(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-100679
(P2012-100679A)
(43)公開日　平成24年5月31日(2012.5.31)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12M 1/00	(2006.01)	C12M 1/00	A	2G054
G01N 27/30	(2006.01)	G01N 27/30	B	4B029
G01N 27/28	(2006.01)	G01N 27/30	Z	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N 27/28	301Z	
G01N 21/78	(2006.01)	G01N 33/543	525U	

審査請求 有　請求項の数 7　ＯＬ　（全 72 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-19525(P2012-19525)
(22)出願日　平成24年2月1日(2012.2.1)
(62)分割の表示　特願2009-3415(P2009-3415)の分割
原出願日　平成14年9月10日(2002.9.10)
(31)優先権主張番号　60/318,293
(32)優先日　平成13年9月10日(2001.9.10)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/318,284
(32)優先日　平成13年9月10日(2001.9.10)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/318,289
(32)優先日　平成13年9月10日(2001.9.10)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504002920
メソ　スケイル　テクノロジーズ，エルエルシー
アメリカ合衆国　メリーランド、ゲイサーズバーグ、　インダストリアル　ドライブ　１６０２０
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100107504
弁理士　安藤　克則

最終頁に続く

(54)【発明の名称】１つの試料について複数の測定を実施する方法及び装置

(57)【要約】
【課題】１つの試料について複数の化学、生化学及び／又は生物学アッセイを実施するための試薬、装置、システム、キット及び方法を提供する。
【解決手段】複数のアッセイドメインを有するアッセイモジュールを用いて多重試験測定を実施する。好ましい実施形態において、これらの測定は、アッセイモジュールを収容し、アッセイモジュールのウェル又はアッセイ領域において発光、好ましくは電極誘導発光を誘発し、誘発された発光を測定するように構成されたリーダー装置を備え一体型電極を有するアッセイモジュールにおいて実施される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
複数のアッセイドメインを含む発光アッセイを実施するためのアッセイモジュールであって、前記アッセイドメインが、第１の試薬を有する第１のアッセイドメインと第２の試薬を有する第２のアッセイドメインとを含み、前記第１のアッセイドメインが前記第２のアッセイドメインの少なくとも１０倍明るい発光を生成可能であり、前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインが隣接しておらずかつ／又は少なくとも１つの他のアッセイドメインによって分離されて、前記第１のアッセイドメインから放出される発光と前記第２のアッセイドメインから放出される発光との干渉が低減されたアッセイモジュール。
【請求項２】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールにおいて複数の分析物のアッセイを実施する方法であって、前記アッセイドメインが、第１の分析物を測定するための第１の試薬を有する第１のアッセイドメインと第２の分析物を測定するための第２の試薬を有する第２のアッセイドメインとを含み、前記第１のアッセイドメインが前記第２のアッセイドメインの少なくとも１０倍明るい発光を生成可能であり、前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインが隣接しておらずかつ／又は少なくとも１つの他のアッセイドメインによって分離されて、前記第１のアッセイドメインから放出される発光と前記第２のアッセイドメインから放出される発光との干渉が低減されたアッセイモジュール。
【請求項３】
前記第１のアッセイドメインが前記第２のアッセイドメインの少なくとも１０倍の捕捉試薬を含む、請求項１に記載のアッセイモジュール。
【請求項４】
前記第１のアッセイドメインが前記第２のアッセイドメインの少なくとも１０倍多い試薬を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
前記第１のアッセイドメインが前記第２のアッセイドメインの少なくとも１００倍明るい発光を生成可能である、請求項１に記載のアッセイモジュール。
【請求項６】
前記第１のアッセイドメインが前記第２のアッセイドメインの少なくとも１，０００倍明るい発光を生成可能である、請求項１に記載のアッセイモジュール。
【請求項７】
前記第２のアッセイドメインが、放出された発光を減少させる１つ又は複数の特性を有する、請求項１、３、５又は６に記載のアッセイモジュール。
【請求項８】
前記１つ又は複数の特性が、放出された発光を減少させる捕捉試薬及び／又は放出された発光を減少させる標的分析物を含む、請求項７に記載のアッセイモジュール。
【請求項９】
前記第１のアッセイドメインが少なくとも１つの他のアッセイドメインによって前記第２のアッセイドメインから分離されている、請求項１、３、５、６、７又は８に記載のアッセイモジュール。
【請求項１０】
前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインが別個に指定可能である、請求項１、３、５、６、７、８又は９に記載のアッセイモジュール。
【請求項１１】
前記アッセイモジュールが、複数のウェルを備えるマルチウェルプレートであって、前記ウェルの各々が前記複数のアッセイドメインのコピーを有する、請求項１、３、５、６、７、８、９又は１０に記載のアッセイモジュール。
【請求項１２】
複数のアッセイドメインを含む発光アッセイを実施するためのアッセイモジュールを作

製する方法であって、前記アッセイドメイン間の干渉が低減するように構成されたパターンで前記アッセイドメインを形成するステップを含む方法。
【請求項１３】
前記パターンが、前記アッセイドメインから放出される発光間の干渉が低減するように構成されている、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記パターンが、前記アッセイドメインにおいて起こる反応間の干渉が低減するように構成されている、請求項１２又は１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記アッセイドメインを形成する前記ステップが、第２のアッセイドメインに隣接しないように第１のアッセイドメインを配置するステップを含む、請求項１２、１３又は１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記アッセイドメインを形成する前記ステップが、第２のアッセイドメインに隣接しないように第１のアッセイドメインを配置するステップを含み、前記第１のアッセイドメインにおいて起こる反応又は前記第１のアッセイドメインに固定された試薬が、（ｉ）前記第２のアッセイドメインにおいて生成される発光、（ｉｉ）前記第２のアッセイドメインにおいて起こる反応、及び／又は（ｉｉｉ）前記第２のアッセイドメインに固定された試薬と干渉する、請求項１２、１３又は１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記パターンが前記発光アッセイの性能を最適化するように構成されている、請求項１２、１３、１４、１５又は１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記パターンが前記アッセイドメインの配列、間隔、サイズ及び濃度を含む、請求項１２、１３、１４、１５、１６又は１７に記載の方法。
【請求項１９】
パネルの分析物を測定するための複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記パネルがサイトカイン及び／又はそれらの受容体；成長因子及び／又はそれらの受容体；セカンドメッセンジャー；乱用薬物；治療薬物；自己抗体；アレルゲン特異的抗体；腫瘍マーカー；心臓マーカー；止血に関連するマーカー；急性ウイルス肝炎感染マーカー；アルツハイマー病マーカー；骨粗しょう症マーカー；受胎能マーカー；うっ血性心不全マーカー；甲状腺障害マーカー；前立腺癌のマーカー；サイトカイン、成長因子、アポトーシス経路の成分、Ｐ４５０酵素の発現、腫瘍関連遺伝子の発現をコードするｍＲＮＡのｍＲＮＡレベルを測定するための核酸アレイ；個体、病原体、腫瘍細胞の遺伝形質を決定するための核酸アレイから選択される分析物カテゴリの成分である複数の分析物を含むアッセイモジュール。
【請求項２０】
前記アッセイドメインが、（ｉ）分析物又は分析物アナログ、（ｉｉ）分析物に結合する結合試薬、及び／又は（ｉｉｉ）分析物の触媒活性基質を含む、請求項１９に記載のアッセイモジュール。
【請求項２１】
アッセイモジュールを用いて複数の分析物のアッセイを実施する方法であって、
（ａ）前記アッセイモジュール内の複数のアッセイドメインと試料を接触させるステップであって、前記複数のアッセイドメインによってパネルの分析物を測定することが可能であり、前記パネルが、サイトカイン及び／又はそれらの受容体；成長因子及び／又はそれらの受容体；セカンドメッセンジャー；乱用薬物；治療薬物；自己抗体；アレルゲン特異的抗体；腫瘍マーカー；心臓マーカー；止血に関連するマーカー；急性ウイルス肝炎感染マーカー；アルツハイマー病マーカー；骨粗しょう症マーカー；受胎能マーカー；うっ血性心不全マーカー；甲状腺障害マーカー；前立腺癌のマーカー；サイトカイン、成長因子、アポトーシス経路の成分、Ｐ４５０酵素の発現、腫瘍関連遺伝子の発現をコードする

ｍＲＮＡのｍＲＮＡレベルを測定するための核酸アレイ；個体、病原体、腫瘍細胞の遺伝形質を決定するための核酸アレイから選択される分析物カテゴリの成分である複数の分析物を含むステップと、
（ｂ）前記アッセイドメインにおいて前記分析物を測定するステップとを含む方法。
【請求項２２】
電気化学発光アッセイモジュールを用いて電気化学発光アッセイを実施する方法であって、
（ａ）前記モジュール内の複数のアッセイドメインと試料を接触させるステップであって、前記複数のアッセイドメインによってパネルの分析物を測定することが可能であり、前記パネルがサイトカイン及び／又はそれらの受容体；成長因子及び／又はそれらの受容体；セカンドメッセンジャー；乱用薬物；治療薬物；自己抗体；アレルゲン特異的抗体；腫瘍マーカー；心臓マーカー；止血に関連するマーカー；急性ウイルス肝炎感染マーカー；アルツハイマー病マーカー；骨粗しょう症マーカー；受胎能マーカー；うっ血性心不全マーカー；甲状腺障害マーカー；前立腺癌のマーカー；サイトカイン、成長因子、アポトーシス経路の成分、Ｐ４５０酵素の発現、腫瘍関連遺伝子の発現をコードするｍＲＮＡのｍＲＮＡレベルを測定するための核酸アレイ；個体、病原体、腫瘍細胞の遺伝形質を決定するための核酸アレイから選択される分析物カテゴリの成分である複数の分析物を含み、前記アッセイドメインが１つ又は複数の作用電極を備え又はそれに隣接しているステップと、
（ｂ）前記複数のアッセイドメインにおいて電気化学発光を誘発させるステップと、
（ｃ）放出された電気化学発光を検出するステップとを含む方法。
【請求項２３】
パネルの分析物を測定する複数の結合ドメインを含むアッセイモジュールにおいてリガンドの特異的結合アッセイを実施する方法であって、前記パネルがサイトカイン及び／又はそれらの受容体；成長因子及び／又はそれらの受容体；セカンドメッセンジャー；乱用薬物；治療薬物；自己抗体；アレルゲン特異的抗体；腫瘍マーカー；心臓マーカー；止血に関連するマーカー；急性ウイルス肝炎感染マーカー；アルツハイマー病マーカー；骨粗しょう症マーカー；受胎能マーカー；うっ血性心不全マーカー；甲状腺障害マーカー；前立腺癌のマーカー；サイトカイン、成長因子、アポトーシス経路の成分、Ｐ４５０酵素の発現、腫瘍関連遺伝子の発現をコードするｍＲＮＡのｍＲＮＡレベルを測定するための核酸アレイ；個体、病原体、腫瘍細胞の遺伝形質を決定するための核酸アレイから選択される分析物カテゴリの成分である複数の分析物を含む方法。
【請求項２４】
前記パネルが成長因子受容体のパネルである、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記アッセイドメインが、分析物の第１の形態に結合可能な第１の試薬を含む第１のアッセイドメインと前記分析物の第２の形態に結合可能な第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項２６】
２つの形態の分析物を測定する方法であって、
（ａ）複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールに試料を導入するステップであって、第１のアッセイドメインが、分析物の第１の形態に結合可能な第１の試薬を含み、第２のアッセイドメインが、前記分析物の第２の形態に結合可能である第２の試薬を含むステップと、
（ｂ）前記第１のアッセイドメイン及び前記第２のアッセイドメインへの分析物の結合を測定して前記第１の形態及び第２の形態の量を測定するステップとを含む方法。
【請求項２７】
前記第２の形態が前記第１の形態の切断された一部である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】

前記第２の形態が前記第１の形態の切断された一部である、請求項２５に記載のアッセイモジュール。
【請求項２９】
前記第２の形態が前記第１の形態のユビキチン結合した形態である、請求項２５に記載のアッセイモジュール。
【請求項３０】
前記分析物の前記第２の形態が前記第１の形態のリン酸化体である、請求項２５に記載のアッセイモジュール。
【請求項３１】
前記第２の形態が前記第１の形態の結合体（ｂｏｕｎｄ　ｆｏｒｍ）である、請求項２５に記載のアッセイモジュール。
【請求項３２】
前記第２のアッセイドメインが前記第１の形態にも結合可能である、請求項２５に記載のアッセイモジュール。
【請求項３３】
前記第１の形態が非グリコシル化タンパク質であり、前記第２の形態がグリコシル化タンパク質である、請求項２５に記載のアッセイモジュール。
【請求項３４】
前記第１の形態が遊離ＰＳＡであり、前記分析物の前記第２の形態が結合ＰＳＡである、請求項２５に記載のアッセイモジュール。
【請求項３５】
前記第１の形態及び前記第２の形態と結合可能である検出試薬をさらに含む、請求項２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３又は３４に記載のアッセイモジュール。
【請求項３６】
アッセイを実施するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）第１の分析物に結合可能である第１の試薬を有する第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記第１の分析物の改変形態に結合可能である第２の試薬を有する第２のアッセイドメインと、
（ｃ）第２の分析物に結合可能である第３の試薬を有する第３のアッセイドメインと、
（ｄ）前記第２の分析物の改変形態に結合可能である第４の試薬を有する第４のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項３７】
前記アッセイモジュールが、さらに、前記第１の分析物、前記第１の分析物の前記改変形態、前記第２の分析物、及び前記第２の分析物の改変形態に結合可能である標識試薬を含む、請求項３６に記載のアッセイモジュール。
【請求項３８】
前記分析物の第１の形態に結合可能である第１の試薬を含む第１のアッセイドメインと前記分析物の第２の形態に結合可能である第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを有するアッセイモジュールにおいて単一試料中の２つ以上の分析物形態を測定する方法であって、
（ａ）前記試料を、前記第１のアッセイドメイン及び前記第２のアッセイドメイン、並びに前記分析物の前記第１の形態及び前記第２の形態に結合可能である標識試薬と接触させるステップと、
（ｂ）前記標識試薬から放出されたシグナルを検出するステップとを含む方法。
【請求項３９】
未結合標識試薬を除去する洗浄ステップをさらに含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
アッセイを実施するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）第１の分析物に結合可能である第１の試薬を有する第１のアッセイドメインと、

（ｂ）前記第１の分析物の改変形態に結合可能である第２の試薬を有する第２のアッセイドメインと、
（ｃ）第２の分析物に結合可能である第３の試薬を有する第３のアッセイドメインと、
（ｄ）前記第２の分析物の改変形態に結合可能である第４の試薬を有する第４のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項４１】
前記アッセイモジュールが、さらに、前記第１の分析物、前記第１の分析物の前記改変形態、前記第２の分析物、及び前記第２の分析物の改変形態に結合可能である標識試薬を含む、請求項４０に記載のアッセイモジュール。
【請求項４２】
前記分析物の第１の形態に結合可能である第１の試薬を含む第１のアッセイドメインと前記分析物の第２の形態に結合可能である第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを有するアッセイモジュールにおいて単一試料中の２つ以上の分析物形態を測定する方法であって、
（ａ）前記試料を、前記第１のアッセイドメイン及び前記第２のアッセイドメイン、並びに前記分析物の前記第１の形態及び前記第２の形態に結合可能である標識試薬と接触させるステップと、
（ｂ）前記標識試薬から放出されたシグナルを検出するステップとを含む方法。
【請求項４３】
未結合標識試薬を除去する洗浄ステップをさらに含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記分析物の第１のエピトープに結合可能である第１の試薬を含む第１のアッセイドメインと前記分析物の第２のエピトープに結合可能である第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを有するアッセイモジュールにおいて単一試料中の分析物の２つ以上のエピトープを測定する方法であって、前記試料を、前記第１のアッセイドメイン及び前記第２のアッセイドメインと接触させるステップを含む方法。
【請求項４５】
前記試料を、前記分析物に結合可能である１つ又は複数の標識と接触させるステップと、前記１つ又は複数の標識によって放出されるシグナルを検出するステップとをさらに含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
分析物のアッセイを実施するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）前記分析物に結合可能である第１の試薬を含む第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記分析物に結合可能である前記第１の試薬又は第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを含み、
前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインが異なる特性を有し、前記異なる特性が表面積、試薬濃度、熱安定性、ｐＨ感度、ぬれ性、エピトープ特異性、結合動力学、非特異的結合特性及び結合定数からなる群から選択されるアッセイモジュール。
【請求項４７】
分析物のアッセイを実施するためのアッセイドメインの設計を最適化するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）前記分析物に結合可能である第１の試薬を含む第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記第１の試薬を含む第２のアッセイドメインとを含み、
前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインが異なる諸特性を有し、前記異なる諸特性が表面積、試薬濃度、熱安定性、ｐＨ安定性、疎水性又は親水性、共反応物、エピトープ特異性、結合動力学、非特異的結合特性、結合定数及び／又は熱力学からなる群から選択されるアッセイモジュール。
【請求項４８】
分析物のアッセイにおけるアッセイ誤差源を検出又は補正する方法であって、
（ａ）分析物を含む試料を、

（ｉ）前記分析物に結合可能である第１の試薬を含む第１のアッセイドメインと、
（ｉｉ）前記第１の試薬を含む第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールに導入するステップであって、
前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインが異なる諸特性を有し、前記異なる諸特性が表面積、試薬濃度、熱安定性、ｐＨ安定性、疎水性又は親水性、共反応物、エピトープ特異性、結合動力学、非特異的結合特性、結合定数及び／又は熱力学からなる群から選択されるステップと、
（ｂ）第１のアッセイドメインと第２のアッセイドメインへの分析物の結合性を比較してアッセイ誤差源を検出又は補正するステップとを含む方法。
【請求項４９】
生物学的材料を同定するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）第１の生物学的材料の成分及び第２の生物学的材料の成分に結合可能である試薬を含む第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記第１の生物学的材料の前記成分及び前記第２の生物学的材料の前記成分に結合可能である第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを含み、
前記第２のアッセイドメインに対する前記第１のアッセイドメインへの結合比によって前記生物学的材料のアイデンティティが示されるアッセイモジュール。
【請求項５０】
生物学的材料を同定する方法であって、
（ａ）前記生物学的材料の試料を、
（ｉ）第１の生物学的材料の第１の成分及び第２の生物学的材料の第１の成分に結合可能である試薬を含む第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記第１の生物学的材料の第２の成分及び前記第２の生物学的材料の第２の成分に結合可能である第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールに導入するステップであって、
前記第２のアッセイドメインに対する前記第１のアッセイドメインへの結合比によって前記生物学的材料のアイデンティティが示されるステップと、
（ｂ）前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインへの前記生物学的材料の結合比を測定して前記生物学的材料のアイデンティティを決定するステップとを含む方法。
【請求項５１】
類似した諸特性を有する２つ以上の病原体のアッセイを実施するための方法であって、
（ａ）前記第１の病原体及び前記第２の病原体に結合可能である試薬を含む第１のアッセイドメインと前記第１の病原体及び前記第２の病原体に結合可能である第２の試薬を含む第２のアッセイドメインとを有するアッセイモジュールに試料を導入するステップであって、前記第１の病原体が存在することによって前記第１のアッセイドメインが前記第２のアッセイドメインよりも大きなシグナルを放出するステップと、
（ｂ）前記第１のアッセイドメインから放出された第１のシグナル及び前記第２のアッセイドメインから放出された第２のシグナルを検出するステップとを含む方法。
【請求項５２】
前記第１のシグナル及び前記第２のシグナルから前記第１の病原体及び前記第２の病原体の量を解析するステップをさらに含む、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
（ａ）分析物に結合可能である試薬を含む第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記分析物に結合可能である前記試薬を含む第２のアッセイドメインとを含み、
前記第１のアッセイドメインと前記第２のアッセイドメインが実質的に同じ濃度の前記試薬を含み、かつそれぞれ独立に指定可能であるアッセイモジュール。
【請求項５４】
反応速度を決定する方法であって、
（ａ）複数のアッセイドメインを有するアッセイモジュールと試料を接触させるステッ

プであって、前記アッセイドメインの各々が、分析物に結合可能なある濃度の試薬を含み、かつそれぞれ独立に指定可能であるステップと、
（ｂ）前記アッセイドメインからのシグナルを順次指定し検出するステップとを含む方法。
【請求項５５】
前記反応が酵素反応である、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記ドメインが酵素反応産物に対する結合試薬を含む、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記反応が２つの結合相手の結合反応であり、前記ドメインが前記結合相手の１つを含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５８】
１つ又は複数の分析物を検出するのに使用するアッセイモジュールの作製を最適化する方法であって、
（ａ）複数のアッセイドメインを有するプロトタイプのアッセイモジュールを形成するステップであって、前記複数のアッセイドメインが前記１つ又は複数の分析物と結合可能であり、異なるパラメータを有することが可能であり、前記異なるパラメータが（ｉ）結合試薬、（ｉｉ）共反応物、（ｉｉｉ）ｐＨ、（ｉｖ）ウェル内の位置、（ｖ）試薬濃度、（ｖｉ）ドメイン位置、（ｖｉｉ）アッセイ試薬親和性、（ｖｉｉｉ）アッセイ試薬特異性、（ｉｘ）干渉物質に対する感度、及び（ｘ）光学的ひずみに対する感度からなる群から選択されるステップと、
（ｂ）前記１つ又は複数の分析物を含有する試験試料を用いて前記プロトタイプアッセイモジュールによって試験アッセイを実施するステップと、
（ｃ）最高性能が得られるアッセイドメインを決定するステップとを含む方法。
【請求項５９】
第１の分析物及び／又は第２の分析物を検出するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）前記第１の分析物及び前記第２の分析物に結合するが、前記第２の分析物よりも前記第１の分析物により良好に結合する第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記第１の分析物及び前記第２の分析物に結合するが、前記第１の分析物よりも前記第２の分析物により良好に結合する第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項６０】
試料中の少なくとも第１の分析物及び第２の分析物を検出する方法であって、前記第１の分析物及び前記第２の分析物が類似の結合特性を有し、前記方法が、
（ａ）第１のアッセイドメイン及び第２のアッセイドメインと前記試料を接触させるステップであって、前記第１のアッセイドメインは前記第１の分析物及び前記第２の分析物に結合するが、前記第２の分析物よりも前記第１の分析物により良好に結合し、前記第２のアッセイドメインは前記第１の分析物及び前記第２の分析物に結合するが、前記第１の分析物よりも前記第２の分析物により良好に結合するステップと、
（ｂ）前記第１のアッセイドメインを誘発してシグナルを放出させるステップと、
（ｃ）前記第１のアッセイドメインからの前記シグナルを測定するステップと、
（ｄ）前記第１の分析物及び／又は前記第２の分析物の量を解析するステップとを含む方法。
【請求項６１】
前記第２のアッセイドメインが前記第２の分析物を隔離する、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記第２のアッセイドメインからのシグナルを測定するステップをさらに含む、請求項６０又は６１に記載の方法。
【請求項６３】

分析物と少なくとも１つの干渉物質を含む試料のアッセイを実施するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）前記分析物に結合可能であるアッセイドメインと、
（ｂ）前記干渉物質に結合可能である隔離ドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項６４】
前記モジュールが、前記隔離ドメインに結合する前記干渉物質を測定するようになされた、請求項６３に記載のアッセイモジュール。
【請求項６５】
干渉物質の存在下で分析物を測定する方法であって、
（ａ）試料を、
（ｉ）前記分析物に結合可能であるアッセイドメインと、
（ｉｉ）前記干渉物質に結合可能である隔離ドメインとを含むアッセイモジュールに導入するステップと、
（ｂ）前記アッセイドメインへの前記分析物の結合を検出するステップとを含む方法。
【請求項６６】
酵素反応を測定するアッセイモジュールであって、
（ａ）前記酵素の基質に結合可能である第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記基質に対する前記酵素の作用によって形成される産物に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項６７】
酵素反応を測定する方法であって、
（ａ）前記酵素の試料を基質と共にインキュベートして反応溶液を形成するステップと、
（ｂ）前記反応溶液をアッセイモジュール内の複数のアッセイドメインと接触させるステップであって、前記アッセイドメインが、
（ｉ）前記基質に結合可能である第１のアッセイドメインと
（ｉｉ）前記基質に対する前記酵素の作用によって形成される産物に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むステップと、
（ｃ）前記第１のアッセイドメイン及び前記第２のアッセイドメインへの前記基質及び産物の結合を検出して前記酵素反応を測定するステップとを含む方法。
【請求項６８】
酵素反応を測定するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）前記酵素の基質又は産物に結合可能である第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記酵素に結合可能である第２のアッセイドメインとを含む、アッセイモジュール。
【請求項６９】
酵素反応を測定する方法であって、
（ａ）酵素を、
（ｉ）前記酵素の基質又は産物の１つに結合可能である第１のアッセイドメインと、
（ｉｉ）前記酵素に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールに導入するステップと、
（ｂ）前記第２のアッセイドメインに前記酵素を結合させるステップと、
（ｃ）前記アッセイモジュールを洗浄して前記酵素を精製するステップと、
（ｄ）前記酵素を前記基質と接触させて前記産物を形成するステップと、
（ｅ）前記基質又は産物の前記１つと前記第１のアッセイドメインとの前記結合を測定して前記酵素反応を測定するステップとを含む方法。
【請求項７０】
酵素を測定する方法であって、
（ａ）酵素を、
（ｉ）前記酵素の基質又は産物の１つに結合可能である第１のアッセイドメインと、

（ｉｉ）前記酵素に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールに導入するステップと、
（ｂ）前記第２のアッセイドメインに前記酵素を結合させるステップと、
（ｃ）前記酵素を前記基質と接触させて前記産物を形成するステップと、
（ｄ）前記基質又は産物の前記１つと前記第１のアッセイドメインとの前記結合を測定して前記酵素の活性を測定するステップと、
（ｅ）前記第２のアッセイドメインへの前記酵素の結合を測定して酵素量を測定するステップとを含む方法。
【請求項７１】
酵素反応を測定する方法であって、
（ａ）酵素を、
（ｉ）前記酵素の基質又は産物の１つに結合可能である第１のアッセイドメインと、
（ｉｉ）前記酵素に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールに導入するステップと、
（ｂ）前記第２のアッセイドメインに前記酵素を結合させて固定酵素を形成するステップと、
（ｃ）前記酵素を前記基質と接触させて前記産物を形成するステップと、
（ｄ）前記基質又は産物の前記１つと前記第１のアッセイドメインとの前記結合を測定して前記酵素反応を測定するステップと、
（ｅ）前記固定酵素の改変を分析するステップとを含む方法。
【請求項７２】
前記酵素を前記改変に特異的な結合試薬と接触させるステップをさらに含む、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記酵素を改変活性と接触させるステップをさらに含み、改変の前記分析ステップで前記改変活性を測定する、請求項７１に記載の方法。
【請求項７４】
酵素による基質から産物への酵素反応を測定するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）（ｉ）酵素、（ｉｉ）基質、（ｉｉｉ）産物、（ｉｖ）反応中間体、（ｖ）反応副産物及び／又は（ｖｉ）反応干渉物質からなる群から選択される第１の反応物に結合可能である第１のアッセイドメインと、
（ｂ）（ｉ）酵素、（ｉｉ）基質、（ｉｉｉ）産物、（ｉｖ）反応中間体、（ｖ）反応副産物及び／又は（ｖｉ）反応干渉物質からなる群から選択される第２の反応物に結合可能である第２のアッセイドメインとを含み、
前記第１の反応物と前記第２の反応物とが異なり、それによって前記酵素反応の少なくとも２つの反応物が測定されるアッセイモジュール。
【請求項７５】
切断反応を測定するためのアッセイモジュールであって、
（ａ）切断反応用基質を含む第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記切断反応の産物に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項７６】
アッセイモジュールにおいて切断反応を測定する方法であって、前記アッセイモジュールが、
（ａ）前記切断反応用基質を含む第１のアッセイドメインと、
（ｂ）前記切断反応の産物に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項７７】
複数の酵素に対する阻害剤の効果を決定する方法であって、前記酵素に対する基質をその上に固定した複数のアッセイドメインと前記阻害剤及び前記複数の酵素を含有する試料

を接触させるステップと、前記複数の酵素に対する前記阻害剤の前記効果を検出するステップとを含む方法。
【請求項７８】
前記複数の酵素が複数のキナーゼを含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項７９】
複数のアッセイドメインを有するアッセイモジュールであって、前記アッセイドメインが前記アッセイドメイン上に固定された酵素を有するアッセイモジュール。
【請求項８０】
前記アッセイドメインが、第１の酵素を第１のアッセイドメイン上に固定した第１のアッセイドメインと第２の酵素を第２のアッセイドメイン上に固定した第２のアッセイドメインとを含む、請求項７９に記載のアッセイモジュール。
【請求項８１】
前記酵素の産物に結合可能である結合試薬をさらに含み、前記結合試薬が、前記アッセイドメインに隣接する結合ドメインに固定されている、請求項７９又は８０に記載のアッセイモジュール。
【請求項８２】
前記酵素の産物に結合可能である結合試薬をさらに含み、前記結合試薬が前記アッセイドメイン上に前記酵素と共に固定されている、請求項７９又は８０に記載のアッセイモジュール。
【請求項８３】
前記アッセイドメインが、前記アッセイドメイン上に固定された前記酵素によって産生される産物の拡散が減少するように構成された封じ込め領域内に含まれている、請求項７９、８０、８１又は８２に記載のアッセイモジュール。
【請求項８４】
前記アッセイドメインが誘電体層内の底部にあって、前記アッセイドメイン上に固定された前記酵素によって産生される産物の拡散が減少する、請求項７９、８０、８１又は８２に記載のアッセイモジュール。
【請求項８５】
複数の酵素の活性を測定する方法であって、
（ａ）前記酵素の基質を含む溶液を、
（ｉ）前記酵素をアッセイドメイン上に固定した複数のアッセイドメインと、
（ｉｉ）前記基質に対する前記酵素の作用によって得られた産物に結合可能である結合試薬とを含むアッセイモジュールに導入するステップであって、
前記酵素が前記基質に作用して前記産物を形成し、前記結合試薬が前記酵素と前記アッセイドメイン中に共に固定されており、又は前記結合試薬が、前記アッセイドメインに隣接する結合ドメインに固定されているステップと、
（ｂ）前記結合試薬への前記産物の結合を測定して、前記複数の酵素の活性を測定するステップであって、特定の結合ドメイン内に位置する又はそれに隣接する結合試薬への結合の程度によって前記結合ドメイン内の酵素活性が示されるステップとを含む方法。
【請求項８６】
複数の酵素を含有する試料を、その上に固定された前記酵素に対応する基質を含む複数のアッセイドメインを有するアッセイモジュールと接触させるステップと、前記アッセイドメインにおいて前記基質の酵素反応を検出するステップとを含むアッセイを実施する方法。
【請求項８７】
その上に固定された酵素と前記酵素によって開始される酵素反応の産物に結合可能である試薬とを有するアッセイドメイン。
【請求項８８】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記複数のアッセイドメインが、

（ａ）分析物Ａ、分析物Ｅ及び分析物Ｃに結合可能である第１のアッセイドメインと、
（ｂ）分析物Ｂ、分析物Ｃ及び分析物Ｆに結合可能である第２のアッセイドメインと、
（ｃ）分析物Ｂ、分析物Ｄ及び分析物Ｅに結合可能である第３のアッセイドメインと、
（ｄ）分析物Ａ、分析物Ｄ及び分析物Ｆに結合可能である第４のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。

【請求項８９】
前記第１のアッセイドメイン、前記第２のアッセイドメイン及び前記第３のアッセイドメインが分析物Ｇに結合可能であり、前記第２のアッセイドメイン、前記第３のアッセイドメイン及び前記第４のアッセイドメインが分析物Ｈに結合可能であり、前記第１のアッセイドメイン、第３のアッセイドメイン及び前記第４のアッセイドメインが分析物Ｉに結合可能である、請求項８８に記載のアッセイモジュール。

【請求項９０】
前記第１のアッセイドメインが分析物Ｗに結合可能であり、前記第２のアッセイドメインが分析物Ｘに結合可能であり、前記第３のアッセイドメインが分析物Ｙに結合可能であり、前記第４のアッセイドメインが分析物Ｚに結合可能である、請求項８８に記載のアッセイモジュール。

【請求項９１】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記複数のアッセイドメインが、
（ａ）分析物Ａ、分析物Ｅ、分析物Ｆ及び分析物Ｈに結合可能である第１のアッセイドメインと、
（ｂ）分析物Ａ、分析物Ｂ、分析物Ｇ及び分析物Ｉに結合可能である第２のアッセイドメインと、
（ｃ）分析物Ｂ、分析物Ｃ、分析物Ｈ及び分析物Ｊに結合可能である第３のアッセイドメインと、
（ｄ）分析物Ｃ、分析物Ｄ、分析物Ｆ及び分析物Ｉに結合可能である第４のアッセイドメインと、
（ｅ）分析物Ｄ、分析物Ｅ、分析物Ｇ及び分析物Ｊに結合可能である第５のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。

【請求項９２】
（ａ）前記第１のアッセイドメインが分析物Ｋに結合可能であり、
（ｂ）前記第２のアッセイドメインが分析物Ｌに結合可能であり、
（ｃ）前記第３のアッセイドメインが分析物Ｍに結合可能であり、
（ｄ）前記第４のアッセイドメインが分析物Ｎに結合可能であり、
（ｅ）前記第５のアッセイドメインが分析物Ｏに結合可能である、請求項９１に記載のアッセイモジュール。

【請求項９３】
Ｍ個のアッセイドメインとＺ個の異なるアッセイ試薬とを含むアッセイモジュールであって、
（ｉ）Ｍが３よりも大きな整数であり、ＺがＭよりも大きく（Ｍ！）／［２！（Ｍ－２）！］以下の整数であり、
（ｉｉ）１～Ｍ－１個のアッセイ試薬が各ドメインに固定され、少なくとも１つのアッセイ試薬が一意的な１対のドメインに固定されるように、前記アッセイ試薬が前記アッセイドメイン間に分布しているアッセイモジュール。

【請求項９４】
アッセイ試薬と相互作用する物質をスクリーニングする方法であって、
（ａ）前記物質を、Ｍ個のアッセイドメインとＺ個の異なるアッセイ試薬とを含むアッセイモジュールに導入するステップであって、
（ｉ）Ｍが３よりも大きな整数であり、ＺがＭよりも大きく（Ｍ！）／［２！（Ｍ－２）！］以下の整数であり、

