

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500549

(P2004-500549A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 27/447

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/68

GO 1 N 27/30

GO 1 N 27/416

F I

GO 1 N 27/26

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/68

GO 1 N 27/30

GO 1 N 27/30

3 3 1 E

A

A

B

F

テーマコード (参考)

4 B 0 2 9

4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 96 頁) 最終頁に続く

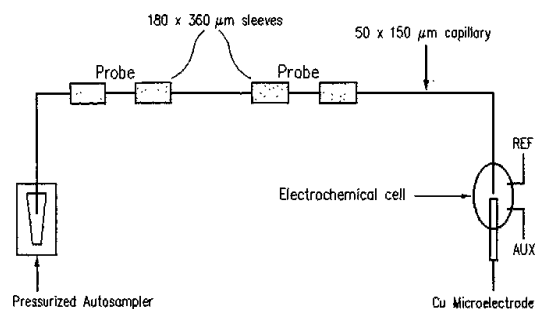
(21) 出願番号 特願2001-512919 (P2001-512919)
 (86) (22) 出願日 平成12年7月17日 (2000.7.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年1月17日 (2002.1.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/019502
 (87) 国際公開番号 WO2001/007653
 (87) 国際公開日 平成13年2月1日 (2001.2.1)
 (31) 優先権主張番号 09/358, 204
 (32) 優先日 平成11年7月21日 (1999.7.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, KR, NO

(71) 出願人 398051143
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 07-5200, オークランド, 12ティ
 ーエイチ フロア, フランクリン ストリ
 ート 1111
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (72) 発明者 クーアー, ワーナー ジー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 923
 45, オーク ヒルズ, コリアンダー
 ドライブ 7075
 Fターム(参考) 4B029 AA07 BB15 CC01 FA02 FA10
 FA15 GB01 GB06
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 空間的にコード化された分析物の検出

(57) 【要約】

サンプル中の複数の異なる分析物 (例えば、核酸、タンパク質、糖類など) 標的の、それらを「相補的な」結合相手 (例えば、相補的核酸、リガンド、抗体など) と結合させることによる検出のためのフロースルーマイクロチャンネル (例えばキャピラリー) バイオセンサが記載される。結合相手はマイクロチャンネル (例えば、溶融シリカキャピラリー) の異なるセクションに固定化される。バイオセンサの製作の後、サンプルがキャピラリー内に流され、サンプル内に含まれるいずれかの標的分析物はマイクロチャンネル壁の固定化された結合相手と結合し、結合複合体を形成する。最後に、結合複合体はキャピラリーの全長に沿って同時に変性され、下流に配備された検出器を通過して流され、分析物濃度が (例えば、シヌソイドボルタンメトリーを用いて) 測定される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の 2 つ以上の標的分析物を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

i) 該 2 つ以上の分析物の各々に対する結合対がその中に固定されているチャンネルを提供する工程であって、ここで該 2 つ以上の分析物の各々に対する結合対は、該チャンネルの異なる領域に位置づけられ、そして該チャンネルは、十分に小さい断面積を有し、その結果、該 2 つ以上の結合対から、該チャンネルを通して流れている流体に分析物が放出される場合に、該分析物が該結合対から下流にある該チャンネルの検出点に到達するまで、該分析物が空間的に隔離されたままである、工程；

10

i i) サンプルを含む流体を、該流体中に存在する該標的分析物がそれらのそれぞれの結合対と結合するような条件下で、該チャンネルを通して流す工程であって、それによって該分析物を該チャンネルに沿って空間的にコード化する、工程、

i i i) 該分析物を、該結合対から、該チャンネルに沿って流れている流体へ放出する工程；および

i v) 該結合対から下流にある該チャンネルに沿った位置で、該分析物を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 2】

前記分析物が標識されていない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

20

前記チャンネルが毛細管である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記毛細管がキャピラリー電気泳動管である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記チャンネルが、表面にエッチングされたチャンネルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記チャンネルが、ガラス表面にエッチングされたチャンネルである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記チャンネルが成型されている、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記チャンネルが、ポリマー材料で成型されている、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記チャンネルが、約 1 未満のレイノルズ数 (Re) を提供する断面積を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記チャンネルが、約 100 μm 未満の断面直径を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 2 つ以上の標的分析物が、少なくとも 3 つの異なる分析物を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記結合対が、抗体、結合タンパク質、および核酸からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記結合対が核酸である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記流体を流す工程が、圧力差によって誘導される流体流れである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記流体を流す工程が、電気浸透流体流れである、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 16】

前記流体が、血液、血漿、血清、尿、口腔液、脳脊髄液、およびリンパからなる群より選択されるサンプルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記検出工程が、吸光分光法を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記検出工程が、シヌソイドボルタンメトリーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記分析物が核酸であり、前記検出工程が、 1×10^{-9} M 未満の濃度で標的分析物を検出する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 20】

サンプル中の 2 つ以上の分析物を検出するためのデバイスであって、該デバイスは、以下：

該 2 つ以上の分析物の各々に対する結合相手がその中に固定されているチャンネルであって、ここで該 2 つ以上の分析物の各々に対する該結合相手は、該チャンネルの異なる領域に位置づけられ、そして該チャンネルは、十分に小さい断面積を有し、その結果、該 2 つ以上の結合相手から、該チャンネルを通して流れている流体に分析物が放出される場合に、該分析物が該結合相手より下流にある該チャンネルに沿った検出点に到達するまで、該分析物が空間的に隔離されたままである、チャンネル；および

該分析物を、該チャンネル内の該検出点で検出する、検出器、

20

【請求項 21】

前記チャンネルが毛細管である、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 22】

前記毛細管が、キャピラリー電気泳動管である、請求項 21 に記載のデバイス。

【請求項 23】

前記チャンネルが、表面にエッチングされたチャンネルである、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 24】

前記チャンネルが、ガラス表面にエッチングされたチャンネルである、請求項 23 に記載のデバイス。

30

【請求項 25】

前記チャンネルが、約 1 未満のレイノルズ数 (Re) を提供する断面積を有する、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 26】

前記チャンネルが、約 100 μ m 未満の断面直径を有する、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 27】

前記 2 つ以上の標的分析物が、少なくとも 3 つの異なる分析物を含む、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 28】

前記結合相手が、抗体、結合タンパク質、および核酸からなる群より選択される、請求項 20 に記載のデバイス。

40

【請求項 29】

前記結合相手が核酸である、請求項 28 に記載のデバイス。

【請求項 30】

前記検出器が、吸光分析計を備える、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 31】

前記検出器が、シヌソイド電圧電流計を備える、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 32】

流体中の 2 つ以上の標的分析物の検出のためのキットであって、該キットは、該 2 つ以上

50

の分析物の各々に対する結合相手がその中に固定されているチャンネルを備え、ここで該 2 つ以上の分析物の各々に対する該結合相手は、該チャンネルの異なる領域に位置づけられ、そして該チャンネルは、十分に小さい断面積を有し、その結果、該 2 つ以上の結合相手から、該チャンネルを通して流れている流体に分析物が放出される場合に、該分析物が該結合相手より下流にある該チャンネルに沿った検出点に到達するまで、該分析物が空間的に隔離されたままである、キット。

【請求項 3 3】

前記キットが、複数の前記チャンネルを備える、請求項 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記複数のチャンネルを含む前記チャンネルの各々が、結合相手の固有の収集を有する、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 5】

前記チャンネルが毛细管である、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 6】

前記毛细管が、キャピラリー電気泳動管である、請求項 3 5 に記載のキット。

【請求項 3 7】

前記チャンネルが、表面にエッチングされたチャンネルである、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 8】

前記チャンネルが、ガラス表面にエッチングされたチャンネルである、請求項 3 7 に記載のキット。

【請求項 3 9】

前記チャンネルが、約 1 未満のレイノルズ数 (Re) を提供する断面積を有する、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 4 0】

前記チャンネルが、約 100 μm 未満の断面直径を有する、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 4 1】

前記チャンネルが、少なくとも 3 つの異なる種の結合相手を含む、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 4 2】

前記結合相手が、抗体、結合タンパク質、および核酸からなる群より選択される、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 4 3】

前記結合相手が核酸である、請求項 4 2 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、すべての目的で本明細書中にその全体が参考として援用される、1999 年 7 月 21 日出願の米国特許出願第 09 / 358 , 204 号の優先権を主張するものである。

【0002】

(連邦後援研究開発の下で行われる発明の権利に関する申し立て)

本研究は、国立予防衛生研究所 (GM 44112 - 01A1) および UC BioSTAR プロジェクトによって支援された。アメリカ合衆国政府は、本発明における一定の権利を有し得る。

【0003】

(発明の分野)

本発明は、診断の分野に関する。詳細には、本発明は、複数の分析物の迅速な検出および / または定量を可能にしながらも、標識または標識づけ工程の使用を必要としないデバイスおよび方法を提供する。

【0004】

10

20

30

40

50

(発明の背景)

イムノアッセイおよび核酸ハイブリダイゼーション化学は、遺伝的欠陥を検出する、疾病診断を実行する、および予後の評価を実行するという目標に向けて急速に開発されている (S o s n o w s k i ら (1 9 9 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 4 : 1 1 1 9 - 1 1 2 3) 。抗体、核酸結合タンパク質、レセプターリガンドおよび核酸は、非常に特異的にかつ高効率で、適切な条件下で各自の同系の「結合相手」と結合することが知られている。この現象は、病原体 (例えば H I V) 、病理学的状態 (例えば、癌、肝臓病、腎臓病、変性関節疾患など) 、薬物乱用 (例えば、コチニンなどといった生成物の検出) などの認識および診断に頻繁に使用されている。

【 0 0 0 5 】

多数の疾病マーカーおよび病原体マーカー (例えば、タンパク質および / または核酸) が周知であり、完全に特徴づけられてきた。従って、そのようなマーカーと特異的に結合する結合相手 (例えば、核酸、抗体など) は、合成および / または単離され、疾病状態または病原体の認識のためのマーカーとして使用することができる (L a n d e g r e n ら (1 9 8 8) S c i e n c e , 2 4 2 : 2 2 9 、 M i k k e l s o n (1 9 9 6) E l e c t r o a n a l y s i s , 8 : 1 5 - 1 9) 。様々なアッセイが、そうした方法を用いて微生物学実験室または病理学実験室において日常的に行われている。

【 0 0 0 6 】

核酸ハイブリダイゼーション、抗体結合反応、タンパク質結合反応およびレクチン結合反応は一般に、分子に (例えば DNA の二重らせんに) 挿入するかまたは、標的もしくはプローブ分子のどちらか一方に共有結合で固定されるかのどちらかである標識の使用によって検出される (例えば、S o s n o w s k i ら (1 9 9 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 4 : 1 1 1 9 - 1 1 2 3 、 L e P e c q および P a o l e t t i (1 9 6 6) A n a l . B i o c h e m . , 1 7 : 1 0 0 - 1 0 7 、 K a p u s c i n s k i および S k o c z y l a s (1 9 7 7) A n a l . B i o c h e m . , 8 3 : 2 5 2 - 2 5 7 参照) 。場合によっては、電気化学発光もまた、挿入された電気活性発光マーカーを検出するために使用されている (P o l l a r d - K n i g h t ら (1 9 9 0) A n a l . B i o c h e m . , 1 8 5 : 8 4 - 8 9 、 P o l l a r d - K n i g h t ら (1 9 9 0) A n a l . B i o c h e m . , 1 8 5 : 3 5 3 - 3 5 8 、 T i z a r d ら (1 9 9 0) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 2 : 4 5 1 4 - 4 5 1 8) 。これらの検出戦略の全部は、プローブと標的分子との間の結合反応の前 (例えば共有結合標識づけのために) または後 (例えば挿入または間接的標識づけのために) のどちらか一方で、標的またはプローブ分子の誘導体化を必要とする。これは汚染問題をもたらす。さらに、複数の分析物が同時に分析される場合、複数の標識が使用されなければならない。さらに、煩雑なサンプル取扱が要求され、それはさらに、汚染のリスクを増大しかつ / または誤った分析につながる。上記および他の問題は、本発明によって克服される。

【 0 0 0 7 】

(発明の要約)

本発明は、サンプル中の複数の分析物を検出および / または定量化する新規なデバイスおよび方法を提供する。本発明は、各自の同系の「結合相手」 (例えば、核酸、抗体、レクチンなど) と結合した後に、サンプル中の異なる標的分析物 (例えば、核酸) を検出するフロースルー微小流体 (例えばキャピラリー) バイオセンサを提供する。一般に、各種分析物に特異的な結合相手「プローブ」が、例えば感光性ピオチン / アビジン技術を用いるなどして、キャピラリーチャネルの異なるセクションに固定化される。サンプルがその後キャピラリー内にフラッシュされ、その結果、標的分析物はキャピラリー壁に固定化された結合相手 (捕獲剤) と結合し、残りのサンプルはキャピラリーから溶離される。最後に、複合体を形成した (結合した) 分析物は、チャネルの全長に沿って放出され、検出器を通過してフラッシュされる。好ましい実施形態において、脱着した標的 - 分析物は、下流に配備された銅電極においてシヌソイドボルタンメトリーを用いて検出される (S i n g h a l および K u h r (1 9 9 7) A n a l . C h e m . , 6 9 : 3 5 5 2 - 3 5 5 7 、

10

20

30

40

50

Singhalら(1997)Anal. Chem., 69:1662-1668)。標的分析物の溶離から検出までの時間は、個々の分析物の正体を決定するために使用される。同一種の分子の(例えば、すべて核酸)、または異なる種(例えば、タンパク質および核酸)の複数の分析物が、このようにして単一のバイオセンサを用いて診断できる。センサは、特異的な結合相手の使用により高度に特異的であり、電気化学的検出により極めて高感度である。

【0008】

従って、1実施形態において、本発明は、サンプル中の2以上の分析物を検出するデバイスを提供する。このデバイスは、2以上の分析物の各々の結合相手が固定されているチャンネルを含み、ここにおいて、2以上の分析物の各々の結合相手はチャンネルの異なる領域に配置されており、チャンネルは十分に小さい断面積を有しており、それによって分析物が2以上の結合相手からチャンネル内を流れる流体に放出されたときに、分析物は、結合相手から下流のチャンネルに沿った検出ポイントに、またはその端に、そして検出ポイントで分析物を検出する検出器に到達するまで、空間的に分離されたままである。

10

【0009】

チャンネルは、例えば毛細管、キャピラリー電気泳動管、表面にエッチングされたチャンネル、表面上にプリントされた疎水剤により形成されたチャンネルなど、あらゆる便宜的なチャンネルであり得る。チャンネルは、分析物が、チャンネルにおける検出領域またはチャンネル端に到達したときに識別されるように十分に分離され続ける限り、本質的にあらゆる寸法を有することができる。好ましいチャンネルは、約1未満のレイノルズ数(Re)を与える断面積を有する。好ましいチャンネルは、約500μm以下の、より好ましくは約100μm以下の、最も好ましくは約50μm以下の、断面直径または幅を有する。特に好ましいデバイスにおいて、2以上の標的分析物は、少なくとも3、好ましくは少なくとも4、より好ましくは少なくとも5、最も好ましくは少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100または少なくとも500の異なる分析物(および、それゆえその多数の異なる結合相手)を含む。以下に限らないが、抗体、結合タンパク質および核酸を含め、多種多様な結合相手が適切である。同様に、多くの検出器が適切であり、分光光度計(例えば、吸光度分光光度計)および(本質的にあらゆる電流測定および/またはボルタンメトリーおよび/または電位差および/または電量分析検出器を含む)電気分析的検出器が挙げられる。好ましい検出器としては、電圧電流計、特にシノソイド電圧電流計が挙げられる。

20

30

【0010】

別の実施形態において、本発明は、サンプル中の2以上の標的分析物を検出する方法を提供する。この方法は、本明細書中に記載される検出デバイスを提供する工程；i i) サンプルを含む流体を、流体に存在する標的分析物がそれぞれ各自の結合相手と結合する条件下でチャンネルを通過させ、それにより分析物をチャンネルに沿って空間的にコード化する工程；i i i) チャンネルに沿って通過している流体の流れに分析物を結合相手から放出する工程；i v) 結合相手から下流のチャンネルに沿った位置で分析物を検出する工程を包含する。好ましい方法において、分析物は標識づけされない。特に好ましい実施形態において、分析物は標識づけされない。特に好ましいデバイスにおいて、2以上の標的分析物は、少なくとも3、好ましくは少なくとも4、より好ましくは少なくとも5、最も好ましくは少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100または少なくとも500の異なる分析物を含む(そしてそれゆえ、その多数の異なる結合相手が検出デバイスを含むチャンネルに存在する)。いくつかの好ましい実施形態において、流体流れは、圧力差および/または電気浸透流によって誘起される。流体流れ。分析物の検出のために好ましい「サンプル」流体としては、血液、血漿、血清、尿、口腔内液、脳脊髄液およびリンパが挙げられる。検出は、分光光度計(例えば、吸光度分光光度法)および(本質的にあらゆる電流測定および/またはボルタンメトリーおよび/または電位差および/または電量分析法を含む)電気分析的方法を含む、多様な方法によることができる。好ましい検出方法は、ボルタンメトリー、特にシノソイドボルタンメトリーである。特に好ましい方法において、分析物は核酸であり、検出は 1×10^{-9} M未満の濃度で標的分析物を検出する。

40

50

【0011】

(定義)

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書中では、アミノ酸残基の重合体を指すために互換可能に使用される。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的アナログであるアミノ酸重合体だけでなく、天然に存在するアミノ酸重合体にもあてはまる。

【0012】

用語「抗体」は、本明細書中で使用される通り、インタクトな免疫グロブリン、軽鎖および重鎖の可変領域だけを含んでいるFvフラグメント、ジスルフィド結合により結合されたFvフラグメント(Brinkmannら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:547-551)、可変領域と定常領域の部分を含んでいるFabまたは(Fab)²フラグメント、一本鎖抗体などを含む、様々な形態の修飾または改変された抗体を含む(Birdら(1988)Science 242:424-426; Hustonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。抗体は、動物(特にマウスまたはラット)またはヒト由来であり得るか、またはキメラ(Morrisonら(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855)もしくはヒト化(Jonesら(1986)Nature 321:522-525; および公開イギリス特許出願#8707252)であり得る。

10

【0013】

用語「結合相手」または「捕獲剤」または「結合ペア」のメンバーは、抗体-抗原、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ピオチン-アビジンなどといった結合複合体を形成するために他の分子と特異的に結合する分子をいう。特に好ましい実施形態において、結合は、非共有結合(例えばイオン、疎水)相互作用によって主として成立する。

20

【0014】

用語「特異的に結合する」は、本明細書中で使用されるように、生体分子(例えば、タンパク質、核酸、抗体など)を指す場合に、分子(例えば、タンパク質および他の生物学的製剤)の異種集団における生体分子の存在を決定づける結合反応をいう。従って、指定された条件下で(例えば、抗体の場合におけるイムノアッセイ条件、または核酸の場合におけるストリンジェントハイブリダイゼーション条件)、特定のリガンドまたは抗体は、その特定の「標的」分子と結合し、サンプル中に存在する他の分子と有意な量で結合しない。

30

【0015】

用語「チャンネル」は、流体の流れを特定の方向に導く経路をいう。チャンネルは、底部および側部を有する溝もしくはトレンチ、または完全に包囲された「管」として形成することができる。一部の実施形態では、チャンネルは「側部」を有する必要さえない。例えば、疎水性ポリマーを平坦な表面に適用し、それによって狭い(例えば親水性)範囲でその表面での流体の流れを制限および/または誘導することができる。チャンネルは好ましくは、結合相手(捕獲)薬剤が固定され得る少なくとも1つの表面を備える。

【0016】

「標的分析物」は、サンプルにおいて検出および/または定量化されるべきあらゆる単数または複数の分子である。好ましい標的分析物としては、核酸、抗体、タンパク質、糖類などの生体分子が挙げられる。

40

【0017】

用語「マイクロチャンネル」は本明細書中で、低レイノルズ数操作($Re < 1$ 、好ましくは $Re < 0.1$ 、より好ましくは $Re < 0.01$ 、最も好ましくは $Re < 0.001$)を可能にする寸法を有するチャンネルについて使用される。一般に低レイノルズ数操作、流体力学は、慣性力よりもむしろ粘性力によって支配される。

【0018】

用語毛細管(キャピラリー)は、狭い寸法の管(例えば一般に低 Re の流れを与える)を

50

いう。開放端毛細管は、水と接触したときに、一般に毛管作用によって水を吸い上げる。毛細管は、以下に限らないが、ガラス、プラスチック、石英、セラミックおよび各種ケイ酸塩を含む、多くの材料で製作することができる。

【0019】

「キャピラリー電気泳動管」は、キャピラリー電気泳動デバイスにおいて、そのために設計および/または一般に使用される、または使用されるように意図された「毛細管」をいう。

