内のゲノミック又はプロテオミック差を測定するための、タンパク質-DNA相互作用を測定するための、mRNA発現及びタンパク質(生)合成についての制御メカニズムを測定するための、毒性研究の発生のため及び発現プロフィールの測定のため、特にmRNA、タンパク質、ペプチド又は小分子有機(メッセンジャー)化合物の如き生物学的及び化学的マーカー化合物を測定するための、及び医薬品の開発研究、人間及び獣医学診断、農業化学製品の開発研究における抗体、抗原、病原体又は細菌を測定するための、症候性及び前症候性の植物診断のための、医薬品開発における患者の層別化のため及び治療薬選択のため

の、食品及び環境分析における病原体、有害物質及び有害細菌、特にサルモネラ、プリオン及び細菌の測定のための上述の実施形態のいずれかに従った方法の使用。

【0101】

本発明について、以下の例を用いて説明、実証する。

【0102】

例1：腫瘍組織内の異なる場所からの選択されたmRNAの発現パターンの差の同時測定のためのデバイス及び方法

組織を、孤立した腫瘍（この場合、前立腺）上の異なる部位から採取し、腫瘍組織内の部位の機能として選択されたmRNAの発現パターンの差について検査する。結果は、組織学検査とは独立して、専ら遺伝的な情報に基づく結論を考慮する。このような標本の中のその方法及び見方の生物学的関連性については、文献中で記述されている（Kristina A. Col, David B. Krizmann 及び Michael R, Emmert-Buch, 「ガンの遺伝学 - 3Dモデル」, Nature Genetics Supplement 21 (1999) 38 - 41）。

【0103】

96個の標本区画の各々の中に400個の離散的な測定領域を有するデバイス

のセンサープラットフォーム上における生物学的認識要素の準備及び被着

a) 発ガン現象又は炎症反応に関与する100個の遺伝子のクローン - 文献中（Kristina A. Col, David B. Krizmann 及び Michael R, Emmert-Buch, 「ガンの遺伝学 - 3Dモデル」, Nature Genetics Supplement 21 (1999) 38 - 41 及びその中で引用された参考文献を参照）に記述された結果に基づく - と、典型的にはこれらの反応に関与しないが理想的な場合には一定の発現レベルを示し、このため標準化のために利用できるような遺伝子（ - アクチン、GAPDH、チュブリン - a、ユビキチン、ホスホリパーゼA2などといったようないわゆる「ハウスキーピング遺伝子」）のクローンと、をセンサープラットフォーム上の別々の測定領域内で固定化させるべき生物学的認識要素として選択する。

【0104】

その他のもの以外で、疾病と潜在的関連性をもつ第1の遺伝子群には、セリンノトレオニンキナーゼ(STK2)、プロテアソームのベータサブユニット(P SMB4)、CD36-抗原(コラーゲンI型レセプター、トロンボスポンジンレセプター)、ホスホリパーゼA2(PLA2G1B)、リボソームタンパク質L17(RPL17)、デスモグレイン(COL4A4)、「活性化転写因子3」(ATF3)、アネクチン1(ANX)、さらなる修復酵素、キナーゼなどが含まれる。

【0105】

必要とされる遺伝子材料は、UniGene SET NIH Cancer Genome Anatomy Projectsからか又は代替的には、I.M.A.G.E. 関連の材料を販売する商業的供給業者からプラスミドの形で得ることができる。対応するcDNAを生成するためのプラスミド内の遺伝子配列のトランスファー及び増幅は、対応するプライマー対を用いて実施され、約300~1000塩基対の長さをもつ2本鎖分子(プローブcDNA)を導く。

【0106】

b) 幅76mm×長さ112mm×厚さ0.7mmの外形寸法を有するセンサープラットフォームを使用し、その表面上に、古典的マイクロタイタープレートの7mm×7mmの内径をもつ96個のウェルを配置することができる。基板材料(光透過層(b))は、AF45のガラス(633nmでの屈折率 $n = 1.52$)から成る。周期360nm、格子深さ 25 ± 5 nmで、上述のとおりセンサープラットフォームの幅に対し平行な格子ラインの配向性をもつ表面レリーフ格子の連続構造を基板内に生成する。光透過層(b)上の Ta_2O_5 の導波性光透過層(a)は、633nmで2.15の屈折率(層の厚さが150nm)をもつ。被着プロセスにより、格子構造は、ほぼ1:1の縮尺で導波層の表面内に移送される。

【0107】

生物学的又は生化学的又は合成の認識要素の固定化のための準備として、超音波装置内のクロロホルムでセンサープラットフォームを清浄し、グリシジルオキシプロピルトリメトキシンのシラン化反応によって化学的に活性化され、かくして生物学的認識要素としてプローブcDNAの固定化のために準備される。市

販の圧電制御されたマイクロピペット (Ge S I M , GroBerkmannsdorf , DE) を用いて、各々10滴 (0 . 1nl) のスポットとして50ng / μ lの濃度で個々のcDNAを被着し、約150 μ mの離散的な測定領域としてのスポットを結果として得る。20 \times 20のスポット配置 (400個のアレイを特徴とする) の中には、固定化工程の終わりで、統計アルゴリズムによって定義された認識要素としての100の異なるcDNAの位置は、純粋な統計的な手法で既知で予め定められている方法で、同じcDNAを有するつねに4つの測定領域が設けられている。スポットの中心間距離は、300 μ mであり、スポットは、センサープラットフォーム上で6mm \times 6mmの領域に及び、アレイを包囲する7mm \times 7mmの正方形の凹部を有するポリジメチルシロキサン (P D M S) の密封層 (g) と共に、96個のウェルのプレートを形成する。96個のあらゆる標本区画の底部には、センサープラットフォーム上に同一パターンの離散的な測定領域が生成される。固定化は、熱処理、すなわち30分間に最高60 $^{\circ}$ Cまで加熱することによって最適化できる。