（ｉｉ）１～Ｍ－１個のアッセイ試薬が各ドメインに固定され、少なくとも１つのアッセイ試薬が一意的な１対のドメインに固定されるように、前記アッセイ試薬が前記アッセイドメイン間に分布しているステップと、
（ｂ）前記物質と相互作用するアッセイ試薬を決定するステップとを含む方法。
【請求項９５】
Ｍ個のアッセイドメインとＺ個の異なるアッセイ試薬とを含むアッセイモジュールであって、
（ｉ）Ｍが３よりも大きな整数であり、ＺがＭよりも大きく（Ｍ！）／［Ｚ！（Ｍ－Ｚ）！］以下の整数であり、
（ｉｉ）１つを超えるアッセイ試薬が各ドメインに固定され、各アッセイ試薬が一意的な１組の１～Ｚ個のドメインに固定されるように、前記アッセイ試薬が前記アッセイドメイン間に分布しているアッセイモジュール。
【請求項９６】
アッセイ試薬と相互作用する物質をスクリーニングする方法であって、
（ａ）前記物質を、Ｍ個のアッセイドメインとＺ個の異なるアッセイ試薬とを含むアッセイモジュールに導入するステップであって、
（ｉ）Ｍが３よりも大きな整数であり、ＺがＭよりも大きく（Ｍ！）／［Ｚ！（Ｍ－Ｚ）！］以下の整数であり、
（ｉｉ）少なくとも１つのアッセイ試薬が各ドメインに固定され、各アッセイ試薬が一意的な１組の１～Ｚ個のドメインに固定されるように、前記アッセイ試薬が前記アッセイドメイン間に分布しているステップと、
（ｂ）前記物質と相互作用するアッセイ試薬を決定するステップとを含む方法。
【請求項９７】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記複数のアッセイドメインが、１つ又は複数の結合試薬を含む１つ又は複数のアッセイドメインを含み、予め結合された標識を含む第１の対照ドメインと、規定の反応をもたらす第２の対照ドメインと、本質的に遮断薬からなる第３の対照ドメインとをさらに含むアッセイモジュール。
【請求項９８】
前記第１の対照ドメインが、（ｉ）ＥＣＬ発生に対する化学的干渉、（ｉｉ）光透過に対する光学的干渉、及び／又は（ｉｉｉ）モジュール変化の１つ又は複数を制御する、請求項９７に記載のアッセイモジュール。
【請求項９９】
前記第２の対照ドメインが、（ｉ）非特異的結合又は生化学活性、（ｉｉ）ＥＣＬ発生に対する化学的干渉、（ｉｉｉ）光透過に対する光学的干渉、（ｉｖ）ピペット操作誤差、（ｖ）タイミング誤差、（ｖｉ）混合の変動、（ｖｉｉ）温度変動、及び（ｖｉｉｉ）アッセイモジュールの変動の１つ又は複数を制御する、請求項９７又は９８に記載のアッセイモジュール。
【請求項１００】
前記第３の対照ドメインが非特異的結合を制御する、請求項９７、９８又は９９に記載のアッセイモジュール。
【請求項１０１】
第１のアッセイドメインと第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールであって、前記第１のアッセイドメインが分析物に結合可能である結合試薬を含み、前記第２のアッセイドメインが前記分析物又は前記分析物のアナログを含むアッセイモジュール。
【請求項１０２】
第１のアッセイドメインと第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールであって、前記第１のアッセイドメインが分析物に結合し、前記第２のアッセイドメインが前記分析物と競合するアッセイモジュール。
【請求項１０３】
目的分析物を分析する方法であって、

（ａ）前記分析物を含む試料を、前記分析物に結合する第１のドメインと前記分析物と競合する第２のドメインとの２つのアッセイドメインを含むアッセイモジュールに導入するステップと、
（ｂ）前記アッセイモジュールにおいて前記分析物のサンドイッチアッセイ及び競合アッセイを実施するステップとを含む方法。
【請求項１０４】
第１のアッセイドメインと第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールであって、前記第１のアッセイドメインが、分析物とのサンドイッチ複合体を形成可能である結合試薬を含み、前記第２のアッセイドメインが、前記分析物と競合する結合試薬を含むアッセイモジュール。
【請求項１０５】
分析物に対する結合親和性を有する第１のアッセイドメインと第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールであって、前記第１のアッセイドメインが分析物に対して前記第２のアッセイドメインの結合親和性の少なくとも１０倍の結合親和性を有するアッセイモジュール。
【請求項１０６】
目的分析物を分析する方法であって、
（ａ）前記分析物を含む試料を、前記分析物に対する結合親和性を有する第１のアッセイドメインと第２のアッセイドメインとの２つのアッセイドメインを含むアッセイモジュールに導入するステップであって、前記第１のアッセイドメインが前記分析物に対して前記第２のアッセイドメインの結合親和性の少なくとも１０倍の結合親和性を有するステップと、
（ｂ）前記第１のドメイン及び前記第２のドメインにおいて前記分析物のサンドイッチアッセイを実施するステップとを含む方法。
【請求項１０７】
第１のアッセイドメインと第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュールであって、前記第１のアッセイドメインが酵素に対する第１の基質を含み、前記第２のアッセイドメインが前記酵素に対する第２の基質を含み、前記第１の基質が前記第２の基質よりも遅いターンオーバー速度及び／又は高いＶｍａｘを有するアッセイモジュール。
【請求項１０８】
酵素反応産物に結合可能であるアッセイ試薬を含む１つ又は複数のアッセイドメインと、前記酵素反応の１つ又は複数の酵素を捕捉可能である封鎖剤（ｓｅｑｕｅｓｔｒａｎｔ）を含む１つ又は複数の隔離ドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項１０９】
１つ又は複数の酵素を含む試料をアッセイモジュール内の複数のアッセイドメインと接触させるステップを含むアッセイを実施する方法であって、前記複数のアッセイドメインが、１つ又は複数の酵素反応産物に結合可能であるアッセイドメインと前記酵素反応の１つ又は複数の酵素を捕捉する１つ又は複数の酵素捕捉ドメインとを含む方法。
【請求項１１０】
前記試料の未結合成分を前記モジュールから洗浄するステップをさらに含む、請求項１０９に記載の方法。
【請求項１１１】
前記酵素反応の１つ又は複数の基質を含む第２の試料を添加するステップをさらに含む、請求項１０９又は１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールを用いてアッセイを実施する方法であって、前記アッセイドメインが、
（ｉ）第１の酵素に結合可能である第１の酵素ドメインと、
第２の酵素に結合可能である第２の酵素ドメインと、
第３の酵素に結合可能である第３の酵素ドメインとを含めた酵素に結合可能である１列

の酵素ドメインと、
（ｉｉ）前記第１の酵素に対応する第１の産物に結合可能である第１の産物ドメインと、
前記第２の酵素に対応する第２の産物に結合可能である第２の産物ドメインと、
前記第３の酵素に対応する第３の産物に結合可能である第３の産物ドメインとを含む前記酵素の産物に結合可能である１列の産物ドメインとを含み、
前記方法が、
（ａ）１つ又は複数の酵素と前記１つ又は複数の酵素に対応する１つ又は複数の基質とを含めて複数の成分を含有する試料を、前記１列の酵素ドメイン及び前記１列の産物ドメインと接触させるステップと、
（ｂ）前記第１の産物ドメインにおける前記第１の産物、前記第２の産物ドメインにおける前記第２の産物、及び前記第３の産物ドメインにおける前記第３の産物を検出するステップとを含む方法。
【請求項１１３】
前記酵素ドメインが前記対応する産物ドメインに隣接している、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
前記酵素ドメインが前記対応する産物ドメインに重なっている、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１５】
前記第１の酵素ドメインにおける前記第１の酵素、前記第２の酵素ドメインにおける前記第２の酵素、及び前記第３の酵素ドメインにおける前記第３の酵素を検出するステップをさらに含む、請求項１１２、１１３又は１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
前記酵素がキナーゼであり、前記産物が前記酵素のリン酸化産物に対応している、請求項１１２、１１３、１１４又は１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
２つ以上のアッセイドメインを含むアッセイモジュールを用いて１つ又は複数の酵素の複数の酵素活性を決定する方法であって、１つ又は複数の酵素を含む試料を、第１の酵素反応の第１の産物に結合可能である第１のドメイン及び第２の酵素反応の第２の産物に結合可能である第２のドメインと接触させるステップと、前記第１のドメイン及び前記第２のドメインにおいて前記第１の産物及び前記第２の産物を検出するステップとを含む方法。
【請求項１１８】
前記モジュールが、さらに、前記１つ又は複数の酵素に結合可能である１つ又は複数の酵素アッセイドメインを含む、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１１９】
前記１つ又は複数の酵素アッセイドメインにおいて前記１つ又は複数の酵素を検出するステップをさらに含む、請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２０】
前記モジュールが、さらに、前記１つ又は複数の酵素に対応する１つ又は複数の基質に結合可能である１つ又は複数の基質アッセイドメインを含む、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１２１】
前記１つ又は複数の基質アッセイドメインにおいて前記１つ又は複数の基質を検出するステップをさらに含む、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記複数のアッセイドメインが、タンパク質切断を含めた活性を測定可能である第１のアッセイドメインと、前記活性の切断産物を測定可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。

【請求項１２３】
前記第１のアッセイドメインがその上に固定された標識タンパク質を含み、前記第２のアッセイドメインがその上に固定された前記標識タンパク質の切断誘導体に結合可能である結合試薬を含む、請求項１２２に記載のアッセイモジュール。
【請求項１２４】
アッセイ試薬を含む１つ又は複数のアッセイドメインと、干渉種を隔離する隔離剤（ｓｅｑｕｅｓｔｒａｔｉｏｎ　ａｇｅｎｔ）を含む１つ又は複数の隔離ドメインとを含む、アッセイモジュール。
【請求項１２５】
前記１つ又は複数の隔離ドメインが、ビオチン、抗ストレプトアビジン、ヘモグロビン、ビリルビン、脂質、高及び低アルブミン、ＨＡＭＡ、抗ルテニウム、高リウマチ因子、ジゴキシンのＤＬＩＦ又はジギトキシンタイプの分子、薬物／コメッズ（ｃｏ　ｍｅｄｓ）、交差反応性分析物、及びそれらの組合せの１つ又は複数の干渉種を隔離する、請求項１２４に記載のアッセイモジュール。
【請求項１２６】
アッセイ試薬を含む１つ又は複数のアッセイドメインと、標識試薬を隔離可能である隔離剤を含む１つ又は複数の隔離ドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項１２７】
試料と１つ又は複数の試薬とを含有する組成物を前記複数のアッセイドメインと接触させるステップを含む、複数のアッセイドメインを有するアッセイモジュールを用いてアッセイを実施する方法であって、前記１つ又は複数の試薬が、分析物に結合可能である標識試薬、分析物のアナログ又は前記分析物の結合相手を含み、前記複数のアッセイドメインが、前記分析物に結合可能である第１のアッセイドメインと前記標識試薬に結合可能である第２のアッセイドメインとを含む方法。
【請求項１２８】
前記第１のアッセイドメイン上の前記分析物を検出するステップをさらに含む、請求項１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記アッセイドメインが、分析物に結合可能である第１のアッセイドメインと、１つ又は複数の凍結乾燥試薬に結合可能である第２のアッセイドメインとを含むアッセイモジュール。
【請求項１３０】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールを用いてアッセイを実施する方法であって、前記アッセイドメインが、１つ又は複数の酵素に結合可能である第１のアッセイドメインと、前記１つ又は複数の酵素の１つ又は複数の酵素産物に結合可能である第２のアッセイドメインとを含み、前記方法が、
（ａ）１つ又は複数の酵素を含めた複数の成分を含有する第１の試料を前記モジュール内の前記第１のアッセイドメインと接触させ、それによって前記１つ又は複数の酵素を固定するステップと、
（ｂ）前記第１の試料の未結合成分を前記モジュールから分離させるステップと、
（ｃ）前記１つ又は複数の酵素の１つ又は複数の基質を含有する第２の試料を前記第２のアッセイドメインと接触させるステップと、
（ｄ）前記第２のアッセイドメインに結合した前記酵素産物を検出するステップとを含む方法。
【請求項１３１】
前記第１のアッセイドメイン上の前記１つ又は複数の酵素を検出するステップをさらに含む、請求項１３０に記載の方法。
【請求項１３２】
前記アッセイモジュールがマルチウェルプレートであり、前記アッセイモジュール内の前記アッセイドメインが前記プレートのウェル内に位置する、請求項１、３、５、６、７

、８、９、１０、１１、１９、２０、２５、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、４０、４１、４６、４７、４９、５３、５９、６３、６４、６６、６８、７４、７５、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９５、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０４、１０５、１０７、１０８、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６又は１２９に記載のアッセイモジュール。

【請求項１３３】

前記ウェルが１つ又は複数の作用電極表面を備え、前記アッセイドメインが前記１つ又は複数の作用電極表面上に位置する、請求項１３２のマルチウェルプレート。

【請求項１３４】

前記アッセイモジュールが、さらに、１つ又は複数の作用電極表面を備え、前記アッセイドメインが前記１つ又は複数の作用電極表面上に位置する、請求項１、３、５、６、７、８、９、１０、１１、１９、２０、２５、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、４０、４１、４６、４７、４９、５３、５９、６３、６４、６６、６８、７４、７５、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９５、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０４、１０５、１０７、１０８、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６又は１２９に記載のアッセイモジュール。

【請求項１３５】

前記アッセイモジュールがマルチウェルプレートであり、前記アッセイモジュール内の前記アッセイドメインが前記プレートのウェル内に位置する、請求項２、４、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、２１、２２、２３、２４、２６、３８、３９、４２、４３、４４、４５、４８、５０、５１、５２、５４、５５、５６、５７、５８、６０、６１、６２、６５、６７、６９、７０、７１、７２、７３、７６、８５、８６、９４、９６、１０３、１０６、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２７、１２８、１３０又は１３１に記載の方法。

【請求項１３６】

前記ウェルが１つ又は複数の作用電極表面を備え、前記アッセイドメインが前記１つ又は複数の作用電極表面上に位置する、請求項１３５に記載の方法。

【請求項１３７】

前記アッセイモジュールが、さらに、１つ又は複数の作用電極表面を備え、前記アッセイドメインが前記１つ又は複数の作用電極表面上に位置する、請求項２、４、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、２１、２２、２３、２４、２６、３８、３９、４２、４３、４４、４５、４８、５０、５１、５２、５４、５５、５６、５７、５８、６０、６１、６２、６５、６７、６９、７０、７１、７２、７３、７６、８５、８６、９４、９６、１０３、１０６、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２７、１２８、１３０又は１３１に記載の方法。

【請求項１３８】

前記複数のアッセイドメインが１つ又は複数の作用電極上に位置する、請求項７７又は７８に記載の方法。

【請求項１３９】

前記アッセイドメインが作用電極上に位置する、請求項８７に記載のアッセイドメイン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本願は、２００１年９月１０日に出願された米国仮出願第６０／３１８，２９３号、２００１年９月１０日に出願された米国仮出願第６０／３１８，２８４号、２００１年９月

１０日に出願された米国仮出願第６０／３１８，２８９号、及び２００２年3月１１日に出願された米国仮出願第６０／３６３，４９８号の優先権を主張するものである。これら各々の特許出願を参照により本明細書に援用する。

【０００２】

本願は、１つの試料について複数の化学、生化学及び／又は生物学アッセイを実施するための試薬、装置、システム、キット及び方法に関する。

【背景技術】

【０００３】

現在、薬物スクリーニングを含めた分析測定に電気化学発光（ＥＣＬ）を利用するいくつかの市販機器がある。誘導されてＥＣＬを放出することができる種（ＥＣＬ活性種）が、ＥＣＬ標識として使用されてきた。ＥＣＬ標識の例には、ｉ）トリス－ビピリジル－ルテニウム（ＲｕＢｐｙ）成分などのＲｕ含有及びＯｓ含有有機金属化合物を含めて、金属が例えばＶＩＩＩ族の貴金属である有機金属化合物、並びにｉｉ）ルミノール及びその関係化合物がある。ＥＣＬプロセスにＥＣＬ標識と共に関与する種を、本明細書ではＥＣＬ共反応物（ｃｏｒｅａｃｔａｎｔ）と呼ぶ。一般に使用される共反応物としては、ＲｕＢｐｙ由来のＥＣＬに対する第三級アミン（例えば、米国特許第５，８４６，４８５号を参照されたい）、オキザレート及びパーサルフェート、並びにルミノール由来のＥＣＬに対する過酸化水素（例えば、米国特許第５，２４０，８６３号を参照されたい）などがある。ＥＣＬ標識が発生する光を、レポーターシグナルとして診断操作に使用することができる（参照により本明細書に援用するＢａｒｄ他、米国特許第５，２３８，８０８号）。例えば、ＥＣＬ標識は、抗体、核酸プローブ、受容体又はリガンドなどの結合剤に共有結合することができる。ＥＣＬ標識から発せられるＥＣＬを測定することによって、結合相互作用への結合試薬の関与をモニターすることができる。あるいは、ＥＣＬ活性化合物からのＥＣＬシグナルによって、化学的環境を示すことができる（例えば、ＥＣＬ共反応物の形成又は破壊をモニターするＥＣＬアッセイについて記載した米国特許第５，６４１，６２３号を参照されたい）。ＥＣＬアッセイを実施するためのＥＣＬ、ＥＣＬ標識、ＥＣＬアッセイ及び計装についてのさらに詳細な背景については、米国特許第５，０９３，２６８号、同第５，１４７，８０６号、同第５，３２４，４５７号、同第５，５９１，５８１号、同第５，５９７，９１０号、同第５，６４１，６２３号、同第５，６４３，７１３号、同第５，６７９，５１９号、同第５，７０５，４０２号、同第５，８４６，４８５号、同第５，８６６，４３４号、同第５，７８６，１４１号、同第５，７３１，１４７号、同第６，０６６，４４８号、同第６，１３６，２６８号、同第５，７７６，６７２号、同第５，３０８，７５４号、同第５，２４０，８６３号、同第６，２０７，３６９号、同第６，２１４，５５２号及び同第５，５８９，１３６号、並びに国際公開第９９／６３３４７号、同第００／０３２３３号、同第９９／５８９６２号、同第９９／３２６６２号、同第９９／１４５９９号、同第９８／１２５３９号、同第９７／３６９３１号及び同第９８／５７１５４号を参照されたい。

【０００４】

市販のＥＣＬ機器は、並外れた性能を示す。これらの機器は、優れた感度、ダイナミックレンジ、精度、及び複雑な試料マトリックスの許容度を含めた理由のために広範に使用されるようになった。市販の計測手段は、恒久的に再使用可能なフローセルを含むフローセルベースの設計を用いている。最近、電極上に固定された、ＥＣＬの誘導に使用される試薬を用いるＥＣＬ計測手段が開示された（例えば、米国特許第６，１４０，０４５号、同第６，０６６，４４８号、同第６，０９０，５４５号、同第６，２０７，３６９号及び国際公開第９８／１２５３９号を参照されたい）。このようなＥＣＬ測定に適した一体型電極を有するマルチウェルプレートも最近開示された（例えば、それぞれ２００２年６月２８日に出願され、参照により本明細書に援用する「発光試験測定用アッセイプレート、リーダーシステム及び方法（Ａｓｓａｙ　Ｐｌａｔｅｓ、Ｒｅａｄｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ａｎｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　Ｔｅｓｔ　Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔｓ）」と題する同時係属出願の米国特許出願第１０／１８５，２７４号及び

同第１０／１８５，３６３号を参照されたい）。一体型電極を有するこれらのマルチウェルプレートには、１つのウェル中に複数のアッセイドメインを有するプレートが具備されている。

【０００５】

マルチウェルアッセイプレートを使用することによって、プレートの複数のウェルに分散された複数の試料を並行して処理し分析することが可能になる。一般に、試料及び試薬は、（マイクロプレート又はマイクロタイタープレートとしても知られる）マルチウェルアッセイプレート中で保存され、処理され、かつ／又は分析される。マルチウェルアッセイプレートは、様々な形式、サイズ及び形状を取ることができる。便宜上、ハイスループットアッセイ用に試料を処理するために使用されるいくつかの計測手段に対する標準がいくつかある。標準プレート形式において実施されるアッセイでは、これらのプレートを保存し移動するための容易に利用可能な装置、並びにプレート中にかつプレートから液体を迅速に分注するための容易に利用可能な装置を利用することができる。いくつかの十分に確立されたマルチウェルプレート形式としては、９６ウェルプレート（１２×８列のウェル）、３８４ウェルプレート（２４×１６列のウェル）及び１５３６ウェルプレート（４８×３２列のウェル）で見られるものなどがある。生体分子スクリーニング学会（Ｔｈｅ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ）は、様々なプレート形式のためのマイクロプレート推奨仕様を公表している（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｂｓｏｎｌｉｎｅ．ｏｒｇ参照）。この推奨仕様を、参照により本明細書に援用する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】米国特許第５，８４６，４８５号
【特許文献２】米国特許第５，２４０，８６３号
【特許文献３】米国特許第５，２３８，８０８号
【特許文献４】米国特許第５，６４１，６２３号
【特許文献５】米国特許第５，０９３，２６８号
【特許文献６】米国特許第５，１４７，８０６号
【特許文献７】米国特許第５，３２４，４５７号
【特許文献８】米国特許第５，５９１，５８１号
【特許文献９】米国特許第５，５９７，９１０号
【特許文献１０】米国特許第５，６４１，６２３号
【特許文献１１】米国特許第５，６４３，７１３号
【特許文献１２】米国特許第５，６７９，５１９号
【特許文献１３】米国特許第５，７０５，４０２号
【特許文献１４】米国特許第５，８４６，４８５号
【特許文献１５】米国特許第５，８６６，４３４号
【特許文献１６】米国特許第５，７８６，１４１号
【特許文献１７】米国特許第５，７３１，１４７号
【特許文献１８】米国特許第６，０６６，４４８号
【特許文献１９】米国特許第６，１３６，２６８号
【特許文献２０】米国特許第５，７７６，６７２号
【特許文献２１】米国特許第５，３０８，７５４号
【特許文献２２】米国特許第５，２４０，８６３号
【特許文献２３】米国特許第６，２０７，３６９号
【特許文献２４】米国特許第６，２１４，５５２号
【特許文献２５】米国特許第５，５８９，１３６号
【特許文献２６】国際公開第９９／６３３４７号
【特許文献２７】国際公開第００／０３２３３号

【特許文献２８】国際公開第９９／５８９６２号
【特許文献２９】国際公開第９９／３２６６２号
【特許文献３０】国際公開第９９／１４５９９号
【特許文献３１】国際公開第９８／１２５３９号
【特許文献３２】国際公開第９７／３６９３１号
【特許文献３３】国際公開第９８／５７１５４号
【特許文献３４】米国特許第６，１４０，０４５号
【特許文献３５】米国特許第６，０６６，４４８号
【特許文献３６】米国特許第６，０９０，５４５号
【特許文献３７】米国特許第６，２０７，３６９号
【特許文献３８】国際公開第９８／１２５３９号
【特許文献３９】米国特許出願第１０／１８５，２７４号
【特許文献４０】米国特許出願第１０／１８５，３６３号
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明は、１つの試料について複数のアッセイを実施するための装置、システム、システムコンポーネント、試薬、キット及び方法を含む。本発明は、複数のアッセイドメイン（例えば、アッセイ反応が起こるモジュール表面、及び／又は複数のアッセイ測定を実施するためにアッセイシグナルが放出されるモジュール表面上の別々の場所を含む１つ又は複数のアッセイセル（例えば、ウェル、コンパートメント、チャンバ、チャネル、フローセルなど）を有するアッセイモジュールを含む。アッセイセルは、そのアッセイセル中のアッセイドメインに接触している体積の流体を、アッセイモジュールの他のアッセイセル中のアッセイドメインに接触することなく保持するように構成されていることが好ましい。好ましい実施形態においては、アッセイモジュールは、マルチウェルプレートである。マルチウェルプレートには、複数のウェルが含まれ、１つ又は複数のウェルには複数のアッセイドメインが含まれている（本明細書ではマルチドメインマルチウェルプレート又はＭＤＭＷプレートと呼ぶ）。プレートは、標準形式のマルチウェルプレートと共に使用されるように設計されたプレートハンドリング装置（例えば、流体ディスペンサ、プレート洗浄装置、プレートスタッカ、プレート移動装置及び／又はプレートリーダー）に適合するように設計されていることが好ましい。
【０００８】
本発明のアッセイは、電極の使用、光の発生、及び発生した光の測定を含む検出ステップと組み合わせることが好ましい。このような検出ステップに使用することができるプロセスの例としては、（電気生成（ｅｌｅｃｔｒｏｇｅｎｅｒａｔｅｄ）化学発光とも呼ばれる）電気化学発光、電界発光、電気化学的に生成される種によって誘発される化学発光などがある。使用上かつ便宜上、これらの３つのプロセスを「電極誘導発光（ｅｌｅｃｔｒｏｄｅ　ｉｎｄｕｃｅｄ　ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ）」と呼ぶ。電気化学発光としては、電気によって生成される種、光の放出などがある。例えば、電気化学発光には、１つ又は複数の反応物が電気化学的に生成され、それらが１つ又は複数の化学反応を起こして光を、好ましくは繰り返し放出する種を生成するプロセスによって生成される発光が含まれる。本発明は、電極を使用する必要がないアッセイ及び測定にも関係し、例えば、本発明のアッセイは、化学発光、蛍光、生物発光、リン光、光学濃度、及びシンチラント（ｓｃｉｎｔｉｌｌａｎｔ）からの光の放出が関与するプロセスの測定に基づくことができる。本発明は、発光を含まないアッセイ及び測定にも関係し、例えば、本発明のアッセイは、電気化学プロセス（例えば、電流又は電圧の測定又は発生を含めたプロセス）、電気的プロセス（例えば、抵抗又はインピーダンスの測定を含めたプロセス）、表面プラズモン共鳴又は光学的干渉効果の測定に基づくことができる。
【０００９】
したがって、本発明の特定の好ましい実施形態において、アッセイモジュール及び／又

はＭＤＭＷプレートは、例えば、それぞれ２００２年６月２８日に出願され、参照により本明細書に援用する（「発光試験測定用アッセイプレート、リーダーシステム及び方法（Ａｓｓａｙ Ｐｌａｔｅｓ、Ｒｅａｄｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ Ｔｅｓｔ Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔｓ）」と題する）同時係属の米国特許出願第１０／１８５，２７４号及び同第１０／１８５，３６３号に記載されるように、電極誘導発光測定（最も好ましくは、電気化学発光測定）を用いてアッセイ測定が実施可能なように構成されている。ウェル表面（例えば、電極によって誘導される発光測定を実施するように構成されたウェル中の電極上）にパターン形成されたアッセイドメインは、表面の突起又はくぼみ、表面に付着又は印刷されたパターン形成材料、及び又は物理的性質（例えば、ぬれ性）が異なる表面領域間の界面を含めた物理的境界によって画成されていることが有利である。このような物理的境界により、アッセイドメインに塗布された数滴の試薬が拡散するのを制限し防止することによって、ウェル表面上での試薬のパターン形成が簡単になる。

【００１０】

２つのレベルの多重化（プレート１枚当たり複数のウェル及びウェル１つ当たり複数のドメイン）を可能にすることによって、ＭＤＭＷプレートでは、ウェル１つ当たり１つのアッセイドメインしかない従来のマルチウェルプレートを上回る様々な利点がもたらされる。例えば、ウェル１つ当たりＮ個のウェルとＭ個のアッセイドメインとを有するＭＤＭＷプレートによって、１枚のパネルでＮ個の複数試料についてＭ種類のアッセイを実施することが可能になる。従来のＮウェルプレートで同じ一連のアッセイを実施して同じ性能を得るためには、Ｍ枚のプレート、Ｍ倍の試料及び試薬、及び極めてより多くのピペット操作及びプレートハンドリングステップが必要になる。従来のアレイ「チップ」で同じ一連のアッセイを実施することは、Ｎ個のチップのハンドリング及び移動が必要であり、マルチウェルプレートと共に使用するように設計された標準プレートハンドリング装置に適合しそうにない。Ｍ×Ｎウェルを含む単一の超高密度マルチウェルプレートで同じ一連のアッセイを実施すると、一般に、アッセイ感度の低下（試料体積は、したがって分析物分子数は、プレート上のウェル密度に逆比例する傾向にある）、及び超高密度プレート形式に付随する他の諸問題（例えば、高価で複雑な流体分注装置、混合不足、蒸発損失、気泡混入、洗浄ステップ実施不能など）が発生する。

【００１１】

本発明には、複数のアッセイドメインを含むアッセイセルを使用することによって、特に、ＭＤＭＷプレートを使用することによって可能になる多重化を利用するアッセイ形式が含まれる。好ましいアッセイ形式を以下に記述する。その形式のいくつかは、ＭＤＭＷプレートとして記述されるものの、複数のドメインを有するアッセイセルを含む他のアッセイモジュールにも適用することができることを理解されたい。アッセイセルにおいて利用可能であるアッセイドメインの多重度によって、下記形式の多くを１つのセルに集約することが可能になることも理解されたい。

【００１２】

好ましい一アッセイ形式においては、複数の分析物又は活性が、ＭＤＭＷプレートの１つのウェル中で測定される。例えば、特定の生体系（例えば、サイトカインｍＲＮＡ又はタンパク質レベルをモニターするためのイムノアッセイ又はハイブリダイゼーションアッセイのパネル）、病態（例えば、心臓マーカー用、アレルギー反応の原因であるアレルゲンの同定用、感染性生物の同定用などのアッセイパネル）、組織タイプ、生物、タンパク質のクラス、酵素又は生物学的分子などに関連する複数の分析物又は活性を測定するためにアッセイパネルを開発することができる。一実施形態においては、１パネルのアッセイによって、生体系を同定するためのフィンガープリント（例えば、特定の細胞タイプ、細胞小器官タイプ、生物タイプ、組織タイプ、細菌又はウイルスに関連する分析物レベルのパターン）が提供される。例えば、生体系のある属内に見出される異なる成分に対する複数のアッセイを使用してその属内の種又は亜種を同定することができる。別の実施形態においては、生体系内の異なる成分に対する複数のアッセイを含む示差的な測定を用いて、

生体系の状態（例えば、疾患状態と正常状態、活性化状態と正常状態など）が同定され、又は外的条件又は刺激（例えば、病態の進行、刺激性種の添加、潜在的薬物候補の添加、ｐＨ、温度などの環境条件の変化などに関連する成分の分布の変化）による影響を受ける生体系内の成分が同定される。アッセイパネルを用いて１つ又は複数のタンパク質の機能を決定することもできる。例えば、酵素基質及び／又は潜在的結合相手のパターン化されたライブラリに対してタンパク質をスクリーニングして、酵素活性又は結合活性を確認することができる。逆に、パターン化されたタンパク質ライブラリを既知の生物学的材料に曝して、タンパク質が生物学的材料に結合し、それと反応し、又は形質転換されるかどうかを決定することができる。

【００１３】

別の好ましいアッセイ形式においては、ウェル中に存在するアッセイドメインのいくつかの画分が、内部標準、対照又は標準物質に充てられる。例えば、１つ又は複数のアッセイドメインは、被覆なしのままでも、試料との反応に関与しないと考えられる遮断薬又は生体材料で被覆することもでき、このようなアッセイドメインを用いて、ウェル表面への標識の非特異的結合を測定及び／又は補正することができる。別の例では、１つ又は複数のアッセイドメインを標識試薬（例えば、ＥＣＬ標識で標識された試薬）で被覆し、このようなアッセイドメインを用いて、標識（例えば、ｐＨ、温度、干渉化学物質（ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｔ）、着色種など）からのシグナル（例えば、ＥＣＬ）の発生及び測定に影響を及ぼし得る諸条件を測定及び／又は補正することができる。別の例では、１つ又は複数のアッセイドメインを用いて、アッセイ混合物中に加えられた対照分析物に対する対照アッセイが実施される。対照アッセイは、他のアッセイドメインで実施されるアッセイに形式が類似していることが好ましい。対照アッセイを用いて、非特異的結合、標識からのシグナルの発生に影響を及ぼす諸条件、及びアッセイ反応に影響を及ぼす諸条件（インキュベーション時間、温度、混合などの変化）を測定及び／又は補正することができる。

【００１４】

別の好ましいアッセイ形式においては、同じ分析物又は活性が、ウェル内の複数のドメインにおいて測定され、このような重複性によって、アッセイ結果における統計的信頼性を高くすることができる。同じ分析物のこのような複数の測定では、複数のほぼ同一のアッセイドメインを使用して、あるいは、ある特性（例えば、ドメインサイズ、ドメイン位置、アッセイ試薬の表面密度、遮断薬、アッセイ試薬の親和性、アッセイ試薬の特異性、アッセイ形式、干渉物質に対する感度、温度に対する感度、アッセイ動力学、光学的ひずみに対する感度など）が異なるアッセイドメインを使用して、アッセイ誤差源（例えば、一貫性のない混合又は不均一な混合、アッセイドメインにおけるアッセイ試薬の立体的な密集、非特異的結合、マトリックス効果、干渉種、不正確な温度制御、アッセイステップの不正確なタイミング、アッセイダイナミックレンジの超過、流体体積又はメニスカス形状の変化など）を明らかにし、検出し、かつ／又は補償することができる。

【００１５】

別の好ましいアッセイ形式においては、同じ分析物又は活性が、ウェル内の、個々に指定可能である電極上に含まれる複数のドメインにおいて測定される。このようなシステムでは、電気的エネルギーを個々のアッセイドメインに選択した回数だけ連続してかけて、電流、電位又は、好ましくは、電極によって誘導される発光（最も好ましくは、ＥＣＬ）の経時変化を測定することによって、アッセイ反応の動力学を測定することができる。異なるアッセイドメインにおいて異なる時点で測定することによって、ダメージを与える恐れがある電気的エネルギーを同じアッセイドメインに繰り返しかける必要がなくなる。

【００１６】

別の好ましいアッセイ形式においては、同じ分析物を、分析物の異なる特性又は活性を測定するように設計されたウェル内の異なるアッセイドメインにおいて測定する。一実施形態においては、各酵素の酵素活性に対する選択性が異なる様々なアッセイドメイン（例えば、選択した酵素活性に対する基質を含むアッセイドメイン、及び／又は選択した酵素