【0020】

用語「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または文法的に同等の語句は本明細書中で、共有結合により一体に結合された少なくとも2個のヌクレオチドをいう。本発明の核酸は好ましくは、一本鎖または二本鎖であり、一般にホスホジエステル結合を含むが、場合によっては以下に概説するように、例えば、ホスホルアミド (Beaucageら (1993) Tetrahedron 49 (10): 1925) およびその参考文献; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35: 3800; Sprinzlら (1977) Eur. J. Biochem. 81: 579; Letsingerら (1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487; Sawaiら (1984) Chem. Lett. 805, Letsingerら (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; および Pauwelsら (1986) Chemical Scripta 26: 1419)、ホスホロチオエート (Magら (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1437; および米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート (Briuら (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 2321)、O-メチルホスホロアミダイト (O-methylphosphoroamidite) 結合 (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press 参照)、ならびにペプチド核酸骨格および結合 (Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 1895; Meierら (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008; Nielsen (1993) Nature, 365: 566; Carlssonら (1996) Nature 380: 207 参照) を含む、交互骨格を有し得る核酸アナログが含まれる。他の類似の核酸は、陽性骨格 (Denpcyら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097)、非イオン性骨格 (米国特許第5,386,023号、同第5,637,684号、同第5,602,240号、同第5,216,141号および同第4,469,863号; Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English 30: 423; Letsingerら (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; Letsingerら (1994) Nucleoside & Nucleotide 13: 1597; 第2章および第3章, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Y. S. Sanghui および P. Dan Cook 編; Mesmaekerら (1994), Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395; Jeffsら (1994) J. Biomolecular NMR 34: 17; Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996))、ならびに米国特許第5,235,033号および同第5,034,506号ならびに前掲書第6章および第7章 (ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Y. S. Sanghui および P. Dan Cook 編) に記載のものを含む、ノンリボース骨格を備えるものを含む。1以上の炭素環式糖類を含有する核酸もまた、核酸の定義の内に含まれる (Jenkinsら (1995), Chem. Soc. Rev. 169-176 頁参照)。いくつかの核酸アナログが Rawls (Rawls, C&E News Jun. 2, 1997, 35 頁) に記載されている。リボース-リン酸塩骨格のこれらの修飾は、標識といった付加的部分の付加を容易に

するか、または生理学的環境における当該分子の安定性および半減期を増大させるために行うことができる。

用語「と特異的にハイブリダイズする」および「特異的ハイブリダイゼーション」および「と選択的にハイブリダイズする」は、本明細書中で使用される通り、ストリンジェント条件の下で特定のヌクレオチド配列に対する選択的な、核酸分子の結合、二重化またはハイブリダイジングをいう。用語「ストリンジェント条件」は、プローブがその標的配列と選択的にハイブリダイズし、そして他の配列とは少ない程度にするかまたはまったくしない条件をいう。核酸ハイブリダイゼーションの状況におけるストリンジェントハイブリダイゼーションおよびストリンジェントハイブリダイゼーション洗浄条件は、配列依存的であり、異なる環境パラメータの下で異なる。核酸ハイブリダイゼーションの包括的な手引きは、例えば Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes 第 I 節, 第 2 章, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, Elsevier, N.Y. (Tijssen) に見出される。一般に、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、規定のイオン強度および pH で特定の配列の熱的融点 (T_m) よりも約 5 低いものであるように選択される。 T_m は、(規定のイオン強度および pH の下で) 標的配列の 50% が、完全に合致したプローブとハイブリダイズする温度である。極めてストリンジェントな条件は、特定のプローブについての T_m と等しいように選択される。サザンブロットまたはノーザンブロットにおいてアレイまたはフィルタに 100 を超える相補的残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションのためのストリンジェントハイブリダイゼーション条件の一例は、標準ハイブリダイゼーション溶液を用いて 42 であり (例えば Sambrook (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版) 1-3 巻, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY および以下の詳細な説明を参照)、ハイブリダイゼーションは終夜で実行される。高度にストリンジェントな洗浄条件の一例は、約 15 分間、72 での 0.15 M NaCl である。ストリンジェント洗浄条件の一例は、SSC 緩衝液の種目の場合、15 分間、65 での $0.2 \times$ SSC 洗浄である (例えば前掲 Sambrook 参照)。たいてい、バックグラウンドプローブ信号を除去するために、高ストリンジェンシー洗浄には低ストリンジェンシー洗浄が先行する。例えば 100 を超えるヌクレオチドの二重化のための中程度のストリンジェンシー洗浄の一例は、15 分間、45 での $1 \times$ SSC である。例えば 100 を超えるヌクレオチドの二重化のための低ストリンジェンシー洗浄の一例は、15 分間、40 での $4 \times \sim 6 \times$ SSC である。

10

20

30

40

50

【0021】

「空間的分離」は、流体ストリームにおける 2 以上の種の分子 (例えば分析物) の濃度分布の局在化の相違をいう。分析物が空間的に分離された (すなわち、フローコード化された) 場合、たとえ分析物の全部の信号のタイプが同一であったとしても、目的の個々の分析物の個別の信号を検出することが可能である。従って、分析物の正体は検出の「流路」に沿った位置または時間によって決定することができ、個々の分析物に関係する標識の相違は要求されない。

【0022】

電気分析的方法は、その系に関する情報を取り出すために系または分析物の「電氣的」特性 (例えば、抵抗、コンダクタンス、キャパシタンス、インピーダンスなど) を利用する方法をいう。電気分析的方法としては、本質的にあらゆる電流測定および/またはボルタンメトリーおよび/または電位差および/または電量分析方法が挙げられる。好ましい電気分析的方法としては、サイクリックボルタンメトリー、交流、直流または回転リングディスクボルタンメトリー、シノソイドボルタンメトリー、インピーダンス分光法などが挙

げられる。

【0023】

用語「サイクリックボルタンメトリー」または「経時変化ボルタンメトリー」は、サイクリックボルタンメトリーを指すために互換可能に使用される。用語「シノソイドボルタンメトリー」は、一般に（例えば、以下に限らないが、方形波、三角波などを含むいずれかの経時変化電圧による）サイクリックボルタンメトリーを指すため、または例えば米国特許第5,650,061号に記載の通り、サイクリックボルタンメトリーと類似の態様で使用される大振幅正弦波電位波形の使用を指すために使用される。

【0024】

（詳細な説明）

10

（I．複数分析物の効率的検出方法）

本発明は、サンプル中の複数の分析物の迅速な検出および／または定量化のための新規な方法および器械を提供する。好ましい1実施形態において、本発明は、検出が望まれる分析物に特異的な結合相手をその中に固定したチャンネルを含む。異なる結合相手がチャンネルの異なる領域に配置されるので、分析物が結合された時に、それらはチャンネルに沿った各自の位置によって「空間的にコード化される」。結合された分析物は後に結合相手から解放されるか、または、結合相手／分析物複合体はチャンネルの壁から、チャンネル内を流れる流体中に放出される。チャンネルの寸法は、分析物が上記結合相手から下流のチャンネルの検出ポイントに到達するまで分析物が空間的に分離され続けるようなものである。

【0025】

20

分析物または分析物／結合相手複合体が流れに放出されると、それらは空間的にコード化される。すなわち、ストリームでの相互に対する各自の位置は、それらがチャンネル壁に固定されていた時の結合相手の位置に依存する。従って、放出と検出との間の時間差は、出力信号を生成する（または生成しない）特定の分析物を特異的に識別するために使用することができる。

【0026】

分析物が各々、それらを他の分析物から区別するために標識を使用することなく特異的に識別され得るので、多数かつ冗長なサンプル取扱および標識化工程が排除される。これは多数の標識化および汚染問題を取り除く。また、偽陽性の高い発生率につながり得るサンプル汚染のリスクも低減または排除される。

30

【0027】

チャンネルが使用前に良好に準備でき、各種微小流体構造（例えばチャンネル）がサンプル取扱、流体の流れおよび分析物検出を行うデバイスの内外へ交換できることが特筆される。異なるチャンネルが異なる集合の分析物に合わせて備えることができ、同一または異なる複数のチャンネルが同時に実行され得る。

【0028】

従って、本発明の方法およびデバイスは、臨床環境における分析物の検出に良好に適する。非誘導体化分析物（例えばDNA、mRNA、等）を検出する能力は、手順を著しく簡素化し、サンプル汚染および誤った識別の問題の防止を助成する。

【0029】

40

特に好ましい1実施形態において、サイクリック（例えばシノソイド）ボルタンメトリーによる銅電極の使用は、従来の電気化学的測定法が遭遇する問題の多くを克服し、それによって分析物の検出を可能にする。その検出戦略の高感度は、周波数ドメインにおける容量性バックグラウンド電流からのファラデー信号の効果的な減結合に起因している。従って、例えばssDNAやdsDNAはピコモル濃度レンジにおいて検出することができ、電気化学的信号は、同じサイズのssDNAに比べて、DNA二重らせんの外周の容易にアクセスできる糖類の酸化に起因する。

【0030】

ただ1個の検出器を使用して複数の標的を検出できるセンサが、製作も容易なより安価かつ小型の検出システムを提供する。

50

【 0 0 3 1 】

(I I . システム構成要素)

(A) チャネル)

(1) チャネルのタイプおよび寸法)

チャネルは、チャネルに沿った異なる位置で溶液中の成分間の本質的な混合を伴わずにチャネル内部の物質の通過を可能にする限り、事実上どのようなタイプのチャネルでも本発明の実施に適する。すなわち、好ましいキャピラリーにおいて、チャネルに沿った個別の場所で最初に放出された分析物（または他の検出可能な試薬）は、初期放出ポイントから「下流」の検出ポイントで空間的に分離され続ける。空間的分離とは、たとえ分析物の全部に関する信号のタイプが同一であったとしても、目的の各分析物の個別の信号を検出できる能力をいう。従って、分析物の正体は「流路」に沿った位置または検出の時間によって決定することができ、個々の分析物に係する標識の相違は要求されない。

10

【 0 0 3 2 】

しかし、空間的分離は分析物相互の完全な分離を要求するものではない。反対に、相当の重なり合いが存在することができ、ピーク濃度が検出でき、関係する濃度プロファイルが測定および／または計算されて陽性／陰性検出および／または完全な分析物定量化を与えることができる。

【 0 0 3 3 】

本発明での使用に特に好ましいチャネルは、「マイクロチャネル」である。本明細書中で用語「マイクロチャネル」は、低レイノルズ数操作を可能にする寸法を有するチャネル、すなわち、流体の動力学が慣性力よりもむしろ粘性力により支配されるものについて使用される。粘性力に対する慣性力の比とも時にいわれるレイノルズ数は、以下により与えられる。

20

【 0 0 3 4 】

$$R e = \rho d^2 / \eta \tau + \rho u d / \eta$$

ここに、 u は速度ベクトル、 ρ は流体の密度、 η は流体の粘度、 d はチャネルの特性寸法、 τ は速度が変化する時間スケールである（ここで $u / \tau = \delta u / d t$ ）。用語「特性寸法」はここで、当業で周知の通り、レイノルズ数を決定する寸法について使用されている。円筒形チャネルの場合、それは直径である。矩形チャネルの場合、それは基本的に幅および深さのうちの小さい方に依存する。V字形チャネルの場合、それは「V」の頂部の幅に依存する、といったことになる。様々な形態学的チャネルに関する $R e$ の計算は、流体力学の標準的な教科書に見ることができる（例えば、Granger (1995) Fluid Mechanics, Dover, N.Y.; Meyer (1982) Introduction to Mathematical Fluid Dynamics, Dover, N.Y.)。

30

【 0 0 3 5 】

定常状態（ $\tau \rightarrow \infty$ ）における流体の流れの挙動は、レイノルズ数 $R e = \rho u d / \eta$ によって特徴づけられる。マイクロ加工された流体システムは、小サイズおよび低速度のために、たいてい低レイノルズ数レジーム（ $R e$ はほぼ 1 未満）にある。このレジームでは、乱流および二次流れ、従って流れ内部での混合を生じさせる慣性効果が無視でき、粘性効果が動力学を支配する。こうした条件下では、チャネル内の流れは一般に層状である。

40

【 0 0 3 6 】

レイノルズ数が、チャネル寸法だけでなく、流体密度、流体粘度、流体速度および、速度が変化する時間スケールにも依存するので、チャネル直径の絶対上限は明確には規定されない。実際、良好に設計されたチャネル幾何学形状によれば、乱流は $R < 100$ について、ことによると $R < 1000$ について回避することができ、従って相対的に大きいチャネルサイズを有する高処理能システムが可能である。好ましいチャネル特性寸法範囲は、約 $0.5 \mu m$ ないし $100 mm$ である。約 $1 \mu m \sim 100 \mu m$ の特性寸法のチャネルレンジが特に好ましく、約 $5 \mu m \sim 100 \mu m$ が最も好ましい。より好ましいレンジは、約 $5 \mu m$ ないし $50 \mu m$ である。

50

【 0 0 3 7 】

本発明のデバイスは低レイノルズ数操作に制限される必要はない。結合プローブが広く離間され、それゆえ放出された分析物が流れにおいて広く離間される場合、異なる分析物が互いの信号を「オーバーラップしたり」マスクすることなく、かなりの対流混合がチャンネルにおいて生起し得る。さらに、2分析物のかなりの混合が生起し得て、2分析物のピーク濃度間に著しい（例えば、統計的に有意な）空間分離が存在する限り、信号は区別可能であり、各分析物の検出が行い得ることが理解されよう。しかし、分析物が混合し合うにつれて、各個別の分析物の定量化は次第により難しくなるかもしれない。それにもかかわらず、そうした状況でさえ、各分析物に積分信号の近似を与えるために濃度ピークの位置およびフォールオフ率に基づく分析物の空間分布を評価またはモデル化することによって、定量化を得ることができる。

10

【 0 0 3 8 】

上述の通り、上述の混合要求条件が満たされる限り、あらゆるチャンネル構成が適格である。従って、適切なチャンネルには、以下に限定されないが、対向する障壁、無蓋溝、閉渠などによって形成されるチャンネルを含む。チャンネルは、例えば円形、方形、矩形、三角形、v字状、u字状、六角形、八角形、不規則形など、事実上あらゆる断面を有することができる。本発明において使用されるチャンネルは連続的である必要もない。従って例えば、チャンネルは、多孔性粒子の集合体、共重合体または架橋重合体などによって形成することができる。

【 0 0 3 9 】

その中を通過する溶液に対し材料が本質的に安定している限り、あらゆるチャンネル材料が本発明の実施に適する。好ましい材料は、結合相手と結合できるかまたは結合するように誘導体化することができる、または結合相手のリンカーである。さらに、好ましい実施形態において、材料は、それが分析物と実質的に結合しないように選択および/または改質される。また好ましい材料は、プローブを固定することが望まれる所以外の領域においてプローブと結合しないか、または別様に相互作用しない。

20

【 0 0 4 0 】

特に好ましい材料は、以下に限定されないが、ガラス、ケイ素、石英または他の鉱物、プラスチック、セラミックス、金属、紙、メタロイド、半導体、セメントなどを含む。さらに、タンパク質（例えばゼラチン）、リポ多糖類、ケイ酸塩、アガロースおよびポリアクリルアミドといったゲルを形成する物質を使用することができる。天然および合成両方の、多種多様な有機重合体および無機重合体が、固体表面の材料として使用され得る。例示的な重合体は、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、レーヨン、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)、シリコン、ポリホルムアルデヒド、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロースなどを含む。

30

【 0 0 4 1 】

導電性または半導電性基板の場合、好ましくは基板に絶縁層が存在する。これは、デバイスが電氣的要素を組み込む場合（例えば、電氣的流体方向システム、センサなど、または電気浸透力を使用してシステムの周りで材料を移動させる）、特に重要である。重合体基質の場合、基質材料は、それらが意図される用途に応じて、硬質、半硬質、または非硬質、不透明、半透明または透明とすることができる。例えば、光学的または視覚的検出要素を含むデバイスは一般に、その検出を可能にするか、または少なくとも助成するために、少なくとも部分的に、透明材料により製作される。あるいはまた、例えばガラスまたは石英の透明な窓が、こうした形式の検出要素についてデバイスに採り入れられ得る。付加的に、重合体材料は、直鎖または枝分かれ主鎖を有し、架橋されるか、または非架橋とすることができる。特に好ましい重合体材料の例は、例えばポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリウレタン、ポリ塩化ビニル(VPC)、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリカーボネートなどを含む。

40

【 0 0 4 2 】

50

チャンネルはより大きい物体の構成要素とすることができる。従って、チャンネルは、多数のチャンネルを得るために１個以上の他のチャンネルと組み立てることができる。それによって複数の異なるアッセイを同時に実行することができる。チャンネルは、適切な液体取扱および／または検出および／またはサンプル取扱／適用機能を含む器械の構成要素とすることができる。

【００４３】

また、チャンネルは、本発明のアッセイを実行する器械に適宜「プラグイン」できる再使用可能または使い捨てのユニットとして製作することができる。チャンネルは、以下に限定されないが、マイクロ滴定皿（例えば、ＰＶＣ、ポリプロピレンまたはポリスチレン）、試験管（ガラスまたはプラスチック）、計量棒（例えばガラス、ＰＶＣ、ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックスなど）、マイクロ遠心分離管、またはガラス、シリカ、プラスチック、金属または重合体ビーズを含む、多種多様な物体のうちのいずれか１個以上に備え得ることが理解される。

10

【００４４】

特に好ましい実施形態では、１個以上のチャンネルが、キャピラリー管（例えばキャピラリー電気泳動管）として、ガラスまたはケイ素スライドに、キャピラリーチャンネルとして設けられるか、または液体の流れの制御、サンプルの適用および／または信号の検出のためのオンボード回路要素を有する「集積回路」の要素として製作される。最も好ましい実施形態において、チャンネルは、本明細書中の実施例において例示したように、例えばキャピラリー電気泳動管などのキャピラリーとして備えられる。

20

【００４５】

（２）チャンネル製作）

本発明のチャンネルを製作する方法は、当業者には公知である。例えば、チャンネルが１個以上のキャピラリーから形成される場合、キャピラリーは市販業者（例えば *Polymericron Technologies, Tucson, Az*）から購入するか、または従来のキャピラリー「引抜き」機によって引抜きまたは押出しすることができる。

【００４６】

表面上にチャンネルを製作する場合、それらは標準の技法によって形成でき、例えば、機械加工、成形、彫刻、エッチング、積層、押出または堆積などが可能である。

【００４７】

好ましい１実施形態において、チャンネルは、固体電子産業で公知のマイクロマシニングプロセス（例えばフォトリソグラフィ）を用いて製作される。通例、マイクロデバイス、例えばマイクロチャンネルは、集積回路を製造するために使用される半導体ウェーハの形で広範に入手可能な結晶ケイ素といった半導体基板から、またはガラスから作成される。材料の共通性のため、半導体ウェーハ基板からのマイクロデバイスの製作は、集積回路（ＩＣ）製造のために半導体加工業によって開発された表面エッチング技法およびバルクエッチング技法両方の幅広い経験を活用できる。

30

【００４８】

ＩＣ製造において半導体ウェーハに薄い表面パターンを形成するために使用される表面エッチングは、可動要素を作成するために半導体材料の薄層の犠牲アンダーカットエッチングを可能にするように修正できる。ＩＣ製造において一般に、異方性エッチングプロセスを用いてウェーハに深いトレンチを形成する際に使用されるバルクエッチングは、マイクロデバイスにおいてエッジまたはトレンチを精密に機械加工するために使用することができる。ウェーハの表面エッチングおよびバルクエッチングは両方とも、ウェーハからマスクされていない材料を取り去るために水酸化カリウム溶液といった化学薬品を使用する、「ウェット処理」により行うことができる。マイクロデバイス作成には、各種チャンネル要素を形成するために、材料の示差的な結晶方位に頼る、または電気化学的エッチストップの使用に依存する、異方性ウェット処理技法を使用することさえ可能である。

40

【００４９】

マイクロデバイス設計の相当の自由を許す別のエッチング処理技法は、一般に「ドライエ

50

「エッチング処理」として知られている。この処理技法は、微細構造の異方性エッチングに特に適する。ドライエッチング処理は、ウェーハ原子を気相に移すためにウェーハを高エネルギー原子またはイオンで衝撃する高異方性スパッタリングプロセスから（例えば、イオンビームミリング）、揮発性反応生成物の形成を誘起するために化学的反応性イオンを含んでいるプラズマストリームをウェーハに対して誘導するやや等方性の低エネルギープラズマ技法にまで及ぶ、多くの気相またはプラズマ相エッチング技法を含む。

【0050】

高エネルギースパッタリング技法と低エネルギープラズマ技法との中間には、反応性イオンエッチングとして知られる特に有用なドライエッチングプロセスがある。反応性イオンエッチングは、同時的なスパッタリングおよびプラズマエッチングのためにイオン含有プラズマストリームを半導体または他のウェーハに対して誘導することを伴う。反応性イオンエッチングは、ウェーハとの反応性プラズマイオンの接触にตอบสนองした気相反応生成物の形成のために反応性プラズマイオンを供しながらも、スパッタリングに関係する異方性の利益のいくつかを保持する。実際、ウェーハ材料除去の速度は、単独で行うスパッタリング技法または低エネルギープラズマ技法のどちらか一方に対して著しく増強される。従って、反応性イオンエッチングは、相対的に高い異方性エッチングレートが持続可能であることにより、マイクロデバイス作成のための優れたエッチングプロセスとなる可能性を有する。上述のマイクロマシニング技法は、他の多くのことと同様、当業者には公知である（例えば、Choudhury (1997) The Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication, Soc. Photo-Optical Instr. Eng. Bard & Faulkner (1997) Fundamentals of Microfabrication 参照）。さらに、ケイ素またはホウケイ酸ガラスチップでのマイクロマシニング技法の使用の実例は、米国特許第5,194,133号、同第5,132,012号、同第4,908,112号および同第4,891,120号に見ることができる。