【0108】

c) 標本材料

(現象論的に正常及び悪性の組織の双方において)前立腺の異なる位置から、例えば、微細な組織片として組織材料(約50000~10000細胞)を採取する。組織を凍結状態で切開し、標準フェノール/クロロホルム抽出により「全RNA」を抽出する。Oligotexスピンカラム(Oiagen, Hilden, DE)を用いて、全RNA片からmRNAを分離する。Cy5-標識づけされた核酸塩基(Cy5-dUTP; Pharmacia Amersham)の存在下で逆転写酵素プロセス(例えばLife Technologies)により、蛍光標識付けされたcDNA分子中へ全てのmRNA分子を移す。得られた材料を、ハイブリダイゼーション緩衝液内で溶解し、かくして、最大10ng/ μ lの合計濃度を有する液体標本を得る。

【0109】

d) 分析システム

光学系

i) 励起ユニット

センサープラットフォームは、コンピュータ制御式調整モジュール上に取付けられており、例1bに挙げられているセンサープラットフォーム内への内部結合のため格子構造(I)上に発射された励起光ビームによって照射された領域の主軸に運動の中心がある状態で、格子ラインに対し平行な軸を中心とした回転及び格子ラインに対し平行かつ垂直な並進運動を可能にする。レーザーが励起光源として作用した直後に、測定データが収集されない場合に光路を遮断するためのシャッターが光路内に存在する。さらに、励起光強度を段階的に又は連続的に変動させるため、センサープラットフォームに向かって励起光の光路において、この位置や他の位置にも、ニュートラルフィルタ又は偏光子を取付けることができる。

【0110】

632.8nmのヘリウムネオンレーザーからの励起光ビームは、25倍の拡大レンズを用いて、断面が直径25mmの円形の平行光束にまで拡張される。この励起光束の中心部分から、長さ10mm×幅10mmの正方形の領域(格子構造の用語に基づく)を選択し、ダイクロイックミラー(650DRLP、Omega Optical, Brattle borough, VT, USA)を通過した後、励起光スポット内を中心とする96個のアレイのうちの1つの上に光透過層(a)を介して向ける。センサープラットフォームは、最大の内部結合となるように調整され、これは測定精度内で反射光と同じ角度で内部結合した後、センサープラットフォームを介しての励起光の透過の最小値によって確定され、及び連続格子構造(c)により外部結合された励起光と反射した励起光の総和の最大値によって確定される。最適な内部結合の角度は、目視により、又はコンピュータ制御の下では、増幅器に接続されたフォトダイオードの信号から測定され得、このフォトダイオードは、関連した光路に位置づけられている。このようにして、内部結合のための共鳴角度として3.5°という角度が決定される。

【0111】

ii) 検出

ペルチェ冷却(動作温度 -30)を有するCCDカメラ(TE3/A, Astrom, Cambridge, UK)を、横方向の分解検出器として使用する。信号収集及

びCCDチップ上への集光は、Heligon Tandem対物レンズ（Rodensstock, 2×Cine-Heligon 2.1/100mm）を用いて実施される。中心波長680nmで、帯域幅40nmの2つの干渉フィルター（Omega Optical, Brattleborough, Vermont）と、（減衰された散乱励起光と、測定領域からのはるかに弱いルミネセンス光と、の透過のための）ニュートラルフィルタ又は（測定領域からの減衰励起光の透過のための）干渉フィルターと組合わせたニュートラルフィルタのいずれかと、が、Heligon Tandem 対物レンズの2つの部分の間で、フィルターホイール上に取付けられる。励起波長と発出波長との信号を交互に測定する。市販の画像分析ソフトウェア（Image Pro Plus）を用いてデータ分析を実施する。

【0112】

e) ハイブリダイゼーション反応のルミネセンス検出方法：

第c)節の「標本材料」において記述した如き調製された30μlの液体標本を、手動で又は実験室用ロボット（例えばBeckman 2000）を用いて、上述した如きデバイスの96個の標本区画の各々の中に充てんする。次に、標本区画をフタで密封し、各ウェル上に100μlの蒸気空間を残す。

【0113】

第1の熱工程では（30分間で85℃まで温度を上昇させる）、表面に固定化された2本鎖cDNAを、デハイブリダイゼーションし（分離させ）、標本中のCy5標識づけされた1本鎖cDNAを用いたハイブリダイゼーションのために準備する。43℃までゆっくりと冷却して（1分あたり約2℃）、その後の8時間にわたる43℃での熱平衡状態にすると、いわゆるストリンジェントな条件下で、相補的Cy5標本付けされた分子を有する固定化された1本鎖cDNAのハイブリダイゼーションを可能にする（完全に相補的な1本鎖のみのハイブリダイゼーション）。これらの状況は、残留標本液体を交換し、かつ温度を周囲温度まで低下させると安定化させることができる。

【0114】

個々の標本区画内のアレイの（光学的）読取りのためには、上述したデバイスを、開示した分析システム内に挿入し、上述した如く、励起波長の透過のためにフィルターホイールの位置において制御されて、96個の標本区画のうちの最初

のもののアレイの中で励起光の最大内部結合に調整される。その後、測定領域（スポット）からの蛍光の強度を、ルミネセンス波長での透過のためのフィルター位置で測定する。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に（つねに各々400個の測定領域を有する標本区画が次々と）実施される。

【0115】

例2：マイクロアレイに基づく高速かつ高度で並列的なディファレンシャル測定方法による毒物学及び薬物代謝における酵素誘導の型及び量の測定

薬品開発においては、薬物代謝の検査及び毒物学研究は、実験動物及び人間における生体異物（生物学的及び/又は薬学的に活性の化学物質）の適用後に実施される。その他のもの以外で、「第1経路代謝」として肝臓内の第1の代謝分解反応が調査される。かかる物質の適用の後、往々にして「酵素誘導」すなわち標準的にP450イソ酵素（混合型機能性モノオキシゲナーゼ）の群の中の肝臓内の代謝に関与する酵素の濃度に対する影響が観察される。この変化は次に、かかる物質のさらなる代謝の質及び速度に影響を及ぼす。新しい薬学的に活性な物質をテストする過程で、テストプログラムの非常に早期の段階で、未処置の（誘発されていない）生体の代謝に比較して高い感度でかつ定量的にmRNAのレベルに対するこれらの影響を測定することが必要である。