活性の基質若しくは産物を捕捉し測定することが可能であるアッセイドメイン）、酵素の結合活性を測定できるように設計された様々なアッセイドメイン（例えば、酵素の潜在的結合相手を含むアッセイドメイン、又は酵素を捕捉して、溶液中の潜在的結合相手との相互作用の測定を可能にするように設計されたアッセイドメイン）、及び／又は酵素が第２の酵素に対する基質として作用する能力を測定できるように設計されたアッセイドメイン（例えば、第１の酵素に対する第２の酵素の作用による産物の特異的結合アッセイを可能にするように設計された結合ドメイン）を含むウェルにおいて複数の異なる活性を有する酵素が測定される。別の実施形態においては、ウェルには、（例えば、イムノアッセイなどの結合アッセイによって）酵素量を測定するためのドメインと、酵素に関連する１つ又は複数の活性を測定するための１つ又は複数の他のドメインとが含まれる。この実施形態によって、測定される活性を酵素量に関係付けることが可能になる。目的とする酵素を捕捉可能であるアッセイドメインを導入することによって、さらに、アッセイウェル中の粗製試料から酵素を精製することが可能になる利点がある。本発明のさらに別の実施形態においては、ウェルには、目的酵素を捕捉可能であるアッセイドメインと、目的酵素の活性を測定するための１つ又は複数の追加のアッセイドメインとが含まれる。このようなウェルを用いる方法には、粗製酵素試料中の不純物から酵素を精製するための洗浄ステップを含めることができる。

【００１７】

別の好ましいアッセイ形式においては、１つのウェルにおいて実施可能である測定数が、ウェル内の各ドメイン中に複数のアッセイ試薬を同時に固定すること（ｃｏ－ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｉｎｇ）によって増加する。例えば、Ｍ個の潜在的結合相手のライブラリパターンをウェル中のＭ個のアッセイドメイン上に形成し、標識生体材料を含む試料にウェルを曝し、結合現象を示すシグナルを生じるアッセイドメインを求めることによって、目的とする生体材料の結合相手をスクリーニングすることができる。あるいは、Ｉ個の潜在的結合相手を各アッセイドメインに同時に固定することによって、Ｍ×Ｉ個の潜在的結合相手のライブラリパターンを形成することができる。特異的アッセイドメインにおけるシグナルによって、Ｉ個の潜在的結合相手のうちの１つが結合活性を有することが示され、次いで、アッセイドメインの各成分を個別に試験することによって、結合相手を特定することができる。アッセイキットは、ウェルのアッセイドメイン内のアッセイ試薬を多重化する第１のＭＤＭＷプレートと、第１のプレート中のアッセイドメインの個々の成分の試験を可能にするようにパターン化された１セットの追加のＭＤＭＷプレート（例えば、各々が第１のプレート上のアッセイドメインの一成分を含む複数のアッセイドメインを有するウェルを含む第２のＭＤＭＷプレート）とを含むことが有利である。

【００１８】

別の好ましい実施形態においては、パターン形成され、１列のＭ個（ここで、Ｍは３よりも大きな整数である）のドメイン上で一義的に同定されるアッセイ成分数は、一義的なアッセイドメイングループ中に各試薬をパターン形成することによって増加する。例えば、最大Ｚ＝（Ｍ！）／［２！（Ｍ－２）！］個の潜在的結合相手（好ましくは、＞Ｍ個の結合相手）のライブラリパターンを形成することができ、最大（Ｍ－１）個の結合相手が各ドメインに固定されるが、１つ又は複数の（好ましくは、すべての）結合相手は一義的な１対のドメインに固定される（他の結合相手は、１つのドメインの一義的なセット中に固定されることが好ましい。この場合、これら１つ又は複数の結合相手を、結合現象を示すシグナルを生じるアッセイドメイン対を求めることによって同定することができる。例として示すと、４、７、１０及び２５個のアッセイドメインを含むウェルは、ウェル１個当たりそれぞれ６、２１、４５及び３００個の一義的なドメイン対を有する。同様に、最大（Ｍ！）／［Ｚ！（Ｍ－Ｚ）！］個の潜在的結合相手（好ましくは、＞Ｍ個の結合相手）のライブラリパターンを形成することができ、１つ又は複数の（好ましくは、すべての）結合相手がＺ個の一義的なドメイングループに固定される。所与のウェルにおいてスクリーニングできる成分数は、Z_1個のドメイングループ中にいくつかの成分をパターン形成させ、Z_2個のドメイングループ中に他の成分をパターン形成させ、以下同様にしてさ

らに増加させることができる。ここで、Z_1、Z_2、．．．は１以上Ｍ以下の整数である。

【００１９】

別の好ましいアッセイ形式においては、潜在的交差反応性分析物が同じウェル中の異なるドメインにおいて測定される。例えば、２つの類似した分析物（第１の分析物及び第２の分析物）を、たとえ結合試薬が各分析物に対して部分的にしか選択的でないとしても、結合試薬を含む２つのアッセイドメイン（第１の分析物に選択的な第１のドメイン及び第２の分析物に選択的な第２のドメイン）を用いて測定することができる。同じウェルにおいてアッセイを実施することによって、第２のドメインに第２の分析物が結合して、溶液中のその有効濃度が低下し、第１のドメインにおける第１の分析物の測定に干渉し難くなる。両方の交差反応種を測定できることによって、このような効果が交差反応を完全には排除しない程度にシグナルを数学的にデコンボリューションすることが可能になり、アッセイ結果に対する交差反応の効果がさらに低下する。このようなデコンボリューションは、例えば、経験的な較正に基づくことができ（例えば、両方の分析物の濃度が異なる標準物質の２次元マトリックスを用いて、好ましくは実験計画法を用いて標準物質が選択され、結果がモデル化される）、又は理論モデル（例えば、各々可能な結合相互作用と関連する熱力学的パラメータ及び／又は動力学的パラメータを用いて誘導されるモデル）に基づくことができる。場合によっては、第１の分析物のみが測定され、第２のドメインは第２の分析物を隔離し、第１の分析物の測定に干渉するのを防止するためにのみ働く。交差反応及び干渉を減少させるための上述の方法を用いて、ｉ）ビリルビン、脂質、ヘマグロビン（ｈｅｍａｇｌｏｂｉｎ）などの粗製生物学的試料（例えば、血液、プラズマ、血清、組織抽出物、細胞抽出物）中の干渉物質を削減しかつ／又は明らかにし、かつ／又はｉｉ）密接に関係する種からのアッセイ干渉及び交差反応を予防するのを助けかつ／又は予防し、例えば、密接に関係する薬物と関係する代謝産物、ステロイドホルモンと関係する代謝産物、ビタミンと関係する代謝産物、タンパク質の変形態、核酸と糖類（例えば、分析物の様々なリン酸化状態、分析物の様々な分解状態間、分析物の様々な結合状態など）などを測定する手助けをし、また識別することができる。

【００２０】

別の好ましいアッセイ形式においては、ウェル中の複数の異なるアッセイドメインは、様々な形態の目的分析物を測定するようになされている。例として示すと、遊離及び結合した形態の目的分析物（例えば、遊離ＰＳＡと結合ＰＳＡ）を測定し、未改変及び／又は改変形態の目的分析物を測定し（測定可能な改変例としては、リン酸化、ユビキチン結合、プレニル化、ミリストイル化、グリコシド化などがあるが、これらだけに限定されない）、かつ／又は分析物の切断又は分解産物（例えば、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ又はグリコシダーゼ産物）を測定するようにドメインを構成することができる。あるいは、（例えば、遊離ＰＳＡと全ＰＳＡを測定する場合）１つのアッセイドメインでは複数の形態の分析物の総量が包括的に測定され、別のアッセイドメインはその分析物の１形態に特異的である。

【００２１】

別の好ましいアッセイ形式においては、目的反応の出発材料／基質及び産物（及び、場合によっては、中間体及び／又は副産物）が、ＭＤＭＷプレートのウェルの異なるアッセイドメインにおいて測定される。一実施形態においては、様々なウェルの測定が異なる反応時間で実施され、反応の完全な動力学的特性の解明が可能になる。第２の実施形態において、出発材料及び産物（又は、反応で生成及び／又は消費される任意の２つの種）のアッセイによって、あるレベルの交差反応性が示される。上述したように、両方の種を測定して、交差反応性の効果を軽減させることができる。第３の実施形態において、出発材料と産物の両方を測定することによって、出発材料の本来の量の変化を補正することが可能になる。このような補正は、組織などの複雑な生体系における細胞中の反応又は活性を追跡するときに特に重要である。例えば、細胞の活性化に応じた細胞受容体のリン酸化を追跡する際には、細胞系における受容体タンパク質の発現レベルの変化を反映するようにリ

ン酸化受容体の測定量を補正することが望ましい。受容体のリン酸化体及び非リン酸化体を測定することによって、リン酸化の程度を百分率で表すことが可能になる。あるいは、全受容体及びリン酸化受容体を測定することによって、同じ情報を得ることができる。

【００２２】

別の好ましいアッセイ形式において、ウェルには、切断反応に対する標識基質を含有する第１のアッセイドメインと、切断反応産物を捕捉可能である結合試薬を含有する第２のアッセイドメインとが含まれている。基質は標識（好ましくはＥＣＬ標識）に連結され、切断反応の結果、標識に連結した切断産物が第１のアッセイドメインから遊離することが好ましい。切断反応の程度を、第１のアッセイドメインからのシグナルの低下、及び第２のアッセイドメインからのシグナルの増加を測定することによって追跡することができる。例として示すと、結合試薬を、切断産物に対して誘導される抗体（例えば、タンパク質分解作用によって放出されるペプチドに特異的な抗体）又は核酸プローブ（例えば、ヌクレアーゼの作用によって放出されるオリゴヌクレオチドに特異的なプローブ）とすることができる。あるいは、基質をさらに捕捉成分（例えば、ハプテン又はビオチン）に連結し、遊離した切断産物が標識と捕捉成分の両方を含むようにすることができる。この別の実施形態においては、結合試薬を、捕捉成分に対して誘導される結合試薬（例えば、ハプテン、アビジン又はストレプトアビジンに対する抗体）とすることができる

【００２３】

別の好ましいアッセイ形式においては、酵素産物を捕捉可能である結合試薬に酵素ライブラリを同時に固定して、酵素と酵素産物を捕捉可能である結合試薬との両方を含有するアッセイドメインを有する１列のアッセイドメインを形成させる。このようなアレイによって、酵素反応に由来するシグナルが、酵素配列に応じたパターンで生じることが可能になる。一実施形態において、酵素を、その酵素の産物に優先的に特異的である結合試薬と組み合わせる。別の実施形態においては、結合試薬は、ウェル中の複数の酵素の産物と結合可能である。このような場合、アッセイドメインは、適切な間隔をおいて配置され、１つのドメイン中で産生された産物が、異なるドメインに拡散する機会を有する前に同じドメイン中の結合試薬に結合する確率を増加させるのに適切な諸条件下（例えば、混合のない状態）で実施される。例えば、チロシンキナーゼのライブラリを、１列のアッセイドメインにパターン化し、各ドメインに抗ホスホチロシン抗体を含ませることもできる。（好ましくは標識に連結された、最も好ましくはＥＣＬ標識に連結された）１つ又は複数のチロシンキナーゼ基質を導入することによって、基質がリン酸化され、抗ホスホチロシン抗体によって標識産物が捕捉される。ドメイン中で産生された標識産物は、同じドメイン中の抗体によって優先的に捕捉され、あるドメインにおいて発生したシグナルが、そのドメインにおける酵素活性を確実に表すようになる。

【００２４】

別の好ましいアッセイ形式においては、結合種に対して所望の特異性を有する結合試薬に対する抗体（又は他の結合試薬）のスクリーニングを助けるために、複数のアッセイドメインが使用される。試料（例えば、ハイブリドーマ培養物の上清）を複数のアッセイドメインと接触させる。１つのアッセイドメインには結合種が含まれる。それ以外のアッセイドメインには、特異性及び交差反応性に対する対照（例えば、密接に関係する物質、潜在的アッセイ干渉物質、結合試薬を生成させるために用いられる免疫化手順において使用される担体タンパク質、担体タンパク質－ハプテン複合体を産生させるために用いられるリンカーなど）が含まれる。一実施形態においては、１クラスの結合試薬（例えば、抗種抗体（ａｎｔｉ－ｓｐｅｃｉｅｓ　ａｎｔｉｂｏｄｙ））に広範に結合する標識された第２の結合試薬を用いて、結合試薬の結合を検出することができる。別の実施形態においては、複数の結合ドメインが、様々な抗体クラスに対する１パネルの抗種抗体を含み（あるいは、任意の抗体クラスに特異的な結合試薬を用いることができる）、上清中の抗体のクラスを決定するために、結合ドメインをハイブリドーマ上清（又は抗体を含有する他の試料）と接触させる。好ましい一実施形態において、特定のドメインへの結合試薬の結合は、試料中のすべての抗体量が測定されるように、１クラスの結合試薬（例えば、抗種抗体

）に広範に結合する標識された第２の結合試薬を用いて検出される。あるいは、標識ハプテンを検出試薬として用いて所望の特異性を有するクラスの抗体のみを測定することができる。

【００２５】

別の好ましいアッセイ形式においては、複数のアッセイドメインを用いて、アッセイのダイナミックレンジが、単一のアッセイドメインを用いて得られるダイナミックレンジよりも拡大される。例えば、目的分析物に対する親和性が異なる結合試薬を含む複数の結合ドメインを結合アッセイに使用することができる。親和性の最も高い結合試薬を含むドメインが、濃度の低い分析物を測定するために使用される。親和性が中程度又は低い結合試薬を含むドメインが、濃度が中程度又は高い分析物を含む試料に対して使用される。親和性が中程度又は低い結合試薬を含むアッセイドメインの場合、結合試薬は、アッセイドメインによって測定される分析物濃度範囲のほぼ中央にある解離定数を有するように選択することが好ましい。

【００２６】

高濃度でフック効果（ｈｏｏｋ　ｅｆｆｅｃｔ）があるサンドイッチ結合アッセイの特異的なケースでは、（第１のアッセイドメインにおいて実施される）サンドイッチイムノアッセイを（第２のアッセイドメインにおいて実施される）同じ分析物に対する競合アッセイと組み合わせることによって、アッセイのダイナミックレンジを拡大することができる。競合アッセイでは、試料中の分析物と固定分析物アナログが、標識抗分析物抗体への結合に対して競合することが好ましい。分析物アナログは、サンドイッチアッセイにおける捕捉抗体によって認識されるエピトープを含まないことがより好ましい（例えば、分析物アナログを、捕捉抗体によって認識されるエピトープを含まないタンパク質分析物から誘導されるペプチド断片とすることができる）。サンドイッチ及び競合アッセイでは、同じ標識検出抗体を使用することができる。検出抗体量は、分析物アナログと捕捉抗体の合計量にほぼ等しいことが有利である。分析物量が捕捉抗体量よりも少ない場合、サンドイッチアッセイによって、分析物濃度にほぼ直線的に依存するシグナルが得られ、競合アッセイは分析物濃度にほぼ無関係になる。分析物量が捕捉抗体量よりも多い場合、サンドイッチアッセイ（フック効果、すなわち、分析物が検出又は捕捉抗体の一方のみに結合し、同時に両方には結合しない確率が高くなるので）と競合アッセイ（競合のために）の両方からのシグナルが減少することになる。この領域においては、競合アッセイを用いて分析物を定量することができ、又は競合アッセイを用いてサンドイッチアッセイのダイナミックレンジを超えたことを単に警告することができる。別の実施形態においては、結合動力学が異なる捕捉試薬が選択される。結合時間及び動力学的定数は、ｉ）低濃度の分析物が、速やかに結合するアッセイドメインにおいて測定され、ｉｉ）（アッセイドメインの結合容量を超える）高濃度の分析物が、結合するのが遅いドメインでの動力学的に制御された結合反応において測定されるように選択される。

【００２７】

別の好ましいアッセイ形式においては、ウェル中の１つ又は複数のアッセイドメインを、固相アッセイ用固相以外の目的で使用する。例として示すと、ｉ）アッセイドメインは、アッセイ干渉物質を隔離する結合試薬を含むことができ、ｉｉ）アッセイドメインは、血液、血清、細胞溶解物、組織試料などの粗製試料から、生物学的材料（例えば、機能が未知なタンパク質、酵素、酵素基質、結合反応における結合相手など）を捕捉及び精製するための結合試薬を含むことができ、かつ／又はｉｉｉ）アッセイドメインを、アッセイの途中で再水和し溶解させる乾燥試薬（例えば、結合試薬、酵素、酵素基質、対照、標準物質、緩衝液、遮断薬、洗浄剤、標識試薬、ＥＣＬ共反応物、阻害剤、薬物候補など）を保存する場所として使用することができる。１つのアッセイドメイン中の乾燥試薬は、アッセイウェルの調製及び保存中に、試薬間の不要な相互作用を防止するために、ウェル中の他のアッセイドメインと接触させないことが好ましい。このような場合、ドメイン全体に試料が広がるのに十分な体積の試料がウェルに添加されるまで、乾燥試薬を他のアッセイドメインと接触させない。乾燥試薬をアッセイドメインに保存するとき、アッセイドメ

インには数滴の流体しか閉じ込められないが、複数のドメインにはより多量の流体が拡散できる物理的境界（例えば、ウェル表面の突起又はくぼみ、表面に付着又は印刷されたパターン形成材料、及び又はぬれ性などの物理的性質が異なる表面領域間の界面）によって、アッセイドメインが包囲されていることが有利である。競合結合アッセイの一実施形態においては、ウェルの１つのアッセイドメインには固定結合試薬が含まれ、別のアッセイドメインには乾燥標識競合物が含まれる。この配置によって、試料添加前に、競合物が結合試薬に結合するのが防止される。サンドイッチ結合アッセイの一実施形態においては、ウェルの第１のアッセイドメインには固定捕捉結合試薬が含まれ、第２のアッセイドメインには乾燥標識結合試薬が含まれる。この配置によって、例えば試薬の乾燥又は保存中に、標識結合試薬が第１のアッセイドメインに非特異的に結合するのが防止される。酵素阻害アッセイの一実施形態においては、ウェルの第１のアッセイドメインには、（アッセイドメイン上で乾燥され又はアッセイドメイン中に固定された）酵素基質が含まれ、第２のアッセイドメインには乾燥酵素が含まれる。この配置によって、阻害剤を含有する試料を添加する前に酵素が基質に作用することが防止される。

【００２８】

本発明は、本発明の１つ又は複数のアッセイ形式を用いてアッセイが実施されるようになされたアッセイモジュール及びＭＤＭＷプレート、モジュール又はプレートを使用する方法、モジュール又はプレートを作製する方法、アッセイにおいて使用されるプレートと１つ又は複数の試薬とを含むキット、及びプレートとプレートを読み取る装置とを含むシステムを含む。本発明は、本発明のモジュール、プレート又は方法を用いた分析物、化学活性、生物活性又は生化学活性の測定を含む。本発明は、そのような化学活性、生物活性又は生化学活性のモジュレータ（例えば、阻害剤又はエンハンサ）の（例えば、潜在的薬物ライブラリのスクリーニングにおける）測定又は同定も含む。本発明は、タンパク質のキャラクタリゼーションに、本発明のプレート、モジュール又は方法を適用することも含む。例えば、タンパク質を生物学的材料ライブラリに対してスクリーニングして、タンパク質に結合し、タンパク質を酵素基質と認め、タンパク質の酵素活性によって改変され、又はタンパク質と相互作用する生物学的材料を同定することができる。逆に、生物学的材料をタンパク質ライブラリに対してスクリーニングして、生物学的材料に結合し、生物学的材料を酵素基質と認め、生物学的材料の活性によって改変され、又は生物学的材料と相互作用するタンパク質を同定することができる。

【図面の簡単な説明】

【００２９】

【図１Ａ】本発明の一実施形態による、結合アッセイのパネルの概略図である。

【図１Ｂ】本発明の一実施形態による、サンドイッチ結合アッセイのパネルの概略図である。

【図１Ｃ】本発明の一実施形態による、競合結合アッセイのパネルの概略図である。

【図１Ｄ】本発明の一実施形態による、酵素アッセイのパネルの概略図である。

【図２】本発明の一実施形態による、試験結合アッセイ、非特異的結合に対する対照、シグナル発生及び伝達の効率に対する対照、及び対照結合アッセイを含むアッセイパネルの概略図である。

【図３】本発明の一実施形態による、複数の活性を有する酵素のいくつかの活性に対するアッセイを含むアッセイパネルの概略図である。

【図４】本発明の一実施形態による、酵素に対する結合アッセイ及び酵素産物に対する結合アッセイを含むアッセイパネルの概略図である。

【図５】本発明の一実施形態による、酵素反応の基質及び産物に対する結合アッセイを含むアッセイパネルの概略図である。

【図６】本発明の一実施形態による、酵素に対する標識基質を含むアッセイドメインと、本発明の標識産物を捕捉可能である結合試薬を含むアッセイドメインとを含む切断酵素用のアッセイパネルの概略図である。

【図７】本発明の一実施形態による、酵素産物に結合可能である試薬を結合させるために

同時固定された様々な酵素を含む１列のアッセイドメインを含むアッセイパネルの概略図である。
【図８Ａ】本発明の好ましい実施形態による、分析物に対して親和性の異なるアッセイドメインを含む拡張ダイナミックレンジ結合アッセイの概略図である。
【図８Ｂ】本発明の好ましい実施形態による、分析物に対して親和性の異なるアッセイドメインを含む拡張ダイナミックレンジ結合アッセイの概略図である。
【図８Ｃ】本発明の好ましい実施形態による、分析物に対して親和性の異なるアッセイドメインを含む拡張ダイナミックレンジ結合アッセイの概略図である。
【図９Ａ】同じ分析物に対してサンドイッチ結合アッセイ及び競合結合アッセイを含む、本発明の好ましい実施形態による拡張ダイナミックレンジ結合アッセイの概略図である。
【図９Ｂ】同じ分析物に対してサンドイッチ結合アッセイ及び競合結合アッセイを含む、本発明の好ましい実施形態による拡張ダイナミックレンジ結合アッセイの概略図である。
【図１０Ａ】電極誘導化学発光測定用に構成されたＭＤＭＷプレート１０００の成層図（ｌａｙｅｒｅｄ　ｖｉｅｗ）である。
【図１０Ｂ】電極誘導化学発光測定用に構成されたＭＤＭＷプレート１０００の３つのウェルの定型化された断面図である。
【図１０Ｃ】図１０Ａ及び１０Ｂに示す誘電体層１０４０の変更形態である誘電体層１１４０を示す図である。
【図１０Ｄ】誘電体層１１４０を用いたプレート１０００の変更形態であるＭＤＭＷプレート１１００の３つのウェルの定型化された断面図である。
【図１１】電極誘導化学発光測定用に構成されたＭＤＭＷプレートを示す図である。
【図１２】ＨＩＶ　ＲＴ酵素の２つの活性に対するアッセイの概略図である。
【図１３Ａ】阻害剤によるＨＩＶ　ＲＴの活性の阻害を示すグラフである。
【図１３Ｂ】阻害剤によるＨＩＶ　ＲＴの活性の阻害を示すグラフである。
【図１４】４つの異なる病原体を測定するように設計されたＭＤＭＷプレートの選択性を示すグラフである。
【図１５】２つの異なるキナーゼ活性を測定するように設計されたＭＤＭＷプレートの選択性を示す表である。
【図１６】ビオチン及びＲｕ（ｂｐｙ）$_3$のスルホン化誘導体で標識されたウシＩｇＧの濃度の関数としてシグナルをプロットしたグラフである。数及びサイズが異なるアビジン被覆アッセイドメインを有するＭＤＭＷプレートに対してデータをプロットした。
【図１７Ａ】マルチウェルアッセイプレートのウェルにおける４種の分析物（ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ）のＥＣＬサンドイッチイムノアッセイによる独立した測定結果を示すグラフである。各ウェル中の作用電極は、それぞれこれらの分析物の１つに特異的な捕捉抗体を含む４つのアッセイドメインによってパターン形成されている。プロットは、各アッセイドメインから放出されるＥＣＬシグナルを分析物の濃度の関数として示したものである。
【図１７Ｂ】マルチウェルアッセイプレートのウェルにおける４種の分析物（ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ）のＥＣＬサンドイッチイムノアッセイによる独立した測定結果を示すグラフである。各ウェル中の作用電極は、それぞれこれらの分析物の１つに特異的な捕捉抗体を含む４つのアッセイドメインによってパターン形成されている。プロットは、各アッセイドメインから放出されるＥＣＬシグナルを分析物の濃度の関数として示したものである。
【図１７Ｃ】マルチウェルアッセイプレートのウェルにおける４種の分析物（ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ）のＥＣＬサンドイッチイムノアッセイによる独立した測定結果を示すグラフである。各ウェル中の作用電極は、それぞれこれらの分析物の１つに特異的な捕捉抗体を含む４つのアッセイドメインによってパターン形成されている。プロットは、各アッセイドメインから放出されるＥＣＬシグナルを分析物の濃度の関数として示したものである。
【図１７Ｄ】マルチウェルアッセイプレートのウェルにおける４種の分析物（ＩＬ－１β

、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ）のＥＣＬサンドイッチイムノアッセイによる独立した測定結果を示すグラフである。各ウェル中の作用電極は、それぞれこれらの分析物の１つに特異的な捕捉抗体を含む４つのアッセイドメインによってパターン形成されている。プロットは、各アッセイドメインから放出されるＥＣＬシグナルを分析物の濃度の関数として示したものである。

【図１８】マルチウェルアッセイプレートのウェルにおける４種の分析物（ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ）のＥＣＬサンドイッチイムノアッセイによる独立した測定結果を示すＣＣＤカメラ画像である。各ウェル中の作用電極は、それぞれこれらの分析物の１つに特異的な捕捉抗体を含む４つのアッセイドメインによってパターン形成されている。図は、４種の分析物の異なる混合物を含有する試料を分析するために使用したウェルの１セクターから放出されたＥＣＬの画像を示している。強調表示したウェルは、４つのアッセイドメインの配置を示すために注釈が付けられている。この特定のウェルを、ＩＬ－１β及びＴＮＦ－αそれぞれ２５０ｐｇ／ｍＬ並びにＩＬ－６及びＩＦＮ－γそれぞれ８ｐｇ／ｍＬを含む試料を分析するために使用した。

【図１９Ａ】本発明の一実施形態によるＭＳＤ（商標）Ｓｔａｎｄａｒｄ　４スポットＭｕｌｔｉ－Ａｒｒａｙ（商標）Ｐｌａｔｅｓを用いたＴｙｒｏｓｉｎｅ　１１７３におけるＥＧＦ誘導Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ａｕｔｏｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｔｉｏｎアッセイ用に構成された４スポットウェルの概略図である。

【図１９Ｂ】ＥＧＦ濃度の異なるプレートのウェルのＣＣＤ画像である。

【図１９Ｃ】ＥＧＦ濃度の異なるプレートのウェルのＣＣＤ画像である。

【図１９Ｄ】ＥＧＦ濃度の異なるプレートのウェルのＣＣＤ画像である。

【発明を実施するための形態】

【００３０】

本発明のアッセイドメインは、広範な形式のアッセイを実施するようになされている。アッセイ測定は、固相、好ましくは、アッセイドメイン表面からの検出可能標識（例えば、酵素、粒子、光ルミネセンス種、化学発光種、電気化学発光種、電気活性種、放射性種、磁性種など）の捕捉又は放出と組み合わせることが好ましい。標識は電極誘導発光（最も好ましくは、電気化学発光）によって検出可能であり、固相は電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）を誘導するようになされた電極であることが好ましい。同様に、本明細書に記載するアッセイの考え方は、表面プラズモン共鳴、光学的干渉技術などの標識を使用する必要がない固相アッセイ形式にも適用することができる。

【００３１】

図１Ａ～Ｄは、複数のアッセイドメインを含むアッセイセル（好ましくは、ＭＤＭＷプレートのウェル）において実施できるアッセイパネルの選択された例を示す概略図である。図１Ａに、標識分析物１１５Ａ～Ｃに対する固定結合試薬１１０Ａ～Ｃを含むアッセイドメイン１０５Ａ～Ｃを有するＭＤＭＷプレートのウェル１００において実施される結合アッセイのパネルを示す。適切な結合試薬／分析物の組合せは当技術分野で既知であり、抗体／ハプテン、抗体／抗原、受容体／リガンド、核酸配列／相補配列、レクチン／糖、核酸／核酸結合タンパク質、タンパク質／タンパク質（例えば、２量体タンパク質、凝集型結合複合体（ａｇｇｒｅｇａｔｅ　ｆｏｒｍ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃｏｍｐｌｅｘ）などがある。

【００３２】

図１Ｂに、分析物１３５Ａ～Ｃに対する固定捕捉結合試薬１３０Ａ～Ｃ及び可溶性検出結合試薬１３２Ａ～Ｃを含むアッセイドメイン１２５Ａ～Ｃを有するＭＤＭＷプレートのウェル１２０において実施されるサンドイッチ結合アッセイのパネルを示す。好ましい一実施形態においては、パネルは、サンドイッチイムノアッセイのパネルである。別の好ましい実施形態においては、パネルは、サンドイッチ核酸ハイブリダイゼーションアッセイのパネルである。

【００３３】

図１Ｃに、アッセイドメイン１４５Ａ～Ｃを含むＭＤＭＷプレートのウェル１４０にお

いて実施される競合結合アッセイのパネルを示す。分析物１５５Ａ～Ｃは、結合試薬１５０Ａ～Ｃへの結合について競合物１５２Ａ～Ｃと競合する。分析物の競合物が標識されている場合、対応する結合試薬は固定されており、その逆もまた同様である。好ましい一実施形態においては、パネルは、競合イムノアッセイのパネルである。

【００３４】

図１Ｄに、ＭＤＭＷプレートのウェル１６０において実施される酵素アッセイのパネルを示す。酵素１７０Ａによって、（アッセイドメイン１６５Ａに固定された）標識基質１７５が切断されてアッセイドメインから標識産物が放出される。酵素１７０Ｂによって、（アッセイドメイン１６５Ｂに固定された）基質１７６と標識基質１７７が結合して標識がアッセイドメインに連結される。酵素１７０Ｃによって、（アッセイドメイン１６５Ｃに固定された）基質１７８が改変されて標識結合試薬１８０によって認識される産物１７９が作製される。酵素１７０Ｄによって、標識基質１８１の標識産物１８２への転換が触媒される。次いで、標識産物１８２が（アッセイドメイン１６５Ｄに固定された）結合試薬１８３に捕捉される。別の実施形態においては、基質１８１及び産物１８２に標識が付けられず、標識検出結合試薬が添加されてサンドイッチ複合体が形成されることによって産物１８２が検出される。図１Ｄに記載した形式の１つ又はすべてによって測定することができる酵素（及び他の化学活性、生化学活性及び／又は生物活性）としては、核酸ポリメラーゼ、核酸リガーゼ、ヘリカーゼ、インテグラーゼ、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、タンパク質合成、グリコシダーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、プレニル化酵素、ミリストイル化酵素などがあるが、これらだけに限定されない。

【００３５】

有用なパネルとしては、特異的生化学システム、生化学経路、組織、生物、細胞タイプ、細胞小器官、病態、受容体クラス、酵素クラスなどに関連した分析物又は活性に対するアッセイパネルなどがある。好ましいパネルとしては、サイトカイン及び／又はそれらの受容体（例えば、ＴＮＦ－α、ＴＮＦ－β、ＩＬ１－α、ＩＬ１－β、ＩＬ２、ＩＬ４、ＩＬ６、ＩＬ１０、ＩＬ１２、ＩＦＮ－γなどの１つ又は複数）、成長因子及び／又はそれらの受容体（例えば、ＥＧＦ、ＶＧＦ、ＴＧＦ、ＶＥＧＦなどの１つ又は複数）、セカンドメッセンジャー（例えば、ｃＡＭＰ、ｃＧＭＰ、イノシトールのリン酸化体、ホスファチジルイノシトールなど）乱用薬物、治療薬物、自己抗体（例えば、Ｓｍ、ＲＮＰ、ＳＳ－Ａ、ＳＳ－Ｂ　Ｊｏ－１及びＳｃｌ－７０抗原に対する１つ又は複数の抗体）、アレルゲン特異的抗体、腫瘍マーカー、心臓マーカー（例えば、トロポニンＴ、トロポニンＩ、ミオグロビン、ＣＫＭＢなどの１つ又は複数）、止血に関連するマーカー（例えば、フィブリンモノマー、Ｄ２量体、トロンビン－アンチトロンビン複合体、プロトロンビン断片１＆２、抗第Ｘａ因子などの１つ又は複数）、急性ウイルス肝炎感染マーカー（例えば、Ａ型肝炎ウイルスに対するＩｇＭ抗体、Ｂ型肝炎コア抗原に対するＩｇＭ抗体、Ｂ型肝炎表面抗原、Ｃ型肝炎ウイルスに対する抗体などの１つ又は複数）、アルツハイマー病マーカー（β－アミロイド、タウタンパク質など）、骨粗しょう症マーカー（例えば、架橋Ｎ又はＣ－テロペプチド、総デオキシピリジノリン、遊離デオキシピリジノリン、オステオカルシン、アルカリホスファターゼ、Ｉ型コラーゲンのＣ末端プロペプチド、骨特異的アルカリホスファターゼなどの１つ又は複数）、受胎能マーカー（ｍａｒｋｅｒｓ　ｏｆ　ｆｅｒｔｉｌｉｔｙ）（例えば、エストラジオール、プロゲステロン、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、プロラクチン、β－ｈＣＧ、テストステロンなどの１つ又は複数）、うっ血性心不全マーカー（例えば、β－ナトリウム利尿タンパク質（β－ｎａｔｒｉｕｒｅｔｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＢＮＰ）、ａ－ナトリウム利尿タンパク質（ＡＮＰ）、エンドセリン、アルドステロンなどの１つ又は複数）、甲状腺障害マーカー（例えば、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、全Ｔ３、遊離Ｔ３、全Ｔ４、遊離Ｔ４及びリバースＴ３の１つ又は複数）、及び前立腺癌のマーカー（例えば、全ＰＳＡ、遊離ＰＳＡ、複合ＰＳＡ、前立腺酸性ホスファターゼ、クレアチンキナーゼなどの１つ又は複数）に対するイムノアッセイなどがある。好ましいパネルとしては、サイトカイン、成長因子、アポトーシス経路の成分、Ｐ４５０酵素の発現、腫瘍関連遺伝子の発現などをコ