10

20

【0051】

1実施形態において、チャンネルは、ケイ素（100）ウェーハにおいて、チャンネルおよび接続をパターン形成するために標準のフォトリソグラフィ技法を用いて微細加工される。エチレンジアミン、ピロカテコール（EDP）が2段エッチングに使用され、閉液系を付与するためにパイレックス（登録商標）（Pyrex）7740カバープレートをケイ素の面に陽極接合することができる。この場合、液体接続はケイ素の背部に作ることができる。

30

【0052】

上述の通り、好ましい実施形態において、チャンネルは、ガラス、石英または、キャピラリー電気泳動管といった他のキャピラリーから製作することができる。

【0053】

他の実施形態では、チャンネルは、チャンネル壁を形成するために基板に材料を堆積させることによって（例えば、スパッタリングまたは他の溶着技術を用いて）製作できるか、またはチャンネルは材料において注型/成形され得る。注型/成形チャンネルは、以下に限らないが、様々な金属、プラスチックまたはガラスを含む、多種多様な材料から容易に製作される。特定の好ましい実施形態において、チャンネルは各種エラストマー（例えば、アルキル化クロロスルホン化ポリエチレン（Acsum（登録商標））、ポリオレフィンエラストマー（例えばEngage（登録商標））、クロロスルホン化ポリエチレン（例えばHypalon（登録商標））、ペルフルオロエラストマー（例えばKalrez（登録商標））、ネオプレンポリクロロプレン、エチレン-プロピレン-ジエンターポリマー（EPDM）、塩素化ポリエチレン（例えばTyryn（登録商標））、各種シロキサン重合体（例えばポリジメチルシロキサンなど）で注型される。

40

【0054】

（B）結合相手）

50

好ましい実施形態において、本発明で使用するチャネルは、1以上の表面に固定された1個以上の生物学的「結合相手」を保持する。生物学的「結合相手」または「結合ペア」の構成員は、抗体-抗原、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ピオチン-アビジンなどといった結合複合体を形成するために、他の分子と特異的に結合する分子または組成をいう。

【0055】

用語「特異的に結合する」は、本明細書中で使用されるように、生体分子（例えば、タンパク質、核酸、抗体など）を指す時に、タンパク質および他の生物学的製剤の生体分子異種集団の存在を決定づける結合反応をいう。従って、指定された条件下で（例えば、抗体の場合におけるイムノアッセイ条件、または核酸の場合におけるストリンジェントハイブリダイゼーション条件）、指定のリガンドまたは抗体は、その特定の「標的」（例えば、タンパク質または核酸）と結合し、他の分子と有意な量で結合しない。

10

【0056】

本発明において使用される結合相手は、識別/定量化される標的に基づいて選択される。従って、例えば、標的が核酸である場合、結合相手は、好ましくは核酸または核酸結合タンパク質である。標的がタンパク質である場合、結合相手は好ましくは、そのタンパク質と特異的に結合するレセプター、リガンドまたは抗体である。標的が糖類または糖タンパク質である場合、結合相手は、好ましくはレクチンなどである。

【0057】

適格な結合相手（捕獲剤）は、以下に限らないが、核酸、タンパク質、レセプター結合タンパク質、核酸結合タンパク質、レクチン、糖類、糖タンパク質、抗体、脂質などを含む。そのような結合相手の合成または単離方法は、当業者には公知である。

20

【0058】

（1）結合相手（捕獲剤）の調製）

（a）核酸）

本発明において結合相手として使用するための核酸は、当業者に公知の多数の方法のいずれかに従って製造または単離することができる。1実施形態では、核酸は、単離された自然発生核酸（例えば、ゲノムDNA、cDNA、mRNAなど）とすることができる。自然発生核酸を単離する方法は当業者には公知である（例えば、Sambrookら（1989）Molecular Cloning - A Laboratory Manual（第2版）、1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 参照）。

30

【0059】

しかし、好ましい実施形態において、核酸は例えば化学合成によって新規に（de novo）作成される。好ましい実施形態では、核酸（例えばオリゴヌクレオチド）は、Needham-Vandevanterら（Needham-Vandevanterら（1984）Nucleic Acids Res., 12:6159-6168）に記載の通り自動合成デバイスを用いるなどして、BeaucageおよびCaruthers（Beaucage and Caruthers（1981）, Tetrahedron Letts., 22（20）:1859-1862）が記載した、固相ホスホラミダイトリエステル法に従って化学的に合成される。必要な場合、オリゴヌクレオチドの精製は一般に、PearsonおよびRegnier（Pearson and Regnier（1983）J. Chrom. 255:137-149）に記載の通り、ネイティブアクリルアミドゲル電気泳動またはアニオン交換HPLCのどちらか一方によって実行される。合成オリゴヌクレオチドの配列は、MaxamおよびGilbert（Maxam and Gilbert（1980）in Grossman and Moldave（編）Academic Press, New York, Meth. Enzymol. 65:499-560）の化学的減成法を用いて確認できる。

40

【0060】

（b）抗体/抗体フラグメント）

50

結合相手（捕獲剤）として使用するための抗体または抗体フラグメントは、当業者に公知の多くの方法によって製造することができる（例えば、Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, and Asai (1993) *Methods in Cell Biology* 第37巻: *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. N.Y. 参照）。1方法において、抗体は、認識／捕獲したいと望むエピトープを含んでいる免疫原により動物（例えばウサギ）を免疫にすることによって産生される。多数の免疫原が特異反応性抗体を産生するために使用できる。組換えタンパク質は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の産生に好ましい免疫原である。また天然に存在するタンパク質も、10
 純粋または不純な形態のどちらか一方で利用できる。合成ペプチドも同様に、標準のペプチド合成化学によって作成される（例えば、BaranyおよびMerrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; 3-284頁、*The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. 第2巻: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A*, Merrifieldら (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156, and Stewartら (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第2版、Pierce Chem. Co., Rockford, Ill 参照）。

【0061】

ポリクローナル抗体の産生方法は当業者に周知である。簡単にいえば、好ましくは精製した細胞骨格成分である免疫原を、アジュバントと混合し、動物を免疫にする。その動物の免疫原製剤に対する免疫反応を、試験ブリードを行い、細胞骨格成分および試験組成への反応性の力価を決定することによって監視する。免疫原に対する抗体の適切に高い力価が得られた場合、血液を動物から採集し、抗血清が準備される。所要の場合、細胞骨格成分に反応性の抗体について濃縮するために抗血清のさらなる画分を行うことができる。（前掲Harlow & Laneを参照）。

【0062】

モノクローナル抗体は、当業者にはなじみの各種技法によって得ることができる。簡単にいえば、所望の抗原で免疫にされた動物からの脾臓細胞を、一般に骨髄腫細胞との融合によって、不死化する（KohlerおよびMilstein (1976) *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519参照）。不死化の代替方法は、エプスタイン・バーウイルス、癌遺伝子もしくはレトロウイルスまたは当業で周知の他の方法による形質転換を含む。単一の不死化細胞から生じるコロニーを、抗原について所望の特異性およびアフィニティの抗体の産生のためにスクリーニングし、そしてそのような細胞により産生されるモノクローナル抗体の収率は、脊椎動物宿主の腹膜腔への注入を含む各種技法によって増強できる。あるいはまた、Huseら（Huseら (1989) *Science*, 246: 1275-1281）により概説された一般プロトコルに従ってヒトB細胞からDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、モノクローナル抗体またはその結合フラグメントをコードするDNA塩基配列を単離することも可能である。

【0063】

例えば一本鎖抗体（scFvまたはその他）などの抗体フラグメントも、ファージディスプレイ技術を用いて産生／選択することができる。バクテリアを感染させるウイルス（バクテリオファージまたはファージ）の表面に抗体フラグメントを発現できる能力は、 10^{10} を超える非結合クローンのライブラリーから単一の結合抗体フラグメントを単離することを可能にする。ファージの表面に抗体フラグメントを発現させる（ファージディスプレイ）ために、抗体フラグメント遺伝子がファージ表面タンパク質（pIII）をコードする遺伝子に挿入され、そして抗体フラグメント-pIII融合タンパク質がファージ表面にディスプレイされる（McCaffertyら (1990) *Nature*, 348: 552-554; Hoogenboomら (1991) *Nucleic Acids R*

10

20

30

40

50

es. 19 : 4133 - 4137)。

【0064】

ファージの表面上の抗体フラグメントが機能性であるので、抗原結合抗体フラグメントを保持するファージは、抗原アフィニティークロマトグラフィー (McCaffertyら (1990) Nature, 348 : 552 - 554) によって非結合ファージから単離できる。抗体フラグメントのアフィニティーに依存して、一回のアフィニティー選別について20倍～1,000,000倍の濃縮率が得られる。しかし、溶離されたファージにバクテリアを感染させることによって、より多くのファージを増殖させ、そしてもう1回の選別を受けさせることができる。このようにして、1回での1000倍の濃縮が2回の選別において1,000,000倍になり得る (McCaffertyら (1990) Nature, 348 : 552 - 554)。従って濃縮が低い時でさえ (Marksら (1991) J. Mol. Biol. 222 : 581 - 597)、複数回のアフィニティー選別は、稀少ファージの単離をもたらし得る。抗原のファージ抗体ライブラリーの選別が濃縮を結果として生じるので、大多数のクローンは、3～4回程度の選別の後に抗原を結合する。従って、比較的少数 (数百) のクローンを抗原との結合のみについて分析する必要がある。

10

【0065】

ヒト抗体は、ファージ上で非常に大きくかつ多様なV遺伝子レパートリーをディスプレイすることによって従来の免疫法によらず產生できる (Marksら (1991) J. Mol. Biol. 222 : 581 - 597)。1実施形態において、ヒトの末梢血リンパ球に存在する自然のV_HおよびV_Lレパートリーが、非免疫化ドナーからPCRによって単離された。V遺伝子レパートリーは、PCRを用いて無作為に共にスプライスされ、scFv遺伝子レパートリーを作製し、これはファージベクターにクローンされて3000万ファージ抗体のライブラリーを作製した (同書)。この単一の「未処理の」ファージ抗体ライブラリーから、結合抗体フラグメントが、ハプテン、多糖類およびタンパク質を含む、17を超える異なる抗原に対して単離された (Marksら (1991) J. Mol. Biol. 222 : 581 - 597; Marksら (1993) Bio/Technology, 10 : 779 - 783; Griffithsら (1993) EMBO J. 12 : 725 - 734; Clacksonら (1991) Nature, 352 : 624 - 628)。抗体は、ヒトのサイログロブリン、免疫グロブリン、腫瘍壊死因子およびCEAを含む、自己タンパク質に対して產生された (Griffithsら (1993) EMBO J. 12 : 725 - 734)。また、そのままの細胞で直接選別することによって細胞表面抗原に対する抗体を単離することも可能である。抗体フラグメントは、選別に使用される抗原について非常に特異的であり、1 : M ~ 100 nMの範囲のアフィニティーを有する (Marksら (1991) J. Mol. Biol. 222 : 581 - 597; Griffithsら (1993) EMBO J. 12 : 725 - 734)。より大きなファージ抗体ライブラリーは、より大きい割合の抗原に対する高い結合アフィニティーの、より多数の抗体の単離を結果として生じる。

20

30

【0066】

(c) 結合タンパク質)

1実施形態において、結合相手 (捕獲剤) は結合タンパク質であり得る。適格な結合タンパク質は、以下に限らないが、レセプター (例えば、細胞表面レセプター)、レセプターリガンド、サイトカイン、転写因子および他の核酸結合タンパク質、成長因子などを含む。

40

【0067】

タンパク質は、天然源から単離するか、単離されたタンパク質から突然変異を誘発させるか、または新規に合成することができる。天然に存在するタンパク質を単離する手段は、当業者に公知である。そのような方法は、以下に限らないが、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、周知のタンパク質精製方法を含む (一般的には、R. Scopes, (1982) Protein

50

Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) Methods in Enzymology 第182巻: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. 参照)。

【0068】

タンパク質が標的を可逆的に結合する場合、標的を保持するアフィニティークラムが、タンパク質をアフィニティ精製するために使用され得る。あるいは、タンパク質は、HISタグと組換え的に発現され、そしてNi²⁺/NTAクロマトグラフィーを用いて精製されることもできる。

【0069】

別の実施形態では、タンパク質は、標準の化学的ペプチド合成技法を用いて化学的に合成され得る。所望の配列が比較的短い場合、分子は、単一の連続的なポリペプチドとして合成され得る。より大きい分子が所望される場合、部分配列は(1以上の単位で)別個に合成され、その後、一方の分子のアミノ末端と他方の分子のカルボキシル末端との縮合によりペプチド結合を形成することによって融合できる。これは代表的に、商業用ペプチド合成機において単一のアミノ酸を結合するために使用されるのと同じ化学(例えば、Fmoc、Tboc)を用いて行われる。

【0070】

配列のC末端アミノ酸が不溶性担体に固定された後、配列の残りのアミノ酸の順次的付加を伴う固相合成は、本発明のポリペプチドの化学合成のために好ましい方法である。固相合成の技法については、BaranyおよびMerrifield (BaranyおよびMerrifield (1962) Solid-Phase Peptide Synthesis; 3-284頁, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, 第2巻: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.), Merrifieldら (Merrifieldら (1963) J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156) および、Stewartら (Stewartら (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill) により記載されている。

【0071】

好ましい実施形態において、それは、組換えDNA方法論を用いて合成され得る。一般に、これは、結合タンパク質をコードするDNA塩基配列を作成する工程、特定のプロモーターの制御下の発現カセットにDNAを置く工程、宿主においてタンパク質を発現させる工程、発現したタンパク質を単離する工程、さらに必要な場合、タンパク質を再生させる工程を包含する。

【0072】

本発明の結合タンパク質または配列をコードするDNAは、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限または、Narangらのホストリエステル法 (Narangら (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99)、Brownらのホスホジエステル法 (Brownら (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151)、Beaucageらのジエチルホスホラミダイト法 (Beaucageら (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862) および、米国特許第4,458,066号の固体担体法といった方法による直接的化学合成を含む、上述のような任意の適切な方法によって調製することができる。

【0073】

所望の結合タンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌、他の細菌宿主、酵母、ならびにCOS、CHOおよびHeLa細胞株および骨髓腫細胞系などの様々な高次の真核細胞を含む、多様な宿主細胞において発現され得る。組換えタンパク質遺伝子は、個々の宿主について適切な発現調節配列と作動可能に連結され得る。大腸菌の場合、これは、T7、trpまたはλプロモーターといったプロモーター、リボソーム結合部位および、好ましく

10

20

30

40

50

は転写終結シグナルを含む。真核細胞の場合、調節配列はプロモーターおよび好ましくは、免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルスなどから誘導されたエンハンサー、およびポリアデニンレーション配列を含み、また、スプライスドナーおよびレセプター配列を含むこともある。

【0074】

プラスミドは、大腸菌の場合の塩化カルシウム形質転換および、哺乳動物細胞の場合のリン酸カルシウム処理または電気穿孔といった公知の方法によって、選択された宿主細胞に移入され得る。プラスミドにより形質転換される細胞は、amp 遺伝子、gpt 遺伝子、neo 遺伝子およびhyg 遺伝子といったプラスミドに含まれる遺伝子により与えられる抗体への耐性によって選択されることができる。

10

【0075】

一旦発現されると、組換え結合タンパク質は、上述のような当業の標準のプロトコルに従って精製され得る。

【0076】

(d) 糖類および炭水化物)

他の結合相手としては糖類および炭水化物を含む。糖類および炭水化物は、天然源から単離するか、酵素により合成するかまたは、化学的に合成することができる。特定の少糖類構造の産生のための経路は、in vivo でそれらを作製する酵素(グリコシルトランスフェラーゼ)の使用によるものである。そうした酵素は、少糖類のin vitro 合成のためのレジオ選択的およびステレオ選択的触媒として使用され得る(Ichikawa 20 a ら(1992) Anal. Biochem. 202:215-238)。シアリルトランスフェラーゼは補助的なグリコシルトランスフェラーゼとの組合せで使用され得る。例えば、シアリルトランスフェラーゼとガラクトシルトランスフェラーゼとの組合せを使用することができる。所望の少糖類構造を合成するためにグリコシルトランスフェラーゼを使用する多くの方法が公知である。例示的な方法は、例えば、WO96/32491、Ito ら(Ito ら(1993) Pure Appl. Chem. 65:753)ならびに、米国特許第5,352,670号、第5,374,541号および第5,545,553号に記載されている。酵素および基質は初期の反応混合物において組合せられるか、または代わりに、酵素および第2のグリコシルトランスフェラーゼ回路の試薬を、最初のグリコシルトランスフェラーゼ回路が完成に近づいた時に反応媒体に添加することができる 30。単一の容器において2つのグリコシルトランスフェラーゼ回路を順番に実施することによって、全体の収率は、中間種が単離されるプロトコルよりも改善される。

20

30

【0077】

化学合成の方法はZhang (Zhang ら(1999) J. Am. Chem. Soc., 121(4):734-753)により記載されている。簡単にいえば、この方法では、糖ベースの基本単位のセットは、異なる保護基をプレロードされた各基本単位により作成される。基本単位は各保護基の反応性によって格付けされる。その後コンピュータプログラムが、最速のものから最緩のものまで一連の反応が所望の化合物を産生するように、どの基本成分が反応に追加されなければならないかを正確に決定する。

【0078】

(2) チャネルへの結合相手の付着)

生体分子を多様な固体表面に固定化する多くの方法が当該分野で公知である。所望の成分は、共有結合されるかまたは、特異的または非特異的な結合を介して非共有結合で固定され得る。

40

【0079】

化合物と表面との間に共有結合が望まれる場合、表面は通常、多官能性であるか、または多官能化できるものである。表面に存在しそして結合に使用され得る官能基は、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基などを含み得る。多様な化合物を各種表面に連結する方法は、周知であり、そして文献に豊富に例示されている。例えば、Ichiro Chibata (Ichiro Chiba 50

50

ta (1978) Immobilized Enzymes, Halsted Press, New York) および Cuatrecasas (Cuatrecasas, (1970) J. Biol. Chem. 245:3059) を参照されたい。

【0080】

共有結合に加え、アッセイ成分を非共有結合で結合する各種方法を使用することができる。非共有結合は一般に、表面への化合物の非特異的な吸着である。通常、表面は、標識されたアッセイ成分の非特異的な結合を防止するために第2の化合物でブロックされる。あるいは、表面を、それが1成分と非特異的に結合するが別のものとはほとんど結合しないように設計する。例えば、コンカナバリンAといったレクチンを保有する表面は、炭水化物含有化合物とは結合するが、グリコシル化を欠く標識されたタンパク質とは結合しないであろう。アッセイ成分の非共有結合での固定に使用するための各種固体表面は、米国特許第4,447,576号および同第4,254,082号において概説されている。

10

【0081】

結合相手が核酸またはポリペプチドである場合、分子は、*in situ*で化学的に合成することができる。これは、光不安定性保護基を通常の保護基（例えば、核酸合成において使用されるジメトキシトリチル基(DMT)）で置換する実質的に標準の化学合成方法を含む。離散した位置でのマイクロチャネルの照射は、モノマー（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）と、照射された部位の成長ポリペプチドまたは核酸との選択的結合を結果として生じる。光指向性重合体合成の方法は当業者には周知である（例えば、米国特許第5,143,854号、PCT公開番号WO90/15070、WO92/10092 およびWO93/09668、さらにFodorら(1991) Science, 251, 767-77参照）。

20

【0082】

好ましい実施形態において、結合相手はリンカー（例えば、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性リンカー）を使用して固定され得る。生物学的結合相手を結合するために適格なリンカーは、当業者に周知である。例えば、タンパク質または核酸分子は、以下に限らないが、ペプチドリリンカー、直鎖または枝分れ鎖炭素鎖リンカーを含む多様なリンカーのうちの一つのいずれかによって、または複素環式炭素リンカーによって結合され得る。N-エチルマレイミドの活性エステルといったヘテロ二官能性架橋試薬は、広く使用されている（例えば、Lernerら(Lernerら(1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78:3403-3407)、Kitagawara(Kitagawara(1976) J. Biochem., 79:233-236)、BirchおよびLennox(Birch and Lennox(1995) 第4章, Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, N.Y.)参照）。

30

【0083】

好ましい1実施形態では、結合相手は、ビオチン/アビジン相互作用を用いて固定される。この実施形態において、光不安定性保護基を有するビオチンまたはアビジンが、チャネルに配置され得る。個別の位置のチャネルの照射は、その位置におけるチャネルへのビオチンまたはアビジンの結合を生じる。その後、各々のビオチンまたはアビジンを保持する結合剤がチャネルに配置されて、それは各々の結合相手と結合し、照射部位において局在化される。このプロセスが、結合相手を固定することが望まれる各個別位置において繰り返され得る。

40

【0084】

別の適切な光化学的結合方法は、Sigristら(Sigristら(1992) Bio/Technology, 10:1026-1028)が記載している。この方法では、有機表面または無機表面とのリガンドの相互作用は、リンカー分子として働くトリフルオロメチル-アリール-ジアジリンを生成するカルベンを有する光活性化可能な重合体によって仲介される。350nmにおけるアリール-ジアジリノ官能基の光活性化は高反応性カルベンを産出し、そして共有結合はリガンドおよび不活性表面両方への同時カルベン