【0116】

96個の標本区画の各々の中に400個の離散的な測定領域を有するデバイスのセンサープラットフォーム上での生物学的認識要素の調製及び被着

a) 肝臓内の「第1経路代謝」に関与する文献中に記述された20の最も重要なシトクロムP450イソ酵素のクローンと、標準的にこれらのプロセスに関与せず理想的なケースではその発現レベルが恒常なものにとどまり、従って標準化のために利用できるような遺伝子（ α -アクチン、GAPDH、チュブリン-a、ユビキチン、ホスホリパーゼA2などといったようないわゆる「ハウスキーピング遺伝子」）の5つのクローンと、を、センサープラットフォーム上の別々の測定領域内で固定化させるべき生物学的認識要素として選択する。

【0117】

その他のもの以外で、選択された生物学的マーカー物質の第1の群には、CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1、CYP3A2、CYP4A1が含まれる。

【0118】

必要とされる遺伝子材料は、市販されているプラスミドの形で得ることができる。対応するcDNAを生成するためのプラスミド内の遺伝子配列の移送及び増幅は、対応するプライマー対を用いて実施され、約300~1000塩基対の長さをもつ2本鎖分子(プローブcDNA)を導く。

【0119】

b) 幅76mm×長さ112mm×厚さ0.7mmの外形寸法を有するセンサープラットフォームを使用し、その表面上には、センサープラットフォームに面する開放凹部を有するポリカーボネートプレートに前記センサープラットフォームを組み合わせることにより、古典的マイクロタイタープレートのピッチ(行列の配置内)の幅7mm×長さ7mm×高さ0.15mmの内形寸法を有する96個のマイクロフローセルを配置することができる。凹部を囲むシールリングを用いて、凹部は、互いに対し密封されている。

【0120】

基板材料(光透過層(b))は、AF45のガラス(633nmで屈折率 $n = 1.52$)から成る。格子ライン(360nm周期)がセンサープラットフォームの幅に対し平行で格子深さが $12 + / - 3$ nmである内部及び外部結合格子対の周期的な配列(「ラスタ」)が基板内に生成され、ここで格子ラインはセンサープラットフォームの全幅にわたって伸長している。後続する格子対の間の距離は9mmであり、個々の格子構造(センサープラットフォームの長さに対し平行な)個々の格子構造の長さは0.5mmである。格子対の内部及び外部結合格子間の距離は5.5mmであり、上述のポリカーボネートプレートにセンサープラットフォームを組合せた後、つねに標本区画の(内側)領域内での励起光の内部及び外部結合を可能にする。

【0121】

光透過層(b)上の Ta_2O_5 の導波性光透過層(a)は、633nmで2.15

の屈折率（層厚さ150nm）を有する。被着プロセスによって、格子構造は、ほぼ1：1の縮尺で導波層の表面内に移送される。

【0122】

ポリカーボネートプレートにセンサープラットフォームを組合せたことによって形成された標本区画には、センサープラットフォームと反対側の境界表面に円錐形に開けられた開口部を有し、かくして、標準型の市販のポリプロピレンのピペットチップを挿入することによって標本区画の充てん又は除去が可能となる。

【0123】

生物学的又は生化学的又は合成の認識要素の固定化のための準備として、超音波装置内のクロロホルムでセンサープラットフォームを清浄し、グリシジルオキシプロピルトリメトキシンのシラン化反応によって化学的に活性化され、かくして生物学的認識要素としてプローブcDNAの固定化のために準備される。市販の圧電制御されたマイクロピペット（GeSIM, GroBerkmannsdorf, DE）を用いて、各々10滴（0.1nl）のスポットとして50ng/μlの濃度で個々のcDNAを被着し、約150μmの離散的な測定領域としてのスポットを結果として得る。10×10のスポット配置（100のアレイを特徴とする）の中には、固定化工程の終わりで、統計アルゴリズムによって定義された認識要素としての25の異なるcDNAの位置は、純粋な統計的な手方で既知で予め定められている方法で、同じcDNAを有し、つねに4つの測定領域が設けられている。スポットの中心間距離は、400μmであり、スポットは、センサープラットフォーム上で4mm×4mmの領域に及ぶ。固定化は、熱処理、すなわち30分間で最高60℃まで加熱することによって最適化できる。

【0124】

標本区画が密封用シールによって互いに流動的に密封され、かつスポットによって形成された100個の測定領域のアレイが標本区画の底面を中心となるように、記述されたポリカーボネートプレートは、準備されたセンサープラットフォームに組合わせられる。

【0125】

c) 標本材料

i) (生体異物で処理されていない) 未誘発実験動物からのmRNA

液体窒素を用いて、屠殺したマウスからの約250mgの肝臓をショック凍結させ、乳鉢内ですりつぶし、クロロホルムで脱脂する。その後、標準フェノール/クロロホルム抽出により「全RNA」を分離する。Oligotexスピンカラム(Oiagen, Hilden, DE)を用いて、全RNA分画からmRNAを分離する。Cy5-標識づけされた核酸塩基(Cy5-dUTP; Pharmacia Amersham)の存在下で逆転写酵素プロセス(例えばLife Technologies)内で、蛍光標識付けされたcDNA分子中へと全てのmRNA分子を移送する。得られた材料を、ハイブリダイゼーション緩衝液内で溶解させ、かくして、最大10ng/μlの全濃度を有する液体標本を得る。

【0126】

ii) (生体異物例えばフェノバルビタールで処理した) 誘発された実験動物からのmRNA

蛍光標識付けをCy5ではなくCy3(Amersham Pharmacia)を用いて実施するという点を唯一の相違点として、例2.c.i)に類似した方法で調製を実施する。