ードするｍＲＮＡのｍＲＮＡレベルを測定するための核酸アレイも含まれる。好ましいパネルとしては、個体（例えば、ＳＮＰ分析）、病原体、腫瘍細胞などの遺伝形質を決定するための核酸アレイも含まれる。好ましいパネルとしては、酵素及び／又は酵素基質（例えば、ユビキチン結合、プロテアーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、核酸プロセシング活性、ＧＴＰ加水分解酵素活性、グアニンヌクレオチド交換活性、ＧＴＰ加水分解酵素活性化活性などに関連する基質及び／又は酵素）のライブラリも含まれる。好ましいパネルとしては、受容体又はリガンドのライブラリ（例えば、Ｇタンパク質共役受容体、チロシンキナーゼ受容体、核ホルモン受容体、細胞接着分子（インテグリン、ＶＣＡＭ、ＣＤ４、ＣＤ８）、主要組織適合複合体タンパク質、ニコチン受容体などのパネル）も含まれる。好ましいパネルとしては、様々な源から（例えば、様々な細胞タイプ、細胞系、組織、生物、活性化状態などから）の細胞、細胞膜、膜断片、再構成膜、細胞小器官などのライブラリも含まれる。

【００３６】

パネルを適用することには、生体系の状態を決定し、病態を検出又は同定することが含まれる。（例えば、正常若しくは罹患生体系、又は正常若しくは活性生体系などに由来する試料中の複数の分析物の示差測定による）生体系の状態に関連する分析物の測定。パネルを薬物スクリーニングに使用することもできる。パネルを使用することによって、複数の生物活性（例えば、結合相互作用又は酵素活性）に対する潜在的薬物の効果を、ＭＤＭＷプレートの１つのウェルで決定することができる。パネルを使用して、タンパク質のキャラクタリゼーションを加速することもできる。例えば、タンパク質を生物学的材料ライブラリに対してスクリーニングして、タンパク質に結合し、タンパク質を酵素基質と認め、タンパク質の酵素活性によって改変され、又はタンパク質と相互作用する生物学的材料を同定することができる。逆に、生物学的材料をタンパク質ライブラリに対してスクリーニングして、生物学的材料に結合し、生物学的材料を酵素基質と認め、生物学的材料の活性によって改変され、又は生物学的材料と相互作用するタンパク質を同定することができる。

【００３７】

アッセイセル又はウェル中のいくつかのアッセイドメインを、アッセイ対照又は標準物質用に確保することができる。図２は、本発明の一実施形態による、目的分析物に対する試験結合アッセイ、非特異的結合に対する対照、シグナル発生及び伝達の効率に対する対照、及び対照結合アッセイを含むアッセイパネルの概略図である。図２に、アッセイドメイン２１０Ａ～Ｄを含むＭＤＭＷプレートのウェル２００を示す。アッセイドメイン２１０Ａには、目的分析物２１７に特異的な捕捉結合試薬２１５（例えば、抗体又は核酸）が含まれる。アッセイドメイン２１０Ｂには、好ましくはアッセイドメイン２１０Ａ中の開口部位（ｏｐｅｎ　ｓｉｔｅ）を遮断するためにも用いられた遮断薬２２５（例えば、ＢＳＡ又はウシＩｇＧ）が含まれる。また、遮断薬２２５は、アッセイに導入される試料と相互作用しないと考えられる以外は、捕捉結合試薬２１５に類似した諸特性を有する試薬である。アッセイドメイン２１０Ｃには、標識試薬２３５が含まれる。アッセイドメイン２１０Ｄには、対照分析物２４７に特異的な捕捉結合試薬２４５が含まれる。ウェルには、分析物２１５に特異的な標識検出抗体２１９、対照分析物２４７に特異的な標識検出抗体２４９、未知量の分析物２１７、及び所定量の対照分析物２４７も含まれる。アッセイドメイン２１０Ａ中にサンドイッチ複合体が形成されることによって、分析物の測定が可能になる。アッセイドメイン２１０Ｂを使用して、標識試薬の非特異的結合を含めたバックグラウンドシグナル量が測定される。アッセイドメイン２１０Ｃを使用して、標識によるシグナル発生効率、及びシグナル検出効率に影響を及ぼす要因が制御される。アッセイドメイン２１０Ｄ中のサンドイッチ複合体の測定を利用して、結合反応効率に影響を及ぼす要因が制御される。別の実施形態においては、アッセイドメイン２１０Ａ及び／又は２１０Ｄには、他の結合アッセイ形式又は酵素活性アッセイなど他のタイプの測定を実施するための試薬が含まれる。

【００３８】

図３に、本発明の一実施形態による、複数の活性を有する酵素の活性のアッセイを示す。アッセイは、ＭＤＭＷプレートのウェル３００中で実施される。酵素３７０によって、（アッセイドメイン３６５Ａに固定された）標識基質３７５が切断されてアッセイドメインから標識産物が放出される。酵素３７０によって、さらに、（アッセイドメイン３６５Ｂに固定された）基質３７６と標識基質３７７が結合して、標識がアッセイドメインに連結される。酵素３７０によって、さらに、（アッセイドメイン３６５Ｃに固定された）基質３７８が改変されて、標識結合試薬３８０によって認識される産物３７９が作製される。酵素３７０によって、さらに、標識基質３８１から標識産物３８２への転化が触媒される。次いで、標識産物３８２が（アッセイドメイン３６５Ｄに固定された）結合試薬３８３に捕捉される。別の実施形態においては、基質３８１に標識が付けられず、標識検出結合試薬が添加されてサンドイッチ複合体が形成されることによって産物３８２が検出される。

【００３９】

図４に、本発明の一実施形態による、酵素活性のアッセイを示す。ＭＤＭＷプレートのウェル４００には、酵素４１５に結合可能である固定捕捉結合試薬４１２（例えば、抗体）を含むアッセイドメイン４１０が含まれ、アッセイドメイン４２０には、酵素４１５の産物を結合可能である固定結合試薬４２５（例えば、抗体）が含まれる。酵素を含有する試料を添加することによって、アッセイドメイン４２０中の酵素が捕捉される。場合によっては、洗浄ステップを導入して酵素試料中の干渉物質を除去することができる。標識基質を添加することによって、アッセイドメイン４２０中で捕捉され測定される標識産物が産生される。標識検出試薬４１７（例えば、抗体）を添加することによって、アッセイドメイン４１０中の酵素４１５の量をサンドイッチ結合アッセイによって測定することが可能になる。この測定によって、酵素量に関係付けられる酵素活性が測定される。あるいは、酵素４１０を標識して、標識検出試薬４１７を省略することができる。別の実施形態においては、標識検出試薬４１７が省略され、酵素４１５が捕捉され、場合によっては、精製されるが、直接には測定されない。アッセイの好ましい実施形態において、酵素４１５はホスファターゼ又はキナーゼであり、結合試薬４２５はリンペプチドの１つ又はその非リン酸化体に優先的に結合する抗体である。

【００４０】

図５に、本発明の一実施形態によるアッセイを示す。ここで、酵素活性は基質の消費及び産物の産生を測定することによって測定される。ＭＤＭＷプレート中のウェル５００には、標識酵素基質５１５に特異的である固定捕捉結合試薬５１２を含むアッセイドメイン５１０Ａ、及び標識酵素産物５２０に特異的である固定捕捉結合試薬５１７を含むアッセイドメイン５１０Ｂが含まれる。標識基質５１５と酵素基質に酵素が作用して得られた標識産物５２０との混合物を含む試料がウェル５００に導入される。基質及び産物を結合アッセイにより測定することによって、基質の初期量が不明であっても、転化の程度を計算することが可能である。あるいは、基質５１５は標識されず、基質５１５及び産物５２０はサンドイッチ結合アッセイ又は競合結合アッセイによって測定される。本発明の好ましい実施形態においては、酵素はキナーゼ又はホスファターゼであり、結合試薬はペプチド又はタンパク質のリン酸化体又は非リン酸化体に特異的な抗体である。あるいは、１つ捕捉試薬は産物又は基質のどちらかに特異的であり、他方の捕捉試薬はその両方に均等に結合する。このパネルによって、１つのドメインにおける産物又は基質、並びに他方のドメインにおける産物及び基質の合計を測定することが可能になる。

【００４１】

図６に、本発明の一実施形態による、切断活性を有する酵素のアッセイを示す。ＭＤＭＷプレートのウェル６００には、固定標識基質６１５を含むアッセイドメイン６１０、及び標識酵素産物６２５に特異的である固定結合試薬６２２を含むアッセイドメイン６２０が含まれる。酵素６３０によって、基質６１５が切断されてアッセイドメイン６２０に捕捉される産物６２５が形成される。このアッセイ形式によって、基質消費と産物産生の両方を測定することが可能になる。場合によっては、基質６１５は標識されず、産物６２５

はサンドイッチ又は競合結合アッセイによって測定される。好ましい実施形態において、酵素６３０はプロテアーゼであり、基質６１５は標識ペプチドであり、結合試薬６２２はペプチドに特異的な抗体である。あるいは、基質６１５には捕捉成分も含まれ、結合試薬６２２はその捕捉成分に特異的である。

【００４２】

図７に、本発明の一実施形態による、固定酵素列の活性を測定するアッセイ形式を示す。ＭＤＭＷプレートのウェル７００には、固定酵素７１５Ａ～Ｃ及び固定結合試薬７２０Ａ～Ｃを含むアッセイドメイン７１０Ａ～Ｃが含まれる。この結合試薬は、同じアッセイドメインに同時固定された酵素の産物に特異的である。（同じでも異なっていてもよい）標識基質７２５Ａ～Ｃを導入すると、（同じでも異なっていてもよい）標識産物７３０Ａ～Ｃが産生される。酵素が結合試薬に接近すると、産物は、（隣接ドメインにおける産物の拡散及び捕捉に対抗して）それが産生されたアッセイドメイン中で優先的に捕捉される。アッセイドメインは、ウェルの底のわずかなくぼみにあって、ドメイン表面近くの対流を防止し、ドメイン表面から離れる水平拡散を防止することが好ましい。別の実施形態においては、基質は標識されず、産物はサンドイッチ又は競合結合アッセイによって測定される。好ましい一実施形態においては、酵素はキナーゼであり、基質はキナーゼライブラリの特異的メンバーのコンセンサス配列を有し、結合試薬は同時固定される酵素の産物に特異的な抗体である。あるいは、結合試薬は、リンペプチド（例えば、抗ホスホチロシン又は抗ホスホセリン抗体）に広く特異的である。別の好ましい実施形態において、酵素はキナーゼであり、基質は同じ一般的なキナーゼ基質であり、結合試薬はリンペプチド（例えば、抗ホスホチロシン又は抗ホスホセリン抗体）に広く特異的である同じ結合試薬である。

【００４３】

図８Ａ～Ｃに、本発明の好ましい実施形態による、目的分析物に対する親和性が異なる３つのアッセイドメインを含む拡張ダイナミックレンジ結合アッセイを示す。このアッセイ形式は、ウェル中のアッセイドメインの結合容量よりも高い分析物濃度にダイナミックレンジを拡張しなければならないときに特に有利である。ＭＤＭＷプレート中のウェル８００には、分析物８２０を測定するためのアッセイドメイン８１０Ａ～Ｃが含まれる。このウェルには、ｉ）分析物の解離定数がK_d^aである固定結合試薬８１５Ａを含むアッセイドメイン８１０Ａ、ｉｉ）分析物の解離定数がK_d^bである固定結合試薬８１５Ｂを含むアッセイドメイン８１０Ｂ、及びｉｉｉ）分析物の解離定数がK_d^cである固定結合試薬８１５Ｃを含むアッセイドメイン８１０Ｃが含まれ、$K_d^a < K_d^b < K_d^c$であり、K_d^b及びK_d^cは、好ましくは、アッセイドメイン８１０Ａを飽和させるのに必要な分析物濃度よりも高い。標識分析物８２０がウェルに導入される。解離定数は１０倍以上異なり、ｉ）分析物濃度が$<< K_d^b$であるとき、アッセイドメイン８１０Ａのみがかなり占有され（図８Ａ）、ｉｉ）分析物濃度がほぼK_d^bに等しいときに、アッセイドメイン８１０Ａが飽和し、アッセイドメイン８１０Ｂの一部が占有され、アッセイドメイン８１０Ｃはごくわずかしか占有されず（図８Ｂ）、ｉｉｉ）分析物濃度がほぼK_d^cに等しいときに、アッセイドメイン８１０Ａ及び８１０Ｂが飽和になり、アッセイドメイン８１０Ｃの一部が占有される（図８Ｃ）ことが好ましい。各濃度範囲において、部分的に占有されたアッセイドメインからのシグナルを用いて分析物が定量される。場合によっては、アッセイドメイン８１０Ｃが省略され、又はアッセイドメインが追加されて、さらなる濃度範囲にダイナミックレンジが拡張される。

【００４４】

図９Ａ～Ｂに、本発明の好ましい実施形態による、同じ分析物のサンドイッチ結合アッセイ及び競合結合アッセイを含む拡張ダイナミックレンジ結合アッセイを示す。このアッセイ形式は、ウェル中のアッセイドメインの結合容量よりも高い分析物濃度にダイナミックレンジを拡張しなければならないときに特に有利である。ＭＤＭＷプレート中のウェル９００には、ｉ）分析物９１５に特異的である固定捕捉結合試薬９１２を含むアッセイドメイン９１０、及びｉｉ）標識結合試薬９１７への結合に対して分析物９１５と競合する

固定競合物９２５を含むアッセイドメイン９２０が含まれる。分析物９１５及び標識結合試薬９１７を導入すると、標識結合試薬９１７がサンドイッチ複合体によってアッセイドメイン９１０に結合し、直接結合によってアッセイドメイン９２０に結合する。捕捉結合試薬９１２の量は、競合物９２５の量とほぼ同じであり、標識結合試薬９１７の量のほぼ半分であることが好ましい。分析物量が捕捉結合試薬量（すなわち、アッセイドメイン９１０の結合容量）よりも少ない場合、アッセイドメイン９１０に結合した標識量は分析物量にほぼ比例し、アッセイドメイン９２０に結合した標識量はほぼ一定で飽和している（図９Ａ）。分析物の量が捕捉結合試薬量よりも多い場合、アッセイドメイン９１０に結合した標識量は「フック効果」のために分析物の増加につれて減少し、アッセイドメイン９２０に結合した標識量も競合結合のために減少する（図９Ｂ）。したがって、競合アッセイを用いて分析物濃度が高い分析物を定量することができ、サンドイッチアッセイがそのダイナミックレンジを超えたことを簡単に警告することができる。好ましい実施形態において、分析物９１５はタンパク質であり、結合試薬９１２及び９１７は分析物９１５上の様々なエピトープに特異的な抗体である。競合物９２５は、分析物９１５の標識されたタイプとすることができ、より好ましくは、結合試薬９１７に結合するが結合試薬９１２には結合しないペプチドとすることができる（それによって、結合試薬９１２又は競合物９２５が表面及び結合から取り除かれる可能性が低下する）。

【００４５】

本発明の好ましい実施形態によれば、本発明のアッセイドメインは、電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）アッセイ用に構成されたアッセイモジュール又はプレートに導入される。例えば、アッセイドメインは、アッセイセル（例えば、ＭＤＭＷプレートのウェル）内の１つ又は複数の一体型電極上に支持される。適切なアッセイモジュール及びウェルプレート、そのようなアッセイモジュール及びプレートを使用する方法、それを組み込んだシステムは、２００２年６月２８日に出願され、参照により本明細書に援用する「発光試験測定用アッセイプレート、リーダーシステム及び方法（Ａｓｓａｙ　Ｐｌａｔｅｓ、Ｒｅａｄｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ａｎｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　Ｔｅｓｔ　Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔｓ）」と題する米国特許出願第１０／１８５，２７４号及び同第１０／１８５，３６３号に記載されている（３、４及び５．１～５．６項参照）。本発明の好ましい一実施形態によれば、アッセイモジュール又はプレートには、１つ又は複数（好ましくは２つ以上、６つ以上、２４個以上、９６個以上、３８４個以上、１５３６個以上又は９６００個以上）のアッセイウェル、アッセイチャンバ及び／又はアッセイドメイン（例えば、アッセイ反応が起きる、かつ／又はアッセイシグナルが放出されるモジュール表面、すなわち、一般に電極表面、好ましくは作用電極表面上の別個の箇所）が含まれる。さらに好ましい実施形態によれば、アッセイモジュールは、標準ウェル構成（例えば、６ウェル、２４ウェル、９６ウェル、３８４ウェル、１５３６ウェル、６１４４ウェル又は９６００ウェル）を有するマルチウェルアッセイプレートである。このようなプレートのウェルは、複数（例えば、２つ以上、４つ以上、７つ以上、２５個以上、６４個以上、１００個以上など）の別個のアッセイドメインをさらに含むことができる。

【００４６】

本発明の一態様は、アッセイ、好ましくは発光アッセイ、より好ましくは電極誘導発光アッセイ、さらに好ましくは電気化学発光アッセイに使用されるように構成された改良アッセイモジュール（例えば、プレート）に関する。本発明のアッセイモジュールは、好ましくはＥＣＬアッセイに適しているだけでなく、蛍光アッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、リン光アッセイ、光透過率アッセイ（例えば、光学濃度又は光散乱の測定）及び（例えば、測定が電流又は電圧の測定を含む）電気化学アッセイにも適している。

【００４７】

本発明の好ましい一実施形態によれば、アッセイモジュール又はプレートには、１つ又は複数（好ましくは２つ以上、６つ以上、２４個以上、９６個以上、３８４個以上、１５３６個以上又は９６００個以上）のアッセイウェル、アッセイチャンバ及び／又はアッセ

イドメイン（例えば、アッセイ反応が起きる、かつ／又はアッセイシグナルが放出されるモジュール表面、すなわち、一般に電極表面、好ましくは作用電極表面上の別個の箇所）が含まれる。特に好ましい実施形態によれば、アッセイプレートは、標準ウェル構成（例えば、６ウェル、２４ウェル、９６ウェル、３８４ウェル、１５３６ウェル、６１４４ウェル又は９６００ウェル）を有するマルチウェルアッセイプレートである。

【００４８】

電極誘導発光ウェル（好ましくは、電気化学発光ウェル（すなわち、電気化学発光用に構成されたウェル））又は電極誘導発光ドメイン（好ましくは、電気化学発光アッセイドメイン（すなわち、電気化学発光アッセイ用に構成されたアッセイドメイン））は、（作用電極表面などの）第１の電極表面を含むことができ、好ましくは（対電極表面などの）第２の電極表面も含むことができる。

【００４９】

本発明は、１つ又は複数のアッセイを実施するための複数のウェル（及び／又はチャンバ）を含むマルチウェルモジュール、好ましくはアッセイプレートにも関する。複数のウェル（及び／又はチャンバ）のうち２つ以上には、少なくとも１つの第１の電極表面、及び好ましくは少なくとも１つの対電極表面が含まれる。好ましい実施形態によれば、複数のウェル（及び／又はチャンバ）のうち２つ以上には、ウェル中で発光を誘発させるようになされた作用電極表面、及び、好ましくは対電極表面が含まれる。本発明は、１つ又は複数のアッセイを実施するための複数のウェルを含むマルチウェルモジュール、好ましくはプレートにも関する。複数のウェルのうち１つ又は複数には、ウェル中で発光を誘発させるようになされた作用電極表面及び対電極表面が含まれる。すべて又は実質的にすべてのウェルが電極表面を含むことが好ましい。

【００５０】

別の実施形態は、電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）アッセイを実施するための、複数のウェルを含むマルチウェルアッセイモジュール、好ましくはアッセイプレートに関する。複数のウェルの各々には、少なくとも１つの第１の電極表面（例えば、作用電極）と、好ましくは、少なくとも１つの第２の電極表面（例えば、対電極）が含まれる。

【００５１】

別の実施形態は、１つ又は複数の電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）アッセイを実施するための、電極表面を含む複数のウェル又はアッセイ領域を有するアッセイプレートに関する。電極表面は、本質的に、少なくとも１つの作用電極表面と少なくとも１つの対電極表面からなる。

【００５２】

アッセイ領域又はアッセイウェルには参照電極がなく、アッセイドメイン密度がより高くなり、発光を誘発し測定するための計測手段が単純化されることが好ましい。

【００５３】

本発明の一態様は、アッセイ、好ましくは発光アッセイ、より好ましくは電極誘導発光アッセイ、さらに好ましくは電気化学発光アッセイに使用するように構成された改良アッセイモジュール（例えば、プレート）に関する。本発明のアッセイモジュールは、ＥＣＬアッセイに適しているだけでなく、蛍光アッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、リン光アッセイ、光透過率アッセイ（例えば、光学濃度又は光散乱の測定）、及び（例えば、測定が電流又は電圧の測定を含む）電気化学アッセイにも適していることが好ましい。

【００５４】

本発明の好ましい一実施形態によれば、アッセイモジュール又はプレートには、１つ又は複数（好ましくは２つ以上、６つ以上、２４個以上、９６個以上、３８４個以上、１５３６個以上又は９６００個以上）のアッセイウェル、アッセイチャンバ及び／又はアッセイドメイン（例えば、アッセイ反応が起こるモジュール表面、及び／又はアッセイシグナルが放出されるモジュール表面、すなわち一般に電極表面、好ましくは作用電極表面上の別個の箇所）が含まれる。特に好ましい実施形態によれば、アッセイプレートは、標準ウ

ェル構成（例えば、６ウェル、２４ウェル、９６ウェル、３８４ウェル、１５３６ウェル、６１４４ウェル又は９６００ウェル）を有するマルチウェルアッセイプレートである。

【００５５】

電極誘導発光ウェル（好ましくは、電気化学発光ウェル（すなわち、電気化学発光用に構成されたウェル））又は電極誘導発光ドメイン（好ましくは、電気化学発光アッセイドメイン（すなわち、電気化学発光アッセイ用に構成されたアッセイドメイン））は、（作用電極表面などの）第１の電極表面を含むことができ、好ましくは（対電極表面などの）第２の電極表面も含むことができる。

【００５６】

本発明は、１つ又は複数のアッセイを実施するための、複数のウェル（及び／又はチャンバ）を含むマルチウェルモジュール、好ましくはアッセイプレートにも関する。複数のウェル（及び／又はチャンバ）のうち２つ以上に、少なくとも１つの第１の電極表面と、好ましくは少なくとも１つの対電極表面とが含まれる。好ましい実施形態によれば、複数のウェル（及び／又はチャンバ）のうち２つ以上に、ウェルにおいて発光を誘発させるように構成された作用電極表面と、好ましくは対電極表面が含まれる。本発明は、１つ又は複数のアッセイを実施するための、複数のウェルを有するマルチウェルモジュール、好ましくはプレートにも関する。複数のウェルのうち１つ又は複数には、ウェルにおいて発光を誘発させるように構成された作用電極表面と対電極表面が含まれる。すべて又は実質的にすべてのウェルには電極表面が含まれることが好ましい。

【００５７】

別の実施形態は、電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）アッセイを実施するための、複数のウェルを含むマルチウェルアッセイモジュール、好ましくはアッセイプレートに関する。複数のウェルの各々には、少なくとも１つの第１の電極表面（例えば、作用電極）と、好ましくは、少なくとも１つの第２の電極表面（例えば、対電極）とが含まれる。

【００５８】

別の実施形態は、１つ又は複数の電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）アッセイを実施するための、複数のウェル又は電極表面を含むアッセイ領域を有するアッセイプレートに関する。電極表面は、本質的に、少なくとも１つの作用電極表面と少なくとも１つの対電極表面とからなる。

【００５９】

アッセイ領域又はアッセイウェルには参照電極がなく、アッセイドメイン密度がより高くなり、発光を誘発し測定するための計測手段が単純化されることが好ましい。

【００６０】

作用電極表面積は、対電極表面積に比べて、小さくても、同じでも、大きくてもよい。いくつかの実施形態において、作用電極表面は、対電極表面よりも極めて大きいことが好ましい。この構成によって、アッセイ試薬を固定する作用電極表面がより大きくなる。好ましくは、作用電極表面と対電極表面の表面比は、少なくとも２対１、より好ましくは少なくとも５対１、さらに好ましくは少なくとも１０対１、さらに好ましくは少なくとも５０対１、さらに好ましくは少なくとも１００対１、最も好ましくは少なくとも５００対１である。驚くべきことに、本発明のアッセイモジュールは、極めて小さな対電極表面を用いて、電気化学発光アッセイを実施することができる。作用電極は、ウェル上に配置された光検出器によって捕捉可能である、電極から放出されるＥＣＬの割合が最大になるように、実質的にウェルの中央に位置することが好ましい。

【００６１】

別の実施形態によれば、第１の電極表面（例えば、作用電極表面）は、各ウェルの底部の中央に位置し、第２の電極表面（例えば、対電極表面）は、各ウェルの底部の周囲に隣接している。いくつかの実施形態において、作用電極表面は各ウェルの底部中央に位置し、対電極表面によって完全に包囲されている。

【００６２】

また、いくつかの用途では、作用電極表面が、例えば、ウェル又はウェル底部の表面積よりも小さいことが望ましい。いくつかの用途では、この構成によって、非特異的シグナルを減少させることができる。本発明の一実施形態によれば、マルチウェルアッセイモジュールは、第１の電極表面、第２の電極表面及び誘電体表面（好ましくは、誘電体表面は、第１の電極表面と第２の電極表面の間のウェル底面である）を含むウェル底部を有する複数のウェルを有する。第１の電極表面と誘電体表面（又は、ウェル底面）の比は、１対５未満、好ましくは１対１０、より好ましくは１対３０である。

【００６３】

本発明の好ましい一実施形態によれば、アッセイモジュールには、誘電体表面が結合している第１の電極表面（好ましくは、作用電極表面）が含まれる。誘電体表面は、電極表面よりも高く又は低く（好ましくは、高く）かつ／又は電極表面と疎水性が異なる（好ましくは、より疎水性）。誘電体境界は、電極表面よりも０．５～１００マイクロメートル、より好ましくは２～３０マイクロメートル、最も好ましくは８～１２マイクロメートル高いことが好ましい。誘電体境界は、鋭く画成された縁部を有する（すなわち、境界壁が急勾配かつ／又は電極と誘電体境界の界面が鋭角である）ことがさらに好ましい。好ましくは、第１の電極表面は、誘電体表面よりも１０度、好ましくは１５度、より好ましくは２０度、より好ましくは３０度、さらに好ましくは４０度、最も好ましくは５０度小さい水接触角を有する。誘電体表面が電極表面よりも高くかつ／又は疎水性である１つの利点は、誘電体境界を用いて電極表面境界内に試薬を閉じ込めることができる試薬付着プロセスにある。特に、境界壁が急勾配かつ／又は電極と誘電体境界の界面が鋭角である鋭く画成された縁部を有することは、溶液の液滴を「ピン止めし」、それらを電極表面に閉じ込めるのに特に有用である。

【００６４】

別の実施形態によれば、アッセイモジュールには、１つ又は複数（好ましくは２つ以上）のウェルと、１つ又は複数の第１の電極表面（好ましくは、１つ又は複数の作用電極表面）と、それに固定された複数のアッセイドメインとが含まれる。複数のアッセイドメインのうち少なくとも２つには異なる結合試薬が含まれることが好ましい。好ましくは、各ウェルには、少なくとも４つ、より好ましくは少なくとも７つ、さらに好ましくは少なくとも１０個のアッセイドメイン、最も好ましくは少なくとも１５個のアッセイドメインが含まれる。好ましい一実施形態は、各ウェルが１つのウェルにつき少なくとも１６個、好ましくは少なくとも２５個、より好ましくは少なくとも６４個、さらに好ましくは少なくとも１００個のアッセイドメイン、最も好ましくは少なくとも２５０個のアッセイドメインを含む２４ウェルプレートである。

【００６５】

本発明の別の実施形態は、複数のウェルを有するマルチウェルモジュール（好ましくはマルチウェルプレート）に関する。このウェルには、アッセイドメインがその上に固定された複数の作用電極表面が含まれる。アッセイドメインは、個別に指定可能であることが好ましい。例えば、ウェルは、ウェル内の他のアッセイドメインから独立して指定可能である電極を含む複数のアッセイドメインを含むことができる。別の例において、一群のウェルは、ウェル内の他のアッセイドメインから独立して指定可能であるが、他のウェルの各々におけるアッセイドメインと一緒に指定可能である電極を含む各々複数のアッセイドメインを含むことができる。

【００６６】

また、いくつかの用途では、作用電極表面は、例えばウェル又はウェル底部の表面積よりも小さいことが望ましい。いくつかの用途においては、この構成によって、非特異的シグナルを減少させることができる。本発明の一実施形態によれば、マルチウェルアッセイモジュールは、第１の電極表面、第２の電極表面及び誘電体表面（好ましくは、誘電体表面は、第１の電極表面と第２の電極表面の間のウェル底面である）を含むウェル底部を有する複数のウェルを有する。第１の電極表面と誘電体表面（又は、ウェル底面）の比は、１対５未満、好ましくは１対１０、より好ましくは１対３０である。

【００６７】
本発明の好ましい一実施形態によれば、アッセイモジュールには、誘電体表面が結合している第１の電極表面（好ましくは、作用電極表面）が含まれる。誘電体表面は、電極表面よりも高く又は低く（好ましくは、高く）かつ／又は電極表面と疎水性が異なる（好ましくは、より疎水性）。誘電体境界は、電極表面よりも０．５～１００マイクロメートル、より好ましくは２～３０マイクロメートル、最も好ましくは８～１２マイクロメートル高いことが好ましい。誘電体境界は、鋭く画成された縁部を有する（すなわち、境界壁が急勾配かつ／又は電極と誘電体境界の界面が鋭角である）ことがさらに好ましい。好ましくは、第１の電極表面は、誘電体表面よりも１０度、好ましくは１５度、より好ましくは２０度、より好ましくは３０度、さらに好ましくは４０度、最も好ましくは５０度小さい水接触角を有する。誘電体表面が電極表面よりも高くかつ／又は疎水性である１つの利点は、誘電体境界を用いて電極表面境界内に試薬を閉じ込めることができる試薬付着プロセスにある。特に、境界壁が急勾配かつ／又は電極と誘電体境界の界面が鋭角である鋭く画成された縁部を有することは、溶液の液滴を「釘づけにし」、それらを電極表面に閉じ込めるのに特に有用である。

【００６８】
別の実施形態によれば、アッセイモジュールには、１つ又は複数（好ましくは２つ以上）のウェルと、１つ又は複数の第１の電極表面（好ましくは、１つ又は複数の作用電極表面）と、それに固定された複数のアッセイドメインとが含まれる。複数のアッセイドメインのうち少なくとも２つには異なる結合試薬が含まれることが好ましい。好ましくは、各ウェルには、少なくとも４つ、より好ましくは少なくとも７つ、さらに好ましくは少なくとも１０個のアッセイドメイン、最も好ましくは少なくとも１５個のアッセイドメインが含まれる。好ましい一実施形態は、各ウェルが１つのウェルにつき少なくとも１６個、好ましくは少なくとも２５個、より好ましくは少なくとも６４個、さらに好ましくは少なくとも１００個のアッセイドメイン、最も好ましくは少なくとも２５０個のアッセイドメインを含む２４ウェルプレートである。

【００６９】
本発明の別の実施形態は、複数のウェルを有するマルチウェルモジュール（好ましくはマルチウェルプレート）に関する。このウェルには、アッセイドメインがその上に固定された複数の作用電極表面が含まれる。アッセイドメインは、個別に指定可能であることが好ましい。例えば、ウェルは、ウェル内の他のアッセイドメインから独立して指定可能である電極を含む複数のアッセイドメインを含むことができる。別の例において、一群のウェルは、ウェル内の他のアッセイドメインから独立して指定可能であるが、他のウェルの各々におけるアッセイドメインと一緒に指定可能である電極を含む各々複数のアッセイドメインを含むことができる。

【００７０】
本発明は、本発明のアッセイモジュール及びＭＤＭＷプレートからのシグナルを測定する方法及び装置にも関する。本発明の好ましい装置を使用して、アッセイモジュール、好ましくはマルチウェルアッセイプレート中で実施されるアッセイにおける発光を誘発させ測定することができる。例えば、１つ又は複数の光検出器；遮光性容器（ｌｉｇｈｔ　ｔｉｇｈｔ　ｅｎｃｌｏｓｕｒｅ）；アッセイモジュールを接触させる電気コネクタ；装置中にかつ装置から（特に、遮光性容器中にかつ遮光性容器から）マルチウェルアッセイモジュールを移す機構；マルチウェルアッセイモジュールを光検出器及び電気接点と配列させ配向させる機構；モジュールを追跡し同定する機構（例えば、バーコードリーダー）；モジュールに電気接続させるための機構、モジュールにおいて発光を誘発させる１つ又は複数の電気エネルギー源；並びに適切な電子機器及びソフトウエアを組み込むことができる。

【００７１】
装置は、１つ又は複数のアッセイモジュールを保管し、積み重ね、移動させかつ／又は分配する機構（例えばマルチウェルプレートスタッカ）も備えることができる。装置は、

光を測定する多数の光検出器（例えば、多数の光ダイオード）又は画像形成用検出器（ｉｍａｇｉｎｇ　ｐｈｏｔｏｄｅｔｅｃｔｏｒ）（例えば、ＣＣＤカメラ）を有利に使用することができる。これらの検出器によって、装置が複数のウェル、アッセイドメイン及び／又はアッセイセルからの光を同時に測定し、かつ／又は個々のウェル、アッセイセル及び／又はアッセイドメインから放出される光の強度及び空間分布を画像化することが可能になる。