50

挿入によって達成される。従って、反応性官能基はリガンドまたは支持材料のどちらにおいても必要ではない。

【0085】

最も好ましい実施形態において、熔融シリカ (fused silica) キャピラリー (内径 $50\text{ }\mu\text{m}$) は、有機塗料で熔融シリカ表面を被覆するためにエポキシ樹脂 (Epo-tek 350) の薄層を塗被される。表面の有機塗料は、キャピラリー壁への DNA 吸着を最小限にするだけでなく、DNA プローブが直接固定化できる重合化表面を提供する。エポキシ樹脂でキャピラリー表面を被覆するプロトコルは、Liura (Liura (1996) J. Chromatogr. 723: 157-167) が記載している。簡単にいえば、キャピラリーを、最初にアセトンで15分間すすぎ洗いした後、20 psi の窒素圧下で1時間、100 でオープンにて乾燥した。エポキシ樹脂 314ND (Epo-Tek, Billerica, MA) を、エポキシ樹脂混合物のアセトン溶液を吸引することによってキャピラリー表面に動的に被覆した。残留溶剤は、室温で30分間、窒素を流すことによってエポキシ樹脂被覆キャピラリーから除去された。エポキシ樹脂塗料を80 で30分間、その後20 psi の窒素圧下で150 で2時間、架橋した。塗被したキャピラリーは、使用前に30分間緩衝液で洗浄する。

10

【0086】

その後、エポキシ樹脂被覆キャピラリーの1 cm セクションに、特定の DNA プローブ溶液を流す。DNA プローブ溶液は、DNA プローブを疎水性相互作用および静電相互作用によってキャピラリー壁と結合させるために一晚キャピラリー片と反応させる。他の DNA プローブは、同様の1 cm 長の被覆キャピラリー片に同様にして固定される。一旦それがキャピラリー壁に固定化されると、それらのハイブリダイゼーション領域は、脱イオン水ですすいだ後、異なる位置に異なる結合相手を有するキャピラリーバイオセンサに組み立てる準備が整う。

20

【0087】

(C) 分析物検出方法)

生物学的分子検出の事実上あらゆる方法が、本発明の方法に従って使用されることができる。各種分析物の正体が、チャンネル内を動いている流れにおけるそれらの空間位置によって決定されるので、個々の分析物に関して異なる標識化システムの必要がない。それどころか、このアッセイシステムの1つの利点は、分析物に標識を付ける必要がまったくない

30

【0088】

分析物を検出する方法は当業者に周知である。分析物が(例えば、放射性、蛍光性、磁気または質量標識により)標識化されている場合、分析物は、標識を検出することによって検出される。しかし、好ましい実施形態では、分析物は標識化されず、そして好ましい検出方法は分析物に付けられた標識の使用に依存しない。そうした検出方法は、以下に限らないが、光信号の検出(例えば、放射および/または吸収分光学)、電気および磁気的信号の検出、分析物を含有する媒体の電気的特性(例えば、コンダクタンス/抵抗、キャパシタンス、インピーダンスなど)の変化の検出を含む。

【0089】

単純な1実施形態では、分析物を含有する流体の光学的吸収が、(例えば、標準の紫外線)検出器により監視される。しかし、好ましい実施形態では、電気分析的検出器が使用される。最も好ましい実施形態では、電気分析的検出器は(例えばシヌソイド)ボルタンメトリーを使用する。

40

【0090】

特に好ましい実施形態において、シヌソイドボルタンメトリーは、少量の目的的分析物をボルタンメトリー電極に供給することを含む。正弦(または他の経時変化する)電圧が電極に適用される。経時変化する(例えば正弦)電圧は、所定の周波数の単一周期で目的のレドックス種の形式電位を掃引するために十分に大きい振幅を有する。正弦波電圧に対する分析物の応答は、経時変化電圧の基本周波数の高調波で選択的に検出される。経時変化

50

ボルタンメトリーを実行する方法は、米国特許第 5,650,061 号およびその中で引用された参考文献において提供されている。

【0091】

特に好ましい実施形態はシヌソイドボルタンメトリーを利用するが、他のボルタンメトリー方法も本発明に良好に適する。上述の通り、経時変化ボルタンメトリー方法が特に好ましく、そしてそうしたボルタンメトリー方法は正弦波の経時変化する電圧の使用に制限されない。また他の波形も適切である。そのような方法は、以下に限らないが、方形波および三角波 (triangle wave) の使用を含む。そうした経時変化ボルタンメトリー方法は当業者に周知である (例えば、Cullison and Kuhr (1996) *Electroanalysis*, 7(1): 1-6 参照)。

10

【0092】

本発明の発見は、シヌソイドボルタンメトリー検出と空間的にコードされた分析物単離との組合せが、複雑なサンプル (例えば血清) において極めて低いレベルで高度に特異的な分析物の検出 / 定量を提供することであった。

【0093】

(III. 統合アッセイデバイス)

薬品製造、環境分析、医学診断および基礎実験室分析において使用される最新の化学分析システムは、好ましくは全自動化の能力がある。そうした総合分析システム (TAS) (Fillipiniら (1991) *J. Biotechnol.* 18: 153; Garnら (1989) *Biotechnol. Bioeng.* 34: 423; Tshulena (1988) *Phys. Scr. T* 23: 293; Edmonds (1985) *Trends Anal. Chem.* 4: 220; Stinshoffら (1985) *Anal. Chem.* 57: 114R; Guibault (1983) *Anal. Chem. Symp. Ser.* 17: 637; Widmer (1983) *Trends Anal. Chem.* 2: 8) は、システムへのサンプルの導入から、システム内のサンプルの輸送、サンプル調製、単離、精製および、データ収集および評価を含む検出に及ぶ機能を自動的に実行する。

20

【0094】

近年、サンプル調製技術は、小型化された形態に首尾よく縮小されている。従って例えば、ガスクロマトグラフィー (Widmerら (1984) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 18: 1)、高圧液体クロマトグラフィー (Mullerら (1991) *J. High Resolut. Chromatogr.* 14: 174; Manzら (1990) *Sensors & Actuators B* 1: 249; Novotnyら編 (1985) *Microcolumn Separations: Columns, Instrumentation and Ancillary Techniques J. Chromatogr. Library*, 第30巻; Kucera編 (1984) *Micro-Column High Performance Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam; Scott編 (1984) *Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses*, Wiley, N. Y. ; Jorgensonら (1983) *J. Chromatogr.* 255: 335; Knoxら (1979) *J. Chromatogr.* 186: 405; Tsudaら (1978) *Anal. Chem.* 50: 632) および、キャピラリー電気泳動法 (Manzら (1992) *J. Chromatogr.* 593: 253; Olefirowiczら (1990) *Anal. Chem.* 62: 1872; Second Int'l Symp. High-Perf. Capillary Electrophoresis (1990) *J. Chromatogr.* 516; Ghowsiら (1990) *Anal. Chem.* 62: 2714) は、小型化された形態に首尾よく縮小されている。

30

40

【0095】

同様に、別の実施形態において、本発明は、多数の分析物を検出および / または定量化す

50

る統合アッセイデバイス（例えばＴＡＳ）を提供する。アッセイデバイスは、上述の通り固定された結合相手を備えるチャンネルを含む。さらに、好ましい統合アッセイデバイスは、以下の１つ以上も含む：検出システム（例えば、電極および／または関係するエレクトロニクスを含むボルタンメトリーシステム）、緩衝液および／またはフラッシング流体を供給する１つ以上のリザーバ、サンプルアプリケーションウェルおよび／または注入口、（ポンプ、リザーバフロー切り替え、検出器およびシグナル分析システムなどの制御のための）コンピュータコントローラ。

【００９６】

特に好ましい実施形態では、統合アッセイデバイスはチャンネルを「着脱可能な」ユニットに備える。従って例えば、付随デバイスから容易に挿入および着脱できるキャピラリーがモジュールにチャンネルとして設けられ得る場合、それによりデバイスは分析物の異なるセットのアッセイで容易に稼働できるようになる。

10

【００９７】

デバイスで使用されるチャンネルが管（例えば、キャピラリー電気泳動管）である場合、従来のキャピラリー電気泳動デバイスは、多くの、本発明に従った「統合」アッセイデバイスのための付随的配管、サンプル取扱い構成要素および送給構成要素およびコンピュータコントローラを備えている。多様な分析物の検出および／または定量に良好に適する統合アッセイデバイスを提供するために、本発明に従った検出器（例えば、シヌソイドボルタンメトリー検出器）および関係するエレクトロニクスのかなり単純な導入／追加以外ほとんど必要ではない。

20

【００９８】

（ＩＶ．アッセイの実行）

一般に、アッセイは、固定された結合相手を有するチャンネルにサンプルを導入することによって実行される。サンプルは、それぞれの結合相手が、サンプルに存在し得る標的分析物と特異的に結合できるようにする条件下に好適に保たれる。その後、サンプルは、一般に結合した分析物の放出を助成する緩衝液の導入によって、チャンネルからフラッシュされる。その後放出された分析物は下流の検出ポイントで検出され、そして分析物の正体が放出から検出までの時間によって決定される。

【００９９】

（Ａ）サンプルの調製）

事実上あらゆるサンプルが、この有利なデバイスおよび方法を用いて分析できる。しかし、好ましい実施形態では、サンプルは生物学的サンプルである。用語「生物学的サンプル」は、本明細書中で使用されるように、生物体または生物体の構成要素（例えば細胞）から得られるサンプルをいう。サンプルはあらゆる生物学的組織または流体のものとし得る。多くの場合、サンプルは、患者に由来するサンプルである「臨床的サンプル」である。そのようなサンプルは、以下に限らないが、喀痰、脳脊髄液、血液、血液画分（例えば血清、血漿）、血球（例えば白血球）、組織または細針生検サンプル、尿、腹水および胸水、またはそれらに由来する細胞を含む。また、生物学的サンプルは、組織学上の目的で得られた凍結切片といった組織切片も含み得る。

30

【０１００】

生物学的サンプル（例えば血清）は直接分析されるてもよいし、それらは本発明のアッセイでの使用前に何らかの調製に供されてもよい。そのような調製は、以下に限らないが、水または適切な緩衝液におけるサンプルの懸濁／希釈または、例えば遠心分離などによる細胞残屑の除去、または分析前のサンプルの特定の画分の選択を含み得る。

40

【０１０１】

（Ｂ）システムへのサンプルの送給）

サンプルは、当業者に周知の標準方法に従って本発明のデバイスに導入できる。従って例えば、サンプルは、高圧液体クロマトグラフィーシステムにおいて使用されるもののよう注入口を通じてチャンネルに導入することができる。別の実施形態では、サンプルはチャンネルと連絡しているサンプルウェルに適用できる。さらに別の実施形態において、サン

50

ルはチャンネル内にポンプ送給され得る。サンプルをチャンネルに導入する方法は周知であり、キャピラリー電気泳動法およびクロマトグラフィーの技術において標準である。

【0102】

(C) 結合条件)

一旦チャンネルに入ると、サンプルは、サンプルと結合相手との間での特異的な結合を促進する条件のもとに保たれる。結合相手と分析物との間での特異的な結合に適合する条件は、当業者に周知である。例えば、抗体と標的タンパク質との間の結合を促進するために適切な緩衝液がイムノアッセイ技術において周知である(例えば、米国特許第4,366,241号、第4,376,110号、第4,517,288号および第4,837,168号; Asai (1993) *Methods in Cell Biology* Volume 37: *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition 参照)。同様に、核酸が相互に特異的にハイブリダイズする際の条件も当業者に周知である(前掲 Tijssen (1993) 参照)。特定の結合条件は、当業者に周知の標準方法に従って、結合相手と標的分析物との特定のセットについて最適化される(例えば、前掲 Tijssen (1993)、米国特許第4,366,241号、第4,376,110号、第4,517,288号および第4,837,168号; Asai (1993) *Methods in Cell Biology* Volume 37: *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition 参照)。

【0103】

(D) 放出条件)

サンプル中の分析物がチャンネルに固定した結合相手と特異的に結合された後、それらは放出される。放出は、結合相手/分析物複合体を緩衝液と接触させることによってまたは、結合相手/分析物の相互作用を破壊する温度条件によって好適に行われる。そのような会合は、特定の分析物/結合相手のペアに応じて、高温、変性剤(例えば、尿素、ホルムアミドなど)、高または低pH、高または低塩類、および様々なカオトロピック試薬(例えば塩酸グアニジン)の使用によって破壊され得る。

【0104】

(E) チャンネル内の分析物/流れ)

サンプルおよび/またはキャリア/緩衝液流体は、標準の方法に従ってチャンネルへ導入し、かつ/または、チャンネル内を移動させることができる。例えば、流体は「リザーバ」からの単純な重力給送によってチャンネル内へ導入され、そして移動され得る。あるいはまた、流体は、ガス圧力、または多様な適切なポンプ(例えば、ぜん動ポンプ、計量ポンプなど)のうちのいずれかによって生じた液圧、変形可能なチャンバ/ダイヤフラムへの圧力などによってチャンネル内を移動され得る。また分析物も、電気浸透方法によってチャンネル内を移動され得る。

【0105】

(F) 検出)

上述の通り、分析物検出は、上述のような当業者に周知の多くの方法のいずれかによることができる。好ましい実施形態において、電気化学的検出方法が使用され、最も好ましい実施形態では、検出はシヌソイドボルタンメトリーによって行われる。

【0106】

シヌソイドボルタンメトリーを実行するためのプロトコルは、既に記載されている(Singhal et al. (1997) *Anal. Chem.* 69: 4828-4832; および米国特許第5,650,061号)。簡単にいえば、2 Hz、0.7 V p-p、+0.35 V 直流オフセットの正弦波が、ソフトウェアプログラムを用いてデジタル生成される。この正弦波は、銅電極への印加電位として働く。電極からの電流応答は、単一の

溶出ランの全長の間、リアルタイムでソフトウェアによって収集される。この時間ドメイン電流応答はその後、高速フーリエ変換によって周波数ドメインに変換される。周波数スペクトルを分析するためのプロトコルは既述されている (Singhal et al. (1997) Anal. Chem. 69: 1662 - 1668)。分析物に対応するスペクトルは、既述の通り (前掲 Singhal et al. (1997)) バックグラウンドサブトラクションおよびデジタル位相ロックの後に得られる。

【0107】

(V. 複数分析物検出用キット)

1 実施形態において、本発明は、サンプル中の多数の分析物の存在または不在を識別するまたは定量化するためにスクリーニングするキットを提供する。キットは、本明細書中に示される通り各自の表面に固定された各種結合相手を保持する本発明のチャンネルを含む。チャンネルは、例えば、本明細書中に説明した通り、電気化学的検出器 (例えば、シヌソイドボルタンメトリー) 回路、サンプルの管理およびチャンネル内の流体の流れの維持のための適切な配管、およびサンプルの適用、流体の流れおよび信号出力の分析の制御のためのコンピュータ制御システムを備えるデバイスといった、一体型アッセイデバイスへの単純かつ迅速な組み込みのために設計され得る。キットは、本明細書中に述べたアッセイ方法での使用に適切な緩衝液ならびに他の溶液および標準物質をさらに含むことができる。

10

【0108】

さらに、キットは、本発明の方法を実施するための指示 (すなわち、プロトコル) を含む教材を含み得る。教材は一般に、書面または印刷物を含むが、それらはそうしたものに制限されない。そのような指示を格納し、それらをエンドユーザに伝達することができるあらゆる媒体が本発明によって考慮されている。そのような媒体は、以下に限らないが、電子格納媒体 (例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学式媒体 (例えば CD-ROM) などを含む。そうした媒体は、そのような教材を提供するインターネットサイトへのアドレスを含み得る。

20

【0109】

(実施例)

以下の実施例は、本願発明を例示するために提示するものであり、限定するためではない。

【0110】

(実施例1)

(DNAハイブリダイゼーションのナノリットル体積の電気化学的検出)

(材料および方法)

(試薬)

使用する水は脱イオン化した後、Milli-Q浄水システム (Millipore Corp., Bedford, Mass.) を通過させた。結核 (TB) およびヒト免疫不全ウイルス (HIV) の同定に特異的なピオチン化DNAプローブおよびcDNA標的を、Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, Calif.) を通じて特注合成した (表1)。DNAプローブ溶液は、脱イオン水に溶解させたDNAプローブの100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液をDNA結合溶液 (Pierce Chemicals, CA) との1:1混合物に希釈することによって作製した。この結合溶液は、疎水および静電相互作用によって重合化表面にDNAを結合するのを容易にする。溶融シリカキャピラリー (Polymicron Technologies, Inc., AZ) を、キャピラリーバイオセンサを作製するために使用した。これらのキャピラリーをアセトンでフラッシュせず、キャピラリー表面に何らかの誘導体化を行う前に乾燥させた。

40

【0111】

(DNAプローブのキャピラリー誘導体化および固定化)

溶融シリカキャピラリー (内径50 μm × 外径150 μm 、長さ1 m) をバイオセンサに使用した。キャピラリーを、有機被覆で溶融シリカ表面を被覆するために、エポキシ樹脂

50

(Epo-tek 350)の薄層で被覆した。表面の有機被覆は、キャピラリーの壁のDNA吸着を最小限にするだけでなく、DNAプローブが直接固定化され得る重合化表面を付与する。キャピラリー表面をエポキシ樹脂で被覆するプロトコルは、Liuら(Liu et al., (1996) J. Chromatogr. 723: 157-167)が正確に説明した通りであった。簡単にいえば、キャピラリーを、最初にアセトンで15分間すすぎ洗いした後、20 psiの窒素圧下で1時間、100 でオープンにて乾燥した。エポキシ樹脂314ND(Epo-Tek, Billerica, MA)を、エポキシ樹脂混合物のアセトン溶液を吸引することによってキャピラリー表面に動的に被覆した。残留溶媒を、室温で30分間、窒素でフラッシュすることによってエポキシ樹脂被覆キャピラリーから除去した。エポキシ樹脂被覆は80 で30分間、さらに20 psiの窒素圧下で150 で2時間、架橋した。被覆したキャピラリーを、使用前に30分間緩衝液で洗浄した。

10

【0112】

次いで、エポキシ樹脂被覆キャピラリーの1 cmセクションを、特定のDNAプローブ溶液でフラッシュした。DNAプローブ溶液を一晩キャピラリー片と反応させて、DNAプローブを疎水および静電相互作用によってキャピラリー壁と結合させた。他のDNAプローブを、同様の1 cm長の被覆キャピラリー片に同様にして固定した。プローブがキャピラリー壁に固定化されると、それらのハイブリダイゼーション領域を脱イオン水ですすいだ後、キャピラリーバイオセンサに組み立てる準備が整った。これらのハイブリダイゼーション領域を、入口から第1のプローブ(TBプローブ)までの距離が約25 cmであり、2つのプローブが15 cm離れた、2つの異なる位置で「分離カラム」にエポキシ樹脂で接着した。これにより、第2のプローブ(HIVプローブ)から検出器まで約60 cmの距離が残された。キャピラリーの異なるセグメントを、やはり各々約1 cmの長さであるスリーブ(180 × 360 μmキャピラリーセクション)にキャピラリーをエポキシ樹脂で接着することによってともに連結した。キャピラリーバイオセンサの全長は約1 mであった。

20

【0113】

(DNA標的のハイブリダイゼーション、溶出および検出)

キャピラリーを、商業用キャピラリー電気泳動デバイス(Biorad Instruments Inc, Hercules, CA)に取り付け、このデバイスをその加圧フローおよびオートサンプラー機能のために使用した。これらのDNAプローブに相補的標的を高ストリンジェンシーでハイブリダイズするために使用されるプロトコルは、文献に広範に記載されている。この実験に使用された特定のプロトコルは次の通りである。

30

【0114】

最初に、cDNA標的をプローブと選択的に結合させるために、キャピラリーを、プレハイブリダイゼーション緩衝液(0.75 M NaCl、75 mMクエン酸ナトリウム、pH = 7.0、0.1% N-ラクトイルサルコシン、0.02% SDS、50%ホルムアミド中、40)でフラッシュした。TBおよびHIV標的両方のDNA標的溶液を、プレハイブリダイゼーション緩衝液に溶解し、フラッシュし、キャピラリーにて約30分間インキュベートし、表面固定化プローブの完全なハイブリダイゼーションおよび飽和を得た。

40

【0115】

次いで、余剰標的溶液をハイブリダイゼーション緩衝液(0.3 M NaCl、30 mMクエン酸ナトリウム、pH = 7.0、0.1% SDS)ですすぎ出した。その後ストリンジェント洗浄を、いずれの非特異的結合したDNA標的も除去するために、ストリンジェント洗浄緩衝液(75 mM NaCl、7.5 mMクエン酸ナトリウム、pH = 7.0、0.1% SDS、40)により行った。このストリンジェント洗浄により、他のすべてのものはこれらのストリンジェント条件のもとで洗い出されるので、完全に相補的DNA標的だけがキャピラリーバイオセンサ内部に残されることが保証された。

【0116】

50

次いで、キャピラリーを、(界面活性剤の存在のために)銅電極と適合しない高ストリンジェンシー洗浄緩衝液をすすぎ出すために、電気化学的洗浄緩衝液(89 mM TRIS、89 mM ホウ酸および1 mM EDTA、pH = 10)で充填した。