【0127】

iii) 調製物i)及びii)からの標識づけされたmRNAを1:1の比で混合する。

【0128】

d) 分析システム

光学系

i) 励起ユニット

センサープラットフォームは、コンピュータ制御式調整モジュール上に取付けられており、例2bに挙げられているセンサープラットフォーム内への内部結合のため格子構造(I)上に発射された励起光ビームによって照射された領域の主軸に運動の中心がある状態で、格子ラインに対し平行な軸を中心とした回転及び格子ラインに対し平行かつ垂直な並進運動を可能にする。レーザーが励起光源として作用した直後に、測定データが収集されない場合に光路を遮断するためのシ

ャッターが光路内に存在する。さらに励起光強度を段階的に又は連続的に変動させるため、センサープラットフォームに向かって励起光の光路内において、この位置や他の位置にも、ニュートラルフィルタ又は偏光子を取付けることができる。

【0129】

ヘリウムネオンレーザー(2mw)からの励起光を、円柱レンズを用いて、(センサープラットフォームの格子ラインに対して平行に)断面スリットタイプの光ビームまで広げる。励起光ビームの周辺上部及び下部領域をスリット絞りでマスクングし、ここで励起光ビームは、わずかに発散するものの格子ラインに対して平行で、格子ラインに対し垂直な投射において平行である。格子構造上のスリットタイプの断面を有する結果として得られた光束は、標本区画の1つの中の内部結合格子の右縁部上に向けられる。励起光スポットのサイズは、およそ長さ0.8mm×幅4mmである。センサープラットフォームは、最大内部結合について調整され、これは、内部結合された励起光の誘導モードに沿って(散乱により)発出された発散光の最大強度によって確定される。この最大値は、誘導モードに沿って発散された光の画像化と同時に目視によっても決定でき、光電子検出器の上に、例えば横方向の分解能検出器の一例としてはCCDカメラの画素の上に、又は横方向には分解しない検出器の1例としてはフォトダイオードの上に、画像システムによって収光される。同じ条件下で、導波路内で透過し、外部結合格子で外部結合した励起光のための最大信号も測定される。3.8°という値が、内部結合のための共鳴角度として決定される。

【0130】

第2の励起光源として、543nmでの発出する緑色ヘリウムネオンレーザーが使用される。励起光ビームは、上述のヘリウムネオンレーザーの赤色ビーム(633nm)と同じ光路内に誘導され得、その後、その光路は、固定位置間におけるモータの駆動により又は手動により揺動することも可能であるミラーにより、妨げられる。内部結合のための共鳴角度の調整は、上述した如き同じ方法で実施され、ここでは、15°という値が決定される。

【0131】

ii) 検出

ペルチェ冷却（運転温度 - 30 ）を有するCCDカメラ（TE3/A、Astrocam, Cambridge, UK）を、横方向の分解検出器として使用する。信号の収集及びCCDチップ上への集光は、Heligon Tandem対物レンズ（Rodestock, 2 × Cine-Heligon 2.1/100mm）を用いて実施する。中心波長680nmで帯域幅40nmの2つの干渉フィルター（Omega Optical, Brattleborough, Vermont）と、（減衰された散乱励起光と、測定領域からのはるかに弱いルミネセンス光と、の透過のための）ニュートラルフィルタ又は（測定領域からの減衰励起光の透過のための）干渉フィルターと組合わせたニュートラルフィルタのいずれかと、が、Heligon Tandem 対物レンズの2つの部分の間で、フィルターホイール上に取り付けられる。励起波長と発出波長との信号を交互に測定する。市販の画像分析ソフトウェア（Image Pro Plus）を用いてデータ分析を実施する。

【0132】

e) ハイブリダイゼーション反応のルミネセンス検出方法

実験室用ロボットを用いて、上述した方法に従って調製された生体材料を、96マイクロフローセルの各々に個別に充てんする。第1の熱工程では（30分間で85℃まで温度を上昇させる）、表面に固定化された2本鎖cDNAを、デハイブリダイゼーションし（分離させ）、次いで、標本中のそれぞれCy5標識づけ又はCy3標識づけされた1本鎖cDNAを用いたハイブリダイゼーションのために準備する。43℃までゆっくりと冷却して、（1分あたり約2℃）次いで、8時間にわたる43℃での熱平衡状態にすると、いわゆるストリンジェントな条件下で、ただし異なる標識のついた分子のいずれをも動力的にも熱力学的にも選ぶことなく、それぞれ相補的にCy5又はCy3標識分子を用いた固定化された1本鎖cDNAのハイブリダイゼーションを可能にする（完全に相補的な1本鎖のみのハイブリダイゼーション）。もう1つの工程では、蛍光まで励起できる未結合材料ならびに表面に非特異的に結合した材料を除去するため、実験室ロボットを使用して、純粋なハイブリダイゼーション緩衝液で、残存液体を交換する。

【0133】

ルミネセンス測定の後、再生のためのカオトロピック試薬としての2モルの尿素を実験室用ロボットに供給することができる。この(再生)プロセスは、80まで温度が上昇することによって達成される。10mMのリン酸緩衝液でのフラッシング及び純粋ハイブリダイゼーション緩衝液内の再平衡化の後、流体/アレイシステムを再使用することができる。

【0134】

個々の標本区画内のアレイの(光学的)読取りのためには、上述したデバイスを、開示した分析システム内に挿入し、上述した如く、励起波長の透過のためにフィルターホイールの位置において制御されて、96個の標本区画のうちの最初のものアレイの中で励起光(最初は633nmのもの)の最大内部結合に調整される。その後、測定領域(スポット)からの蛍光の強度を、ルミネセンス波長の透過のためのフィルター位置で測定する(最初はCy5についてフィルター680DF40、Omega Optical, Brattleborough, Vtを用いる)。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に(つねに各々100個の測定領域を有する標本区画が次々と)実施される。