【００７２】

装置は、好ましくは、アッセイモジュール、好ましくはマルチウェルアッセイプレートの１つ又は複数のセクターからの光を測定することができる。いくつかの実施形態においては、セクターには、１からアッセイモジュール中のウェル（及び／又はチャンバ）の全数よりも少ない数までの一群のウェル、アッセイドメイン及び／又はアッセイセルが含まれる（例えば、マルチウェルプレート中のウェルの横列、縦列又は２次元サブアレイ）。好ましい実施形態においては、セクターには、マルチウェルプレートのウェルの４パーセントから５０パーセントが含まれる。特に好ましい実施形態においては、マルチウェルアッセイプレートは、欄型セクター（１行又は１列のウェルを含む各セクター）又は正方形セクター（例えば、標準サイズのマルチウェルプレートは、サイズが同じ６つの正方形セクターに分割することができる）に分割される。いくつかの実施形態においては、セクターは、ウェル内に２つ以上の流体封じ込め領域を有する１つ又は複数のウェルを含むことができる。装置は、好ましくは、所与のモジュール、好ましくはプレートにおいてＥＣＬを連続的に誘発し、かつ／又は所与のモジュール、好ましくはプレート内のセクターからのＥＣＬを連続的に測定するように構成されている。

【００７３】

本発明の一態様は、改良電極組成及び表面を有する電極上のアッセイドメイン、及びこれらの電極組成及び表面を含むアッセイモジュールにおける材料の固定化に関する。本発明における電極は、好ましくは、導電性材料で構成される。電極は、金、銀、白金、ニッケル、スチール、イリジウム、銅、アルミニウム、導電性アロイなどの金属を含むことができる。これらは酸化物被覆金属（例えば、酸化アルミニウム被覆アルミニウム）も含むことができる。電極は、分子炭素導電体などの非金属導体を含むことができる。電極は、インジウムスズ酸化物（ＩＴＯ）、アンチモンスズ酸化物（ＡＴＯ）などの半導体材料（例えば、ケイ素、ゲルマニウム）又は半導体フィルムを含むこともできる。電極は、導電性複合材を含有する材料、インク、ペースト、ポリマーブレンド、金属／非金属複合材などの混合物を含むこともできる。このような混合物は、非導電性材料と混合された導電性又は半導体材料を含むことができる。電極材料は、実質的にシリコーンベースの材料を含まないことが好ましい。

【００７４】

本発明のアッセイモジュールに使用される電極（特に作用電極）は、発光種から発光を有利に誘発させることができる。作用電極の好ましい材料は、第三級アルキルアミン（トリプロピルアミンなど）の存在下でルテニウム－トリス－ビピリジンから電気化学発光を誘発可能な材料である。このような好ましい材料の例は、白金、金、ＩＴＯ、炭素、炭素－ポリマー複合材及び導電性ポリマーである。

【００７５】

電極は、カーボン、カーボンブラック、グラファイトカーボン、カーボンナノチューブ、カーボンフィブリル、グラファイト、カーボンファイバー、それらの混合物などの炭素ベース材料で構成されることが好ましい。導電性カーボン－ポリマー複合材、マトリックス中に分散された導電性粒子（例えば、カーボンインク、カーボンペースト、金属インク）及び／又は導電性ポリマーで構成されることが有利である。本発明の好ましい一実施形態は、炭素、好ましくはカーボン層、より好ましくはカーボンインクのスクリーン印刷層を含む電極（例えば、作用電極及び／又は対電極）を有するアッセイモジュール、好ましくはマルチウェルプレートである。いくつかの有用なカーボンインクには、Ａｃｈｅｓｏｎ　Ｃｏｌｌｏｉｄｓ　Ｃｏ．（例えば、Ａｃｈｅｓｏｎ　４４０Ｂ、４２３ｓｓ、ＰＦ

４０７Ａ、ＰＦ４０７Ｃ、ＰＭ－００３Ａ、３０Ｄ０７１、４３５Ａ、Ｅｌｅｃｔｒｏｄａｇ ５０５ＳＳ及びＡｑｕａｄａｇ（商標））、Ｅ．Ｉ．Ｄｕ Ｐｏｎｔ ｄｅ Ｎｅｍｏｕｒｓ ａｎｄ Ｃｏ．（例えば、Ｄｕｐｏｎｔ ７１０５、７１０１、７１０２、７１０３、７１４４、７０８２、７８６１Ｄ及びＣＢ０５０）、Ｃｏｎｄｕｃｔｉｖｅ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ Ｉｎｃ（例えば、Ｃ－１００）、及びＥｒｃｏｎ Ｉｎｃ．（例えば、Ｇ－４５１）によって製造される材料などがある。

【００７６】

別の好ましい実施形態においては、本発明の電極は、カーボンフィブリルを含む。「カーボンフィブリル」、「カーボンナノチューブ」、単層ナノチューブ（ＳＷＮＴ）、多層ナノチューブ（ＭＷＮＴ）、「グラファイトナノチューブ」、「グラファイトフィブリル」、「カーボン細管（ｃａｒｂｏｎ ｔｕｂｕｌｅ）」、「フィブリル」及び「バッキーチューブ」という用語はすべて、広範なクラスの炭素材料を記述するために使用することができる（Ｄｒｅｓｓｅｌｈａｕｓ，Ｍ．Ｓ．；Ｄｒｅｓｓｅｌｈａｕｓ，Ｇ．；Ｅｋｌｕｎｄ，Ｐ．Ｃ．；「フラーレン及びカーボンナノチューブの科学（Ｓｃｉｅｎｃｅ ｏｆ Ｆｕｌｌｅｒｅｎｅｓ ａｎｄ Ｃａｒｂｏｎ Ｎａｎｏｔｕｂｅｓ）」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ．、１９９６及びそれに引用されている文献を参照されたい）。「フィブリル」及び「カーボンフィブリル」という用語を、本願ではこの広範なクラスの炭素ベース材料を包含するために使用する。米国特許第４，６６３，２３０号、同第５，１６５，９０９号及び同第５，１７１，５６０号に記載されている個々のカーボンフィブリルは特に有利である。それらは、約３．５ｎｍ～７０ｎｍの範囲にある直径、及び直径の10^2倍を超える長さ、複数の本質的に連続した秩序のある炭素原子層の外部領域、及び明確な内核領域を有することができる。単に説明のために示すと、カーボンフィブリルの典型的な直径は、約７～２５ｎｍとすることができ、典型的な長さの範囲は１０００ｎｍ～１０，０００ｎｍとすることができる。カーボンフィブリルは、単層の炭素原子及び１ｎｍ～２ｎｍの範囲の直径を有することもできる。本発明の電極には、例えばフィブリルマット、フィブリル凝集体、フィブリルインク、フィブリル複合材（例えば、オイル、ペースト、セラミック、ポリマーなどの中に分散されたフィブリルを含む導電性複合材）の形をした１つ又は複数のカーボンフィブリルが含まれる。本発明の好ましい一実施形態は、炭素ナノチューブ含有複合材（好ましくは、ポリマーマトリックス中に分散されたカーボンナノチューブ）を含む基板を含むマルチウェルプレートに関する。基板表面はエッチングされてカーボンナノチューブが露出しており、それによって１つ又は複数の作用電極が形成される。

【００７７】

電極は、モールディングプロセスによって（すなわち、電極の作製中に）、パターン付着によって、パターン印刷によって、選択的エッチングによって、ダイ打ち抜き又はレーザ穿孔などのカッティングプロセスによって、かつ／又はエレクトロニクス微細加工分野で既知の技術によってパターン形成することができる。電極は、自立型とすることができ、又は他の材料、例えばフィルム、プラスチックシート、接着剤フィルム、紙、バッキング、メッシュ、フェルト、繊維材料、ゲル、固体（例えば、金属、セラミック、ガラス）、エラストマー、液体、テープ、接着剤、他の電極、誘電体材料などで支持することができる。支持体は剛性でも柔軟性でも、平面でも異型でも、透明でも、半透明でも、不透明でも反射性でもよい。支持体は、アセテート、ポリスチレンなどの平面プラスチックシートを含むことが好ましい。電極材料を、塗布、スプレーコーティング、スクリーン印刷、インクジェット印刷、レーザ印刷、スピンコーティング、蒸着コーティング、化学気相成長など当分野で既知の様々なコーティング及び堆積プロセスによって支持体に施すことができる。支持された電極は、フォトリソグラフィ技術（例えば、電子機器の微細加工において確立された技術）、選択的エッチング、及び／又は選択的堆積（例えば、マスクを通して実施される蒸着又はＣＶＤプロセス）によってパターン形成することができる。好ましい実施形態において、電極は、導電性炭素／ポリマー複合材の押出しフィルムで構成される。別の好ましい実施形態においては、電極は、基板上に付着したスクリーン印刷導電

性インクで構成される。電極は、他の導電性材料によって支持されていてもよい。スクリーン印刷カーボンインク電極は、電極の導電性が向上するように導電性金属インク（例えば、銀インク）層上に印刷されていることが有利である。

【００７８】

本発明の好ましい一実施形態によれば、電極表面（好ましくは、アッセイモジュール又はアッセイプレートの作用電極表面）は、誘電体表面に結合している。誘電体表面は、電極表面よりも高く又は低く（好ましくは、高く）かつ／又は電極表面と疎水性が異なる（好ましくは、より疎水性）。誘電体境界は、電極表面よりも０．５～１００マイクロメートル、より好ましくは２～３０マイクロメートル、最も好ましくは８～１２マイクロメートル高いことが好ましい。誘電体境界は、鋭く画成された縁部を有する（すなわち、境界壁が急勾配かつ／又は電極と誘電体境界の界面が鋭角である）ことがさらに好ましい。

【００７９】

好ましくは、第１の電極表面は、誘電体表面よりも１０度、好ましくは１５度、より好ましくは２０度、より好ましくは３０度、さらに好ましくは４０度、最も好ましくは５０度小さい水接触角を有する。誘電体表面が電極表面よりも高くかつ／又は疎水性である１つの利点は、誘電体境界を用いて電極表面境界内に試薬を閉じ込めることができる試薬付着プロセスにある。特に、境界壁が急勾配かつ／又は電極と誘電体境界の界面が鋭角である鋭く画成された縁部を有することは、溶液の液滴を「ピン止めし」、それらを電極表面に閉じ込めるのに特に有用である。本発明の特に好ましい実施形態において、誘電体境界は、１つ又は複数のアッセイドメインが電極上に露出するようにパターン形成された誘電体インクを、電極上及び／又は電極の周囲に印刷することによって形成される。

【００８０】

電極は、化学又は機械的処理によって改変して、試薬が固定されるのを改善することができる。その表面を処理して、試薬を固定するための官能基を導入し、吸着性を向上させることができる。表面処理を用いて、電極表面の諸特性、例えば、水の表面拡散性又は電極表面における電気化学プロセスの動力学に影響を及ぼすこともできる。使用可能な技術としては、電磁放射、電離放射、プラズマ、あるいは酸化剤、求電子試薬、求核試薬、還元剤、強酸、強塩基及び／又はそれらの組合せなどの化学試薬への暴露などがある。電極の１つ又は複数の成分をエッチングする処理によって、粗度が増加し、したがって電極の表面積が増加して特に有利になることがある。ポリマーマトリックス又はバインダ中に導電性粒子又はファイバー（例えば、カーボン粒子又はフィブリル）を含む複合材電極の場合、ポリマーの選択的エッチングによって導電性粒子又はファイバーを露出させることができる。

【００８１】

特に有用な一実施形態は、電極の変更形態であり、より広範にはプラズマ、特にグロー放電とも呼ばれる低温プラズマで処理することによって本発明に組み込まれる材料である。処理中にプラズマと接触する電極の表面特性を変えるためにこの処理が実施される。プラズマ処理によって、例えば、電極の物理的性質、化学組成又は表面化学諸特性を変えることができる。これらの変化によって、例えば、試薬の固定を助け、汚染物質を削減し、他の材料への付着を改善し、表面のぬれ性を変え、材料の付着を促進し、パターンを形成し、かつ／又は均一性を向上させることができる。有用なプラズマの例としては、酸素、窒素、アルゴン、アンモニア、水素、フルオロカーボン、水及びそれらの組合せがある。酸素プラズマは、炭素－ポリマー複合材料においてカーボン粒子を露出させるのに特に好ましい。酸素プラズマを用いて、カルボン酸又は他の酸化炭素官能基を炭素又は有機材料に導入することもでき（これらを、例えば、活性エステル又は塩化アシルのように活性化させることができる）、試薬が結合できるようになる。同様に、アンモニア含有プラズマを用いて、アッセイ試薬を結合させるのに使用されるアミノ基を導入することができる。

【００８２】

電極表面の処理は、固定化を改善又は促進させ、電極のぬれ性を変え、表面積を増加させ、試薬（例えば、脂質、タンパク質又は脂質／タンパク質層）を固定するための結合容

量又は分析物の結合を増大させ、かつ／又は電極での電気化学反応の動力学を変えるのに有利である。しかし、いくつかの用途においては、未処理電極を使用することが好ましい場合もある。例えば、本発明者らは、大きなダイナミックレンジ、したがって電極面積当たり大きな結合容量を要する用途の場合、カーボンインク電極をエッチングしてから固定することが有利であることを見出した。本発明者らは、（例えば、酸素プラズマによる）酸化エッチングが、エッチングされていないインクよりも、トリプロピルアミン（ＴＰＡ）が酸化される可能性が低下し、水の接触角が減少する点でさらに利点があることを発見した。水の接触角が小さいと、少量の水性緩衝液に希釈した試薬を塗布することによって試薬が電極に吸着し、少量でも電極表面に均等に分散させることが可能になる。驚くべきことに、本発明者らは、インク中にポリマーバインダが存在するにもかかわらず、エッチングされていないカーボンインク電極でも優れたアッセイを実施できることを見出した。実際、感度が高く、又は非特異的結合が少ないことが必要ないくつかの用途においては、エッチングされていないカーボンインク電極を用いて、露出炭素の表面積を最低限に抑え、したがってバックグラウンドシグナル、及び露出炭素に対する試薬の非特異的結合による試薬の損失を最小限に抑えることが好ましい。使用するインク、及びインクを塗布するために使用するプロセスによっては、電極表面が水性溶液で容易にぬれないこともある。本発明者らは、試薬吸着時の電極のぬれ性の低さを、低濃度の非イオン洗浄剤を試薬溶液に添加して電極表面上の溶液の拡散を促進させることによって補えることを見出した。少量の溶液から試薬を局在的に固定させている間は、均一に拡散させることが特に重要である。例えば、本発明者らは、０．００５～０．０４％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（登録商標）の添加によって、電極へのタンパク質の吸着に影響を及ぼすことなく、電極に施された誘電体膜又は隣接する誘電体膜（好ましくは、厚さが０．５～１００マイクロメートル、より好ましくは２～３０マイクロメートル、最も好ましくは８～１２マイクロメートルであり、鋭く画成された縁部を有する印刷誘電体膜）の、電極表面に流体を閉じ込める能力が乱されることなく、エッチングされていないカーボンインク表面上にタンパク質溶液を拡散させることが可能になることを見出した。Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００などの非イオン洗浄剤を用いて、エッチングされていないスクリーン印刷電極上への試薬（例えば、捕捉試薬）の拡散を促進させるときには（すなわち、試薬を固定させるために）、試薬を含有する溶液を電極表面上で乾燥させることが好ましい。この乾燥ステップによって、固定化プロセスの効率及び再現性が大きく向上することが判明した。

【００８３】

他の材料をそれに結合させるために用いることができる化学官能基で電極を誘導体化することができる。材料を、これらの官能基に共有結合させることができ、又は非共有的に吸着させて、電極を誘導体化又は非誘導体化することができる。電極を、その表面に共有結合した化学官能基と共に調製することができる。これらの化学官能基としては、ＣＯＯＨ、ＯＨ、NH_2、活性カルボキシル（例えば、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル）、ポリ（エチレングリコール）、チオール、アルキル（$(CH_2)_n$）基、及び／又はそれらの組合せ）などがあるが、これらだけに限定されない。ある種の化学官能基（例えば、ＣＯＯＨ、ＯＨ、NH_2、ＳＨ、活性カルボキシル）を用いて、試薬を電極に結合させることができる。有用な固定化及びバイオコンジュゲーション技術をさらに参照するには、Ｇ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、Ａ．Ｍａｌｌｉａ及びＰ．Ｓｍｉｔｈ、固定親和性リガンド技術（Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ　Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｌｉｇａｎｄ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、１９９２）及びＧ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、バイオコンジュゲート技術（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、１９９６）を確認されたい。

【００８４】

好ましい実施形態においては、ＮＨＳエステル基を用いて求核性化学官能基（例えば、アミン）を有する他の分子又は材料を結合させる。好ましい実施形態において、求核性化学官能基は、天然に及び／又は化学誘導体化によって生体分子上及び／又は生体分子中に

存在する。適切な生体分子の例としては、アミノ酸、タンパク質及びその機能性断片、抗体、抗体の結合断片、酵素、核酸、及びそれらの組合せなどがあるが、これらだけに限定されない。これは、多数のこのような可能な技術の１つであり、一般に、本明細書に示す例、並びに多数の他の類似の材料及び／又は生体分子に適用可能である。好ましい実施形態において、ＥＣＬ用に使用することができる試薬を、ＮＨＳエステル基によって電極に結合させることができる。

【００８５】

電極に対する材料の非特異的結合の程度を制御できることが望ましい。単に非限定的な例として示すと、タンパク質、抗体、抗体断片、細胞、細胞下粒子、ウイルス、血清及び／又は１つ若しくは複数のその成分、ＥＣＬ標識（例えば、$Ru^{II}(bpy)_3$及び$Ru^{III}(bpy)_3$誘導体）、シュウ酸塩、トリアルキルアミン、抗原、分析物及び／又はそれらの組合せ）の非特異的吸着を低減又は防止できることが好ましい。別の例では、生体分子の結合が促進されることが望ましい。

【００８６】

非特異的結合を低減又は防止する１つ又は複数の化学成分（ブロッキング基としても知られる）を、電極中、電極上、又は電極近傍に存在させることができる。そのような成分、例えば、ＰＥＧ成分及び／又は帯電残基（例えば、リン酸塩、アンモニウムイオン）を、電極に結合させ又は電極上に塗布することができる。有用なブロッキング試薬の例としては、タンパク質（例えば、血清アルブミン及びイムノグロビン（ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｉｎｓ））、核酸、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロックコポリマー、ポリエチレンイミン、洗浄剤又は界面活性剤（例えば、Ｂｒｉｊ、Ｔｒｉｔｏｎ、Ｔｗｅｅｎ、Ｔｈｅｓｉｔ、Ｌｕｂｒｏｌ、Ｇｅｎａｐｏｌ、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（例えば、Ｆ１０８）、Ｔｅｔｒｏｎｉｃ、Ｔｅｒｇｉｔｏｌ及びＳｐａｎの商品名で知られる非イオン洗浄剤／界面活性剤のクラス）などがある。

【００８７】

電極に使用される材料を界面活性剤で処理して非特異的結合を減少させることができる。例えば、当業者に周知の界面活性剤及び／又は洗浄剤（例えば、洗浄剤のＴｗｅｅｎ、Ｔｒｉｔｏｎ、Ｐｌｕｒｏｎｉｃｓ（例えば、Ｆ１０８）、Ｓｐａｎ及びＢｒｉｊシリーズ）で電極を処理することができる。ＰＥＧ及び／又はＰＥＧと同様に振るまう分子（例えば、オリゴ糖又は多糖、他の親水性オリゴマー又はポリマー）（「ポリエチレングリコールの化学：バイオ技術的及び生物医学的応用（Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、Ｈａｒｒｉｓ，Ｊ．Ｍ編、１９９２、Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ）の溶液を、界面活性剤及び／又は洗浄剤の代わりに使用することができ、かつ／又はそれらと併用することができる。上述したある種の要素の望ましくない非特異的吸着を、遮断薬、例えば、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）などのタンパク質の競合非特異的吸着によってブロックすることができる。アッセイ試薬を電極上に吸着又は共有結合させ、その後その電極を遮断薬で処理して、表面の残留非占有部位をブロックすることができる

【００８８】

好ましい実施形態においては、生体分子又は他の媒体を、炭素含有材料、例えば、カーボンブラック、フィブリル、及び／又は他の材料中に分散させた炭素に（共有手段によってでも非共有手段によってでも）固定させることが望ましい。抗体、抗体断片、タンパク質、酵素、酵素基質、阻害剤、補助因子、抗原、ハプテン、リポタンパク質、リポ糖、細胞、細胞下成分、細胞受容体、ウイルス、核酸、抗原、脂質、糖タンパク質、炭水化物、ペプチド、アミノ酸、ホルモン、タンパク質結合リガンド、薬物、及び／又はそれらの組合せを結合させることができる。ポリマー、エラストマー、ゲル、コーティング、ＥＣＬタグ、レドックス活性種（例えば、トリプロピルアミン、シュウ酸塩）、無機材料、キレート剤、リンカーなど、ただしこれらだけに限定されない非生物学的要素を結合させるこ

とも望ましい。複数の種を同時に吸着させて電極表面上に混合層を形成させることもできる。生物学的材料（例えば、タンパク質）を受動吸着によって炭素含有電極上に固定させることが最も好ましい。驚くべきことに、生体膜（例えば、細胞、細胞膜、膜断片、膜小胞、リポソーム（ｌｉｐｓｏｍｅｓ）、細胞小器官、ウイルス、細菌など）を、膜成分の活性、又は結合試薬への接近し易さを損なうことなく、炭素上に直接吸着させることができる（例えば、２００２年７月２９日に出願され、参照により本明細書に援用する同時係属中の米国特許出願第１０／２０８，５２６号（「固定脂質／タンパク質層を有するアッセイ電極、それを作製する方法、及びそれを発光試験測定に使用する方法（Ａｓｓａｙ Ｅｌｅｃｔｒｏｄｅｓ Ｈａｖｉｎｇ Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｌｉｐｉｄ／Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｌａｙｅｒｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｏｆ Ｍａｋｉｎｇ Ｔｈｅ Ｓａｍｅ Ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｏｆ Ｕｓｉｎｇ Ｔｈｅ Ｓａｍｅ Ｆｏｒ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ Ｔｅｓｔ Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔｓ）」と題する）を参照されたい）。

【００８９】

本発明のマルチウェルアッセイプレートに使用される電極は、一般に、非多孔質であるが、いくつかの用途においては、多孔質電極を使用することが有利である（例えば、カーボンファイバー又はフィブリルのマット、焼結金属、及びろ過膜に付着した金属フィルム、紙又は他の多孔質基板。これらの用途としては、ｉ）電極表面への質量輸送を増加させる（例えば、電極表面上の分子に対する溶液中の分子の結合速度を増加させる）、ｉｉ）電極表面上で粒子を捕捉する、かつ／又はｉｉｉ）ウェルから液体を除去するために電極による溶液のろ過を使用する用途などがある。

【００９０】

本発明のアッセイモジュールには、誘電体インク、フィルム又は他の電気絶縁材料（以後、誘電体と称する）を使用することができる。本発明における誘電体を、電極間の電気接続を防止し、パターン領域を画成し、材料を接着し（すなわち、接着剤として）、材料を支持し、アッセイドメインを画成し、マスクとして、しるし（ｉｎｄｉｃｉａ）として、かつ／又はアッセイ試薬及び他の流体を入れるために使用することができる。誘電体は、非導電性であり、有利には非多孔質（すなわち、材料を透過させない）であり、電極誘導発光測定において生じる培地存在下での溶解又は分解に耐性がある。本発明における誘電体は、液体、ゲル、固体、又はマトリックス中に分散した材料とすることができる。これらは、未硬化の形で付着し、硬化して固体になることができる。これらは、インク、固体フィルム、テープ又はシートとすることができる。誘電体に使用される材料としては、ポリマー、フォトレジスト、プラスチック、接着剤、ゲル、ガラス、非導電性インク、非導電性ペースト、セラミック、紙、エラストマー、ケイ素、熱可塑性物質などがある。本発明の誘電体材料は、実質的にシリコーンを含まないことが好ましい。非導電性インクの例としては、Ａｃｈｅｓｏｎ Ｃｏｌｌｏｉｄｓ Ｃｏ．（例えば、Ａｃｈｅｓｏｎ ４５１ＳＳ、４５２ＳＳ、ＰＦ－０２１、ＭＬ２５２５１、ＭＬ２５２４０、ＭＬ２５２６５及びＥｌｅｃｔｒｏｄａｇ ３８ＤＪＢ１６クリアー）及びＥ．Ｉ．ｄｕ Ｐｏｎｔ ｄｅ Ｎｅｍｏｕｒｓ ａｎｄ Ｃｏ．（例えば、Ｄｕｐｏｎｔ：５０１８、３５７１及び５０１７）によって製造される材料などのＵＶ硬化誘電体がある。

【００９１】

本発明の誘電体は、様々な手段、例えば、印刷、スプレー、積層によって施すことができ、あるいは接着剤、にかわ、溶媒又はメカニカルファスナーを用いて付けることができる。誘電体層のパターン及び／又は穴は、モールディングプロセスによって（すなわち、層の作製中に）、選択的エッチングによって、かつ／又はダイ打ち抜き、レーザ穿孔などのカッティングプロセスによってパターン形成させることができる。誘電体は、確立されたフォトリソグラフィ技術（例えば、半導体電子機器産業において用いられている技術）を使用して、かつ／又は蒸着又はＣＶＤプロセスを用いてパターン形成された付着によって（例えば、マスクを通した付着によって）パターン状に付着及び／又はエッチングすることができる。好ましい実施形態においては、印刷（例えば、インクジェット印刷、レーザ印刷又は、より好ましくは、スクリーン印刷）、及び場合によっては、ＵＶ硬化によっ

て誘電体インクを基板上に付着させる。スクリーン印刷誘電体はＵＶ硬化され、溶媒ベースの誘電体よりもエッジ解像力が向上することが好ましい。別の好ましい実施形態において、非導電性ポリマーフィルムは、接着剤を用いて支持体に付けられる。

【００９２】

電極に印刷された又は隣接した誘電体インクを用いて電極表面領域に流体を閉じ込めるときには、誘電体膜は、好ましくは厚さが０．５～１００マイクロメートル、より好ましくは２～３０マイクロメートル、最も好ましくは８～１２マイクロメートルであり、好ましくは、急勾配の壁を有する鋭く画成された縁部も有する。

【００９３】

本発明には、プレート上部、並びにプレート上部及び、好ましくは、１つ又は複数の電極表面、最も好ましくは１つ又は複数の作用電極表面、及び場合によっては、１つ又は複数の対電極表面を有するウェル底部を画成するプレート底部を含む組立プレートが含まれる。プレート上部は、穴を含む構造であることが好ましい。この構造は、プレート底部と組み合わせてマルチウェルプレートを形成することができ、プレートのウェルの壁は、プレート上部を通る穴の内面によって少なくとも部分的に画成される。プレート上部を通る穴は、様々な形状（例えば、円形、楕円形、正方形、矩形、三角形、星形など）とすることができる。穴は、様々なサイズとすることができる。穴の内部を不規則な寸法にすることもできる（例えば、穴を様々な深さでより狭く又はより広くすることができる）。例えば、穴を、ウェル底部から放出される光の収集を最適化できるように底部でより狭くなる錐体のような形状にすることができる。プレート上部は、プレート上部を特定し、プレート上部をプレート上部の他の構成から識別し、又はプレート上部を整列させハンドリングする助けとなる構造又はその上の標識も有することができる。プレート上部の寸法及び構造は、アッセイプレートの設置面積及び形状に対する業界標準に好ましくは従い、少なくとも適合していることが有利である。

【００９４】

プレート上部は、導電性材料でできていても非導電性材料でできていてもよい。プレート上部の大部分は、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンなどの堅い熱可塑材料でできた単一の成形構造であることが好ましい。この単一構造は、一般に反応物を通さず、適度なレベルの熱及び光に耐え、好ましくは、生体分子の吸着に耐性がある安価な材料で形成されている（あるいは、被覆されている）ことが最適である。プレート上部は実質的にシリコーンを含まないことが好ましい。プレート上部は透明でも半透明でもよい。ある種のＥＣＬ測定プロセスの結果を改善するために、様々な色の材料を使用することができる

【００９５】

プレート上部は、ウェル間のクロストークを防止するために、光を透過させない材料を含むことが好ましい。反射性の高い金属コーティング又は構成材料を用いて、ウェルの各々に対して特に反射性の内面を設けて光が光検出器に伝送される効率を上げることができる。光散乱粒子（例えば、酸化鉛、アルミナ、シリカ、好ましくは、二酸化チタン粒子）を充填したプラスチックなどの不透明白色プラスチック材料を用いて、光を高度に散乱するウェル内面を設け、それによって集光効率を上げることができる。一実施形態において、好ましいプレート上部は、このような光散乱粒子を４～２０ｗｔ％、好ましくは６～２０％、より好ましくは６～１５％、さらに好ましくは６～１２％、最も好ましくは約９％の濃度で含むプラスチック（例えば、ウェル壁）を含む。別の好ましい実施形態においては、プレート上部は、ウェル内の異なる箇所からのＥＣＬで発生した光の反射又は散乱を防止し、ＥＣＬ試験測定中の反射干渉を防止する不透明な、好ましくは非反射性の黒色材料を含む。一般に、ウェルから放出された光を画像化するとき（例えば、ウェルから放出された光の画像を作製するカメラを用いるとき）には、散乱光を検出すると画像の忠実度が低下するので、（例えば、プレート上部によって画成される）ウェル内面は、吸収性（例えば、黒色）の、好ましくは非散乱性材料を含むことが有利である。一般に、非画像モードで光を検出するとき（例えば、ウェルから放出された光すべてを、単一の光検出器を

用いて検出するとき）、ウェル内面は反射性又は散乱性の高い材料を含み、ウェル壁での光の吸着による光損失を防止し、検出器における集光を最大にすることが有利である。

【００９６】

本発明には、アッセイモジュール上部、並びにアッセイモジュール上部及びプレート底部又はアッセイモジュール基板を含む組立アッセイモジュールも含まれる。アッセイモジュール上部は、（上述したように）プレート上部とすることができる。アッセイモジュール上部は、例えば、プレート底部又はアッセイモジュール基板と結合させたときに、ウェル及び／又はチャンバを画成する穴、チャネル及び／又はウェルを有することができる。このようなウェル及び／又はチャンバは、好ましくは、プレート底部又はアッセイモジュール基板によって設けられる１つ又は複数の電極（及び／又はアッセイドメイン）を含む。アッセイモジュール上部は、追加のチャネル、チューブ又は他のマイクロフルイディクスを有し、アッセイモジュールのウェル、フローセル及びチャンバの中、外及び／又は間に試料を流すことができる。

【００９７】

図１０Ａ及び１０Ｂに、本発明のマルチウェルアッセイプレートの実施形態のそれぞれ成層図及び定型化された断面図を示す。マルチウェルアッセイプレート１０００は、順に、プレート上部１０２０、接着層１０３０、誘電体層１０４０、導電層１０５０、基板層１０６０、及び接触層１０７０を含む層状構造である。それぞれプレート上部１０２０及び接着層１０３０を通る穴１０２２及び１０３２は、誘電体層１０４０、導電層１０５０及び／又は基板層１０６０によって画成されるウェル底部と、穴１０２２及び１０３２の内面によって画成されるウェル壁とを有する複数のウェル１００２を形成するように整列している。基板層１０６０を通るスルーホール１０６２及び１０６４によって、導電層１０５０の素子と接触層１０７０の素子との間に電気的通路が設けられる。詳細図Ａ～Ｄに、プレート１０００の所与のセクター内の層１０７０、１０６０、１０５０及び１０４０のパターンを示す。構成要素１０８０に、一体型電極を有するプレート底部を形成させるように整列させ、上部から底部に１０４０（上部）、１０５０、１０６０及び１０７０（底部）の順に積み重ねた層１０７０、１０６０、１０５０及び１０４０を示す。

【００９８】

プレート上部１０２０は、上述したプレート上部である。接着層１０３０は、プレート上部１０２０と誘電体層１０４０、導電層１０５０及び／又は基板層１０６０の流体耐密シールを形成するのに適切な接着剤である。接着層１０３０は、例えば、スプレーコーティングによってプレート上部１０２０に塗布される接着剤コーティングとすることができる。好ましい実施形態において、接着層１０３０は、両面接着テープ（すなわち、両面に接着剤が塗布されたプラスチックフィルム）である。穴１０３２は、レーザ穿孔、ダイ打ち抜きなどのカッティングプロセスによって形成されることが好ましい。場合によっては、接着剤１０３０を省略することができる（例えば、隣接層が接着性を有するとき、又は例えば、締め付け、ヒートシール、音波溶接（ｓｏｎｉｃ　ｗｅｌｄｉｎｇ）、溶剤溶接などによって接着剤を用いないで封止できるとき）。あるいは、プレート上部１０２０と接着層１０３０の両方を省略することができる。

【００９９】

導電層１０５０は、ＥＣＬアッセイにおける作用電極及び／又は対電極として使用するのに適した材料を備え、プラスチックシート、フィルムなどの非導電性基板である基板１０６０上に支持されている。導電層１０５０は、カーボンインクなどの導電性コーティングであり、スクリーン印刷などの印刷プロセスによって形成できることが好ましい。導電層１０５０は、例えば、規定のパターンのスクリーン印刷によって、６つの電気的に絶縁された作用電極セクション１０５２と６つの電気的に絶縁された対電極セクション１０５４に区分けされて、プレート１０００が６つの独立して指定可能な正方形のセクターに分割される。図に示すように、区分けは、所与のウェル中の流体が少なくとも１つの作用電極セクションと少なくとも１つの対電極セクションに接触するように設計される。作用電極セクションは、電極の性能を最適化するように対電極セクションとは異なるコンポーネ

ントを有することができ、又は製造の複雑さを最小限に抑えるために、例えば、印刷ステップ数を削減するために同じ材料からなることができる。これらはどちらも、銀インク下層の上にカーボンインク上層を備え、カーボンインクは活性電極表面を与え、銀インクはアッセイでのプレート使用中に、電気的ポテンシャル（ｅｌｅｃｔｒｉｃａｌ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）が特定のセクション全体に均等に分布するように十分な導電性を備えていることが好ましい。例えば２段階の印刷プロセスによって、このような層を形成するとき、上層は下層よりも寸法がわずかに大きく、かつウェル１００２中の試料が下層材料に確実に曝されない適切な厚さであることが有利である。複数の層において、下層が後続の処理ステップ又はＥＣＬ測定を妨害しないように確実に完全に下層を覆うために、上層を印刷又は付着させることが有利である（例えば、好ましい電極材料は、１層の銀インクの上に３層のカーボンインクを含み、これらの層は、最も好ましくは、スクリーン印刷によって付けられる）。誘電体層１０４０は電気絶縁フィルムであり、好ましくは、スクリーン印刷などの印刷プロセスによって誘電体インクで形成される。誘電体層１０４０は、ウェル１００２中の流体に接触する導電層１０５０の表面（すなわち、覆われていない表面）を画成するようにパターン形成されている。誘電体層１０４０中の穴１０４２によって、導電層１０５０の作用電極セクション１０５２上に流体封じ込め領域が画成される。このような流体封じ込め領域において、誘電体層は、少量の流体を作用電極上に閉じ込め、例えば、ウェル内の選択したアッセイドメイン上にアッセイ試薬を付着させる助けとするために用いることができるバリアーとして作用する。誘電体層１０４０中の穴１０４２によって、プレート１０００の各ウェル内の作用電極表面上に、１つの流体封じ込め領域及び／又はアッセイドメインが画成される。場合によっては、誘電体層１０４０を省略することができる（このような場合、試薬を、例えば、マイクロディスペンシング（ｍｉｃｒｏｄｉｓｐｅｎｓｉｎｇ）又はピントランスファー（ｐｉｎ　ｔｒａｎｓｆｅｒ）技術を用いて制御された付着によって、規定のアッセイドメイン中に依然として付着させることができる）。