【0117】

一旦、キャピラリーを電気化学的洗浄緩衝液で充填すると、銅電極はバイオセンサキャピラリー出口に保たれた。電極を、ツーパート機械加工設計(two-part machined design)(Kuhner(1993)米国特許第5,650,061号)によりキャピラリー出口と自動的に整列させた。次いで、キャピラリーを、溶出緩衝液(89 mM Tris、89 mM ホウ酸および1 mM EDTA、pH = 11)を(100 psiで)迅速に満たし、室温で30分間インキュベートした。溶出緩衝液は、ハイブリダイズしたDNA標的の変性を促進し、それによって、特異的な位置でキャピラリー内部の溶液中にオリゴマーを放出した。

10

【0118】

次いで、脱ハイブリダイズされた標的DNAを含む溶出緩衝液を、約5 psiで加圧誘起フローを用いて一定の流速でポンプ送給し、それによってそれらが緩衝液とともに移動する際に放出されたDNA標的を溶出した。DNA標的オリゴマーが検出器を通過して流れると、DNAは銅電極で電気触媒作用で酸化され、それにより、既述の通り(米国特許第5,650,061号参照)シヌソイドボルタンメトリーを用いて検出され得る信号を発生させた。その後DNAの各個別のゾーンが、DNAが検出器を通過して移動する際に出口の銅電極で検出された。

20

【0119】

(電気化学的検出)

直径40ミクロンの銅微小電極を、5 cm、50×360 μm 溶融シリカキャピラリーの内側に製作した。キャピラリーを、シリンジを用いてガリウムで満たした。次に、小さい長さの銅ワイヤを一端でキャピラリーに挿入した後、5分のエポキシ樹脂接着によって適所に密封した。別のワイヤを、キャピラリーの後端から挿入して、銅ワイヤとの電気接続を与えた。キャピラリー内部のガリウムが2個のワイヤ間の電気接続を与えた。これらのキャピラリー微小電極は、非常に丈夫であり、研磨後に再使用可能である。これらの電極を、600粒度のサンドペーパーを用いた手による研磨以外、いかなる形態でも前処理しなかった。

30

【0120】

脱ハイブリダイズされたDNA標的を、それがキャピラリーから溶出した場合に銅微小電極で検出するために、シヌソイドボルタンメトリーを使用した。シヌソイドボルタンメトリーを実行するためのプロトコルは既述されている(Singhal et al.(1997)Anal. Chem. 69:4828-4832;米国特許第5,650,061号)。簡単にいえば、2 Hz、0.7 Vp-p、+0.35 V 直流オフセットの正弦波を、企業内ソフトウェアプログラムを用いてデジタル生成した。この正弦波は、銅電極への印加電位として働いた。電極からの電流応答を、単一の溶出ランの全長の間、リアルタイムでソフトウェアによって収集した。次いで、この時間ドメイン電流応答を、高速フーリエ変換によって周波数ドメインに変換した。周波数スペクトルを分析するためのプロトコルは既述されている(Singhal et al.(1997)Anal. Chem. 69:1662-1668)。分析物に対応するスペクトルは、既述の通り(前掲Singhal et al.(1997))バックグラウンドサブトラクションおよびデジタル位相ロックの後に得られた。

40

【0121】

(結果および考察)

DNAハイブリダイゼーションの低量、直接的な検出は、疾患の指標としてDNAが臨床的に重要であるために望ましい。一旦、特定のヌクレオチド配列が所定のマーカー(例えば、感染因子、遺伝形質、腫瘍タイプ)と特有にまたは識別可能に関係づけられることが示されれば、その配列は、大量に合成され、その特定の配列が存在するかどうかを決定す

50

るために他の供給源から核酸のプロープとして使用することができる。ハイブリダイゼーションに基づくDNAアッセイは多くの異なる用途のために開発されており、多くの場合、存在するDNAを完全にフィンガープリントし、そして同定するためにすべてのサンプルについて複数の試験が実行される必要がある。

【0122】

周波数ドメインボルタンメトリー検出技術であるシヌソイドボルタンメトリーは、糖類の検出に使用されるものと同様の実験条件の下で核酸を検出するために使用できる。ヌクレオチドも核酸塩基にアミン部分を含み、そしてそれらも銅表面で電気活性であるので、ヌクレオチドの何らかの信号が糖主鎖によるものとは別にそれらの塩基によって寄与され得ることが可能であった。

10

【0123】

非誘導体化DNAの検出は、あらゆるサンプル取扱損失および汚染問題を回避するために非常に望ましい。電気化学的検出は、高感度な検出器としてその能力を犠牲にすることなく容易に小型化できる（ナノリットルからピコリットル容量で作業し得る）ことから、DNA分析の概してサンプルの限られた場合に特に適する。

【0124】

このキャピラリーバイオセンサの開発において、DNAの特定の配列を、連続する微小流体チャネル（すなわち、溶融シリカキャピラリー）内部の異なる領域に固定化した。20 nLのサンプル体積に一致する内径50 μ mキャピラリーの1cmセクションを、センサの認識領域を付与するために使用した。サンプルを、個々の領域を通して順次的にポンプ送給し、そこで、適切なDNA標的（存在すれば）が個々の固定化DNAプロープと独立して結合し得る。一旦、サンプルが個々の固定化された標的と相互作用する機会を持てば、それはキャピラリーから溶出され、キャピラリー全体は一連のストリンジェント洗浄で洗浄されて、それによって、材料を汚染するあらゆる可能性が排除された。次いで、固定化されたプロープの各領域と結合したままの標的DNAを、空間的にコードされた様式で溶出した。

20

【0125】

図1は、単一の実験において複数のハイブリダイゼーション事象を観察する可能性を与えるためにこの設計において使用された基本的アプローチを示す。ゾーン1および2は、TBおよびHIVのDNAプロープがそれぞれ固定された固定化ゾーンである。これらのゾーンは後に、DNA標的を含有するサンプルの1回だけの注入を使用するために、単一のキャピラリーシステムを作製するために組み合わせられた。極めて高いストリンジェンシーでより複雑なサンプル（すなわち、タンパク質、他の細胞株などのような多数の他の生体分子を含んでいる臨床的サンプル）を洗浄するために必要な試薬は、キャピラリーの先頭のリザーバから加圧誘起された流れによって導入することができる。銅微小電極は、キャピラリーの出口端に配備され、それは、電極とのキャピラリーの自動整列を可能にする機械加工ツートパートシステムを用いて配置される（Kuhらの米国特許第5,650,061号）。従って、システムは組み合わせるのが非常に容易であり、一旦稼働すると頑強である。

30

【0126】

特異的ハイブリダイゼーション、洗浄および、変性した標的オリゴヌクレオチドの溶出を実行するために使用される工程の順序は、図2に示されている。同様な工程は、それらの相補的プロープへのDNA標的のあらゆる種類のストリンジェントなハイブリダイゼーションに使用することができる。このスキームにおいて、

40

1) ハイブリダイゼーションは、キャピラリー壁、または標的分析物に対して完全な相補体ではないプロープへの標的のあらゆる非特異的な結合を回避するために、ストリンジェント条件のもとで実行される。その結果、TB標的（TBをコードするDNAに特徴的な配列を有するオリゴマー（ゾーン1）は、固定化されたTBプロープ（相補的配列）にハイブリダイズするだけであり、HIV標的は、ストリンジェント条件下で固定化されたHIVプロープ（ゾーン2）にハイブリダイズするだけである。これらのゾーンは空間的に

50

隔離しており、ストリンジェント洗浄は、各ゾーンからだけでなく、それらのゾーンを分離するキャピラリーからも、全部の干渉成分を除去する。

【0127】

2) 溶出緩衝液 (TBE、 $pH = 11$) による最終洗浄は、ハイブリダイズした相補的核酸を同時に変性させ、それによって、結合したDNA標的をキャピラリーの固定化プローブに直接隣接する溶液に放出する。これらの2つの標的の空間的選択性は保たれる。なぜならその緩衝液は (脱ハイブリダイゼーションが生じ得るよりもずっと高速な時間スケールで) 適所に迅速に移動し、そしてキャピラリー内の流れは停止し、変性プロセスは30分のインキュベーション後に完了するからである。

【0128】

3) 最後に、「自由な」空間的に分離した標的DNAオリゴマーを含有する溶液が溶出される。その2つの標的を含んでいるゾーンが空間的に別個であるので、それらは、異なる時間に出口に配置された銅電極を過ぎて流れる。図3に示されたスキームは、溶出しているDNA標的を検出するその局面を例示している。検出器における各標的の溶出時間はその正体を示し、それによりDNAハイブリダイゼーションの部位をコード化する。

【0129】

固定化DNAプローブの1cmゾーンによるキャピラリーバイオセンサを用いたHIV標的DNAの検出は、図4に示されている。10 $\mu g / ml$ の合成HIV標的の100 μL を含有するサンプルを、HIVプローブが固定化されたキャピラリーバイオセンサ内を通してフラッシュした。サンプルのHIVオリゴヌクレオチド標的の検出を可能にするために、図2に記載した工程の順序に従った。本来、その順序は電気化学的洗浄緩衝液 (89 mM TRIS、89 mM ホウ酸および1 mM EDTA、 $pH = 10$) を含まなかった。これを、溶出緩衝液が銅電極に攻撃する時に観察される人工産物を最小限にするために添加した。この緩衝液の pH は重要である。なぜなら、過度に高い pH は標的DNAの脱ハイブリダイゼーションにつながり、信号の損失をもたらす一方、過度に低い pH は溶出緩衝液が検出器に到達した時に大きな人工産物を結果として生じるからである。

【0130】

図4に示すように、シヌソイドボルタンメトリーで得られた信号は、溶出緩衝液での脱ハイブリダイゼーションの後にDNA標的の溶出を実証する。ブランク溶液の溶出は、信号が非常に安定していることを示すが、単一プローブシステムによるHIV標的の結合の特異性を評価することは困難である。従って、この種の検出はDNA試験において偽陽性をもたらす可能性がある。

【0131】

複数プローブシステムは、核酸サンプルの並行処理の問題に取り組むことができるだけでなく、その固有の設計において非特異的なハイブリダイゼーションに対する内部基準を付与する。非特異的なハイブリダイゼーションが所与のサンプルで生じた場合、それは複数プローブシステムにおいて複数のピークを与えるであろう。これは、単一の注入した標的について単一のピークが検出されるまで、よりいっそうストリンジェントなハイブリダイゼーションプロトコルの必要性を直接示すことになる。このシステムのハイブリダイゼーションの特異性は、図5(A)に例証されており、TBおよびHIVの特異的標的のハイブリダイゼーションの検出が同一サンプルにおいて同時に存在する。サンプルは各DNAプローブと1回だけ相互作用させられたが、2つの標的は1回のランで同時に検出することができる。2つのゾーンに関する移動時間は、図5(B)および5(C)にそれぞれ示されたTBおよびHIV標的の内部基準と合致する。従ってこれは、2つの標的が同時に検出できるだけでなく、使用されているハイブリダイゼーション条件のもとで生じるいかなる非特異的なハイブリダイゼーションが存在しないことも示している。そうでなければ、内部基準ランは1つではなく2つのピークを示したであろう (すなわち、TB特異的標的は自己の完全に相補的なプローブおよびHIV特異的プローブに対しハイブリダイズしたであろうし、HIV特異的標的についても同様である)。従って、図5(A)における2つのピークの検出は、合成のTBおよびHIV特異的標的の検出を同時にはっき

10

20

30

40

50

りと示しており、非特異的なハイブリダイゼーションの不在を例証しており、あらゆる偽陽性の結果の発生の見込みを低減させる。

【0132】

ハイブリダイゼーションによるDNAシーケンシングは、サンプル（例えば、標的）DNA分子の固定化プローブDNAへのハイブリダイゼーションによって与えられる分子認識に依存する。好ましいプローブオリゴヌクレオチドは、長さが少なくとも約7のヌクレオチドであり、より好ましくは長さが少なくとも約10のヌクレオチドであり、さらに好ましくは長さが少なくとも15または20のヌクレオチドであり、最も好ましくは長さが少なくとも30、40または50のヌクレオチドである。このプローブは、標的の少なくとも1領域に相補的である既知の配列を有する。多数の異なるアッセイ形式が存在するが、プローブは代表的に、ニトロセルロース、アガロース、プラスチックまたは、サンプルと接触して置かれ、非認識DNAをきれいに洗浄した後、含量についてアッセイすることができる、他の不活性基質に固定化される。ハイブリダイズしたDNAのアッセイは、本明細書中に記載したシステムにおいて、DNAの変性、キャピラリーまたはチャンネルからの溶離、銅微小電極でのSVによる検出を伴って遂行できる。

10

【0133】

（結論）

新しいキャピラリーベースのDNAバイオセンサを、複数のDNAオリゴマーを同時に検出することができる直接的な電気化学的検出を利用して開発した。この検出スキームは、キャピラリー表面の様々な位置に固定化された様々なDNAプローブにより、サンプル中のDNA標的のフローコード化ハイブリダイゼーションアッセイを利用した。各種タイプのDNA標的の同時ハイブリダイゼーションは、それらが溶離されると、シヌソイドボルタンメトリーを使うことによる銅電極におけるそれらの標的の直接検出によって補足される。疾患特異的なオリゴヌクレオチド配列のそのような並行的かつ生の検出は、頑強で、耐久性がありかつ安価な複数疾患DNAセンサへの道を開くことができる。従って、それは、実行がオペレータ集約的で高価である各種光学式検出スキームに基づく既存のDNAセンサに伴う問題を回避する。

20

【0134】

（実施例2）

（シヌソイドボルタンメトリーによるアミノ酸およびペプチドの高感度かつ選択的検出）

30

（実験パラメータ）

（試薬）

使用する水は脱イオン化した後、Milli-Q浄水システム（Millipore Corp., Bedford, Mass.）を通過させた。アミノ酸およびインスリン（98～99%、Sigma Chemical Corp., St. Louis, Mo.）、および残りのペプチド（Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA）を、受領したまま使用した。全ての実験を、泳動電解質として0.10水酸化ナトリウム（A.C.S等級、Fisher Scientific, Fair Lawn NJ）により行った。0.10Mの原液を脱イオン水にて調製した。以後の希釈を泳動電解質を用いて行った。

40

【0135】

（銅微小電極）

銅微小電極は、最初に微小電極ブラー（Model PE-2, Narishige, Tokyo Japan）によりガラスキャピラリーを引張ることによって作製した。その後、顕微鏡下でキャピラリーの端をスカルペルで切り取った。その後、直径20μmの銅線（99.99%、Goodfellow, Cambridge, England）を、新しく切り取られた端部に挿入し、エポキシ樹脂で密封した（Epoxy Technology, Billerica, Massachusetts）。電極は、ダイヤモンド研磨ホイールで研磨し、脱イオン水での超音波処理によって清浄した。銅線との電気接続を作るために、キャピラリーの後端をガリウム（Sigma Chemi

50

a l C o .) で充填し、直径 $150\text{ }\mu\text{m}$ 銅線をガリウムに挿入した。代替として、キャピラリーの後端をエポキシ樹脂で充填し、より大径の銅線を、それが $20\text{ }\mu\text{m}$ ワイヤと物理的に接触するまで、エポキシ樹脂充填キャピラリーに入れた。いかなる電気化学的前処理も実行せず、電極は、実験条件下で約 1 時間の間、または安定した応答が観察されるまで、安定化させた。

【0136】

(電気化学的計測および実験条件)

フローセルはプレキシガラスで構成し、管は拡散的広がり回避されるように整合した。サンプルプラグの導入は、電磁弁により制御される空気式アクチュエータによって制御した。流速は、フローセルの 19 cm 上に緩衝液リザーバを保つことによって重力流れにより維持した。流速を 0.5 ml/分 であると決定し、サンプルの体積を注入の流速および長さから決定した。注入時間は、電極が分析物の完全な濃度を見るように決定した。

10

【0137】

報告された実験の条件をここで説明する。アミノ酸およびペプチドの場合、 2 Hz 正弦波 ($0\sim690\text{ mV}$ 対 Ag/AgCl) が、Labview (National Instruments, Austin, Tex.) で著者によって書かれたソフトウェアにより適用した。波形は、基本周波数の 3 倍 (6 Hz) の 3 db 点により cyberamp (Model 380, Axon Instruments Inc., Foster City, CA.) を用いて 4 極低域濾過フィルタでろ波した。出力電流は 4 極低域通過フィルタでろ波した。フィルタは 40 Hz に設定された (観察された最大周波数の 4 倍、第 10 高調波または 20 Hz)。電流は、 300 MHz Pentium (登録商標) II パーソナルコンピュータを用いて 16 ビットアナログ-ディジタル変換器 (PCI-4451, National Instruments) によりディジタルからアナログに変換した。単一のスキャンは 4 正弦波周期から構成された。

20

【0138】

収集された時間ドメインは、Labviewソフトウェア (National Instruments) によって周波数ドメインに変換し、Matlabプログラミング (The Mathworks, Inc., Englewood Cliffs NJ) を用いてさらに処理した。注入前に得られたバックグラウンドベクトルを瞬時信号電流ベクトルから引くことによって信号だけのスペクトルを得た。時間ドメインスペクトルを取得するためにディジタルロックイン増幅法を使用した。時間スペクトルは、各周波数高調波 (最大第 10 高調波まで) の振幅および位相角を生成するために 512 ポイントのレートでフーリエ変換した。各高調波の位相情報は、信号だけのベクトルを使用して、それをバックグラウンド減算信号ベクトルに投影することによって得た。最後に、位相分解ベクトルは、移動平均平滑化 (箱形積分) を用いて低域ろ波通過した。

30

【0139】

(結果)

図 6 は、銅微小電極でのアルギニンのバックグラウンド減算周波数スペクトルを示す。実験は $1\text{ }\mu\text{M}$ アルギニンを用いて実行した。励起信号は 2 Hz 、 $0\sim690\text{ mV}$ 対 Ag/AgCl の正弦波であった。 512 ポイント (全体時間 = 1 秒) から成る 4 正弦波周期からの電流を、各周波数スペクトルを生成するために使用した。三次元グラフは、第 10 高調波までの、周波数 (x 軸)、振幅 (z 軸) および位相角 (y 軸) 情報から成っている。

40

【0140】

図 7 は、第 5 高調波 (10 Hz) での $1\text{ }\mu\text{M}$ アルギニンからの正弦波時間ドメイン応答を示す。この高調波は、最高の信号 / 雑音比および 39 nM の検出限界 ($S/N = 3$) を与えた。

【0141】

図 8 は、様々なアルギニン濃度の線形ダイナミックレンジを示す。 1 、 10 、 100 および $1000\text{ }\mu\text{M}$ のアルギニン濃度をフロー注入分析システムに注入した。第 5 高調波 (10 Hz) の振幅が、注入された 4 つの異なる濃度に対してプロットされている。このプロ

50

ットは、第 5 高調波での 3 オーダにわたる優れた直線性 ($R = 0.9997$) を示す。

【0142】

図 9 は、銅微小電極でのアスパラギンおよびグルタミンの減算周波数スペクトルを示す。四角形は $10 \mu\text{M}$ アスパラギンを表し、円は $10 \mu\text{M}$ グルタミンを表している。実験条件は、図 1 を生成するために使用したものと同一である。

【0143】

図 10 A および 10 B は、第 6 高調波 (12 Hz) でのアスパラギンおよびグルタミンの正弦波時間ドメイン応答を示す。図 10 A は $10 \mu\text{M}$ アスパラギンを示し、図 10 B は $10 \mu\text{M}$ グルタミンを示す。第 6 高調波は、それらの 2 つのアミノ酸の最適化位相角が 90° 分離に最も近いものである。この高調波は、それらの 2 つの分析物間で最大の選択性を与える。アスパラギンの場合この高調波での検出限界 ($S/N = 3$) は 400 nM であり、グルタミンの場合 500 nM である。

10

【0144】

図 11 は、 $10 \mu\text{M}$ インスリン B 鎖のバックグラウンド減算周波数ドメインスペクトルを示す。図 1 と同じ条件を使用した。

【0145】

図 12 は、第 4 高調波 (8 Hz) でのインスリン B 鎖の正弦波時間ドメイン成分を示す。第 4 高調波は、最大の信号 / 雑音比および 500 nM の検出限界 ($S/N = 3$) を与えた。

【0146】

図 13 は、銅微小電極での黄体形成ホルモン放出ホルモン (円) およびブラジキニン (四角形) の減算周波数スペクトルを示す。

20

【0147】

図 14 A および 14 B は、第 2 高調波 (4 Hz) でのブラジキニンおよび黄体形成ホルモン放出ホルモンの時間ドメイン応答をそれぞれ示す。

【0148】

図 15 は、ニューロテンシン (四角形) および P 物質 (円) のバックグラウンド減算周波数ドメイン応答をそれぞれ示す。

【0149】

図 16 A および 16 B は、基本周波数 (2 Hz) でのニューロテンシンおよび P 物質の時間ドメイン応答をそれぞれ示す。

30

【0150】

ここで説明した実施例および実施形態は例示目的だけのためであり、それに照らして様々な修正または変更が当業者に提起され、本願の精神および本文ならびに添付請求の範囲の内に含まれるはずであることが理解される。従って、ここに引用された全部の出版物、特許および特許出願は、すべての目的で完全な形で参照によりここに採り入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、電気化学的検出によるキャピラリーベースの DNA バイオセンサの略図を示す。キャピラリーには 2 つの異なるプローブセクションが存在する。TB 特異的プローブのプローブ 1 および HIV 特異的プローブのプローブ 2 である。HPCE オートサンプラーは、これらの固定化されたプローブの cDNA 標的の特異的ハイブリダイゼーションに必要な様々なストリンジェント洗浄およびリンスに使用される。銅電極は、機械加工ツールパートシステムを使用してキャピラリーバイオセンサの出口に配置される。