【0135】

次いで、デバイスは、第1の標本区画内のアレイのための内部結合位置に戻され、ミラーを揺動した後、緑色励起光(543nm)の最大内部結合に調整される。その後、アレイの測定領域(スポット)からの蛍光の強度を、より短い波長のルミネセンスでの透過のためのフィルターホイールの位置で測定する(Cy3については、フィルター580DF40、Omega Optical, Brattleborough, Vt)。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に(つねに各々100個の測定領域を有する標本区画が次々と)実施される。

【0136】

例3: 1つの及び複数の標本内の複数のサイトカインマーカータンパク質の同時定量的測定のためのデバイス及び方法(多サイトカインプレート)。

a) デバイスとして、外形寸法101.6mm×101.6mm(4インチ×4イ

ンチ) × 厚さ 0.7 mm の正方形のセンサープラットフォームが用いられ、これは、分析体積 (10 μ l ~ 100 μ l) を収容するための標本区画が設けられて、9 mm の (中心間) 距離で各々直径 7 mm の円形開口部が内部に形成されている厚さ 5 mm の P D M S 層 (ポリジメチルシロキサン、Sylgard 184 Silicon Elastomer Kit, Dow Corning) と接合されている。層内の開口部は、11行と11列の形状をして (合計121ウェル) 配置されている。散乱光を抑制すべく、重合体材料には黒色顔料でインキ着けがほどこされている。

【0137】

基板材料 (光透過層 (b)) は、A F 45 のガラス (633 nm での屈折率 $n = 1.52$) から成る。周期 360 nm、格子深さ 25 ± 5 nm の表面レリーフ格子の連続構造を、センサープラットフォームの縁部に対し平行な格子ラインの配向性を有する基板内に生成する。光透過層 (b) 上の $T a_2 O_5$ の導波性光透過層 (a) は、633 nm で 2.15 の屈折率 (層厚さ 150 nm) をもつ。被着プロセスにより、格子構造は、ほぼ 1 : 1 の縮尺で導波層の表面内に移送される。

【0138】

有機汚染を除去するため、酸素プラズマに暴露すると、センサープラットフォームの表面を清浄する。次いで、モノ-リン酸オクタデシルの単層を含む付着性促進層を、自動組立てプロセスにより親水性導波路表面上に被着する。この表面の修正により、非常に疎水性の高い表面に導く (水に対する接触角度 $100^\circ \sim 110^\circ$)。表面修正のプロセスは、文献内に詳述されている (D. Brorelli et al., Langmuir 15 (1999) 4324 - 4327)。

【0139】

サイトカインマーカータンパク質の認識及び結合のための生物学的認識要素として異なる抗体を有する 25 スポットの 121 のアレイ (11行 × 11列で配置) を、インクジェットプロッタ N P I C 型 (G e S i m G m b H, GroBerkmannsdorf, D E) の各々を用いて、付着性促進層でコーティングされたセンサープラットフォームの疎水性表面上に被着させ、ここでアレイは各々 5行 × 5列の形状をして配置されている。

【0140】

b) 糖含有(0.1%トレハロース)、リン酸緩衝シラン(pH7.4)中100 µg/mlの濃度で抗体を被着させ、2~3時間飽和水蒸気雰囲気内で液体状態でインキュベートさせ、次いで、洗浄し、窒素でブロー乾燥させる。1mmの(中心間)距離でスポットの平均直径は、0.5mmである。サイトカインの認識、特に異なるインターロイキンの認識のための常に5つの異なる抗体を、個々のアレイの5つの列において使用する。各アレイ内には、供給された標本で既に行われたあらゆる測定の間々から統計的分析の再現性についてのデータを生成すべく、生物学的認識要素と同じインターロイキン抗体を有する5つの測定領域が設けられる。このため、(アレイ内の)生物学的認識要素としてのインターロイキン-抗体の間々を有する測定領域の位置は、統計アルゴリズムによって決定され、固定化工程の終りで25スポットアレイ内の5つの異なるインターロイキン抗体の位置を、予め定められた純統計的手法で知ることができる。次いで、記述した既知の分析方法(例えばELISA)に比べて、分析時間及び必要とする標本量を著しく減らすことにより後続する分析工程を達成し得、これらの知られた分析方法は、一般に離散的な標本区画内で個々の複数の測定を行なうことと、必要な個々の測定の数が多いことに起因して分析の再現性を決定するために複数のマイクロタイタープレートを使用することと、を必要とする。

【0141】

タンパク質で覆われていない(センサープラットフォームの)残りの疎水性表面は、その後の分析工程の間の2次的抗体の非特異的結合を抑制すべく、10mg/mlの血清アルブミン(インキュベーション時間は10分)で遮られる。抗体の固定化の終了後、準備されたセンサープラットフォームは、つねに1つのアレイがPDMS層の121の開口部の各々の中に位置づけられるようにして、PDMS層に接合される。

【0142】

c) 分析システム

光学系

i) 励起ユニット

センサープラットフォームは、コンピュータ制御式調整モジュール上に取付け

られており、例3 a) に挙げられているセンサープラットフォーム内への内部結合のため格子構造 (I) 上に発射された励起光ビームによって照射された領域の主軸に運動の中心がある状態で、格子ラインに対し平行な軸を中心とした回転及び格子ラインに対し平行かつ垂直な並進運動を可能にする。レーザーが励起光源として作用した直後に、測定データが収集されない場合に光路を遮断するためのシャッターが光路内に存在する。さらに、励起光強度を段階的に又は連続的に変動させるため、センサープラットフォームに向かって励起光の光路においてこの位置や他の位置にも、ニュートラルフィルタ又は偏光子を取付けることができる。