【０１００】

接触層１０７０は、マルチウェルアッセイプレートを外部の電気エネルギー源へ電気的に接続する導電層である。接触層を、一連の作用電極接点１０７２及び対電極接点１０７４に区分して、電極１０５２及び１０５４の特定のセクションに独立して接続させることができる。接触層は、（導電性の高い）銀インク下層とその後の（銀インクの腐食を防止し、銀が後続のプラズマ処理ステップに曝されることによって生じるあらゆる有害効果を防止するための）カーボンインク上層を好ましくは印刷することによって、最も好ましくはスクリーン印刷することによって形成される。基板１０６０中の穴１０６２及び１０６４は、好ましくは、ダイ打ち抜き、レーザ穿孔などのカッティングプロセスによって作製される。穴１０６２には、導電性材料が充填されて、作用電極接点１０７２と作用電極セクション１０５２が電気的に接続される。穴１０６４には、導電性材料が充填されて、対電極接点１０７４と対電極セクション１０５４が電気的に接続される。穴１０６２及び１０６４には、導電層１０５０又は接触層１０７０の形成中、好ましくは導電性材料が充填される。例えば、基板上への導電性インクの印刷中に、余分なインクが基板の穴に押し込められて、穴が導電性インクで充填される。

【０１０１】

操作時、試験試料は、プレート１０００のウェルに導入される。電気エネルギー源は、（それぞれ１つ又は複数の作用電極接点１０７２及び１つ又は複数の対電極接点１０７４を介して）１つ又は複数の作用電極セクション１０５２と１つ又は複数の対電極セクション１０５４に接続される。これらの接続間に電気的エネルギーをかけることによって、電極セクション１０５２及び１０５４の露出表面を介して試験試料に電気化学ポテンシャルが印加される（電気化学ポテンシャルの印加は、電気的エネルギー源に電気的に接続している作用電極セクション及び対電極セクションに接触しているセクター中のウェルに限定される）。

【０１０２】

図１０Ａ及び１０Ｂに示す構造は、異なる数のウェル、異なる配置のウェル及び／又は異なる配置の独立して指定可能であるセクターを有するプレートに適用可能なように容易に改変される。好ましい実施形態には、１つのウェル当たり４、７又は１０個のアッセイドメインを有する９６ウェルプレート、１つのプレート当たり２５、６４又は１００個のウェルを有する２４ウェルプレートなどがある。図１０Ｃに、４つの「流体封じ込め領域」１１４１が各ウェルの作用電極表面に露出するように設計された誘電体層１０４０の変更形態である誘電体層１１４０を示す（図では、プレートの１つのセクターのみが示されている）。図１０Ｄに、誘電体層１０４０を誘電体層１１４０で置換した以外はプレート１０００と同じであるプレート１１００の３つのウェルの定型化された断面図を示す。

【０１０３】

図１１に、ゲノム分析又はプロテオーム分析に特に適した本発明の実施形態であるマルチウェルアッセイプレート１５００を示す。ウェルのサイズは、（下記のように）画像装置によってウェルから生じる発光のイメージング効率が最適化されるように選択される。マルチウェルアッセイプレート１５００は、順に、プレート上部１５２０、接着層１５３０、導電性テープ層１５１４Ｂ、誘電体層１５４０、導電層１５５２、基板１５６０、接触層１５７２及び導電性テープ層１５１４Ａを含む層状構造である。構成要素１５８０に、上部から底部に１５４０（上部）、１５５２、１５６０、１５７２（底部）の順で整列し積み重ねられた層１５７２、１５６０、１５５２及び１５４０を示す。折り目１５１６で構成要素１５８０の周りに導電性テープ１５１０を折り重ねることによって、導電性テープ層１５１４Ａ及び１５１４Ｂが設けられる。穴１５２２、１５３２及び１５１８は、構成要素１５８０によって画成されるウェル底部を有する複数のウェルを形成するように配列される。基板１５６０を通るスルーホール１５６２によって、導電層１５５２と接触層１５７２との間に電気的通路が設けられる。導電性テープ層１５１４Ａを通るスルーホール１５１２によって、接触層１５７２への接続（したがって、導電層１５５２に接触させる方法）が可能になる。プレート上部１５２０は、ウェルの特異的な配置以外は図１０のプレート上部１０２０と同様である。接着層１５３０は、図１０の接着層１０３０と同様の接着剤であり、省略することができる。導電性テープ１５１０は、絶縁及び接着基板上の導電性フィルムを含む積層構造である（好ましくは、一方がアルミニウム蒸着層で被覆され、他方が接着剤で被覆されたプラスチックフィルムである）。基板１５６０、導電層１５５２、誘電体層１５４０及び接触層１５７２は、組成及び調製が図１０に示した基板１０６０、導電層１０５０、誘電体層１０４０及び接触層１０７２に類似している。導電層１５５２は、プレート１５００が６つの独立して指定可能であるセクターに分割されるように、６つの正方形セクションに区分けされている（各々が１つのウェルを有する）。誘電体層１５４０を通る穴１５４２によって、各ウェル中の多数（好ましくは１０～５０，０００、より好ましくは１００～１０，０００；図に示したのは２５６である）の流体封じ込め領域が画成される。特定の核酸配列、特定のタンパク質などの結合試薬を、選択的に導入し、かつ又は選択的マイクロディスペンシングによって特異的流体封じ込め領域中に固定する。

【０１０４】

本発明のプレートの実施形態を示す図は、ウェル、セクター及び流体封じ込め領域／アッセイドメインの数、形状及び分布について特定のパターンで示されているが、これらのパラメータが広範に変化してもこれらの設計が適応可能であることは明白なはずである。

【０１０５】

本発明のアッセイドメイン及び固定層は、多種多様な確立されたアッセイ形式、例えば、電気化学電圧及び／又は電流、好ましくは電極誘導発光、最も好ましくは電気化学発光の測定に基づくアッセイを実施するのに有用である。ＥＣＬアッセイを実施する方法の例としては、米国特許第５，５９１，５８１号、同第５，６４１，６２３号、同第５，６４３，７１３号、同第５，７０５，４０２号、同第６，０６６，４４８号、同第６，１６５，７０８号、同第６，２０７，３６９号及び同第６，２１４，５５２号、並びに国際公開第８７／０６７０６号及び同第９８／１２５３９号を参照されたい。これらの参考文献を

参照により本明細書に援用する。アッセイは、分析物の量の測定；試料の特性（例えば、温度、発光、電気化学活性、色、濁度など）の測定；化学、生化学及び／又は生物活性（例えば、酵素活性）の測定；動力学又は熱力学的パラメータ（例えば、反応速度又は反応平衡定数）の測定などを対象にすることができるが、これらだけに限定されない。

【０１０６】

本発明の実施形態を用いて、目的分析物又は活性を含む様々な試料を試験することができる。このような試料は、固形、エマルジョン、懸濁液、液体又は気体の形とすることができる。これらは、例えば、（生又は死）細胞及び細胞に由来する産物、細胞断片、細胞画分、細胞溶解物、細胞小器官、細胞膜、（ハイブリドーマなどの抗体産生生物からの上清を含めた）細胞培養上清、廃水又は飲料水、食品、飲料、薬学的組成物、血液、血清、血しょう、毛、汗、尿、糞便、組織、唾液、粘液、オイル、下水、環境試料、有機溶媒又は空気を含む試料又はそれらに由来する試料とすることができるが、これらだけに限定されない。試料は、さらに、例えば、水、有機溶媒（例えば、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ｎ－メチルピロリドン又はアルコール）又はそれらの混合物を含むことができる。

【０１０７】

測定することができる分析物としては、試料中に存在するホールセル、細胞表面抗原、細胞下粒子（例えば、細胞小器官又は膜断片）、ウイルス、プリオン、チリダニ又はその断片、ウイロイド、抗体、抗原、ハプテン、脂肪酸、核酸（及び合成アナログ）、タンパク質（及び合成アナログ）、リポタンパク質、多糖、阻害剤、補助因子、ハプテン、細胞受容体、受容体リガンド、リポ多糖、糖タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、酵素、酵素基質、酵素産物、セカンドメッセンジャー、細胞代謝産物、ホルモン、薬物、合成有機分子、有機金属分子、トランキライザー、バルビツール酸塩、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、レクチン、組換え又は誘導タンパク質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、無機分子などがあるが、これらだけに限定されない。測定することができる活性としては、ホスホリラーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼ、トランスグルタミナーゼ、核酸損傷活性（ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｄａｍａｇｉｎｇ ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ）、トランスフェラーゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ、デヒドロゲナーゼ、グリコシダーゼ、リボソーム、タンパク質プロセシング酵素（例えば、プロテアーゼ、キナーゼ、タンパク質ホスファターゼ、ユビキチン－タンパク質リガーゼなど）、核酸プロセシング酵素（例えば、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、リガーゼ、ヘリカーゼ、テロメラーゼなど）、細胞受容体活性化（ｃｅｌｌｕｌａｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）、セカンドメッセンジャーシステム活性化（ｓｅｃｏｎｄ ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ ｓｙｓｔｅｍ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）などの活性があるが、これらだけに限定されない。

【０１０８】

本発明の一実施形態においては、発光、化学発光及び／又はレドックス活性物質（好ましくは、ＥＣＬ活性物質）を含んでいる可能性がある試料を、本発明のアッセイプレート又はアッセイプレートの１つ若しくは複数のウェルに導入し、試料からの電気化学又は発光シグナル（好ましくは、電気化学発光）を誘発させ、１つ又は複数のアッセイドメインからの電気化学又は発光シグナル（好ましくは、電気化学発光）を測定して、物質の量を測定し、かつ／又は物質を同定する。本発明の別の実施形態においては、発光、化学発光及び／又はレドックス活性物質（好ましくは、ＥＣＬ活性物質）を含有する試料を、本発明のアッセイプレート又はアッセイプレートの１つ若しくは複数のウェルに導入し、試料からの電気化学又は発光シグナル（好ましくは、電気化学発光）を誘発させ、１つ又は複数のアッセイドメインからの電気化学又は発光シグナル（好ましくは、電気化学発光）を測定して、物質からのシグナルの発生に影響を及ぼす物質、化学活性又は生物活性の存在（例えば、ＥＣＬ共反応物、水素イオン、消光剤、化学発光トリガー（ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ ｔｒｉｇｇｅｒ）などの存在、生成及び／又は消費）を測定する。本発明の別の実施形態においては、発光、化学発光及び／又はレドックス活性物質（好ま

しくは、ＥＣＬ活性物質）を標識として用いて、酵素基質、結合試薬などのアッセイ試薬のモニタリングが可能になる。分析物に特異的な標識結合試薬を用いることによって分析物を測定するアッセイ形式には、均一法と不均法がある。不均法には、溶液中の標識から固相／電極上の標識（及び／又は材料に結合した標識）を分離する洗浄ステップが含まれる。

【０１０９】

多種多様な材料が、電極誘導発光、特に電気化学発光を放出することが示され、本発明の方法、プレート、キット、システム及び機器と共に使用することができる。好ましい電気化学発光システムにおいて、ＥＣＬ活性材料及び／又は標識は、電気化学発光の放出後に再生され、電気化学発光実験中、繰り返して励起状態に励起され、かつ／又は誘発されて発光を放出することができる。例えば、１クラスのＥＣＬ活性材料は、ｉ）材料を酸化するステップと、ｉｉ）酸化された材料が強い還元剤によって還元されて励起状態の材料を生成するステップと、ｉｉｉ）励起状態から光子が放出されてＥＣＬ活性材料が再生されるステップとを含む機構によって機能すると考えられる。ステップ（ｉｉ）によって放出されるエネルギーが光子のエネルギー以上になるように、ＥＣＬ活性材料と強い還元剤との酸化還元電位差が十分あることが好ましい。類似の機構においては、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）を、ｉ）材料の還元、及びｉｉ）強い酸化剤による還元材料の酸化で置換することができる。いくつかの特に好ましいシステムにおいて、機構は、さらに、ＥＣＬ共反応物を酸化して強い還元剤を形成するステップ、又は同様に、ＥＣＬ共反応物を還元して強い酸化剤を形成するステップを含むと考えられる。

【０１１０】

好ましい発光材料及び標識としては、Ｒｕ、Ｏｓ及びＲｅの発光有機金属複合体などがある。いくつかの特に有用な材料は、ルテニウム及びオスミウムのポリピリジル複合体、特に、$ML^1L^2L^3$（式中、Ｍはルテニウム又はオスミウムであり、L^1、L^2及びL^3は各々ビピリジン、フェナントロリン、置換ビピリジン及び／又は置換フェナントロリンである）の構造を有する複合体である。本発明者らは、（その開示を参照により本明細書に援用する、２００１年６月２９日に出願され同時係属中の「非特異的結合特性の改善されたＥＣＬ標識、それを使用する方法、及びそれを含むキット（ＥＣＬ　Ｌａｂｅｌｓ　Ｈａｖｉｎｇ　Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　Ｎｏｎ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｕｓｉｎｇ　ａｎｄ　Ｋｉｔｓ　Ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｓａｍｅ）」と題する米国特許出願第０９／８９６，９７４号に記載されたように）負に帯電した基、好ましくはサルフェート基、最も好ましくはスルホネート基を含む置換基を与える置換ビピリジン又はフェナントロリンを加えることが、特に炭素、カーボン粒子、カーボンフィブリル、炭素複合材、カーボンフィブリル複合材及び／又はカーボンインクを含む電極への非特異的結合に対するそれらの耐性のために特に好ましいことを見出した。

【０１１１】

本発明は、本発明の電極を用いた検出方法にも関する。

【０１１２】

本発明の一態様は、（好ましくは、アッセイセル又はアッセイウェルのアッセイドメイン中の）電極上に固定された目的分析物を測定する方法に関する。一実施形態は、ｉ）例えば目的分析物を含む試料と電極を接触させることによって、好ましくはアッセイドメイン内で、電極に目的分析物を固定するステップと、ｉｉ）目的分析物を測定するステップとを含む。固定化は、好ましくは電極上の官能基との共有結合の形成によって、より好ましくは電極に固定された結合試薬との特異的結合相互作用の形成によって、最も好ましくは電極への受動吸着によって進行する。

【０１１３】

本発明の別の態様は、（好ましくは、アッセイセル又はアッセイウェルのアッセイドメイン中の）電極上に固定された生体材料に結合している目的分析物を測定する方法に関する。一実施形態は、ｉ）分析物を含む試料と生体材料を接触させるステップと、ｉｉ）分

析物及び生体材料を含む複合体を電極上に形成させるステップと、ｉｉ）目的分析物を測定するステップとを含む。生体材料は、好ましくは電極上の官能基との共有結合を介して、より好ましくは電極上に固定された捕捉試薬との特異的結合相互作用によって、最も好ましくは電極上への受動吸着によって電極上に固定されている。場合によっては、アッセイ方法には、電極上に生体材料を固定するステップも含まれる。この固定化ステップを、生体材料を試料と接触させるステップの前、ステップ中及び／又はステップ後に実施することができる。

【０１１４】

分析物を測定する上述の方法には、さらに、（好ましくは、電気化学発光を誘発させるのに適切な諸条件下、例えば、ＥＣＬ共反応物の存在下で）電気的エネルギー（例えば、電流又は電圧）を電極に適用するステップと、（例えば、分析物に関連する発光種、好ましくは電気化学発光種から）電極において誘発された発光（好ましくは、電気化学発光）を測定するステップとが含まれることが好ましい。ここで、発光シグナルは、存在する分析物の量に相関する。場合によっては、この方法は、ＥＣＬ共反応物を導入した後で発光を誘発させるステップを含むこともできる。発光種は、分析物自体でも、分析物に結合した発光種でもよい。このような結合には、ｉ）共有結合、ｉｉ）（例えば、分析物に対する標識抗体による）特異的結合相互作用、及び／又はｉｉｉ）非特異的結合相互作用などがある。このアッセイ方法は、さらに、例えば分析物を標識又は標識結合試薬などの標識試薬と接触又は混合することによって、標識と分析物の結合を形成するステップを含むことが好ましい。この結合の形成を、固定化ステップの前、ステップ中及び／又はステップ後に実施することができる。アッセイ方法は、電極に結合していない材料（例えば、分析物、生体材料、ブロッキング試薬、標識試薬など）を除去する１つ又は複数の洗浄ステップも含むことができる。

【０１１５】

本発明の別の態様は、（好ましくは、アッセイセル又はアッセイウェルのアッセイドメイン中の）電極上に固定された生体材料と結合相手の結合相互作用を測定する方法に関する。一実施形態には、ｉ）生体材料を生体材料の結合相手と接触させるステップと、ｉｉ）生体材料と結合相手を含む複合体を電極上に形成するステップと、ｉｉ）複合体を測定して結合相互作用を測定するステップとが含まれる。生体材料は、好ましくは電極上の官能基への共有結合を介して、より好ましくは電極上に固定された捕捉試薬との特異的結合相互作用によって、最も好ましくは電極上の受動吸着によって電極上に固定されている。場合によっては、このアッセイ方法には、電極上に生体材料を固定するステップも含まれる。この固定化ステップを、生体材料を結合相手と接触させるステップの前、ステップ中及び／又はステップ後に実施することができる。結合相互作用の測定は、ｉ）生体材料の量を測定すること、ｉｉ）結合相手の量を測定すること、及びｉｉｉ）結合相手に対する生体材料の親和性を測定することを含めて、ただしこれらだけに限定されない様々な用途に使用することができる。結合の程度が、例えば、阻害剤量又は阻害剤の阻害定数を示すように、アッセイ方法は、さらに、生体材料及び／又は結合相手を結合相互作用の阻害剤と接触させるステップを含むことができる。阻害アッセイを用いて、結合相互作用の阻害剤用化合物をスクリーニングすることもできる。

【０１１６】

結合相互作用を測定する上述の方法には、さらに、（好ましくは、電気化学発光を誘発させるのに適切な諸条件下、例えば、ＥＣＬ共反応物の存在下で）電気的エネルギー（例えば、電流又は電圧）を電極に適用するステップと、（例えば、結合相手に関連する発光種、好ましくは電気化学発光種から）電極において誘発された発光（好ましくは、電気化学発光）を測定するステップとが含まれることが好ましい。ここで、発光シグナルは、存在する結合相互作用数に相関する。場合によっては、この方法は、ＥＣＬ共反応物を導入した後で発光を誘発させるステップを含むこともできる。発光種は、結合相手自体でも、結合相手に結合した発光種でもよい。このような結合には、ｉ）共有結合、ｉｉ）（例えば、結合相手に対する標識抗体による）特異的結合相互作用、及び／又はｉｉｉ）非特異

的結合相互作用などがある。このアッセイ方法は、さらに、例えば結合相手を標識又は標識結合試薬などの標識試薬と接触又は混合することによって、標識と結合相手との結合を形成させるステップを含むことが好ましい。この結合の形成を、固定化ステップの前、ステップ中及び／又はステップ後に実施することができる。アッセイ方法は、電極に結合していない材料（例えば、結合相手、生体材料、ブロッキング試薬、標識試薬など）を除去する１つ又は複数の洗浄ステップも含むことができる。

【０１１７】

本発明の別の態様は、物質を改変する活性又はプロセスを測定する方法に関する。この方法には、活性を含む試料に物質をさらすステップ、又はプロセスが起こる条件に物質をさらすステップと、改変の程度を測定して活性又はプロセスを測定するステップとが含まれる。改変された物質及び／又は残留している未改変物質を本発明のアッセイ方法に従って（例えば、出発材料又は産物に特異的な標識抗体を用いることによって）選択的に測定することによって、改変の程度を測定することが好ましい。場合によっては、改変の程度が、例えば、阻害剤量又は阻害剤の阻害定数を示すように、活性又はプロセスの阻害剤の存在下で活性又はプロセスを実施する。阻害アッセイを用いて、結合相互作用の阻害剤用化合物をスクリーニングすることもでき、かつ／又は固定物質の結合相手を改変する活性又はプロセスを測定することもできる。

【０１１８】

一実施形態において、物質は（好ましくは、アッセイセル又はアッセイウェルのアッセイドメイン中の）電極上に固定され、改変活性又はプロセスに供され、分析されて改変の程度が決定される。別の実施形態において、物質は、改変活性又はプロセスに供され、電極に固定され、分析されて改変の程度が決定される。さらに別の実施形態において、細胞は、改変活性又はプロセスに供され、溶解され、生体膜又は細胞に由来する他の成分（例えば、タンパク質、核酸、セカンドメッセンジャー、細胞小器官、膜断片、膜小胞、膜ゴースト、膜タンパク質、膜脂質など）が電極上に固定され、分析されて改変の程度が決定される。測定可能である活性及びプロセスの例としては、（膜結合キナーゼの自己リン酸化を含めた）キナーゼ活性／リン酸化、ホスファターゼ活性／脱リン酸化、膜脂質組成又は配向の変化（例えば、アポトーシス中のホスファチジルセリンレベルの変化）、膜ホスファチジルイノシトールのリン酸化状態における加水分解又は変化、タンパク質のプレニル化又はミリストイル化、可溶性タンパク質及び／又は末梢膜タンパク質の生体膜への結合及び／又は遊離、生体膜間のタンパク質及び／又は脂質の移動（例えば、細胞小器官間及び／又は細胞小器官と細胞膜の間）などがある。

【０１１９】

物質を改変する活性又はプロセス（あるいは、活性又はプロセスの阻害剤）を測定する方法の一実施形態は、膜タンパク質の活性化の結果（例えば、物理的又は化学的環境の変化、膜電位の変化、タンパク質の凝集、膜受容体へのリガンドの結合などの結果として）起こる活性又はプロセスの測定に関する。例えば、膜タンパク質の活性化によって、タンパク質又は他の膜成分のリン酸化（リン酸化成分は、例えば、リンペプチド特異的抗体を用いて測定される）、ｉｉ）表在性膜タンパク質（ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ）、細胞質タンパク質などの可溶性細胞成分の隔離又は膜への結合（あるいは、遊離）（可溶性細胞成分の結合は、例えば、成分に特異的な抗体を用いて測定される）、ｉｉｉ）膜タンパク質のアップレギュレーション又はダウンレギュレーション（膜タンパク質は、例えば、モニターする特異的膜タンパク質に特異的な抗体を用いて測定される）などがもたらされることがある。

【０１２０】

本発明の別の態様は、アッセイモジュール、好ましくはアッセイプレート、より好ましくはマルチウェルアッセイプレートと、結合試薬、酵素、酵素基質及びアッセイを実施するのに有用な他の試薬からなる群から選択される少なくとも１つのアッセイ成分とを含む、アッセイ、好ましくは発光アッセイ、より好ましくは電極誘導発光アッセイ、最も好ましくは電気化学発光アッセイを実施するのに使用するキットに関する。例としては、ホー

ルセル、細胞表面抗原、細胞下粒子（例えば、細胞小器官又は膜断片）、ウイルス、プリオン、チリダニ又はその断片、ウイロイド、抗体、抗原、ハプテン、脂肪酸、核酸（及び合成アナログ）、タンパク質（及び合成アナログ）、リポタンパク質、多糖、リポ多糖、糖タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、酵素（例えば、ホスホリラーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼ、トランスグルタミナーゼ、トランスフェラーゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ、デヒドロゲナーゼ、グリコシダーゼ、タンパク質プロセシング酵素（例えば、プロテアーゼ、キナーゼ、タンパク質ホスファターゼ、ユビキチン－タンパク質リガーゼなど）、核酸プロセシング酵素（例えば、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、リガーゼ、ヘリカーゼ、テロメラーゼなど））、酵素基質（例えば、上述した酵素基質）、セカンドメッセンジャー、細胞代謝産物、ホルモン、薬物、トランキライザー、バルビツール酸塩、アルカロイド、ステロイド、ビタミン、アミノ酸、糖、レクチン、組換え又は誘導タンパク質、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、発光標識（好ましくは、電気化学発光標識）、電気化学発光共反応物、ｐＨ緩衝液、遮断薬、防腐剤、安定剤、洗浄剤、乾燥剤、吸湿剤などがあるが、これらだけに限定されない。このようなアッセイ試薬は、（好ましくは、発光標識、最も好ましくは電気化学発光標識で）標識されていてもいなくてもよい。本発明の一実施形態には、アッセイモジュール、好ましくはアッセイプレート、より好ましくはマルチウェルアッセイプレートと、（ａ）少なくとも１つの発光標識（好ましくは、電気化学発光標識）、（ｂ）少なくとも１つの電気化学発光共反応物）、（ｃ）１つ又は複数の結合試薬、（ｄ）ｐＨ緩衝液、（ｅ）１つ又は複数のブロッキング試薬、（ｆ）防腐剤、（ｇ）安定剤、（ｈ）酵素、（ｉ）洗浄剤、（ｊ）乾燥剤及び（ｋ）吸湿剤からなる群から選択される少なくとも１つのアッセイ成分とを含む、アッセイ、好ましくは発光アッセイ、より好ましくは電極誘導発光アッセイ、最も好ましくは電気化学発光アッセイを実施するのに使用されるキットが含まれる。

【０１２１】

キットは、アッセイモジュール、好ましくはアッセイプレートと、１つ以上、好ましくは２つ以上、より好ましくは３つ以上の容器に入ったアッセイ成分とを含むことが好ましい。

【０１２２】

アッセイモジュールは、マルチウェルプレートは、セクター中での電極誘導発光アッセイ（好ましくは、電気化学発光アッセイ）の実施に使用するようになされていることが好ましい。

【０１２３】

一実施形態によれば、キットには、１つ又は複数のプレートウェル中に、好ましくは乾燥した形で１つ又は複数のアッセイ成分が含まれる。

【０１２４】

一実施形態によれば、アッセイ成分は、別個の容器に入れられている。別の実施形態によれば、キットには、結合試薬及び安定剤を含む容器が含まれる。別の実施形態によれば、ウェル試薬には、結合試薬、安定剤が含まれ得る。キットでは、いかなる液体もウェル中に含まれないことが好ましい。

【０１２５】

好ましい一実施形態は、アッセイプレート、好ましくはマルチウェルアッセイプレートと、少なくとも１つの発光標識（好ましくは、電気化学発光標識）及び少なくとも１つの電気化学発光共反応物）からなる群から選択される少なくとも１つのアッセイ成分とを含む電極誘導発光アッセイ（好ましくは、電気化学発光アッセイ）を実施するのに使用するキットに関する。

【０１２６】

別の実施形態は、マルチウェルプレート及び少なくとも１つの電極誘導発光標識（好ましくは、電気化学発光標識）及び／又は少なくとも１つのバイオ試薬及び／又は少なくとも１つのブロッキング試薬（例えば、ＢＳＡ）を含むキットに関する。

【０１２７】

好ましい一実施形態によれば、キットには、抗体、抗体断片、タンパク質、酵素、酵素基質、阻害剤、補助因子、抗原、ハプテン、リポタンパク質、リポ糖、細胞、細胞下成分、細胞受容体、ウイルス、核酸、抗原、脂質、糖タンパク質、炭水化物、ペプチド、アミノ酸、ホルモン、タンパク質結合リガンド、薬物、発光標識（好ましくは、ＥＣＬ標識）又はそれらの組合せから選択されるプレート表面上に好ましくは固定された少なくとも１つのバイオ試薬が含まれる。

【０１２８】

別の好ましい実施形態によれば、キットには、固有のチロシンキナーゼ活性を有する１回膜貫通受容体、非チロシンキナーゼ膜貫通受容体（例えば、トランスフェリン受容体）、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）、ＧＰＣＲエフェクタータンパク質（例えば、アデニル酸シクラーゼ）、ホスホイノシチド（例えば、ホスファチジルイノシトール４，５二リン酸（PIP_2））、リン脂質又はスフィンゴ脂質組成物、同定（（ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、又は機能（ｆｕｎｃｔｉｏｎ）（すなわち、アポトーシス中のホスフォチジルセリン（ｐｈｏｓｐｈｏｔｉｄｙｌｓｅｒｉｎｅ）存在量の変化）、細胞小器官に結合したＧＴＰ加水分解酵素／グアニンヌクレオチド交換因子（ＧＥＦ）／ＧＴＰ加水分解酵素活性化タンパク質（ＧＡＰ）、サイトカイン／ケモカイン受容体、細胞接着分子（例えば、ＶＣＡＭ、インテグリン）、細胞質表在性膜タンパク質キナーゼ（ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｍｅｍｂｒａｎｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅｓ）（例えば、ｓｒｃ）、細胞内タンパク質キナーゼアダプタ／ドッキングタンパク質（例えば、インシュリン受容体基質１、ＧＲＢ２）、イオンチャネル（例えば、ニコチンアセチルコリン受容体、ＣＦＴＲなど）、受動輸送体（例えば、グルコース）、能動（ＡＴＰ駆動）輸送体、イオン連結輸送体（ｉｏｎ－ｌｉｎｋｅｄ ｔｒａｎｓｐｏｒｔｅｒ）（例えば、Ｎａ＋／グルコース）、グリコシルトランフェラーゼ（ｇｌｙｃｏｓｙｌｔｒａｎｆｅｒａｓｅ）／糖タンパク質修飾酵素、核膜断片、及び可溶性受容体から選択される活性タンパク質を含む、プレート表面に好ましくは固定された少なくとも１つの生体膜又はその成分が含まれる。

【０１２９】

キットは、タンパク質、核酸又はそれらの組合せで構成される固定試薬を含むことが好ましい。

【０１３０】

好ましい一実施形態によれば、複数のウェルには、少なくとも２つの異なるバイオ試薬が含まれる。例えば、ウェルは、異なるバイオ試薬を含む２つ以上のアッセイドメインを含むことができる。

【０１３１】

キットは、少なくとも１つの電気化学発光共反応物及び／又は少なくとも１つの電極誘導発光標識（好ましくは、電気化学発光標識）を含むことが好ましい。

【０１３２】

本発明の別の態様は、生物活性化合物を選択又は同定するための、場合によっては、このような生物活性化合物を適切な担体組成物に適切な用量で組み込むための改良方法及びシステムに関する。本発明には、好ましくは５０を超える、より好ましくは１００、より好ましくは５００、さらに好ましくは１，０００、最も好ましくは５，０００のスクリーニングが含まれる、好ましくはハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）によって、新しい薬物をスクリーニングするための本発明のアッセイ電極、キット及び／又は方法の使用が含まれる。特に好ましい実施形態によれば、スクリーニングには、１０，０００を超える、５０，０００を超える、１００，００を超える、５００，０００を超える及び／又は１，０００，０００を超える化合物が含まれる。

【０１３３】

本発明の一実施形態は、生物活性化合物を化合物ライブラリから選択又は同定する方法に関する。前記方法には、生物活性又は生化学活性について前記化合物ライブラリをスクリーニングすることが含まれる。前記スクリーニングには、本発明のアッセイ電極を用い

て、生物活性又は生化学活性について化合物ライブラリの分析を行うことが含まれる。

【０１３４】

この方法は、さらに、１つ又は複数の活性化合物を同定することを含むことが好ましい。

【０１３５】

この方法は、さらに、前記１つ又は複数の活性化合物のインビボでの生物学的利用能、毒性及び／又は生物活性の試験を含むことが好ましい。好ましい一実施形態によれば、この試験には、さらに、本発明のアッセイ電極を用いたスクリーニングが含まれる。

【０１３６】

この方法は、さらに、前記１つ又は複数の活性化合物のアナログを合成することを含むことが好ましい。好ましい一実施形態によれば、このアナログは、本発明のアッセイ電極を用いて生物学的利用能、生物活性及び／又は毒性についてスクリーニングされる。

【０１３７】

特に好ましい実施形態によれば、この方法は、さらに、ヒト及び／又は動物に投与するために１つ又は複数の化合物を薬物に処方することも含む。この処方は、１つ又は複数の活性化合物の薬物中の適切な量を決定すること、及びこの適切な量を１つ又は賦形剤又は担体と混合することを含むことが好ましい。賦形剤は、糖及び／又はデンプンを含むことが好ましい。

【０１３８】

本発明の別の実施形態は、生化学物質の１つ又は複数の複合混合物を分析してその中の複数の結合成分を測定する方法に関する。この方法は、

（ａ）前記混合物を、その上に固定された１つ又は複数の脂質／タンパク質層を含む１つ又は複数のアッセイ電極と、好ましくは電極誘導発光アッセイ（好ましくは、電気化学発光アッセイ）に適合したマルチウェルプレートに前記混合物を添加することによって接触させるステップであって、プレートのウェルがアッセイ電極を備えるステップと、

（ｂ）発光を誘発させるのに十分な電圧又は電流を電極に適用するステップと、

（ｃ）放出された発光を測定するステップとを含む。

【０１３９】

本発明の別の実施形態は、１つ又は複数のコンビナトリアル（生物学的及び／又は化学的）混合物の結果を分析してその中の複数の結合成分を測定する方法に関する。この方法は、

（ａ）好ましくは前記混合物を電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）アッセイに適合したマルチウェルプレート中に導入することによって、前記混合物を１つ又は複数のアッセイ電極に接触させるステップであって、前記プレートが１つ又は複数のアッセイ電極を備える複数のウェルを有するステップと、

（ｂ）発光を誘発させるのに十分な電圧又は電流を電極に適用するステップと、

（ｃ）放出された発光を測定するステップとを含む。

【０１４０】

本発明の別の実施形態は、多数の同時アッセイにおいて試料中の単一の生化学物質を測定する方法に関する。この方法は、

（ａ）好ましくは電極誘導発光（好ましくは、電気化学発光）アッセイに適合したマルチウェルプレート中に前記試料を導入することによって、前記試料をアッセイ電極と接触させるステップであって、前記プレートが１つ又は複数のアッセイ電極を備える複数のウェルを有するステップと、