40

【図 2】

図 2 は、キャピラリーバイオセンサ内部で DNA 標的のストリンジェントハイブリダイゼーションおよびアルカリ変性を実行するためのプロトコルを示す。(1) キャピラリー表面に固定化されたプローブに各種 DNA 標的をハイブリダイズする。(2) その後ストリンジェント洗浄が、いずれかの非特異的吸着またはハイブリダイズした DNA を除去するために実行される。(3) 最後に、キャピラリーバイオセンサから以前にハイブリダイズ

50

したDNA標的を溶離するためにアルカリ変性が実行される。

【図3】

図3は、アルカリ変性されたDNA標的のキャピラリーバイオセンサからの溶離、および引き続く電気化学的検出の略図を示す。電極は、自動整列を容易にするためにバイオセンサキャピラリーと同じ直径を備えるキャピラリー片の内側に製作される。電極はバイオセンサキャピラリーの出口に極めて近く($< 5 \mu\text{m}$)位置する。下側のトレースは、それらがバイオセンサキャピラリーから溶離する際のDNA標的の検出の略図を示す。

【図4】

図4は、キャピラリーバイオセンサおよびシヌソイドボルタンメトリー検出を用いたHIV特異的標的の検出を例示する。 $10 \mu\text{g/ml}$ のHIV特異的標的が、HIV特異的プローブだけが固定化されたキャピラリーバイオセンサ内部に流される。すべてのハイブリダイゼーション条件は本明細書中に記載の通りである。シヌソイドボルタンメトリー励起波形は $0 \sim 700 \text{ mV p-p}$ で 2 Hz であった。図示された信号は第5高調波で得られた。

10

【図5】

図5は、フローコード化ハイブリダイゼーションアッセイを同時に用いた複数のDNA標的の検出を示す。使用したサンプルは、HIVおよびTBの特異的標的のそれぞれ $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度の1:1混合物を含んでいた。すべてのハイブリダイゼーションおよび溶離条件は、図4でのものおよび実施例1で説明したものと同一である。図示された信号は、それが検出に最良の感度を有するとわかったので、第5高調波で得られた。

20

【図6】

図6は、銅微小電極でのアルギニンのバックグラウンド減算周波数スペクトルを示す。三次元グラフは、第10高調波までの、周波数(x軸)、振幅(z軸)および位相角(y軸)情報から成っている。

【図7】

図7は、第5高調波(10 Hz)での $1 \mu\text{M}$ アルギニンからの正弦波時間ドメイン応答を示す。

【図8】

図8は、様々なアルギニン濃度の線形ダイナミックレンジを示す。

【図9】

図9は、銅微小電極でのアスパラギンおよびグルタミンの減算周波数スペクトルを示す。四角形は $10 \mu\text{M}$ アスパラギンを表し、円は $10 \mu\text{M}$ グルタミンを表している。

30

【図10】

図10Aおよび10Bは、第6高調波(12 Hz)でのアスパラギンおよびグルタミンの正弦波時間ドメイン応答を示す。図10Aは $10 \mu\text{M}$ アスパラギンを示し、図10Bは $10 \mu\text{M}$ グルタミンを示す。

【図11】

図11は、 $10 \mu\text{M}$ インスリンB鎖のバックグラウンド減算周波数ドメインスペクトルを示す。

【図12】

図12は、第4高調波(8 Hz)でのインスリンB鎖の正弦波時間ドメイン成分を示す。

40

【図13】

図13は、銅微小電極での黄体形成ホルモン放出ホルモン(円)およびブラジキニン(四角形)の減算周波数スペクトルを示す。

【図14】

図14Aおよび14Bは、第2高調波(4 Hz)でのブラジキニンおよび黄体形成ホルモン放出ホルモンの時間ドメイン応答をそれぞれ示す。

【図15】

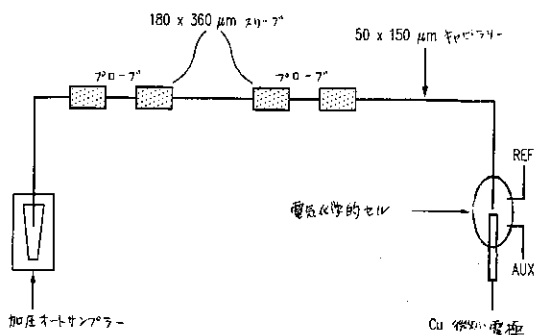
図15は、ニューロテンシン(四角形)およびP物質(円)のバックグラウンド減算周波数ドメイン応答をそれぞれ示す。

50

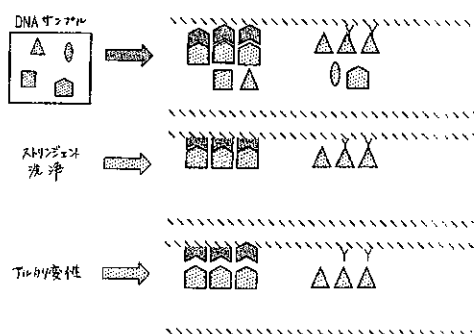
【図 16】

図 16 A および 16 B は、基本周波数 (2 H z) でのニューロテンシンおよび P 物質の時間ドメイン応答をそれぞれ示す。

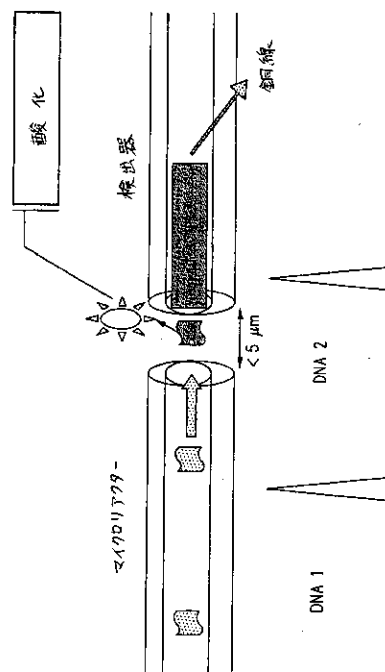
【図 1】



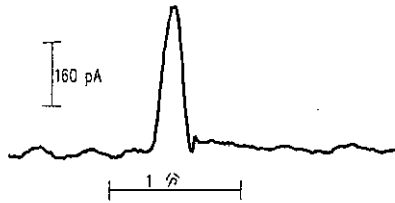
【図 2】



【図 3】

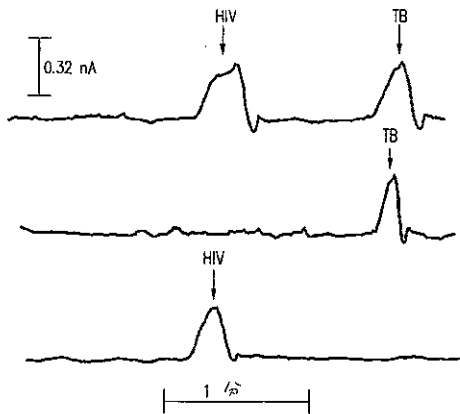


【図 4】

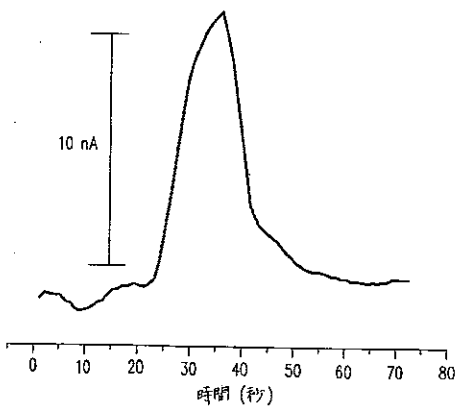


固定されたTB+HIVプローブを有するキャピラリーDNAバイオセンサー。
各プローブ領域の長さ=1 cm。領域間の距離=7 インチ。
30分のインキュベーションの後、TB E緩衝液 (pH=1.1) で標的を溶出。
検出: 4.0 μ m銅電極を用いる正弦波ボルタメトリー
2 Hz、0~7.00 mV p-p 正弦波。第5高調波で示された応答。

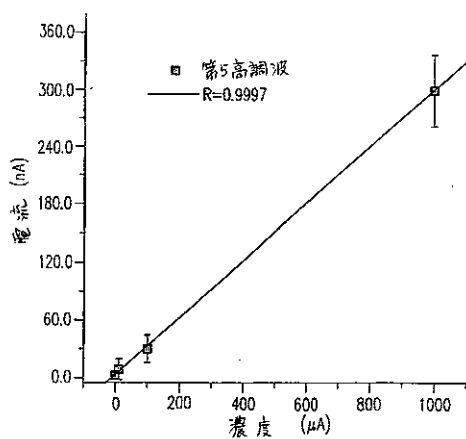
【図 5】



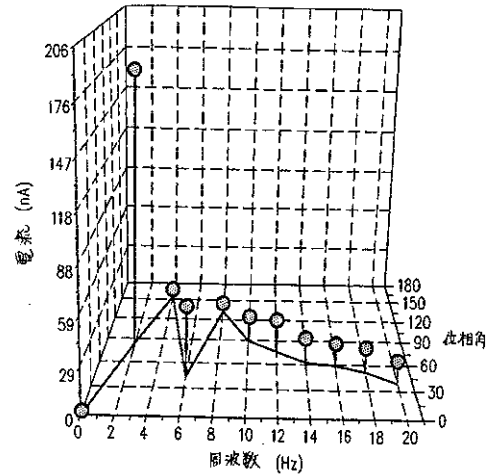
【図 7】



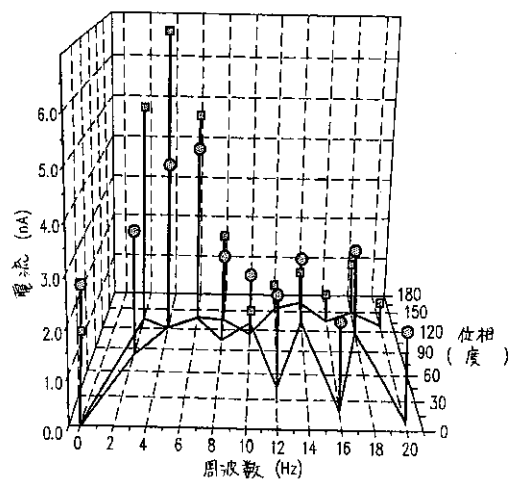
【図 8】



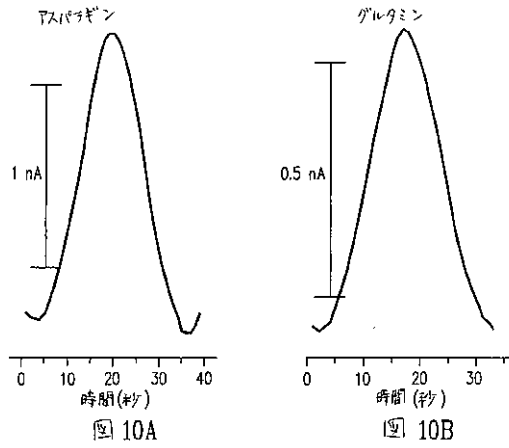
【図 6】



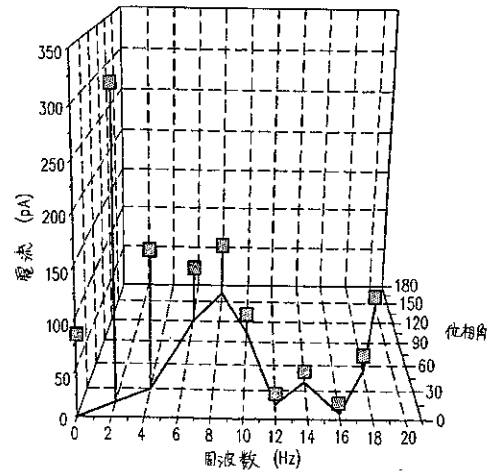
【図 9】



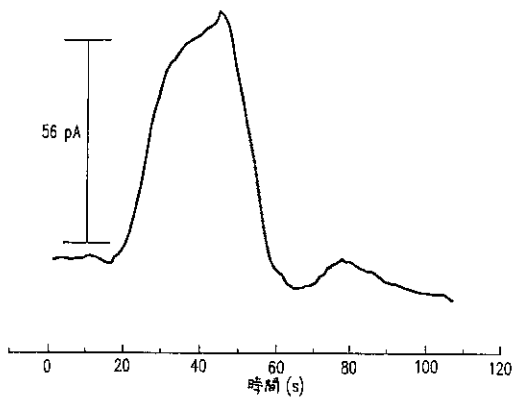
【図 10】



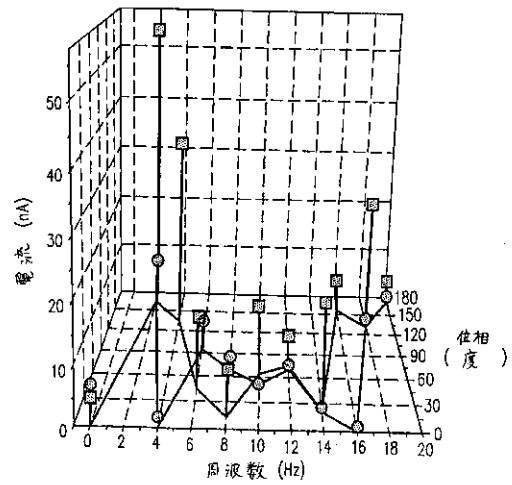
【図 11】



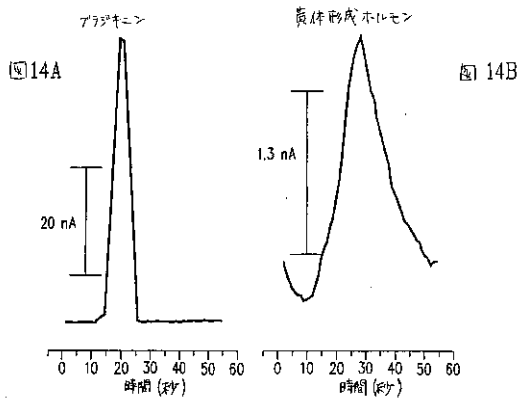
【図 12】



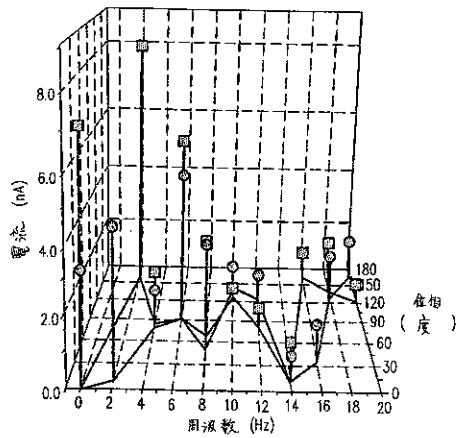
【図 13】



【図 14】



【図 15】



【図 16】

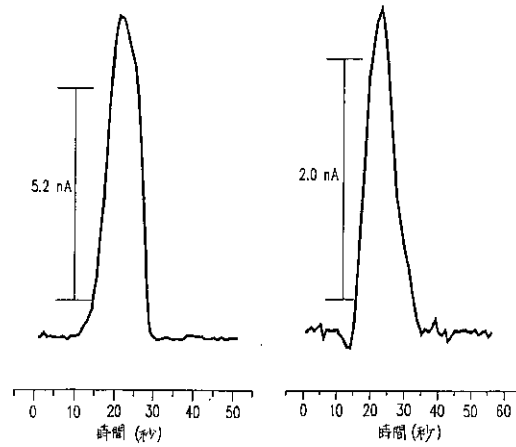


図 16A

図 16B

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 February 2001 (01.02.2001)

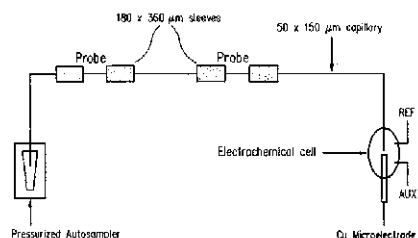
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/07653 A1

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68 (74) Agents: HUNTER, Tom et al., Skjervem Merrill MacPherson LLP, Suite 700, 25 Metro Drive, San Jose, CA 95110 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/19502
- (22) International Filing Date: 17 July 2000 (17.07.2000) (81) Designated States (national): AU, CA, JP, KR, NO.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/358,204 21 July 1999 (21.07.1999) US Published: — With international search report.
- (71) Applicant: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (US/US); 12th floor, 1111 Franklin Avenue, Oakland, CA 94607-5200 (US).
- (72) Inventor: KUHR, Werner, G.; 7075 Coriander Drive, Oak Hills, CA 92345 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SPATIALLY-ENCODED ANALYTE DETECTION



(57) Abstract: A flow-through microchannel (e.g., capillary) biosensor is described for the detection of multiple, different analytes (e.g., nucleic acids, proteins, sugars, etc.) targets in a sample by binding them to "complementary" binding partners (e.g., complementary nucleic acids, ligands, antibodies, etc.). The binding partners are immobilized in different sections of a microchannel (e.g., a fused silica capillary). After fabrication of the biosensor, a sample is flushed through the capillary, and any target analyte(s) contained within the sample are bound to the immobilized binding partner(s) on the microchannel wall forming bound complexes. Finally, the bound complexes are simultaneously denatured along the entire length of the capillary and flushed out past a detector poised downstream, and the analyte concentration is measured (e.g., using sinusoidal voltammetry). Direct electrochemical detection of underivatized DNA is accomplished by oxidizing its sugar backbone and the amine containing nucleobase at the copper electrode. The elution time of the desorbed target DNA(s) is used for the sequence identification of the target. Multiple genetic sequences can be diagnosed by using a single biosensor in this manner. The sensor is highly specific due to hybridization chemistry, and extremely sensitive due to electrochemical detection.

WO 01/07653 A1

WO 01/07653

PCT/US00/19502

SPATIALLY-ENCODED ANALYTE DETECTION**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

5 This application claims priority to USSN 09/358,204, filed on July 21, 1999
which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.

**STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY
SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT**

10 This work was supported by the National Institutes of Health (GM44112-
01A1) and the UC BioSTAR project. The Government of the United States of America
may have certain rights in this invention.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to the field of diagnostics. In particular this invention
provides devices and methods that allow rapid detection and/or quantitation of multiple
15 analytes and yet does not require the use of labels or labeling steps.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Immunoassays and nucleic acid hybridization chemistries are rapidly being
developed towards the goal of detecting genetic defects, performing disease diagnostics,
and performing prognostic evaluations (Sosnowski *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
20 *USA*, 94: 1119-1123). Antibodies, nucleic acid binding proteins, receptor ligands, and
nucleic acids are known to bind very specifically and with high efficiency to their
congrate "binding partner" under suitable conditions. This phenomenon is frequently used
for the recognition and diagnosis of disease-causing organisms (*e.g.*, HIV), pathological
conditions (*e.g.* cancer, liver disease, kidney disease, degenerative joint disease, *etc.*),
25 substance abuse (*e.g.* detection of products such as cotinine, *etc.*), and the like.

Numerous disease markers, and pathogen markers (*e.g.* proteins and/or
nucleic acids) are well known and have been thoroughly characterized. Thus, binding
partners (*e.g.* nucleic acids, antibodies, and the like), that specifically bind such markers
can be synthesized and/or isolated and used as markers for recognition of the disease state,
30 or disease-causing agent (Landegren *et al.* (1988) *Science*, 242: 229, Mikkelsen (1996)

WO 01/07653

PCT/US00/19502

Electroanalysis, 8: 15-19). Various assays are carried out routinely in microbiology laboratories or pathology laboratories using such methodologies.

Nucleic acid hybridization, antibody binding reactions, protein binding reactions, and lectin binding reactions are generally detected through the use of labels that either intercalate into the molecule (*e.g.* into the double helix of a DNA) or are covalently attached to either the target or the probe molecule (*see, e.g.*, Sosnowski *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 1119-1123, LePecq and Paoletti (1966) *Anal. Biochem.*, 17: 100-107, Kapuscinski and Skoczylas (1977) *Anal. Biochem.*, 83: 252-257). In some cases, electrogenerated chemiluminescence has also been utilized to detect an intercalated electroactive luminescent marker (Pollard-Knight *et al.* (1990) *Anal. Biochem.*, 185: 84-89, Pollard-Knight *et al.* (1990) *Anal. Biochem.*, 185: 353-358, Tizard *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 12: 4514-4518). All of these detection strategies require the derivatization of the target or probe molecule, either before (*e.g.* for covalent labeling) or after (*e.g.* for intercalation or indirect labeling) the binding reaction between the probe and target molecule. This introduces contamination problems. In addition, where multiple analytes are analyzed simultaneously multiple labels must be employed. In addition, tedious sample handling is required which further enhances the risk of contamination and/or leads to false analysis. These and other problems are overcome by the present invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides novel devices and methods for detecting and/or quantifying a plurality of analytes in a sample. This invention provides a flow-through microfluidic (*e.g.*, capillary) biosensor for detecting different target analytes (*e.g.* nucleic acids) in a sample after binding to their cognate "binding partners" (*e.g.* nucleic acids, antibodies, lectins, *etc.*). In general, binding partner "probes", specific to various analytes are immobilized in different sections of a capillary channel, *e.g.*, using photolabile biotin/avidin technology. The sample is then flushed through the capillary, so that the target analytes are bound to the binding partners (capture agents) immobilized on the capillary wall and the rest of the sample is eluted from the capillary. Finally, the complexed (bound) analyte is released along the entire length of the channel and flushed past a detector. In a preferred embodiment, the desorbed, target-analytes are detected at a copper electrode poised downstream using sinusoidal voltammetry (Singhal and Kuhr (1997) *Anal. Chem.*, 69: 3552-3557, Singhal *et al.* (1997) *Anal. Chem.*, 69: 1662-1668).