【0143】

632 . 8 nmのヘリウムネオンレーザーからの励起光ビームは、25倍の拡大レンズを用いて、断面が直径25 mmの円形の平行光束にまで拡張される。この励起光束の中心部分から、長さ16 mm×幅16 mmの正方形の領域 (格子構造の用語に基づく) を選択し、ダイクロイックミラー (650 D R L P、Omega Optical, Brattle borough, VT, USA) を通過した後、励起光スポットの中心部分内に位置する121のアレイのうちの4つの群に光透過層 (a) を介して向けられる。センサープラットフォームは、最大の内部結合となるように調整され、これはセンサープラットフォームを介しての励起光の透過の最小値によって確定され、及び測定精度内で反射光と同じ角度で内部結合した後、連続格子構造 (c) により外部結合された励起光と反射した励起光の総和の最大値によって確定される。最適な内部結合の角度は、目視により、又は、コンピュータ制御の下では、増幅器に接続されたフォトダイオードの信号から決定され得、このフォトダイオードは、関連した光路に位置づけられている。このようにして、内部結合のための共鳴角度として3 . 5 ° という角度が決定される。

【0144】

ii) 検出

ペルチェ冷却 (動作温度 - 30) を有するCCDカメラ (TE3 / A、Astrocam, Cambridge, UK) を、横方向の分解検出器として使用する。信号収集及びCCDチップ上への集光は、Heligon Tandem対物レンズ (Rodenstock, 2 × Ci

ne-Heligon 2.1/100mm) を用いて実施される。中心波長680nmで帯域幅40nmの2つの干渉フィルター(Omega Optical, Brattleborough, Vermont)と、(減衰された散乱励起光と、測定領域からのはるかに弱いルミネセンス光と、の透過のための)ニュートラルフィルタ又は(測定領域からの減衰励起光の透過のための)干渉フィルターと組合わせたニュートラルフィルタのいずれかと、が、Heligon Tandem 対物レンズの2つの部分の間で、フィルターホイール上に取り付けられる。励起波長と発出波長との信号を交互に測定する。市販の画像分析ソフトウェア(Image Pro Plus)を用いてデータ分析を実施する。

【0145】

d) 分析方法

測定すべきサイトカインの特異的認識のためには、サンドイッチ分析の方式が選択される。選択されたインターロイキン(インターロイキンIL#1~IL#5)の各々について、0.1%の血清アルブミン及び0.05%のTween 20を有するリン酸緩衝溶液中の11の検量用溶液を調製する(インターロイキン濃度; 0、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、300pg/ml)。さらに、5つのインターロイキンの各々を同じ濃度で含み、5つのインターロイキンの全ての11の混合型検量用溶液が調製され、統計的(混合)方法で、未知の濃度のインターロイキンを含有する55の標本溶液を生成した。次に、対応する特異的ビオチニル化2次インターロイキン抗体(つねに200ピコモル)で個々の検量用溶液を、1時間予備インキュベートした。同様にして、5つの異なるビオチニル化2次インターロイキン抗体(各々200ピコモル)の混合物で混合型検量用溶液及び標本溶液を、同じく1時間予備インキュベートした。

【0146】

次に、50µlの個々の検量用溶液を、センサープラットフォーム上の最初の5列の標本区画内に充てんし、後続する蛍光測定の分析工程において各列内のインターロイキンにつき1つの個々の検量曲線(用量応答曲線)の生成を可能にする。後に分析物混合物の存在下で対応する検量曲線を生成するべく、第6番目の列の11個の標本区画の各々の中に50µlの混合型検量用溶液を充てんする。対応するやり方で、55個の標本溶液を、標本区画の残りの列の全体にわたり分

配する。121個の測定溶液の全てのインキュベーション時間は30分である。その後、緩衝液（0.1%の血清アルブミンと0.05%のTween 20を添加したリン酸緩衝溶液）で標本区画を洗浄する。蛍光測定による最終的分析工程では、緩衝溶液（0.1%の血清アルブミン及び0.05% Tween 20を付加したリン酸緩衝溶液）中の50 μ lの1-ナノモルCy5-ストレプトアビジン（Amersham Pharmacia）を標本区画の各々に充てんし、121アレイ内の全ての測定領域からの蛍光信号を、15分間のインキュベーション時間の後に測定する。

【0147】

個別の標本区画内のアレイの（光学的）読取りのためには、上述したデバイスを、開示した分析システム内に挿入し、上述した如く、励起波長の透過のためにフィルターホイールの位置において制御されて、96個の標本区画のうちの最初の4つのアレイの中で励起光の最大内部結合に調整される。その後、測定領域（スポット）からの蛍光の強度を、ルミネセンス波長での透過のためのフィルター位置で測定する。次の標本区画からのルミネセンス信号の読取りのための次の位置までデバイスを搬送すると、他の標本区画内のアレイの読取りが逐次的に（つねに各々25の離散的な測定領域を有する4つの標本区画の群について）実施される。

【図1】

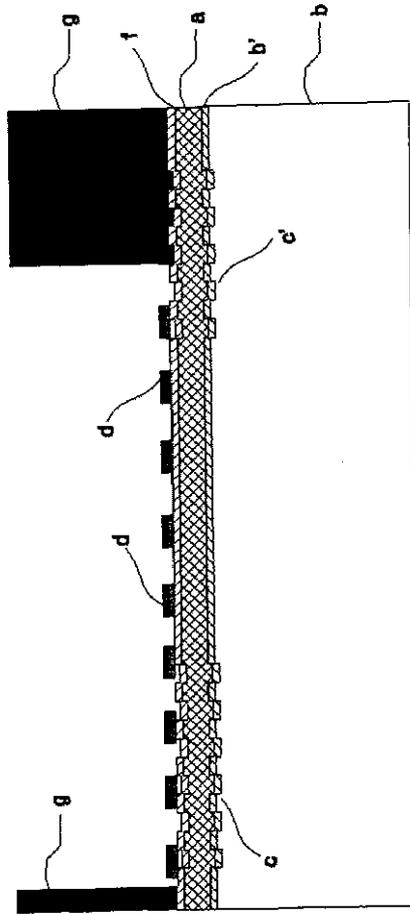


Abbildung 1

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年9月3日(2001.9.3)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】請求項1