（ｂ）発光を誘発させるのに十分な電圧又は電流を電極に適用するステップと、

（ｃ）放出された発光を測定するステップとを含む。

【０１４１】

本発明のさらなる実施形態は、創薬方法に関する。この方法は、

（ａ）多数の試験用化合物を選択するステップと、

（ｂ）（上述したマルチウェルプレート及び／又は装置のどれか１つを用いて）前記多

数の化合物を生物活性についてスクリーニングして、１つ又は複数の生物活性化合物を見出すステップと、

（ｃ）前記１つ又は複数の生物活性化合物を改変して毒性を低減し、かつ／又は生物活性を高め、それによって１つ又は複数の改変生物活性化合物を形成するステップとを含む。

【０１４２】

この方法は、さらに、（上述した本発明のアッセイ電極を用いて）前記改変生物活性化合物を生物活性及び／又は毒性についてスクリーニングすることを含むことが好ましい。

【０１４３】

この方法は、さらに、１つ又は複数の前記改変生物活性化合物の適切な用量を決定することを含むことが好ましい。この方法は、さらに、このような用量を糖、デンプンなどの適切な担体に組み込んで固体（例えば、丸剤又は錠剤）又は液体の薬物を形成することを含むことが好ましい。

【０１４４】

本発明のアッセイ電極、アッセイモジュール及び方法を、様々なスクリーニング及び／又は創薬方法に組み込みかつ／又はその中で使用することが有利である。このようなスクリーニング及び／又は創薬方法としては、Ｂｌａｋｅの米国特許第５，５６５，３２５号、Ｃｈｅｎ他の米国特許第５，５９３，１３５号、Ｔｈａｓｔｒｕｐ他の米国特許第５，５２１，１３５号、Ａｇｒａｆｉｏｔｉｓ他の米国特許第５，６８４，７１１号、Ｄｏｗｅｒ他の米国特許第５，６３９，６０３号、Ａｓｈｂｙ他の米国特許第５，５６９，５８８号、米国特許第５，５４１，０６１号、米国特許第５，５７４，６５６号、及びＰｅｔｅｒｓｏｎ他の米国特許第５，７８３，４３１号に開示された方法などがある。

【０１４５】

別の実施形態によれば、本発明には、さらに、薬物に付随する有害作用を同定すること、及びその有害作用に関する情報をデータベースに保存することが含まれる。参照により本明細書に援用するＣｌａｓｓｅｎの米国特許第６，２１９，６７４号を参照されたい。

【０１４６】

本発明の別の態様は、本発明の方法を用いて調製される改良された生物活性化合物及び／又は薬物に関する。

【０１４７】

（実施例）

以下の実施例は、本発明の範囲内にある電極、プレート、キット及び方法のいくつかを説明するものである。これらの実施例が、決して本発明を限定するものと考えるべきでないことは言うまでもない。本発明に関する多数の変更形態及び改変形態が、当業者によって不必要な実験をすることなくなされ得る。

【実施例１】

【０１４８】

スクリーン印刷電極を有するマルチウェルアッセイプレートの作製

多層プレートの底部を、０．００７”厚みのＭｙｌａｒポリエステルシート上に電極及び電気接点をスクリーン印刷することによって調製した。Ｍｙｌａｒシートを、まずCO_2レーザで切断して、導電性スルーホール（すなわち、その後導電性インクを充填して導電性にされる穴）、及びプレート底部をプレート上部と整列させるために使用した整列ホールを形成した。適切にパターン形成された銀インク層（Ａｃｈｅｓｏｎ　４７９ｓｓ）及びカーボンインク上層（Ａｃｈｅｓｏｎ　４０７ｃ）をスクリーン印刷して、Ｍｙｌａｒシートの底部に電気接点を形成させた。カーボンインク層を銀インク層よりもわずかに（０．０３ｃｍ（０．０１インチ））大きくして銀フィルムの縁部が露出するのを防止した。３層のカーボンインクを用いて確実に銀が露出しないようにした以外は同様にしてＭｙｌａｒフィルム上部に作用電極及び対電極を形成させた。導電性スルーホールは、これらのスクリーン印刷ステップ中に導電性インクで充たされた。続いて、誘電体インクを電極層上に印刷して、作用電極の活性露出表面を画成した。一般に、９つのプレートの底部

を、１８”×１２”のＭｙｌａｒシート上に同時に印刷した。スクリーン印刷ステップ中の典型的な見当合わせ許容誤差（ｒｅｇｉｓｔｒａｔｉｏｎａｌ　ｔｏｌｅｒａｎｃｅ）は、基板上部で＋／－０．０１８～０．０２０ｃｍ（０．００７～０．００８インチ）であり、底部で＋／－０．０３ｃｍ（０．０１０インチ）であった。印刷された対電極帯と作用電極帯の間隔を＞０．０２５ｃｍ（０．０１０インチ）に維持して短絡が形成されるのを防止した。場合によっては、パターン形成されたプレート底部を、大面積の平面電極で改変されたプラズマチャンバ（Ｓｅｒｉｅｓ　Ｂ、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｐｌａｓｍａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｓｔ．Ｐｅｔｅｒｓｂｕｒｇ、ＦＬ）中で酸素プラズマ（２０００Ｗ、２００ｍｔｏｒｒ）で５分間処理して、作用電極をコンディショニングした。

【０１４９】

上述したプレート底部及び射出成形プレート上部を用いてマルチウェルアッセイプレートを組み立てた。プレート上部の寸法は、生体分子スクリーニング学会制定の業界標準に適合した。プレート上部は、黒色プラスチック（黒色顔料を充填したポリスチレン）又は白色プラスチック（二酸化チタンを充填したポリスチレン）のどちらかでできていた。プレート上部底面を、ダイで打ち抜かれた両面テープ（０．０５ｍｍ（２ミル）のアクリル感圧接着剤で両面を被覆された０．０２ｍｍ（１ミル）ＰＥＴ）に接触させて、プレート上部をプレート底部に密着させた。プレート上部の穴よりもわずかに大きな穴を形成するようにテープを切断した。プレート底部を（レーザカット整列ホールを用いて）Ｘ－Ｙテーブル上のアラインメントピン上に固定した。プレート底部をプレート上部に光学的に整列させ、次いで、空気圧プレス（１８２ｋｇ（４００ポンド）、１０秒）によって封着させた。アラインメントを十分正確に実施して、露出作用電極をウェル内の中央に置いた（９６ウェルプレートの場合＋／－０．０５０ｃｍ（０．０２０インチ）及び３８４ウェルプレートの場合＋／－０．０３８ｃｍ（０．０１５インチ））。これらの許容誤差によって、作用電極の露出領域が確実にウェル内にあり、露出した対電極表面が作用電極の両面に確実に存在した。いくつかの例においては、アッセイ試薬をプレート底部に付着させ乾燥させてからプレートを組み立てた。

【０１５０】

上述した手順に従って様々なタイプのマルチウェルアッセイプレートを準備した。参照のため、以下の例において数個の特定のプレート設計をより詳細に説明する。４×４ウェルの６つの正方形セクターに区分けされた９６ウェルプレートであるプレートＢを、図１０Ａに示す部品及びパターンを用いて作製し、黒色プレート上部を付けた。４×４ウェルの６つの正方形セクターに区分けされた９６ウェルプレートであるプレートＣを、（各ウェル内の作用電極表面上の４つの孤立した「流体封じ込め領域」が露出するように、プレートＣ中の誘電体層がパターン形成されている以外は、）図１０に示すように、部品及びパターン並びに黒色プレート上部を用いて作製した（図１０Ｃ及び１０Ｄ参照）。プレートＤは、各ウェル内の作用電極上の７つの孤立した「流体封じ込め領域」が露出するように誘電体層がパターン形成されている以外は、プレートＣとほぼ同じであった。プレートＥは、各ウェル内の作用電極上の１０個の孤立した「流体封じ込め領域」が露出するように誘電体層がパターン形成されている以外は、プレートＣとほぼ同じであった。プレートＦ、Ｇ及びＨは、正方形の２４個のウェルを有する以外はプレートＣと類似しており（プレートは４ウェルの６つの正方形セクターに区分されている）、誘電体層はそれぞれ２５、６４又は１００個の流体封じ込め領域を露出するようにパターン形成された。図１０Ａにおいて、プレートＢの詳細図Ａ、Ｂ、Ｃ及びＤは、それぞれ（プレートの１セクターにおける）印刷接触層、スルーホールを含むＭｙｌａｒフィルム、印刷電極層、及び印刷誘電体層を示す。

【実施例２】

【０１５１】

ＥＣＬ測定

個々の正方形セクターに電気的に接触するように設計された機器でプレートを読み取った。セクターから放出されたＥＣＬを画像化するために用いた冷却ＣＣＤカメラ（Ｖｅｒ

ｓＡｒｒａｙ：１３００Ｆ、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）に連結された（直径が４．１”のフロントエレメントを有する）テレセントリックレンズを用いて、機器と電気的に接触しているセクターの位置を合わせた。カメラには、寸法がほぼ２．６ｃｍ×２．６ｃｍで１３４０×１３００ピクセルのＣＣＤチップを使用した。ピクセルサイズは、０．０２ｍｍ×０．０２２ｍｍであった。光路中に光学的バンドパスフィルターを用いて、ルテニウムートリスービピリジンの放出プロファイルに一致する光を選択した。６つのセクターすべてを読み取りできるように平行移動テーブルを用いてプレートをテレセントリックレンズの下に平行移動させた。画像分析ソフトウエアを用いて、ウェル又はウェル内のアッセイドメインを確認し、特定のウェル又はドメインからのＥＣＬを定量した。特に示さない限り、およそ２～５Ｖで３秒間の線形電圧スキャンを用いてスクリーン印刷炭素作用電極を有するプレートからＥＣＬを誘発させた。ＥＣＬは、（バックグラウンド光レベル及び検出器オフセットが補正された後）電圧スキャン期間にわたって測定された全積分光シグナルとして記録される。

【実施例３】

【０１５２】

ＭＤＭＷプレートの１つのウェルにおける複数の酵素活性を測定するＥＣＬアッセイ

多数の核酸プロセシング酵素が、核酸合成（例えば、ポリメラーゼ又はリガーゼ）活性とヌクレアーゼ活性の両方を有する。一例は、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ（ＲＤＤＰ）活性とリボヌクレアーゼＨ活性の両方を有する酵素であるＨＩＶ逆転写酵素（ＲＴ）である。以下の例に、ＭＤＭＷプレートの１つのウェル中で両方のＨＩＶ　ＲＴ活性を測定するＥＣＬアッセイを示す。

【０１５３】

このアッセイ形式を図１２に示す。酵素基質は、ＲＮＡ標的配列の３’末端に結合した（ＴＡＧホスホアミダイト、ＩＧＥＮ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．を用いて）５’標識されたＤＮＡプライマーである。ＲＤＤＰ活性によって、ＤＮＡプライマーが伸長されてＲＮＡ配列の相補コピーが作られる。リボヌクレアーゼＨ活性によって、ＲＮＡ－ＤＮＡ二重鎖中のＲＮＡが選択的に加水分解される。リボヌクレアーゼ活性は、ＤＮＡプライマー配列に相補的である固定プローブ（３’－Ｂ１３）に標識ＤＮＡ産物をハイブリダイズすることによって測定される（したがって、リボヌクレアーゼ触媒に曝されたＤＮＡプライマーが測定される）。ＲＤＤＰ活性は、伸長されたＤＮＡ配列に相補的である固定プローブ（５’－Ｂ１３）に標識ＤＮＡ産物をハイブリダイズすることによって測定される（したがって、ＤＮＡプライマーのＲＤＤＰ伸長が測定される）。

【０１５４】

電極誘導化学発光測定用に構成され、各ウェルの作用電極表面に露出した４つの流体封じ込め領域を有するＭＤＭＷプレート上でアッセイを実施した（実施例１のプレートＣ）。２つのプローブ（３’－Ｂ１３及び５’－Ｂ１３）をビオチン標識して固定化を促進させた。予め各プローブをアビジンに結合させた。（１ｐｍｏｌのプローブを含有する１００～１０００ｎＬの）流体封じ込め領域上に非接触マイクロディスペンサ（ＢｉｏＤｏｔ又はＣａｒｔｅｓｉａｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いてアビジンープローブ複合体を微量分注し、溶液を乾燥させて、各プローブを各ウェルの１つの流体封じ込め領域に固定することによって、アッセイドメインを形成した。２つの追加の流体封じ込め領域を対照ドメインとして用いた（１つをアビジンで被覆し、もう１つは未処理であった）。プレートをＢＳＡ含有溶液でブロックし、洗浄してから使用した。

【０１５５】

プレートのウェルに、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０、４０ｍＭ ＫＣｌ、１０ｍＭ $MgCl_2$、０．０２５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、２．５ｍＭ ＤＴＴを含有する緩衝液１００ｕＬに希釈したｄＮＴＰ １ｎｍｏｌ、基質５ｐｍｏｌ、酵素３ｐｍｏｌ、及び可変量のＲＴ阻害剤を添加することによって、アッセイを実施した。反応混合物を２０分間２２℃でインキュベートし、次いで、ＥＤＴＡを添加してクエンチした。プレートをさらに2時間インキュベートしてハイブリダイゼーション反応を進行させた。トリプロ

ピルアミンを添加し（ＯＲＩＧＥＮアッセイ緩衝液、ＩＧＥＮ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、産物を電気化学発光測定によって分析した。（酵素の前にＥＤＴＡを添加したウェルにおいて測定された）アッセイバックグラウンドを減算してＥＣＬシグナルを補正した。図１３Ａ～Ｂから、阻害剤アウリントリカルボン酸（ＡＴＡ；ＤｕＰｏｎｔ）がリボヌクレアーゼＨ（図１３Ｂ）とＲＤＤＰ活性（図１３Ａ）の両方を阻害することがわかる。これに対し、１２５ｕＭ ｄｄＣＴＰ（連鎖停止剤）は、ＲＤＤＰ活性を完全に阻害したが、リボヌクレアーゼＨ活性には効果を及ぼさなかった（データ示さず）。

【実施例４】

【０１５６】

呼吸器疾患抗原のパネルの検出

ＥＣＬ測定用に構成され、各ウェル中に露出した作用電極表面上に４つの流体封じ込め領域を有するＭＤＭＷプレート（実施例１のプレートＣ）を、４つの呼吸器疾患に特異的な抗体、すなわち、インフルエンザＡ、インフルエンザＢ、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、及びＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ Ｐｙｏｇｅｎｅｓ（Ｓｔｒｅｐ Ａ）で被覆した。各抗体で被覆された１つのアッセイドメインを各ウェルが含むように、捕捉抗体溶液（リン酸緩衝食塩水ＰＢＳ中５０ｕｇ／ｍｌ）を、ＢｉｏＤｏｔディスペンサを用いてウェル内の流体封じ込め領域に分注した（２５０ｎｌ／スポット）。溶液を乾燥させ、５％ＢＳＡ溶液を添加し（２００ｕｌ／ウェル）、プレートを終夜冷蔵した。プレートをＰＢＳで洗浄してから使用した（４×２５０ｕｌ／ウェル）。

【０１５７】

市販供給元から入手した精製ウイルス又は細菌溶液をそれぞれ１０００倍又は１００倍にＰＢＳで希釈して抗原溶液を調製した。希釈後の概略の力価は、インフルエンザＡが２．３×10^{11}ウイルス粒子／ｍｌであり、インフルエンザＢが３２０ＨＡ単位／０．０５ｍｌ又は０．１ｍｇ／ｍｌタンパク質であり、ＲＳＶが６．６×10^{8}ウイルス粒子／ｍｌであり、Ｓｔｒｅｐ Ａが１．５×10^{4}ＣＦＵ／ｍｌであった。

【０１５８】

アッセイを実施するために、各希釈抗原溶液１００ｕｌを、０．２％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳ ４５０ｕｌと混合した。これらの溶液７５ｕｌを、適切な標識抗体溶液（Ｒｕ（ｂｐｙ）$_3$のスルホン化誘導体）の溶液１０ｕｌと最終濃度が３ｕｇ／ｍｌ標識抗体となるように混合した。この溶液５０ｕｌを、洗浄したプレートの個々のウェルに添加し、８分間インキュベートした。次いで、プレートをＰＢＳで洗浄し（４×２００ｕｌ／ウェル）、ＯＲＩＧＥＮアッセイ緩衝液１００ｕｌ（ＩＧＥＮ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を各ウェルに添加した。次いで、電気化学発光検出によってプレートを分析した。図１４から、適切なアッセイドメインにおいて各抗原が選択的に測定されたことがわかる。

【実施例５】

【０１５９】

ＭＤＭＷプレートのウェルにおけるチロシンキナーゼ及びセリン／トレオニンキナーゼ活性の測定

この実施例では、ＥＣＬ測定用に構成され、各ウェル中に露出した作用電極表面上に４つの流体封じ込め領域を有するＭＤＭＷプレート（実施例１のプレートＣ）を用いた。以下の溶液、すなわち、０．００７５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＰＢＳ緩衝液に希釈した１ｍｇ／ｍｌポリ－Ｇｌｕ：Ｔｙｒ（４：１）（ＰＧＴ）、０．００７５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＰＢＳ緩衝液に希釈した１ｍｇ／ｍｌミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）、０．００７５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＰＢＳ緩衝液に希釈した０．５ｍｇ／ｍｌアビジン、５％ＢＳＡのＰＢＳ溶液のうち１つの２５０ｎＬを各流体封じ込め領域に入れた。次いで、プレートを終夜乾燥させ、５％ＢＳＡ溶液中４℃で２日間ブロックした。プレートを洗浄して遮断薬を除去したから使用した。

【０１６０】

ＰＧＴをリン酸化する場合（チロシンキナーゼアッセイ）０．１ｍＵ／μｌのｃ－ＳＲ

Ｃを用い、ＭＢＰをリン酸化する場合（トレオニンキナーゼ）１５ｐｇ／μｌのＥＲＫ－１を用いた。アビジン被覆ドメインの捕捉効率を、ビオチン及びＲｕ（ｂｐｙ）３のスルホン化体で標識されたウシＩｇＧの結合を測定して決定した。

【０１６１】

各スポット（ＰＧＴ、ＭＢＰ、アビジン及びＢＳＡ）を、キナーゼ産物に対する標識（$Ru(bpy)_3$のスルホン化誘導体）抗体（抗ホスホチロシン及び抗ホスホ－ＭＢＰ（あるいは、未標識１次抗体及び標識２次抗体）の存在下で各酵素／分析物の溶液（並びに酵素と分析物の混合物）に暴露した。プレートをインキュベートして酵素反応及び結合反応を進行させた後、ＴＰＡ含有緩衝液を添加して、プレートをＥＣＬによって分析した（洗浄は不要であった）。酵素／分析物の非存在下で測定されたバックグラウンドを減算して、記録されたシグナルを補正した。各ポイントには、バックグラウンドシグナルに対して平均４つの測定値が含まれ、特異的シグナルに対して１２個の測定値が含まれる。図１５の表に、この実験結果を要約する。

【０１６２】

ＰＧＴドメインのみが、チロシンキナーゼｓｒｃの存在下で高いシグナルを示した。予想したように、ＭＰＢは、ＥＲＫ－１の存在下で高いシグナルが示したが、ＳＲＣの存在下でも高いシグナルが得られた。これはおそらく、ＭＰＢ中にいくつかのチロシンが存在し、また、ＳＲＣと抗ホスホチロシン抗体の両方が比較的非特異的な性質を有するためと思われる。アビジンドメインによって、ビオチン化分析物の存在下で良好なシグナルが得られ、アビジンドメインはキナーゼに対する基質として作用しなかった。この結果から、例えば、試験しようとするキナーゼを粗製試料から捕捉する（場合によっては、精製する）ための結合ドメインを含むことの有用性が実証される。ＢＳＡスポットでは、分析物／酵素の存在下で有意なシグナルが得られず、遮断薬がアッセイ試薬と非特異的反応を示さなかったことがわかる。

【実施例６】

【０１６３】

ＭＤＭＷプレートの検出限界の評価

この実施例において、出願人らは、結合ドメイン面積の関数として、ビオチン及びＲｕ（ｂｐｙ）３のスルホン化誘導体で標識されたウシＩｇＧ（タンパク質１つ当たり約２．３標識）のＥＣＬ測定の検出限界を測定した。結合ドメインを、電極の１つ又は複数の露出領域（流体封じ込め領域）上にアビジンを被覆することによって（電極表面にアビジン溶液を微量分注し、乾燥させることによって）形成させた。以下の５つのプレートタイプを準備した。

標準９６：アビジンで被覆された単一の大きな結合ドメインを有する実施例１のプレートタイプＢ。

４－スポット－１：３つがアビジンで被覆されて結合ドメインを形成している４つの小さな流体封じ込め領域を有する実施例１のプレートタイプＣ。

４－スポット－３：１つのみがアビジンで被覆されて結合ドメインを形成している４つの小さな流体封じ込め領域を有する実施例１のプレートタイプＣ。

７－スポット－１：３つがアビジンで被覆されて結合ドメインを形成している７つのより小さな流体封じ込め領域を有する実施例１のプレートタイプＤ。

７－スポット－３：１つのみがアビジンで被覆されて結合ドメインを形成している７つのより小さな流体封じ込め領域を有する実施例１のプレートタイプＤ。

【０１６４】

標準のブロッキング及び洗浄操作の後、体積５０マイクロリットルの一連のタグ－ＩｇＧ－ビオチン希釈液を、２時間インキュベートし断続的に振とうさせながら分析した。２．５～４．５ボルトで５秒間スキャンしてプレートを読み取った。図１６に、未補正データの両対数プロットを示す。驚くべきことに、標準形式よりもマルチアレイ形式の方が、実際に、検出限界がかなり良好である。各プレートタイプに対して計算された（標準９６プレートに対する）相対検出限界は、標準９６（１．０）、４－スポット－１（４．２）

、４－スポット－３（１．４）、７－スポット－１（４．４）、７－スポット－３（２．１）であった。これは、ほとんどのタグが作用電極スポットにおいて捕捉される場合に予測されたものである。スポットが小さくなるにつれ、放出される特定の光はすべて一定であるが、バックグラウンドシグナルは面積と共に減少するはずである。検出限界を超えるすべての標準物質を平均すると、４スポットのうち１つがスポットされたシグナルは、３スポットがスポットされたときの平均シグナルの２．７倍の高さである。これは、タグ付き分子のほとんど（約９０％）が単一のスポットに捕捉されていることを示している。この実施例によって、小さなアッセイドメインを有するＭＤＭＷプレートにおけるアッセイが、従来の単一のドメインプレートにおけるアッセイよりも同等以上の性能を有し得ることが実証される。

【実施例７】

【０１６５】

ＭＤＭＷプレートの複数の分析物のイムノアッセイ

４種の異なるサイトカイン－インターロイキン１β（ＩＬ－１β）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、インターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）及び腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）－のサンドイッチイムノアッセイを、実施例１のプレートＣに対して記載した設計及び手順に従って作製されたプレートのウェルにおいて、同時に実施した。各ウェル内の流体封じ込め領域上に抗体溶液を微量分注することによって別個のアッセイドメイン中に（目的分析物の１つにそれぞれ選択的である）４つの捕捉抗体をパターン形成させ（領域１つ当たり１つの抗体）、作用電極表面に抗体を吸着させた。（ＩＬ－１β及びＴＮＦ－αの場合３２ｕｇ／ｍＬ、ＩＬ－６及びＩＦＮ－γの場合６４ｕｇ／ｍＬの濃度で）抗体を含有する溶液（０．２５ｕＬ）及び０．１％ＢＳＡのリン酸緩衝食塩水溶液を、ソレノイドバルブ制御マイクロディスペンサ（Ｂｉｏｄｏｔ　Ｄｉｓｐｅｎｓｏｒ、Ｃａｒｔｅｓｉａｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて流体封じ込め領域上に分注し、蒸発乾燥させた。この体積の抗体は、流体封じ込め領域内の露出電極表面全体に拡散するのに十分であるが、誘電体層によって形成される境界を超えて拡散しないのに十分な少なさであった。作用電極上の抗体溶液を乾燥後、プレート上部を取り付け、５％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有するリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）溶液をウェルに充填することによって、余分な未結合抗体を取り除いた（及び被覆されていない表面をブロックした）。プレートをブロッキング溶液と共に終夜４℃でインキュベートし、次いで、ＰＢＳで洗浄した。

【０１６６】

アッセイを、ｉ）試料０．０２ｍＬをウェルに添加し、プレート振とう機上で１時間インキュベートするステップと、ｉｉ）ウェルをＰＢＳで洗浄するステップと、ｉｉｉ）４つの目的分析物に対する４つの（ＮＨＳエステル１で標識された）検出抗体各２，０００ｎｇ／ｍＬを含有する溶液０．０２ｍＬを添加し、プレート振とう機上で１時間インキュベートするステップと、ｉｖ）ＰＢＳで洗浄するステップと、ｖ）トリプロピルアミンを含有するリン酸緩衝液（ＯＲＩＧＥＮアッセイ緩衝液、ＩＧＥＮ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）溶液０．１ｍＬを導入するステップと、ｖｉ）ＥＣＬを測定するステップとによって実施した。図１７Ａ～Ｄは、マルチウェルアッセイプレートの単一のウェルにおいて単一の試料中の目的分析物の各々を独立に測定可能であることを示している。図は、各アッセイドメインから放出されたＥＣＬを、各分析物の濃度の関数として示している。特定の分析物を導入すると、分析物に対する捕捉抗体を有するアッセイドメインでは（分析物の非存在下で測定されたバックグラウンドシグナルに対して）分析物濃度と共にＥＣＬが直線的に増加したが、他の分析物に対する抗体を有するアッセイドメインにおけるＥＣＬは影響を受けなかった。図１８に、４つの分析物の混合物を含有する溶液を分析するために用いたウェルのセクターから放出されたＥＣＬのＣＣＤ画像を示す。強調表示したウェルは、４つのアッセイドメインの配置を示すために注釈が付けられている。この特定のウェルを、ＩＬ－１β及びＴＮＦ－αをそれぞれ２５０ｐｇ／ｍＬ含み、ＩＬ－６及びＩＦＮ－γをそれぞれ８ｐｇ／ｍＬ含む試料を分析するために使用した。

【実施例８】
【０１６７】
全ＥＧＦ受容体及び自己リン酸化ＥＧＦ受容体の多重アッセイ
この実施例では、ＭＤＭＷプレートの１つのウェルにおいて全（リン酸化及び非リン酸化）ＥＧＦ受容体（Ｔ－ＥＧＦＲ）及びリン酸化ＥＧＦ受容体（Ｐ－ＥＧＦＲ）を測定するＥＣＬアッセイを示す。
【０１６８】
多重用溶解物の調製
１．Ａ－４３１細胞を１５０ｍｍ組織培養皿で培養し、血清を終夜飢餓状態においた（１％ペニシリン－ストレプトマイシン及び１％ピルビン酸ナトリウムを補充したＤＭＥＭ）。
２．無血清培地で２回すすいだ後、１枚の皿に、無血清培地中２００ｎＭ　ＥＧＦで１５分間室温で刺激を与えた。刺激を与えないプレートには、無血清培地のみを加えた。
３．細胞を２体積のＰＢＳですすいだ。
４．改変ＲＩＰＡ緩衝液（アッセイ初期に添加した新しいオルトバナジン酸ナトリウム）２ｍｌを皿に添加した。ＲＩＰＡ緩衝液には、緩衝液１０ｍＬ当たり１錠の新しいプロテアーゼ阻害錠剤を含む水中に、１ｍＭ純粋オルトバナジン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、６ｍＭデオキシコレート、０．５％ＮＰ４０が含まれていた）。細胞をＲＩＰＡと共に１０分間氷上でインキュベートした。
５．上清を収集し、Ｐｉｅｒｃｅ　ＢＣＡタンパク質アッセイによって定量した。
【０１６９】
多重アッセイの手順
１．（ＥＧＦＲの細胞質ドメインに特異的な）Ｔ－ＥＧＦＲのビオチン標識抗体及びＰ－ＥＧＦＲ（抗ホスホチロシン）を、予め１当量のアビジンと結合させ（１時間）、ＭＤＭＷプレート（実施例１のプレートＣ）の各ウェルにおける４つの流体封じ込め領域のうちの２つに分注して（領域１つ当たり１つの抗体、０．５ｐｍｏｌ／領域０．２５ｕＬ）付着させた。残り２つの流体封じ込め領域を、非特異的結合及び交差反応の対照として用いた。１つの領域は、アビジンのみで被覆された。他の領域は、露出したままであったが、最終的にＢＳＡでブロックした。
２．抗体を乾燥させた。次いで、ウェル１つ当たり２００μｌの５％ＢＳＡ水溶液で１時間室温でウェルをブロックした。
３．プレートをdH_2Oで４回洗浄した。
４．溶解物５０μｇ／ウェルを９６ウェルプレートの各ウェルに添加し、１時間断続的に振とうさせた。
５．プレートをdH_2Oで４回洗浄した。
６．Ｓｕｌｆｏ－Ｔａｇ（商標）標識α－ＥＧＦＲ抗体（３３ｎＭ５０ｕＬ）を添加し、結合反応を１時間室温で振とうさせながら進めた。プレートをdH_2Oで４回洗浄した。
７．４００ｍＭ　ｇｌｙ－ｇｌｙアッセイ緩衝液を含むウェル１つ当たり１００μｌの１００ｍＭ　ＴＰＡをＥＣＬ分析直前に添加した。
８．ＥＣＬ検出によってプレートを分析した。
【０１７０】
以下の表は、刺激を与えた細胞及び刺激を与えない細胞からの溶解物をＴ－ＥＧＦＲ及びＰ－ＥＧＦＲアッセイして測定したＥＣＬシグナルを比較したものである。予想したように、実験の経過と共に、Ｔ－ＥＧＦＲレベルは刺激によってさほど変化しないが、Ｐ－ＥＧＦＲは大きく増加することが認められた。

【表１】

	分析物	
試料	Ｔ－ＥＧＦＲ	Ｐ－ＥＧＦＲ
非刺激	２４，２００	５７
刺激	２３，５４５	１２２

【実施例９】

【０１７１】

自己リン酸化及び非リン酸化ＥＧＦ受容体を検出するための多重アッセイ

この実施例では、非リン酸化ＥＧＦ受容体とチロシン１１７３がリン酸化されているＥＧＦ受容体との両方をＭＤＭＷプレートの単一のウェルにおいて測定するＥＣＬアッセイを示す。

【０１７２】

別個の細胞皿に０．２ｎＭ、５ｎＭ及び２００ｎＭ　ＥＧＦで刺激を与えた以外は実施例８に記載したようにして、Ａ－４３１細胞溶解物を調製した。

【０１７３】

多重アッセイの手順

１．チロシン１１７３が自己リン酸化されているＥＧＦ受容体に特異的な抗体（ｐＹ１１７３）及びチロシン１１７３がリン酸化されていないＥＧＦ受容体に特異的な抗体（Ｙ１１７３）を、ＭＤＭＷプレート（実施例１のプレートＣ）の各ウェルにおける４つの流体封じ込め領域のうち２つに微量分注し（領域１つ当たり１つの抗体、０．２ｐｍｏｌ／領域０．２５ｕＬ）、受動吸着させて付着させた。残り２つの流体封じ込め領域を、非特異的結合及び交差反応の対照として用いた。これらの領域は露出したままであったが、最終的にＢＳＡでブロックした。

２．抗体を終夜乾燥させた。次いで、ウェル１つ当たり２００μｌの５％ＢＳＡ水溶液で１時間室温でウェルをブロックした。

３．プレートをＰＢＳで洗浄した。

４．溶解物５μｇ／ウェルを９６ウェルプレートの各ウェルに添加し、プレートを３時間断続的に振とうさせた。

５．プレートをＰＢＳで洗浄した。

６．受容体の細胞外ドメインに対するＳｕｌｆｏ－ＴＡＧ標識α－ＥＧＦＲ抗体（３３ｎＭ溶液５０ｕＬ）を添加し、結合反応を１時間室温で振とうさせながら進めた。プレートをＰＢＳで４回洗浄した。

７．４００ｍＭ　ｇｌｙ－ｇｌｙアッセイ緩衝液を含む１００ｍＭ　ＴＰＡを、ＥＣＬ分析直前にウェル１つ当たり１５０μｌ添加した。

８．Ｓｅｃｔｏｒ　ＨＴＳ（商標）プレートリーダー（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ）を用いたＥＣＬ検出によってプレートを分析した。

【０１７４】

図１９Ａ～Ｄは、ＥＧＦ受容体の１１７３位のチロシンの自己リン酸化量を、マルチウェルアッセイプレートの単一ウェルにおいて制御し定量できることを示している。図１９Ａの概略図は、同じウェルにおけるｐＹ１１７３及びＹ１１７３抗体の２つのはすむかいの流体封じ込め領域上の配置を示している。Ａ－４３１細胞溶解物に含有されるＥＧＦ受容体は、適切な表面固定抗体に結合する。具体的には、１１７３位のリン酸化チロシンのみがｐＹ１１７３抗体に結合し、１１７３位の非リン酸化チロシンのみがＹ１１７３抗体に結合する。単一ウェル内の２つ以上のアッセイドメインに対する受容体結合の競合は、この形式で回避される。レポーターα－ＥＧＦＲ抗体は、両方の受容体の細胞外ドメイン

に結合する。図１９Ｂ～ＤのＣＣＤ画像は、増加するＥＧＦ濃度の関数として各アッセイドメインから放出されるＥＣＬを示している。０．２ｎＭ　ＥＧＦではチロシン１１７３の検出可能な自己リン酸化は認められない。５ｎＭ　ＥＧＦでは受容体の約５０％がリン酸化され、２００ｎＭ　ＥＧＦでは約９０％がリン酸化された。