WO 01/07653

PCT/US00/19502

The time from the elution of the target analyte(s) to detection is used to determine the identity of each analyte. Multiple analytes, of the same species of molecule (*e.g.*, all nucleic acids), or of different species (*e.g.*, proteins and nucleic acids), can be diagnosed by using a single biosensor in this manner. The sensor is highly specific due to the use of
5 specific binding partners, and extremely sensitive due to electrochemical detection.

Thus, in one embodiment, this invention provides devices for detecting a two or more analytes in a sample. The devices comprise a channel having affixed therein a binding partner for each of the two or more analytes, where the binding partners for each of the two or more analytes are located in different regions of the channel and the channel
10 has a cross-sectional area small enough such that when analytes are released from the two or more binding partners into a fluid flowing through the channel, the analytes remain spatially segregated until they reach a detection point along, or at the end of, the channel downstream from the binding partners; and a detector that detects the analytes at the detection point.

The channel can be any convenient channel, *e.g.*, a capillary tube, a capillary electrophoresis tube, a channel etched in a surface, a channel formed by hydrophobic agents printed onto a surface, *etc.* The channel can have essentially any dimension(s) as long as the analytes remain sufficiently segregated to be distinguished when they reach a detection region in the channel or at the channel end. Preferred channels have a cross-
20 sectional area that provides a Renold's number (Re) of less than about 1. Preferred channels have a cross-sectional diameter or width less than or equal to about 500 μm , more preferably less than or equal to about 100 μm , and most preferably less than or equal to about 50 μm . In particularly preferred devices the two or more target analytes comprise at least three, preferably at least 4, more preferably at least 5, and most preferably at least 10,
25 at least 50, at least 100, or at least 500 different analytes (and hence that many different binding partners). A wide variety of binding partners are suitable including, but not limited to antibodies, binding proteins, and nucleic acids. Similarly many detectors are suitable and include spectrophotometers (*e.g.*, absorbance spectrophotometers), and electroanalytic detectors (including essentially any amperometric and/or voltammetric
30 and/or potentiometric and/or coulometric detectors). Preferred detectors include voltameters, especially a sinusoidal voltameters.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

In another embodiment, this invention provides methods of detecting two or more target analytes in a sample. The methods involve providing a detection device as described herein; ii) passing a fluid comprising a sample through the channel under conditions where the target analytes present in the fluid bind to their respective binding partners thereby spatially encoding the analytes along the channel; iii) releasing the analytes from the binding partners into fluid flow passing along the channel; and iv) detecting the analytes at a position along the channel downstream from the binding partners. In preferred methods, the analytes are not labeled. In particularly preferred embodiments the analytes are not labeled. In particularly preferred devices the two or more target analytes comprise at least three, preferably at least 4, more preferably at least 5, and most preferably at least 10, at least 50, at least 100, or at least 500 different analytes (and hence that many different binding partners are present in the channel(s) comprising the detection device). In some preferred embodiments, the fluid flow induced by a pressure difference and/or by electroosmotic flow. fluid flow. Preferred "sample" fluids for the detection of analytes include blood, plasma, serum, urine, oral fluid, cerebrospinal fluid, and lymph. Detecting can be by a variety of means including spectrophotometers (e.g. absorbance spectrophotometry), and electroanalytic methods (including essentially any amperometric and/or voltammetric and/or potentiometric and/or coulometric method). Preferred detection methods voltammetry, especially sinusoidal voltammetry. In particularly preferred methods, the analytes are nucleic acids and the detecting detects target analytes at a concentration of less than 1×10^{-9} M.

DEFINITIONS

The terms "polypeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical analogue of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers.

The term "antibody", as used herein, includes various forms of modified or altered antibodies, such as an intact immunoglobulin, an Fv fragment containing only the light and heavy chain variable regions, an Fv fragment linked by a disulfide bond (Brinkmann *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 547-551), an Fab or (Fab)₂ fragment containing the variable regions and parts of the constant regions, a single-chain

WO 01/07653

PCT/US00/19502

antibody and the like (Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 424-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). The antibody may be of animal (especially mouse or rat) or human origin or may be chimeric (Morrison *et al.* (1984) *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855) or humanized (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525, and published UK patent application #8707252).

The terms "binding partner", or "capture agent", or a member of a "binding pair" refers to molecules that specifically bind other molecules to form a binding complex such as antibody-antigen, lectin-carbohydrate, nucleic acid-nucleic acid, biotin-avidin, *etc.* In particularly preferred embodiments, the binding is predominantly mediated by non-covalent (*e.g.* ionic, hydrophobic, *etc.*) interactions.

The term "specifically binds", as used herein, when referring to a biomolecule (*e.g.*, protein, nucleic acid, antibody, *etc.*), refers to a binding reaction which is determinative of the presence biomolecule in heterogeneous population of molecules (*e.g.*, proteins and other biologics). Thus, under designated conditions (*e.g.* immunoassay conditions in the case of an antibody or stringent hybridization conditions in the case of a nucleic acid), the specified ligand or antibody binds to its particular "target" molecule and does not bind in a significant amount to other molecules present in the sample.

The term channel refers to a path that directs fluid flow in a particular direction. The channel can be formed as a groove or trench having a bottom and sides, or as a fully enclosed "tube". In some embodiments, the channel need not even have "sides". For example, a hydrophobic polymer can be applied to a flat surface and thereby confine and/or direct fluid flow on that surface in a narrow (*e.g.* hydrophilic) domain. The channel preferably includes at least one surface to which a binding partner (capture) agent can be affixed.

A "target analyte" is any molecule or molecules that are to be detected and/or quantified in a sample. Preferred target analytes include biomolecules such as nucleic acids, antibodies, proteins, sugars, and the like.

The term "microchannel" is used herein for a channel having dimensions which provide low Reynolds number operation ($Re \leq 1$, preferably $Re \leq 0.1$, more preferably $Re \leq 0.01$, and most preferably $Re \leq 0.001$). Generally low Reynolds number operation, fluid dynamics are dominated by viscous forces rather than inertial forces.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

The term capillary tube refers to a tube of narrow dimension (e.g. typically providing low Re flow). Open-ended capillary tubes, when contacted with water will typically uptake the water by capillary action. Capillary tubes can be fabricated of a number of materials including, but not limited to, glass, plastic, quartz, ceramic, and various silicates.

A "capillary electrophoresis tube" refers to a "capillary tube" designed for and/or typically used or intended to be used in a capillary electrophoresis device.

The terms "nucleic acid" or "oligonucleotide" or grammatical equivalents herein refer to at least two nucleotides covalently linked together. A nucleic acid of the present invention is preferably single-stranded or double stranded and will generally contain phosphodiester bonds, although in some cases, as outlined below, nucleic acid analogs are included that may have alternate backbones, comprising, for example, phosphoramidate (Beaucage *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) and references therein; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; and Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26: 141 9), phosphorothioate (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; and U.S. Patent No. 5,644,048), phosphorodithioate (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111 :2321, O-methylphosphoramidite linkages (see Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), and peptide nucleic acid backbones and linkages (see Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson *et al.* (1996) *Nature* 380: 207). Other analog nucleic acids include those with positive backbones (Denpey *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; non-ionic backbones (U.S. Patent Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 and 4,469,863; Angew. (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.* (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) and non-ribose backbones, including those described in U.S. Patent Nos. 5,235,033 and 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

Y.S. Sanghui and P. Dan Cook. Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included within the definition of nucleic acids (see Jenkins *et al.* (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp169-176). Several nucleic acid analogs are described in Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35. These modifications of the ribose-phosphate backbone may be done to facilitate the addition of additional moieties such as labels, or to increase the stability and half-life of such molecules in physiological environments.

The terms "hybridizing specifically to" and "specific hybridization" and "selectively hybridize to," as used herein refer to the binding, duplexing, or hybridizing of a nucleic acid molecule preferentially to a particular nucleotide sequence under stringent conditions. The term "stringent conditions" refers to conditions under which a probe will hybridize preferentially to its target subsequence, and to a lesser extent to, or not at all to, other sequences. Stringent hybridization and stringent hybridization wash conditions in the context of nucleic acid hybridization are sequence dependent, and are different under different environmental parameters. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in, *e.g.*, Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes part 1, chap 2, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays*, Elsevier, NY (Tijssen). Generally, highly stringent hybridization and wash conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. Very stringent conditions are selected to be equal to the T_m for a particular probe. An example of stringent hybridization conditions for hybridization of complementary nucleic acids which have more than 100 complementary residues on an array or on a filter in a Southern or northern blot is 42°C using standard hybridization solutions (see, *e.g.*, Sambrook (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, and detailed discussion, below), with the hybridization being carried out overnight. An example of highly stringent wash conditions is 0.15 M NaCl at 72°C for about 15 minutes. An example of stringent wash conditions is a 0.2x SSC wash at 65°C for 15 minutes (see, *e.g.*, Sambrook *supra.*) for a description of SSC buffer). Often, a high stringency wash is preceded by a low stringency wash to remove background probe signal. An example medium stringency wash for a duplex of,

WO 01/07653

PCT/US00/19502

e.g., more than 100 nucleotides, is 1x SSC at 45°C for 15 minutes. An example of a low stringency wash for a duplex of, *e.g.*, more than 100 nucleotides, is 4x to 6x SSC at 40°C for 15 minutes.

5 "Spatial segregation" refers to the differences in the localization of a the concentration distributions of two or more species of molecule (*e.g.* analytes) in a fluid stream. Where the analytes are spatially segregated (*i.e.*, flow encoded) it is possible to detect distinct signals for each analyte of interest even though the type of signal for all of the analyte may be identical. Thus, the analyte identity can be determined by position along the "flow path" or time of detection, and differences in labels associated with each
10 analyte are not required.

Electroanalytic methods refer to methods that exploit the "electrical" properties (*e.g.*, resistance, conductance, capacitance, impedance, *etc.*) of a system or analyte to extract information regarding that system. Electroanalytic methods include, essentially any amperometric and/or voltammetric and/or potentiometric and/or
15 coulometric method. Preferred electroanalytic methods include cyclic voltammetry, ac, dc, or rotating ring-disc voltammetry, sinusoidal voltammetry, impedance spectroscopy, and the like.

The terms "cyclic voltammetry" or "time-varying voltammetry" are used interchangeably to refer to cyclic voltammetry. The term "sinusoidal voltammetry" is used
20 to refer generally to cyclic voltammetry (*e.g.* with any time-varying voltage including, but not limited to a square wave, a triangle wave, *etc.*), or to the use of a large amplitude sinusoidal potential waveform which is used in analogous fashion to cyclic voltammetry, *e.g.*, as described in U.S. Patent, 5,650,061.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

25 Figure 1 shows a schematic of a capillary based DNA-biosensor with electrochemical detection. Two different probe sections are present in the capillary; probe 1, a TB-specific probe, and probe 2, an HIV-specific probe. An HPCE autosampler is used for various stringent washes and rinses required for specific-hybridization of complementary DNA-targets to these immobilized probes. A copper electrode is
30 positioned at outlet of the capillary biosensor by using a machined two-part system.

Figure 2 shows protocols for performing stringent hybridization and alkali denaturation of DNA-targets inside the capillary biosensor. (1) Hybridize the various

WO 01/07653

PCT/US00/19502

DNA-targets to the probes immobilized on the capillary surface. (2) Stringent washes are then performed to remove any non-specific adsorbed or hybridized DNA. (3) Finally, alkali denaturation is performed to elute the previously hybridized DNA-targets from the capillary biosensor.

5 Figure 3 provides a schematic of the elution of alkali denatured DNA-targets from a capillary biosensor, and consequent electrochemical detection. The electrode is fabricated inside a capillary piece with the same diameter as the biosensor capillary to facilitate auto-alignment. The electrode lies very close ($< 5 \mu\text{m}$) to the outlet of the biosensor capillary. The lower trace shows a schematic of the detection of the

10 DNA-targets as they elute from the biosensor capillary.

 Figure 4 illustrates detection of HIV-specific target using capillary biosensor and sinusoidal voltammetric detection. $10 \mu\text{g/ml}$ HIV-specific target flushed inside a capillary biosensor with HIV-specific probe immobilized only. All hybridization conditions as described herein. The sinusoidal voltammetric excitation waveform was 2

15 Hz, at 0-700 mVp-p. The signal shown was obtained at the 5th harmonic.

 Figure 5 shows the detection of multiple DNA-targets simultaneously using flow-encoded hybridization assay. Sample used contained a 1:1 mixture of HIV, and TB-specific targets, each at a concentration of $10 \mu\text{g/ml}$. All hybridization and elution conditions are the same as in Figure 4 and as described in Example 1. The signal shown

20 was obtained at the 5th harmonic, as it was found to have the best sensitivity for detection.

 Figure 6 shows the background subtracted frequency spectrum for Arginine at a copper microelectrode. The three dimensional graph consists of the frequency (x-axis), magnitude (z-axis) and phase angle (y-axis) information out to the 10th harmonic.

 Figure 7 shows the sinusoidal time domain response from $1 \mu\text{M}$ arginine at

25 the fifth harmonic (10 Hz).

 Figure 8 demonstrates the linear dynamic range of various arginine concentrations.

 Figure 9 shows the subtracted frequency spectra for asparagine and glutamine at a copper microelectrode. The squares represent $10 \mu\text{M}$ asparaginos, while the

30 circles represent $10 \mu\text{M}$ glutamine.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

Figures 10A and 10B show the sinusoidal time domain response of asparagine and glutamine at the sixth harmonic (12 Hz). Figure 10A shows 10 μ M asparagines, while Figure 10B shows 10 μ M glutamine.

Figure 11 shows the background subtracted frequency domain spectrum for
5 10 μ M Insulin B-chain.

Figure 12 shows the sinusoidal time domain component of insulin B-chain at the fourth harmonic (8 Hz).

Figure 13 shows the subtracted frequency spectra for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (circles) and Bradykinin (squares) at a copper microelectrode.

10 Figures 14A and 14B show the time domain response of Bradykinin and Luteinizing Hormone-Releasing Hormone at the second harmonic (4 Hz), respectively.

Figure 15 shows the background subtracted frequency domain response for Neurotensin (squares) and Substance P (circles), respectively.

Figure 16A and 16B show the time domain response of Neurotensin and
15 Substance P, respectively, at the first harmonic (2 Hz).

DETAILED DESCRIPTION

I. Methods for efficient detection of multiple analytes.

This invention provides novel methods and instruments for the rapid detection and/or quantification of multiple analytes in a sample. In one preferred
20 embodiment, this invention comprises a channel having attached therein binding partner(s) specific for the analytes that it is desired to detect. Different binding partners are located in different regions of the channel so that when the analyte(s) are bound they are "spatially encoded" by their location along the channel. The bound analytes are subsequently released from the binding partner, or the binding partner/analyte complex is released from
25 the wall of the channel, into a fluid flowing through the channel. The channel dimensions are such that the analytes remain spatially segregated until they reach a detection point in the channel downstream from said binding partners.

When the analytes or analyte/binding partner complexes are released into the flow, they are spatially encoded; their position in the stream relative to each other
30 being dependent on the position of the binding partners when they were affixed to the channel wall(s). The time difference between the release and the detection can therefore

WO 01/07653

PCT/US00/19502

be used to specifically identify the particular analyte generating (or not generating) an output signal.

Because the analytes can each be specifically identified without the use of a label to distinguish them from other analytes numerous and tedious sample-handling and labeling steps are eliminated. This eliminates multiple labeling and contamination problems. Also, the risk of sample contamination, that could lead to an elevated incidence of false positives is reduced or eliminated.

It is noted that the channels can be prepared well before use and different microfluidic structures (e.g. channels) can be swapped into and out of the device that provides sample handling, fluid flow and analyte detection. Different channels can be provided for different collections of analytes and multiple channels, either the same or different, can be run simultaneously.

The methods and devices of this invention are therefore well suited to the detection of analytes in a clinical setting. The ability to detect underivatized analytes (e.g. DNA, mRNA, etc.) greatly simplifies the procedure and helps in preventing sample contamination and false identification problems.

In one particularly preferred embodiment, the use of copper electrodes with cyclic (e.g. sinusoidal) voltammetry overcomes many of the problems encountered by traditional electrochemical measurements, and thereby allows the detection of the analyte. The sensitivity of the detection strategy is due to the effective decoupling of the faradic signal from the capacitive background currents in the frequency domain. Thus, for example, ssDNA and dsDNA can be detected in the picomolar concentration range, and the electrochemical signal is due to the oxidation of easily accessible sugars on the outer perimeter of the DNA double helix compared to a ssDNA of the same size.

A sensor that can detect multiple targets by using only one detector provides a cheaper and more compact detection system that is also easier to fabricate.

II. System Components.

A) Channel.

1) Channel types and dimensions.

Virtually any type of channel is suitable for the practice of the present invention so long as the channel allows the passage of materials through it without

WO 01/07653

PCT/US00/19502

substantial mixing between components in a solution at different positions along the channel. In other words, in a preferred capillary, analytes (or other detectable reagents) initially released at distinct locations along the channel remain spatially segregated at a detection point "downstream" from the initial release point. Spatial segregation refers to the ability to detect distinct signals for each analyte of interest even though the type of signal for all of the analyte may be identical. Thus, the analyte identity can be determined by position along the "flow path" or time of detection, and differences in labels associated with each analyte are not required.

Spatial segregation, however, does not require complete segregation of the analytes away from each other. To the contrary, there can exist significant overlap and peak concentrations can be detected and, associated concentration profiles and be measured and/or calculated to provide positive/negative detection and/or full analyte quantification.

Particularly preferred channels for use in this invention are "microchannels". The term microchannel is used herein for a channel having dimensions that provide low Reynolds number operation, *i.e.*, for which fluid dynamics are dominated by viscous forces rather than inertial forces. Reynolds number, sometimes referred to the ratio of inertial forces to viscous forces is given as:

$$Re = \frac{\rho d^2 \eta \tau}{\mu} + \frac{\rho u d}{\eta}$$

where u is the velocity vector, ρ is the fluid density, η is the viscosity of the fluid, d is the characteristic dimension of the channel, and τ is the time scale over which the velocity is changing (where $u/\tau = \partial u/\partial t$). The term "characteristic dimension" is used herein for the dimension that determines Reynolds number, as is known in the art. For a cylindrical channel it is the diameter. For a rectangular channel, it depends primarily on the smaller of the width and depth. For a V-shaped channel it depends on the width of the top of the "V", and so forth. Calculation of Re for channels of various morphologies can be found in standard texts on fluid mechanics (*e.g.* Granger (1995) *Fluid Mechanics*, Dover, N.Y.; Meyer (1982) *Introduction to Mathematical Fluid Dynamics*, Dover, N.Y.).

Fluid flow behavior in the steady state ($\tau \rightarrow \infty$) is characterized by the Reynolds number, $Re = \rho u d / \eta$. Because of the small sizes and slow velocities, microfabricated fluid systems are often in the low Reynolds number regime (Re less than

WO 01/07653

PCT/US00/19502

about 1). In this regime, inertial effects, that cause turbulence and secondary flows, and therefore mixing within the flow, are negligible and viscous effects dominate the dynamics. Under these conditions, flow through the channel is generally laminar.

Since the Reynolds number depends not only on channel dimension, but on
5 fluid density, fluid viscosity, fluid velocity and the timescale on which the velocity is changing, the absolute upper limit to the channel diameter is not sharply defined. In fact, with well designed channel geometries, turbulence can be avoided for $R < 100$ and possibly for $R < 1000$, so that high throughput systems with relatively large channel sizes are possible. The preferred channel characteristic dimension range is between about 0.5
10 μm and 100 μm . Particularly preferred channel range from a characteristic dimension of about 1 μm to about 100 μm , most preferably from about 5 μm to about 100 μm . A more preferred range is between about 5 μm and 50 μm .

The devices of this invention need not be confined to low Reynolds number operation. Where the binding probes are widely separated and hence the released analytes
15 are widely separated in the flow considerable convective mixing can occur in the channel without the different analytes "overlapping" and masking each other's signal. In addition, it will be appreciated that considerable mixing of the two analytes can occur and as long as there is a significant (e.g., statistically significant) spatial separation between the peak concentrations of the two analytes, the signals will be distinguishable and detection of each
20 analyte can be effected. However, as analytes co-mix, quantification of each individual analyte may become progressively more difficult. Nevertheless, even in this context quantification can be obtained by estimating or modeling the spatial distribution of the analyte based on the location of the concentration peak(s) and the rate of fall-off to provide an approximation of the integrated signal for each analyte.