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項1**】 センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層(g)と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を2次元配置で形成するデバイスであって、

前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画内の前記平面型光導波路上において2次元配列で5つ以上の離散的な測定領域(d)に固定化され、

前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、

前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動し得るデバイス。

【**手続補正2**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】請求項7

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**請求項7**】 センサープラットフォームの一部としてのフィルム光導波路が、層(a)よりも低い屈折率を有する第2の光透過層(b)の上の第1の光透過層(a)を有するフィルム光導波路である請求項1~4のいずれかのデバイス。

。

【手続補正3】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**請求項12**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項12】 光透過層(a)と(b)との間に、層(a)よりも低い屈折率を有しかつ層(a)に接触し、かつ、厚さが5nm~10000nm、好ましくは10nm~1000nmである付加的な光透過層(b)が位置づけられている請求項7~11のいずれかのデバイス。

【手続補正4】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**請求項15**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項15】 付着促進層(f)が、200nm未満、好ましくは20nm未満の厚さを有する請求項14のデバイス。

【手続補正5】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**請求項23**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項23】 測定領域(d)への励起光の内部結合が、光透過層(a)に形成された1以上の格子構造(c)によって実施される請求項7~22のいずれかのデバイス。

【手続補正6】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**請求項24**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項24】 光透過層(a)に誘導された光の外部結合が、光透過層(a)内に形成された格子構造(c)によって実施される請求項7~23のいずれかのデバイス。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項64

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項64】 センサープラットフォームの一部としての平面型光導波路と、前記プラットフォームに直接的に又は封止媒体によって接続された層(g)と、を含み、前記層は、緊密シールを直接的に形成し又は封止媒体によって密封層を形成し、センサープラットフォームに向かって少なくとも開放された複数の凹部を含み、対応する複数の標本区画を2次元配置で形成するデバイスを用いて、横方向に分離した少なくとも5つの測定領域上の1以上の標本におけるルミネセンスにより1以上の分析物を測定する方法であって、

前記標本区画の各々において、異なる分析物の特異的認識と結合のための異なる生物学的又は生化学的認識要素が、これらの標本区画内の前記平面型光導波路上において2次元配列で5つ以上の離散的な測定領域(d)に固定化され、

前記測定領域は、前記標本区画の境界を形成するセンサープラットフォームの一部として、光学的に相互作用して前記光導波路から励起光を発生し、

前記標本区画は、収容した標本又は試薬溶液を除去し、かつ次いで、場合によっては洗浄工程を経ることなく、同じ前記標本区画に引き続いて供給される標本又は試薬溶液を収容するように作動し得、

励起光が測定領域へと誘導され、標本中又は測定領域上の発光し得る物質を励起してルミネセンスを放射せしめ、発せられたルミネセンスを測定する方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Intern. Application No. PCT/EP 00/07529
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N21/77 G01N21/76 G01N21/64 G01N21/55 G01N33/543		
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) IPC 7 G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14 November 1996 (1996-11-14) cited in the application	1-19, 23-35, 40, 43-57, 60, 64-71, 76,80
Y	page 2, line 1 - line 3 page 8, line 6 - line 18 page 8, line 28 -page 9, line 3 page 13, line 9 - line 10 page 13, line 13 - line 19 page 14, line 6 - line 16 page 15, line 15 - line 22 -/--	41,42, 58,59, 61-63, 72-75, 77-79
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but 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 7 December 2000		Date of mailing of the international search report 20/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Navas Montero, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/07529

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 15, line 28 - line 29 page 16, line 1 - line 8 page 16, line 10 - line 27 page 18, line 1 - line 2 page 18, line 21 - line 27 page 19, line 1 - line 5 page 19, line 14 -page 20, line 3 page 21, line 10 - line 12 page 21, line 19 - line 24 page 27, line 19 -page 28, line 2 page 26, line 16 - line 22 page 28, line 11 - line 17 page 29, line 10 - line 17 page 34, line 1 - line 12 page 38, line 26 -page 39, line 5 page 39, line 14 - line 26 page 40, line 19 - line 22 ---	
Y	WO 99 36766 A (STAALBERG RALPH ;SJOELANDER STEFAN (SE); ROOS HAAKAN (SE); BIACORE) 22 July 1999 (1999-07-22) page 12, line 14 - line 28 page 27, line 1 - line 17 page 28, line 24 -page 29, line 4 page 33, line 17 - line 18 page 39, line 28 - line 30 claim 20 ---	41, 42
Y	WO 97 35203 A (CHRISTENSEN DOUGLAS A ;UNIV UTAH RES FOUND (US); MILES SCOTT D (US) 25 September 1997 (1997-09-25) cited in the application page 9, line 22 -page 10, line 2 ---	58, 59, 61
Y	US 5 459 325 A (HUETON IAIN ET AL) 17 October 1995 (1995-10-17) column 5, line 14 - line 24 column 5, line 54 - line 63 column 6, line 38 - line 64 ---	62, 63
Y	WO 97 46707 A (RASMUSSEN RANDY P ;UNIV UTAH RES FOUND (US); RIRIE KIRK M (US); WI) 11 December 1997 (1997-12-11) page 9, line 30 -page 10, line 25 ---	72
Y	WO 98 09156 A (CIBA GEIGY AG ;KUNZ RINO ERNST (CH); DUEBENDORFER JUERG (CH); KRAU) 5 March 1998 (1998-03-05) page 11, line 8 - line 26 ---	73
Y	EP 0 872 735 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 21 October 1998 (1998-10-21) column 6, line 52 -column 7, line 18 ---	74
	-/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/07529