【実施例１０】

【０１７５】

ＭＤＭＷプレートのウェルにおけるチロシンキナーゼ及びセリン／トレオニンキナーゼ活性の測定

この実施例では、ＥＣＬ測定用に構成され、各ウェル中に露出した作用電極表面上に４つの流体封じ込め領域を有するＭＤＭＷプレート（実施例１のプレートＣ）を用いた。４つの以下の溶液、すなわち、（ｉ）０．０１５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＰＢＳ緩衝液に希釈した０．５ｍｇ／ｍｌポリ－Ｇｌｕ：Ｔｙｒ（４：１）（ＰＧＴ）、（ｉｉ）０．０１５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＰＢＳ緩衝液に希釈した０．２ｍｇ／ｍｌミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）、（ｉｉｉ）０．０１５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＰＢＳ緩衝液に希釈した０．３ｍｇ／ｍｌストレプトアビジン、（ｉｖ）０．１５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＰＢＳ緩衝液に希釈した０．３ｍｇ／ｍｌＢＳＡ溶液のうち１つの２５０ｎＬを４つの流体封じ込め領域の各々に入れた。次いで、プレートを、周囲条件で１～１．５時間乾燥させ、０．１％Ｔｒｉｔｏｎを含有するＰＢＳで強力に洗浄し、水で洗浄し、５％ＢＳＡ溶液中で少なくとも２時間室温でブロックした。洗浄には、ウェル中に洗浄溶液の一定の流れを形成し、余分なペプチド／タンパク質を電極表面から極めて効率的に洗浄除去可能であるＢｉｏｔｅｃｈの９６ウェルプレートウォッシャーを用いた底部洗浄が含まれる。Ｔｒｉｔｏｎ含有溶液を用いて洗浄した後に３回洗浄して痕跡量のＴｒｉｔｏｎを除去した。ブロッキング後、プレートを再度洗浄して遮断薬を除去してから使用した。

【０１７６】

ＰＧＴをリン酸化する場合（チロシンキナーゼアッセイ）０．０５ｍＵ／μｌのｃ－ＳＲＣを用い、ＭＢＰをリン酸化する場合（トレオニンキナーゼ）２ｎＭのＥＲＫ－２を用いた。ストレプトアビジン被覆ドメインの捕捉効率を、ビオチン及びＲｕ（ｂｐｙ）３のスルホン化体（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　ＤｉｓｃｏｖｅｒｙのＳｕｌｆｏ－ＴＡＧ（商標）標識）で標識されたウシＩｇＧの結合を測定して決定した。

【０１７７】

各スポット（ＰＧＴ、ＭＢＰ、ストレプトアビジン及びＢＳＡ）を、ホスホチロシン及びリン酸化ＭＢＰに対する未標識１次抗体及び標識２次抗体の溶液にさらした。プレートをインキュベートして酵素反応及び結合反応を進行させた後、ＴＰＡ含有緩衝液を添加し、プレートをＥＣＬによって分析した（洗浄は不要であった）。各ポイントには、ＣＶが７～１０％の１２回の測定値の平均が含まれる。下記表Ａに、この実験から得られた結果を要約する。

【表２】

表Ａ

ドメイン	酵素なし / bIgG* なし	分析物 bIgG* のみ	SRCのみ	ERK2のみ
SA	272	**5,447**	324	309
PGT	990	953	**17,223**	1,153
MBP	1,241	1,354	1,237	**32,810**
BSA	138	134	168	209

【０１７８】

太字の数値は、特異的シグナルである。他の数値は非特異的相互作用によるＥＣＬである。

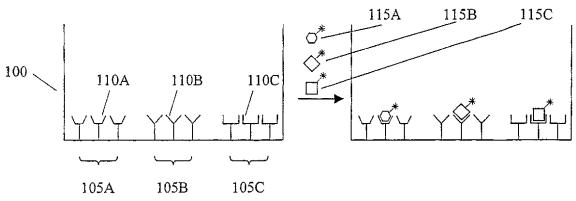
【０１７９】

ＰＧＴ及びＭＢＰドメインは、それぞれチロシンキナーゼＳＲＣ及びトレオニンキナーゼ（ＥＲＫ２）の存在下でのみ高いシグナルを示した。両方のキナーゼ（ＳＲＣ及びＥＲＫ）の活性の滴定曲線は、対応するドメイン上でほぼ直線的な応答を示した。ストレプトアビジンドメインは、ビオチン化分析物の存在下で良好なシグナルを示したが、キナーゼに対する基質としては働かなかった。この結果から、例えば、試験しようとするキナーゼを粗製試料から捕捉する（場合によっては、精製する）ための結合ドメインを含むことの有用性が実証される。ＢＳＡスポットでは、分析物／酵素の存在下では有意なシグナルが得られず、遮断薬がアッセイ試薬と非特異的反応を示さなかったことがわかる。

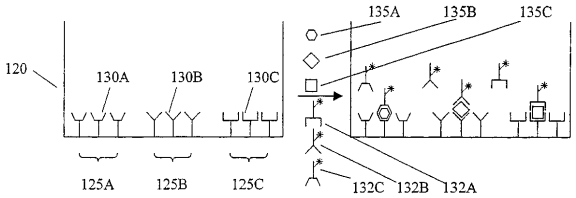
【０１８０】

本発明は、本明細書に記載する具体的な実施形態によって範囲が限定されるべきではない。実際、本明細書に記載する実施形態に加えて本発明の様々な変更形態が、上述の説明及び添付した図から当業者には明らかになるはずである。このような変更形態も、特許請求の範囲内にあるものとする。様々な出版物を本明細書に引用したが、その開示全体を参照により本明細書に援用する。

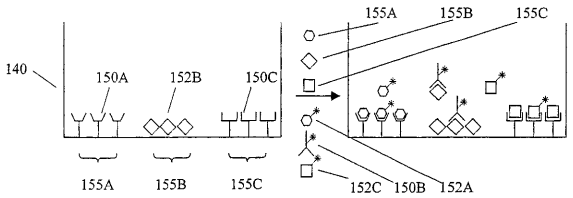
【図１Ａ】



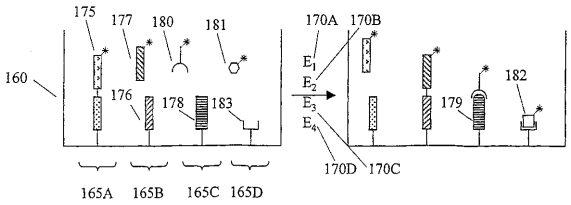
【図１Ｂ】



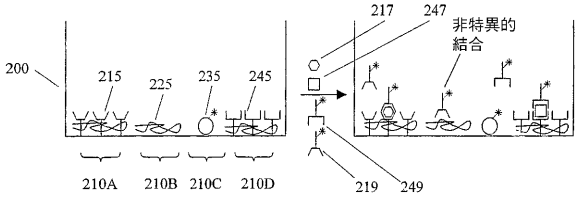
【図１Ｃ】



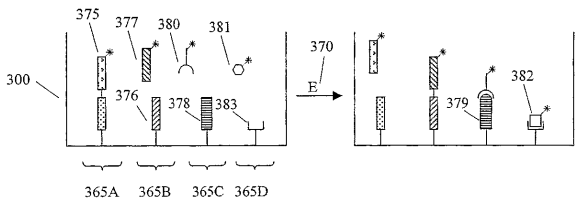
【図１Ｄ】



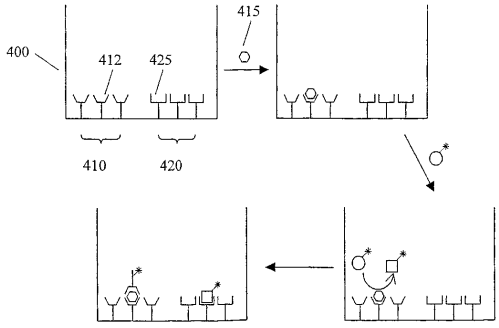
【図２】



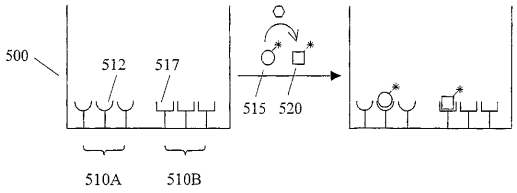
【図３】



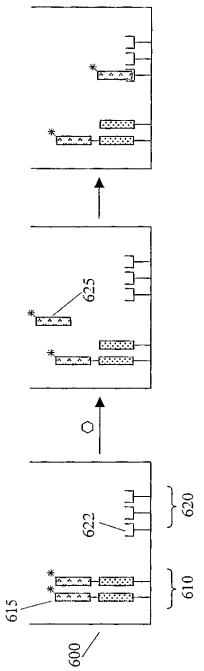
【図４】



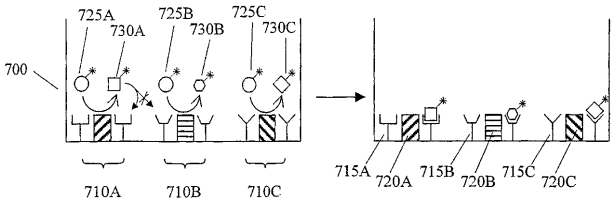
【図５】



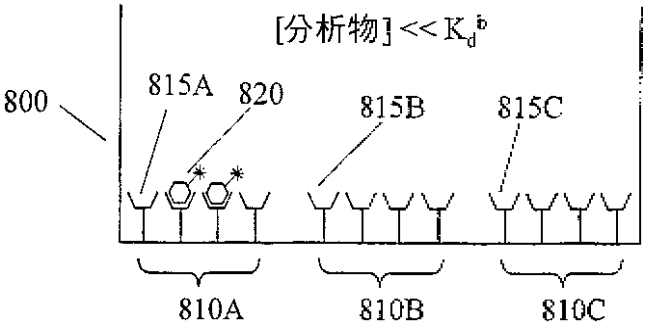
【図６】



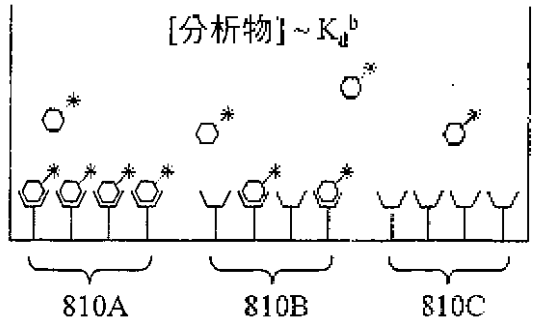
【図７】



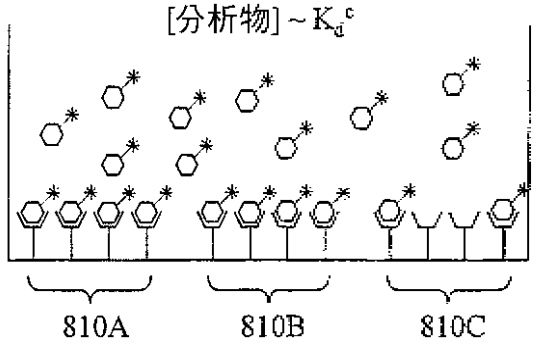
【図８Ａ】



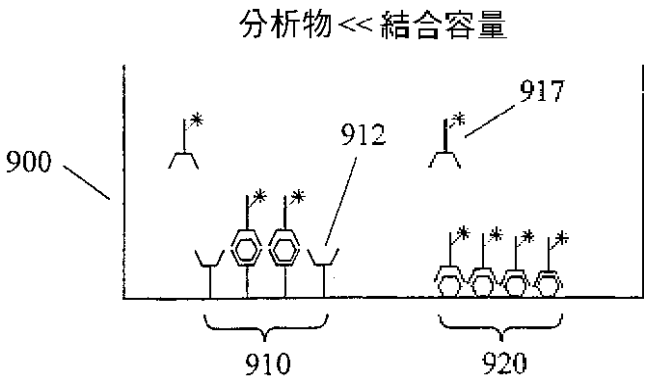
【図８Ｂ】



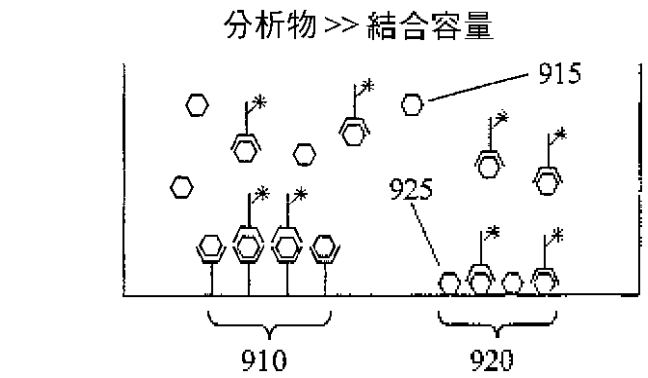
【図８Ｃ】



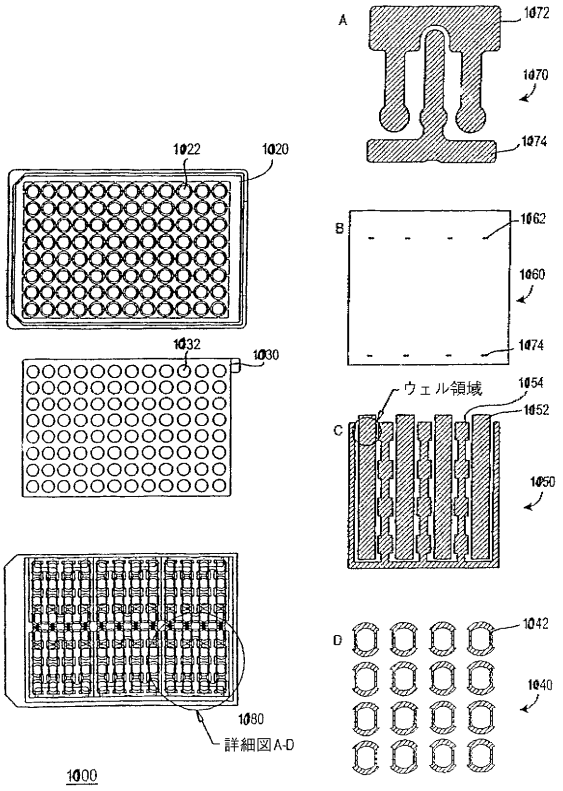
【図９Ａ】



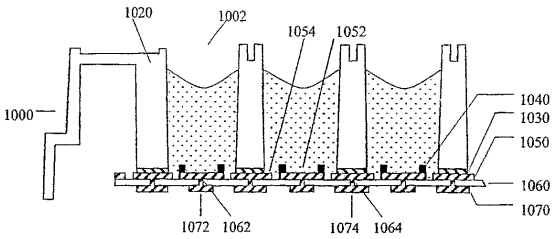
【図９Ｂ】



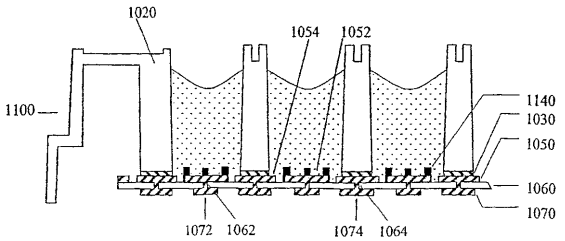
【図１０Ａ】



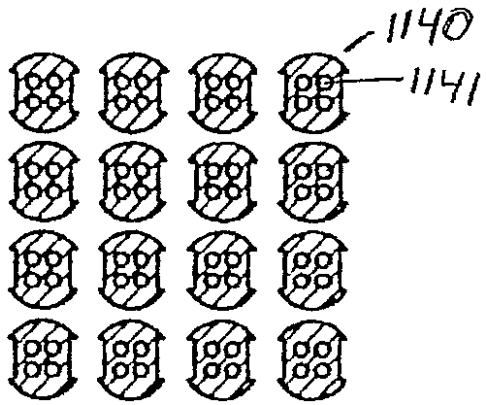
【図１０Ｂ】



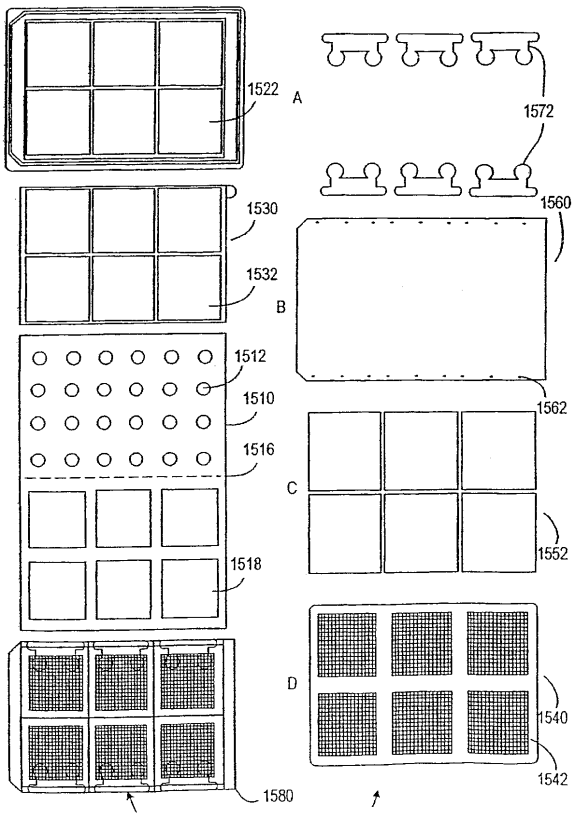
【図１０Ｄ】



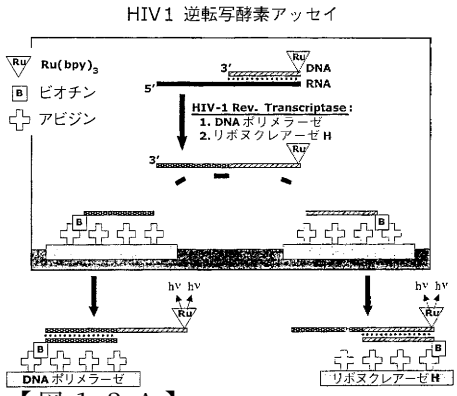
【図１０Ｃ】



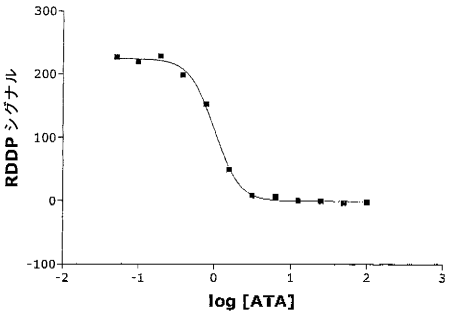
【図１１】



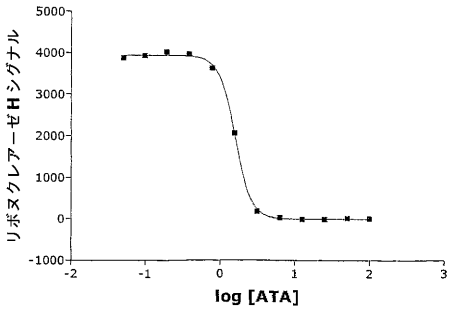
【図１２】



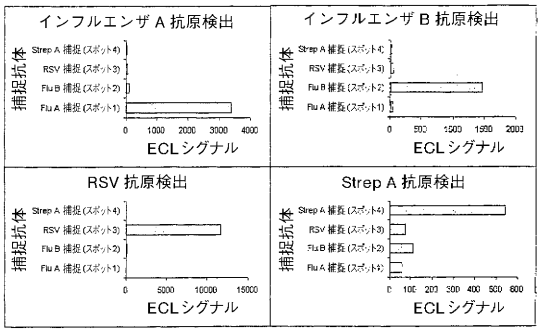
【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】



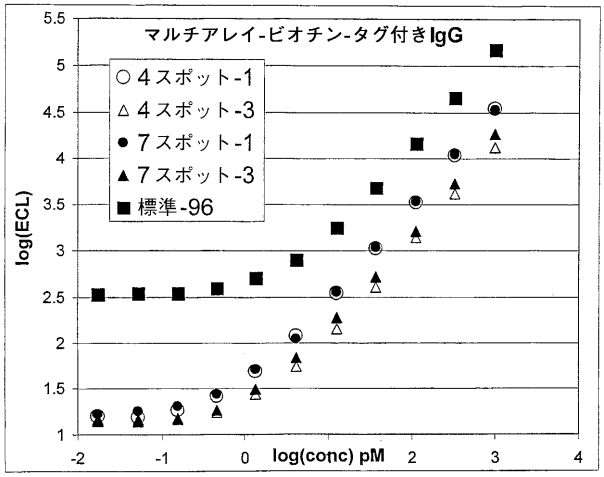
【図１４】



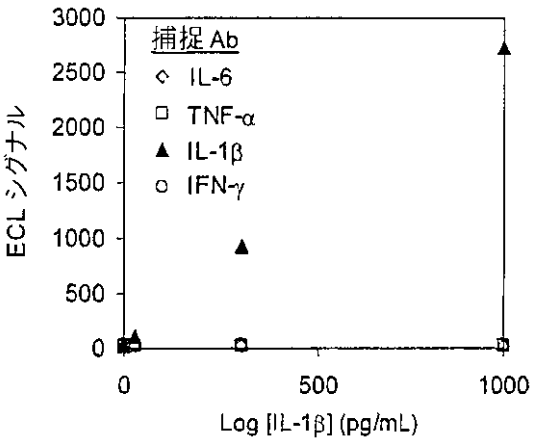
【図１５】

	PGT 酵素/分析物				
	bIgG*	SRC	ERK	SRC + ERK	SRC + ERK + bIgG*
B	268	177	157	152	447
CV	13%	8%	4%	6%	11%
S	1,005	35,696	1,114	29,508	29,963
CV	13%	7%	3%	5%	12%
	MBP 酵素/分析物				
	bIgG*	SRC	ERK	SRC + ERK	SRC + ERK + bIgG*
B	646	262	327	315	1162
CV	4%	6%	11%	16%	8%
S	1,453	5,955	11,728	19,062	22,413
CV	7%	10%	6%	5%	7%
	アビジン 酵素/分析物				
	bIgG*	SRC	ERK	SRC + ERK	SRC + ERK + bIgG*
B	27,467	38	26	27	24720
CV	5%	19%	14%	21%	8%
S	56,145	1,459	240	2,743	53,406
CV	4%	16%	13%	20%	4%
	BSA 酵素/分析物				
	bIgG*	SRC	ERK	SRC + ERK	SRC + ERK + bIgG*
B	83	25	16	17	93
CV	13%	22%	20%	19%	21%
S	162	94	139	338	553
CV	37%	17%	11%	14%	19%

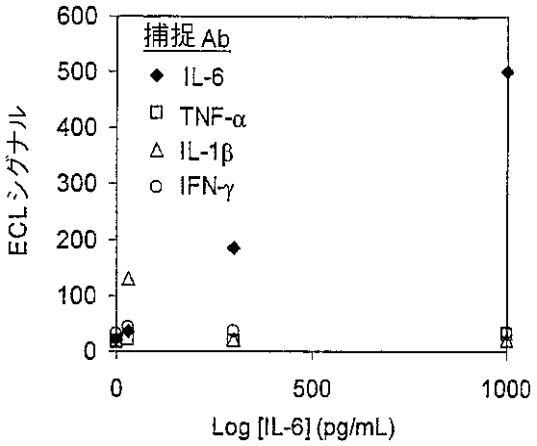
【図１６】



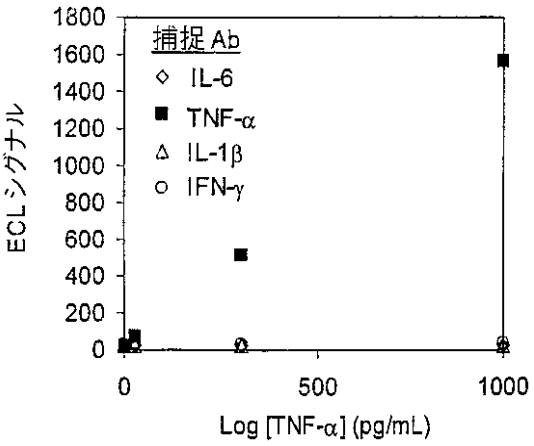
【図１７Ａ】



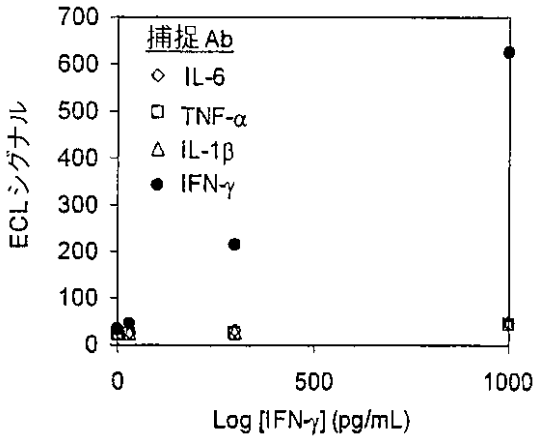
【図１７Ｂ】



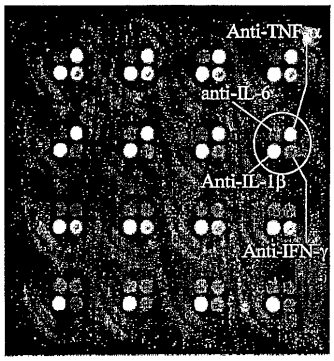
【図１７Ｃ】



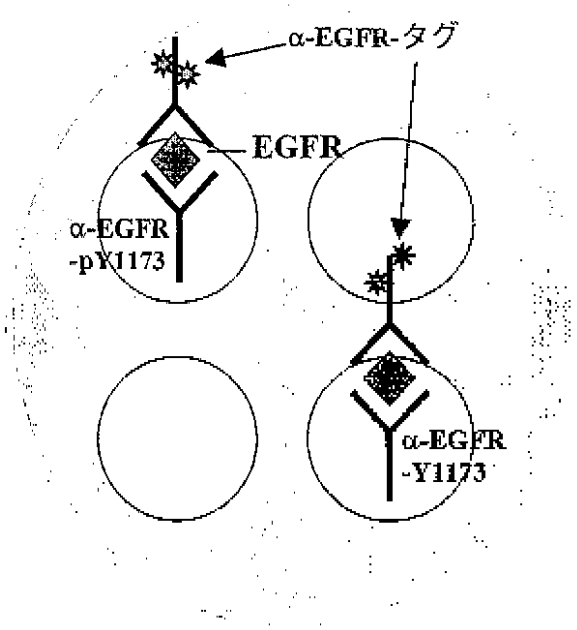
【図１７Ｄ】



【図１８】



【図１９Ａ】

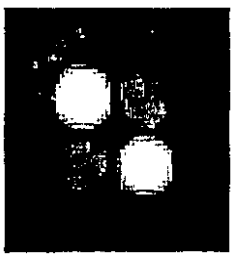


【図１９Ｂ】

0.2nM EGF

【図１９Ｃ】

5nM EGF



【図１９Ｄ】

200nM EGF

【手続補正書】
【提出日】平成24年2月2日(2012.2.2)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
複数のアッセイドメインを含むアッセイモジュールであって、前記複数のアッセイドメインが、１つ又は複数の結合試薬を含む１つ又は複数のアッセイドメインを含み、予め結合された標識を含む第１の対照ドメインと、規定の反応をもたらす第２の対照ドメインと、本質的に遮断薬からなる第３の対照ドメインとをさらに含むアッセイモジュール。
【請求項２】
前記第１の対照ドメインが、（ｉ）ＥＣＬ発生に対する化学的干渉、（ｉｉ）光透過に対する光学的干渉、及び／又は（ｉｉｉ）モジュール変化の１つ又は複数を制御する、請求項１に記載のアッセイモジュール。
【請求項３】
前記第２の対照ドメインが、（ｉ）非特異的結合又は生化学活性、（ｉｉ）ＥＣＬ発生に対する化学的干渉、（ｉｉｉ）光透過に対する光学的干渉、（ｉｖ）ピペット操作誤差、（ｖ）タイミング誤差、（ｖｉ）混合の変動、（ｖｉｉ）温度変動、及び（ｖｉｉｉ）アッセイモジュールの変動の１つ又は複数を制御する、請求項１又は２に記載のアッセイモジュール。
【請求項４】
前記第３の対照ドメインが非特異的結合を制御する、請求項１、２又は３に記載のアッセイモジュール。
【請求項５】
前記アッセイモジュールがマルチウェルプレートであり、前記アッセイモジュール内の前記アッセイドメインが前記プレートのウェル内に位置する、請求項１乃至４のいずれか一項に記載のアッセイモジュール。
【請求項６】
前記ウェルが１つ又は複数の作用電極表面を備え、前記アッセイドメインが前記１つ又は複数の作用電極表面上に位置する、請求項５のアッセイモジュール。
【請求項７】
前記アッセイモジュールが、さらに、１つ又は複数の作用電極表面を備え、前記アッセイドメインが前記１つ又は複数の作用電極表面上に位置する、請求項１乃至４のいずれか一項に記載のアッセイモジュール。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	FI	テーマコード（参考）
	G01N 21/78 C	

(31)優先権主張番号 60/363,498
(32)優先日 平成14年3月11日(2002.3.11)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 グレザー、エリ、エヌ
アメリカ合衆国、メリーランド、チェヴィ チェイス、アビレン ドライブ ２８００
(72)発明者 ジョンソン、ケント
アメリカ合衆国、メリーランド、ベテスダ、ローズデイル アヴェニュー ４７０３
(72)発明者 ツイオンスキィ、マイケル
アメリカ合衆国、メリーランド、ゲイサーズバーグ、ファウンタン グリーン レイン １３３
(72)発明者 ケンテン、ジョン、エイチ
アメリカ合衆国、メリーランド、ボイズ、シュガー リッジ テラス ２１０２１
(72)発明者 デバッド、ジェフ、ディ
アメリカ合衆国、メリーランド、ゲイサーズバーグ ファウンタン グリーン レイン ２６２
ユニット １００
(72)発明者 ウメク、ロバート、エム
アメリカ合衆国、メリーランド、シルバースプリング、インウッド アベニュー １０３１３
(72)発明者 イーゾン、ポーラ、デニー
アメリカ合衆国、メリーランド、ゲルマンタウン コーチマンズ サークル １３９０９
(72)発明者 ビーバイク、ハンス
アメリカ合衆国、メリーランド、ロックビル、スターリング コート １
(72)発明者 ウォルシュクトテーア、ヤコブ、エヌ
アメリカ合衆国、メリーランド、ポトマック、ベル エアー レイン ８９２４
(72)発明者 ウィルバー、ジェームズ
アメリカ合衆国、メリーランド、ゲルマンタウン、スピニング ホイール ドライブ １３６３６
(72)発明者 スィガル、ジョージ
アメリカ合衆国、メリーランド、ロックビル トレイルウェイ ドライブ ５３３３

Fターム(参考) 2G054 AA01 AA02 AA03 AA04 AA07 AA08 AB03 AB04 AB05 BB10
BB12 BB13 CA20 CA22 CA23 CA25 EA01 EA02 EA03 EA04
EA05 FA12 FA33 GA04
4B029 AA07 AA09 AA23 BB15 BB20 CC01 CC03 CC08 FA09 FA12
FA15 GA03 GB06 GB09 GB10

专利名称(译)	用于对一个样本执行多个测量的方法和设备		
公开(公告)号	JP2012100679A	公开(公告)日	2012-05-31
申请号	JP2012019525	申请日	2012-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	中尺度技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	中尺度技术有限责任公司		
[标]发明人	グレザーエリエヌ ジョンソンケント ツイオンスキィマイケル ケンテンジョンエイチ デバッドジェフディ ウメクロバートエム イーゾンポーラデニー ビーバイクハンス ウォルシュクトテーアヤコブエヌ ウィルバージェームズ スィガルジョージ		
发明人	グレザー、エリ、エヌ ジョンソン、ケント ツイオンスキィ、マイケル ケンテン、ジョン、エイチ デバッド、ジェフ、ディ ウメク、ロバート、エム イーゾン、ポーラ、デニー ビーバイク、ハンス ウォルシュクトテーア、ヤコブ、エヌ ウィルバー、ジェームズ スィガル、ジョージ		
IPC分类号	C12M1/00 G01N27/30 G01N27/28 G01N33/543 G01N21/78 G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/00 C12Q1/48 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00		
FI分类号	C12M1/00.A G01N27/30.B G01N27/30.Z G01N27/28.301.Z G01N33/543.525.U G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA01 2G054/AA02 2G054/AA03 2G054/AA04 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB03 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/BB10 2G054/BB12 2G054/BB13 2G054/CA20 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA25 2G054/EA01 2G054/EA02 2G054/EA03 2G054/EA04 2G054/EA05 2G054/FA12 2G054/FA33 2G054/GA04 4B029/AA07 4B029/AA09 4B029/AA23 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA09 4B029/FA12 4B029/FA15 4B029/GA03 4B029/GB06 4B029/GB09 4B029/GB10		
代理人(译)	安藤胜则		
优先权	60/318293 2001-09-10 US 60/318284 2001-09-10 US 60/318289 2001-09-10 US 60/363498 2002-03-11 US		
其他公开文献	JP5791535B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于对样品进行多种化学，生物化学和/或生物测定的试剂，装置，系统，试剂盒和方法。溶剂：使用具有多个测定结构域的测定模块进行多重测试测量。在优选的实施方案中，这些测量在具有集成电极的测定模块中进行，所述集成电极具有读取器装置，所述读取器装置适于接收测定模块，在测定模块的孔或测定区域中诱导发光，优选电极诱导的发光，并测量诱导的发光。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-10067
(P2012-100679
(43)公開日　平成24年5月31日(2012.5.3

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A	2G054
G01N 27/30	(2006.01)	G01N	27/30	B	4B029
G01N 27/28	(2006.01)	G01N	27/30	Z	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	27/28	301Z	
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	33/543	525U	

審査請求 有　請求項の数 7　OL　（全 72 頁）　最終頁に続

(21)出願番号　特願2012-19525 (P2012-19525)
(22)出願日　平成24年2月1日 (2012.2.1)
(62)分割の表示　特願2009-3415 (P2009-3415)
の分割
原出願日　平成14年9月10日 (2002.9.10)
(31)優先権主張番号　60/318,293
(32)優先日　平成13年9月10日 (2001.9.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/318,284
(32)優先日　平成13年9月10日 (2001.9.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/318,289
(32)優先日　平成13年9月10日 (2001.9.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504002920
メソ　スケイル　テクノロジーズ，エルエ
ルシー
アメリカ合衆国　メリーランド、ゲイサー
ズバーグ、　インダストリアル　ドライブ
１６０２０
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100107504
弁理士　安藤　克則

最終頁に続く