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 25892 A (ARS HOLDING 89 NV ;ATTRIDGE JOHN WORTHINGTON (GB); ROBINSON GRENVIL) 23 December 1993 (1993-12-23) page 9, line 28 - line 37 ---	75
Y	US 5 747 274 A (JACKOWSKI GEORGE) 5 May 1998 (1998-05-05) cited in the application column 9, line 31 - line 50 ---	77-79
X	WO 94 27137 A (UNIV UTAH RES FOUND) 24 November 1994 (1994-11-24) cited in the application page 7, line 27 -page 8, line 19 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5747274 A		AU 8475791 A	16-04-1992
		BE 1004994 A	16-03-1993
		BR 9104431 A	09-06-1992
		CN 1060533 A, B	22-04-1992
		DE 4122886 A	16-04-1992
		ES 2070658 A	01-06-1995
		FR 2667944 A	17-04-1992
		GB 2248688 A, B	15-04-1992
		IT 1251682 B	19-05-1995
		JP 2628421 B	09-07-1997
		JP 4258765 A	14-09-1992
		KR 167564 B	30-03-1999
		MX 9101550 A	08-07-1992
		NZ 239938 A	25-03-1994
		US 5290678 A	01-03-1994
		US 5744358 A	28-04-1998
		US 5710008 A	20-01-1998
		AU 5117996 A	30-10-1996
		CA 2215018 A	17-10-1996
		EP 0826151 A	04-03-1998
		WO 9632648 A	17-10-1996
		JP 10511185 T	27-10-1998
		NO 974682 A	10-12-1997
		AU 4553993 A	13-02-1995
WO 9502612 A	26-01-1995		
EP 0710252 A	08-05-1996		
ZA 9404547 A	17-02-1995		
WO 9427137 A	24-11-1994	US 5512492 A	30-04-1996
		AU 4341699 A	28-10-1999
		AU 704947 B	06-05-1999
		AU 7311694 A	12-12-1994
		CA 2162996 A	24-11-1994
		EP 0700514 A	13-03-1996
		JP 8510331 T	29-10-1996
		US 5677196 A	14-10-1997
		US 5846842 A	08-12-1998
		US 5919712 A	06-07-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 6 3
33/50		33/50	Z
33/566		33/566	
33/58		33/58	A
			Z
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2
	1 0 3		1 0 3
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	F
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	エーラート, マルクス スイス国 ツェーハー - 4312 マグデン イム ブリュエール 6		
(72)発明者	クレスバツハ, ゲルハルト エム ドイツ国 デー - 79219 シュタウフェン ブルクハルデンヴェーク 6		
(72)発明者	パウラク, ミヒャエル ドイツ国 デー - 79725 ローフェンブル ク アンデルスバツハシュトラーセ 5		
(72)発明者	シュールマン - マーダー, エヴェリーネ スイス国 ツェーハー - 5089 ツァイヒェ ン タールヒューベル 1		

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01 FA06
GA07 GB02 GB16 HA01 HA02
HA07 HA15 JA02 JA05 KA01
KA02 KA03 KA05 KA08 KA09
LA02 LA03
2G045 AA40 CA25 CA26 CB03 CB20
DA12 DA13 DA14 DA37 FA12
FA16 FB11 FB12 GC15
2G054 AA07 CA21 CA22 CA23 CA28
CE01 EA03 EB03 FA06 FA12
FA16 FA17 FA19 FA33 GB01
GB10
4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 HA14
HA19
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03
FA12 FA15
4B063 QA01 QA12 QA18 QA19 QQ02
QQ03 QQ42 QQ52 QR56 QR62
QR82 QS25 QS34 QS39 QX02

专利名称(译)	用于测量多种分析物的装置和方法		
公开(公告)号	JP2003507705A	公开(公告)日	2003-02-25
申请号	JP2001517147	申请日	2000-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	ZEPTOSENS		
申请(专利权)人(译)	Tsueputozensu股份公司		
[标]发明人	アーベルアンドレアスパー ドゥベネックゲルトエル エーラートマルクス クレスパツハゲルハルトエム パウラクミヒャエル シュールマンマーダーエヴェリーネ		
发明人	アーベル,アンドレアス パー ドゥベネック,ゲルト エル エーラート,マルクス クレスパツハ,ゲルハルト エム パウラク,ミヒャエル シュールマン-マーダー,エヴェリーネ		
IPC分类号	G01N21/64 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6816 G01N21/25 G01N21/552 G01N21/77 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	G01N21/648 C12Q1/6816 G01N21/253 G01N21/552 G01N21/7703 G01N33/54373 C12Q2565/628		
FI分类号	G01N33/53.M C12M1/00.A C12M1/34.Z G01N21/64.G G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/566 G01N33/58.A G01N33/58.Z G01N37/00.102 G01N37/00.103 C12Q1/68.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA06 2G043/GA07 2G043/GB02 2G043 /GB16 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA07 2G043/HA15 2G043/JA02 2G043/JA05 2G043/KA01 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/KA08 2G043/KA09 2G043/LA02 2G043/LA03 2G045 /AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB20 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA37 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FB11 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA07 2G054 /CA21 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/CE01 2G054/EA03 2G054/EB03 2G054/FA06 2G054/FA12 2G054/FA16 2G054/FA17 2G054/FA19 2G054/FA33 2G054/GB01 2G054/GB10 4B024 /AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063 /QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
优先权	1999001486 1999-08-13 CH		
其他公开文献	JP5006494B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括作为传感器平台的一部分的平面光波导以及直接或通过封装介质连接到所述平台的层 (g) (根据图1)。一种用于通过密封介质直接形成密封或形成密封层的装置,该装置包括多个至少朝着传感器平台开口并形成二维排列的相应标本室的凹槽。在每个所述样品室中,用于特异性识别和结合不同分析物的不同生物或生化识别元件具有五个或更多离散测量区域 (d (根据图1),测量区域与来自光波导的激发光光学相互作用,作为构成样品室边界的传感器平台的一部分。然而,样品室可以容纳样品或试剂溶液,随后将其供应到相同的样品室,而无需去除所容纳的样品或试剂溶液,然后可选地进行洗涤步骤。..