As indicated above, any channel configuration is suitable so long as the
25 mixing requirements described above are met. Thus, appropriate channels include, but are not limited, to channels formed by opposed barriers, open-topped grooves, closed channels, and the like. The channels can have virtually any cross-section, e.g. circular, square, rectangular, triangular v-shaped, u-shaped, hexagonal, octagonal, irregular, and so
30 forth. The channel(s) used in this invention also need not be continuous. Thus, for example, channels can be formed by an aggregation of porous particles, by mixed or cross-linked polymers, and so forth.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

Any channel material is suitable for practice of this invention so long as the material is essentially stable to the solutions passed through it. Preferred materials are capable of binding, or being derivatized to bind, to the binding partner or a linker to the binding partner. In addition, in a preferred embodiment, the material is selected and/or
 5 modified so that it does not substantially bind to the analyte. Preferred materials also do not bind, or otherwise interact with the probes in regions other than where it is desired to affix the probes.

Particularly preferred materials include, but are not limited to glass, silicon, quartz or other minerals, plastic(s), ceramics, metals, paper, metalloids, semiconductive materials, cements, and the like. In addition, substances that form gels, such as proteins
 10 (e.g., gelatins), lipopolysaccharides, silicates, agarose and polyacrylamides can be used. A wide variety of organic and inorganic polymers, both natural and synthetic may be employed as the material for the solid surface. Illustrative polymers include polyethylene, polypropylene, poly(4-methylbutene), polystyrene, polymethacrylate, poly(ethylene terephthalate), rayon, nylon, poly(vinyl butyrate), polyvinylidene difluoride (PVDF),
 15 silicones, polyformaldehyde, cellulose, cellulose acetate, nitrocellulose, and the like.

In the case of conductive or semiconductive substrates, there is preferably an insulating layer on the substrate. This is particularly important where the device incorporates electrical elements (e.g. electrical fluid direction systems, sensor, and the like
 20 or uses electroosmotic forces to move materials about the system). In the case of polymeric substrates, the substrate materials may be rigid, semi-rigid, or non-rigid, opaque, semi-opaque, or transparent depending upon the use for which they are intended. For example, devices that include an optical or visual detection element are generally fabricated, at least in part, from transparent materials to allow or at least facilitate that
 25 detection. Alternatively, transparent windows of e.g. glass or quartz can be incorporated into the device for these types of detection elements. Additionally, the polymeric materials may have linear or branched backbones and may be crosslinked or noncrosslinked. Example of particularly preferred polymeric materials include e.g. polydimethylsiloxanes (PDMS), polyurethane, polyvinylchloride (PVC), polystyrene,
 30 polysulfone, polycarbonate, and the like.

The channel can be a component of a larger object. Thus, the channel can be assembled with one or more other channels to provide a multiplicity of channels

WO 01/07653

PCT/US00/19502

whereby a number of different assays can be run simultaneously. The channel can be a component of an instrument that includes appropriate liquid handling, and/or detection, and/or sample processing/application functions.

The channel(s) can also be fabricated as a reusable or disposable unit that can be conveniently "plugged" into an instrument for running the assays of this invention. It will be appreciated that the channel(s) can be provided on any one or more of a wide variety of objects including, but not limited to a microtiter dish (e.g., PVC, polypropylene, or polystyrene), a test tube (glass or plastic), a dipstick (e.g. glass, PVC, polypropylene, polystyrene, latex, and the like), a microcentrifuge tube, or a glass, silica, plastic, metallic or polymer bead.

In particularly preferred embodiments, one or more channels are provided as a capillary tube (e.g. a capillary electrophoresis tube), on a glass or silicon slide, as a capillary channel, or fabricated as an element of an "integrated circuit" having on board circuit elements for control of liquid flow, sample application, and/or signal detection. In a most preferred embodiment, the channel is provided as a capillary tube, e.g. a capillary electrophoresis tube as illustrated herein in the Examples.

2) Channel fabrication.

Methods of fabricating the channels of this invention are well known to those of skill in the art. For example, where the channel is formed of one or more capillary tubes, the capillaries can be purchased from commercial vendors (e.g. Polymicron Technologies, Tucson, Az) or pulled or extruded by conventional capillary "pulling" machines.

Where the channels are fabricated on a surface, they can be formed using standard techniques, e.g. they can be machined, molded, carved, etched, laminated, extruded, or deposited, etc.

In one preferred embodiment, the channel(s) are fabricated using micromachining processes (e.g. photolithography) well known in the solid state electronics industry. Commonly, microdevices, e.g. microchannels, are constructed from semiconductor material substrates such as crystalline silicon, widely available in the form of a semiconductor wafer used to produce integrated circuits, or from glass. Because of the commonality of material(s), fabrication of microdevices from a semiconductor wafer substrate can take advantage of the extensive experience in both surface and bulk etching

WO 01/07653

PCT/US00/19502

techniques developed by the semiconductor processing industry for integrated circuit (IC) production.

Surface etching, used in IC production for defining thin surface patterns in a semiconductor wafer, can be modified to allow for sacrificial undercut etching of thin layers of semiconductor materials to create movable elements. Bulk etching, typically used in IC production when deep trenches are formed in a wafer using anisotropic etch processes, can be used to precisely machine edges or trenches in microdevices. Both surface and bulk etching of wafers can proceed with "wet processing", using chemicals such as potassium hydroxide in solution to remove non-masked material from a wafer. For microdevice construction, it is even possible to employ anisotropic wet processing techniques that rely on differential crystallographic orientations of materials, or the use of electrochemical etch stops, to define various channel elements.

Another etch processing technique that allows great microdevice design freedom is commonly known as "dry etch processing". This processing technique is particularly suitable for anisotropic etching of fine structures. Dry etch processing encompasses many gas or plasma phase etching techniques ranging from highly anisotropic sputtering processes that bombard a wafer with high energy atoms or ions to displace wafer atoms into vapor phase (e.g. ion beam milling), to somewhat isotropic low energy plasma techniques that direct a plasma stream containing chemically reactive ions against a wafer to induce formation of volatile reaction products.

Intermediate between high energy sputtering techniques and low energy plasma techniques is a particularly useful dry etch process known as reactive ion etching. Reactive ion etching involves directing an ion containing plasma stream against a semiconductor, or other, wafer for simultaneous sputtering and plasma etching. Reactive ion etching retains some of the advantages of anisotropy associated with sputtering, while still providing reactive plasma ions for formation of vapor phase reaction products in response to contacting the reactive plasma ions with the wafer. In practice, the rate of wafer material removal is greatly enhanced relative to either sputtering techniques or low energy plasma techniques taken alone. Reactive ion etching therefore has the potential to be a superior etching process for construction of microdevices, with relatively high anisotropic etching rates being sustainable. The micromachining techniques described above, as well as many others, are well known to those of skill in the art (see, e.g.,

WO 01/07653

PCT/US00/19502

Choudhury (1997) *The Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication*, Soc. Photo-Optical Instru. Engineer, Bard & Faulkner (1997) *Fundamentals of Microfabrication*). In addition, examples of the use of micromachining techniques on silicon or borosilicate glass chips can be found in U.S. Patents 5,194,133,
 5 5,132,012, 4,908,112, and 4,891,120.

In one embodiment, the channel is micromachined in a silicon (100) wafer using standard photolithography techniques to pattern the channels and connection ports. Ethylene-diamine, pyrocatechol (EDP) is used for a two-step etch and a Pyrex 7740 coverplate can be anodically bonded to the face of the silicon to provide a closed liquid
 10 system. In this instance, liquid connections can be made on the backside of the silicon.

As indicated above, in a preferred embodiment, the channel is fabricated from a glass, quartz, or other capillary tube, such as a capillary electrophoresis tube.

In other embodiments, the channel can be built up by depositing material on a substrate to form channel walls (e.g. using sputtering or other deposition technology) or
 15 the channel can be cast/molded in a material. Cast/molded channels are easily fabricated from a wide variety of materials including but not limited to various metals, plastics, or glasses. In certain preferred embodiments, the channel(s) are cast in various elastomers. (e.g. alkylated chlorosulfonated polyethylene (Acsium®), polyolefin elastomers (e.g. Engage®), chlorosulfonated polyethylene (e.g. Hypalon®), perfluoroelastomer (e.g. Kalrez®), neoprene-polychloroprene, ethylene-propylene-diene terpolymers (EPDM),
 20 chlorinated polyethylene (e.g. Tyryn®), various siloxane polymers (e.g. polydimethylsiloxane), etc).

B) Binding Partners.

In a preferred embodiment, the channel(s) utilized in this invention bear,
 25 affixed to one or more surfaces one or more biological "binding partner(s)." A biological "binding partner" or a member of a "binding pair" refers to a molecule or composition that specifically binds other molecules to form a binding complex such as antibody-antigen, lectin-carbohydrate, nucleic acid-nucleic acid, biotin-avidin, etc.

The term "specifically binds", as used herein, when referring to a
 30 biomolecule (e.g., protein, nucleic acid, antibody, etc.), refers to a binding reaction which is determinative of the presence biomolecule heterogeneous population of proteins and other biologics. Thus, under designated conditions (e.g. immunoassay conditions in the

WO 01/07653

PCT/US00/19502

case of an antibody, or stringent hybridization conditions in the case of a nucleic acid), the specified ligand or antibody binds to its particular "target" (e.g. a protein or nucleic acid) and does not bind in a significant amount to other molecules.

The binding partner(s) used in this invention are selected based upon the targets that are to be identified/quantified. Thus, for example, where the target is a nucleic acid the binding partner is preferably a nucleic acid or a nucleic acid binding protein. Where the target is a protein, the binding partner is preferably a receptor, a ligand, or an antibody that specifically binds that protein. Where the target is a sugar or glycoprotein, the binding partner is preferably a lectin, and so forth.

Suitable binding partners (capture agents) include, but are not limited to nucleic acids, proteins, receptor binding proteins, nucleic acid binding proteins, lectins, sugars, glycoproteins, antibodies, lipids, and the like. Methods of synthesizing or isolating such binding partners are well known to those of skill in the art.

1) Preparation of binding partners (capture agents).

a) Nucleic acids

Nucleic acids for use as binding partners in this invention can be produced or isolated according to any of a number of methods well known to those of skill in the art. In one embodiment, the nucleic acid can be an isolated naturally occurring nucleic acid (e.g., genomic DNA, cDNA, mRNA, etc.). Methods of isolating naturally occurring nucleic acids are well known to those of skill in the art (see, e.g., Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

However, in a preferred embodiment, the nucleic acid is created *de novo*, e.g. through chemical synthesis. In a preferred embodiment, nucleic acids (e.g., oligonucleotides) are chemically synthesized according to the solid phase phosphoramidite triester method described by Beaucage and Caruthers (1981), *Tetrahedron Letts.*, 22(20): 1859-1862, e.g., using an automated synthesizer, as described in Needham-VanDevanter *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12: 6159-6168. Purification of oligonucleotides, where necessary, is typically performed by either native acrylamide gel electrophoresis or by anion-exchange HPLC as described in Pearson and Regnier (1983) *J. Chrom.* 255: 137-149. The sequence of the synthetic oligonucleotides can be verified using the chemical

WO 01/07653

PCT/US00/19502

degradation method of Maxam and Gilbert (1980) in Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, *Meth. Enzymol.* 65: 499-560.

b) Antibodies/antibody fragments.

Antibodies or antibody fragments for use as binding partners (capture
5 agents) can be produced by a number of methods well known to those of skill in the art
(see, e.g., Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor
Laboratory, and Asai (1993) *Methods in Cell Biology Vol. 37: Antibodies in Cell Biology*,
Academic Press, Inc. N.Y.). In one approach, the antibodies are produced by immunizing
an animal (e.g. a rabbit) with an immunogen containing the epitope it is desired to
10 recognize/capture. A number of immunogens may be used to produce specifically reactive
antibodies. Recombinant protein is the preferred immunogen for the production of
monoclonal or polyclonal antibodies. Naturally occurring protein may also be used either
in pure or impure form. Synthetic peptides made as well using standard peptide synthesis
chemistry (see, e.g., Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in
15 *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis*,
Part A, Merrifield et al. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156, and Stewart et al.
(1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill.)

Methods of production of polyclonal antibodies are known to those of skill
in the art. In brief, an immunogen, preferably a purified cytoskeletal component, is mixed
20 with an adjuvant and animals are immunized. The animal's immune response to the
immunogen preparation is monitored by taking test bleeds and determining the titer of
reactivity to the cytoskeletal components and test compositions. When appropriately high
titers of antibody to the immunogen are obtained, blood is collected from the animal and
antisera are prepared. Further fractionation of the antisera to enrich for antibodies reactive
25 to the cytoskeletal component can be done if desired. (See Harlow and Lane, *supra*).

Monoclonal antibodies may be obtained by various techniques familiar to
those skilled in the art. Briefly, spleen cells from an animal immunized with a desired
antigen are immortalized, commonly by fusion with a myeloma cell (See, Kohler and
Milstein (1976) *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519). Alternative methods of immortalization
30 include transformation with Epstein Barr Virus, oncogenes, or retroviruses, or other
methods well known in the art. Colonies arising from single immortalized cells are
screened for production of antibodies of the desired specificity and affinity for the antigen,

WO 01/07653

PCT/US00/19502

and yield of the monoclonal antibodies produced by such cells may be enhanced by various techniques, including injection into the peritoneal cavity of a vertebrate host. Alternatively, one may isolate DNA sequences which encode a monoclonal antibody or a binding fragment thereof by screening a DNA library from human B cells according to the general protocol outlined by Huse *et al.* (1989) *Science*, 246:1275-1281.

Antibodies fragments, *e.g.* single chain antibodies (scFv or others), can also be produced/selected using phage display technology. The ability to express antibody fragments on the surface of viruses that infect bacteria (bacteriophage or phage) makes it possible to isolate a single binding antibody fragment from a library of greater than 10^{10} nonbinding clones. To express antibody fragments on the surface of phage (phage display), an antibody fragment gene is inserted into the gene encoding a phage surface protein (pIII) and the antibody fragment-pIII fusion protein is displayed on the phage surface (McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348: 552-554; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4133-4137).

Since the antibody fragments on the surface of the phage are functional, phage bearing antigen binding antibody fragments can be separated from non-binding phage by antigen affinity chromatography (McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348: 552-554). Depending on the affinity of the antibody fragment, enrichment factors of 20 fold - 1,000,000 fold are obtained for a single round of affinity selection. By infecting bacteria with the eluted phage, however, more phage can be grown and subjected to another round of selection. In this way, an enrichment of 1000 fold in one round can become 1,000,000 fold in two rounds of selection (McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348: 552-554). Thus even when enrichments are low (Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597), multiple rounds of affinity selection can lead to the isolation of rare phage. Since selection of the phage antibody library on antigen results in enrichment, the majority of clones bind antigen after as few as three to four rounds of selection. Thus only a relatively small number of clones (several hundred) need to be analyzed for binding to antigen.

Human antibodies can be produced without prior immunization by displaying very large and diverse V-gene repertoires on phage (Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597). In one embodiment natural V_H and V_L repertoires present in human peripheral blood lymphocytes were isolated from unimmunized donors by PCR. The V-gene repertoires were spliced together at random using PCR to create a scFv gene

WO 01/07653

PCT/US00/19502

repertoire which is was cloned into a phage vector to create a library of 30 million phage antibodies (*Id.*). From this single "naive" phage antibody library, binding antibody fragments have been isolated against more than 17 different antigens, including haptens, polysaccharides and proteins (Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; Marks *et al.* (1993) *BioTechnology*, 10: 779-783; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725-734; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624-628). Antibodies have been produced against self proteins, including human thyroglobulin, immunoglobulin, tumor necrosis factor and CEA (Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725-734). It is also possible to isolate antibodies against cell surface antigens by selecting directly on intact cells. The antibody fragments are highly specific for the antigen used for selection and have affinities in the 1 :M to 100 nM range (Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725-734). Larger phage antibody libraries result in the isolation of more antibodies of higher binding affinity to a greater proportion of antigens.

c) Binding proteins.

In one embodiment, the binding partner (capture agent) can be a binding protein. Suitable binding proteins include, but are not limited to receptors (*e.g.* cell surface receptors), receptor ligands, cytokines, transcription factors and other nucleic acid binding proteins, growth factors, *etc.*

The protein can be isolated from natural sources, mutagenized from isolated proteins or synthesized *de novo*. Means of isolating naturally occurring proteins are well known to those of skill in the art. Such methods include but are not limited to well known protein purification methods including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like (*see, generally*, R. Scopes, (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y.).

Where the protein binds a target reversibly, affinity columns bearing the target can be used to affinity purify the protein. Alternatively the protein can be recombinantly expressed with a HIS-Tag and purified using Ni²⁺/NTA chromatography.

In another embodiment, the protein can be chemically synthesized using standard chemical peptide synthesis techniques. Where the desired subsequences are relatively short the molecule may be synthesized as a single contiguous polypeptide. Where larger molecules are desired, subsequences can be synthesized separately (in one or

WO 01/07653

PCT/US00/19502

more units) and then fused by condensation of the amino terminus of one molecule with the carboxyl terminus of the other molecule thereby forming a peptide bond. This is typically accomplished using the same chemistry (e.g., Fmoc, Tbc) used to couple single amino acids in commercial peptide synthesizers.

5 Solid phase synthesis in which the C-terminal amino acid of the sequence is attached to an insoluble support followed by sequential addition of the remaining amino acids in the sequence is the preferred method for the chemical synthesis of the polypeptides of this invention. Techniques for solid phase synthesis are described by Barany and Merrifield (1962) *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis. Part A.*,
10 Merrifield et al. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156, and Stewart et al. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill.

In a preferred embodiment, the can also be synthesized using recombinant DNA methodology. Generally this involves creating a DNA sequence that encodes the binding protein, placing the DNA in an expression cassette under the control of a particular
15 promoter, expressing the protein in a host, isolating the expressed protein and, if required, renaturing the protein.

DNA encoding binding proteins or subsequences of this invention can be prepared by any suitable method as described above, including, for example, cloning and
20 restriction of appropriate sequences or direct chemical synthesis by methods such as the phosphotriester method of Narang et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; the phosphodiester method of Brown et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; the diethylphosphoramidite method of Beaucage et al. (1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862; and the solid support method of U.S. Patent No. 4,458,066.

25 The nucleic acid sequences encoding the desired binding protein(s) may be expressed in a variety of host cells, including *E. coli*, other bacterial hosts, yeast, and various higher eukaryotic cells such as the COS, CHO and HeLa cells lines and myeloma cell lines. The recombinant protein gene will be operably linked to appropriate expression control sequences for each host. For *E. coli* this includes a promoter such as the *T7*, *trp*, or
30 *lambda* promoters, a ribosome binding site and preferably a transcription termination signal. For eukaryotic cells, the control sequences will include a promoter and preferably

WO 01/07653

PCT/US00/19502

an enhancer derived from immunoglobulin genes, SV40, cytomegalovirus, *etc.*, and a polyadenylation sequence, and may include splice donor and acceptor sequences.

The plasmids can be transferred into the chosen host cell by well-known methods such as calcium chloride transformation for *E. coli* and calcium phosphate treatment or electroporation for mammalian cells. Cells transformed by the plasmids can be selected by resistance to antibiotics conferred by genes contained on the plasmids, such as the *amp*, *gpt*, *neo* and *hyg* genes.

Once expressed, the recombinant binding proteins can be purified according to standard procedures of the art as described above.

10

d) Sugars and carbohydrates.

Other binding partners include sugars and carbohydrates. Sugars and carbohydrates can be isolated from natural sources, enzymatically synthesized or chemically synthesized. A route to production of specific oligosaccharide structures is through the use of the enzymes which make them *in vivo*, the glycosyltransferases. Such enzymes can be used as regio- and stereoselective catalysts for the *in vitro* synthesis of oligosaccharides (Ichikawa *et al.* (1992) *Anal. Biochem.* 202: 215-238). Sialyltransferase can be used in combination with additional glycosyltransferases. For example, one can use a combination of sialyltransferase and galactosyltransferases. A number of methods of using glycosyltransferases to synthesize desired oligosaccharide structures are known.

15

Exemplary methods are described, for instance, WO 96/32491, Ito *et al.* (1993) *Pure Appl. Chem.* 65:753, and U.S. Patents 5,352,670, 5,374,541, and 5,545,553. The enzymes and substrates can be combined in an initial reaction mixture, or alternatively, the enzymes and reagents for a second glycosyltransferase cycle can be added to the reaction medium once the first glycosyltransferase cycle has neared completion. By conducting two glycosyltransferase cycles in sequence in a single vessel, overall yields are improved over procedures in which an intermediate species is isolated.

20

Methods of chemical synthesis are described by Zhang *et al.* (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121(4): 734-753. Briefly, in this approach, a set of sugar-based building blocks is created with each block preloaded with different protecting groups. The building blocks are ranked by reactivity of each protecting group. A computer program then determines exactly which building blocks must be added to the reaction so that the sequences of reactions from fastest to slowest produces the desired compound.

25

30

WO 01/07653

PCT/US00/19502

2) Attachment of binding partners to the channel.

Many methods for immobilizing biomolecules to a variety of solid surfaces are known in the art. The desired component may be covalently bound, or noncovalently attached through specific or nonspecific bonding.

5 If covalent bonding between a compound and the surface is desired, the surface will usually be polyfunctional or be capable of being polyfunctionalized. Functional groups which may be present on the surface and used for linking can include carboxylic acids, aldehydes, amino groups, cyano groups, ethylenic groups, hydroxyl groups, mercapto groups and the like. The manner of linking a wide variety of compounds to various surfaces is well known and is amply illustrated in the literature. See, for example, Ichiro Chibata (1978) *Immobilized Enzymes*, Halsted Press, New York, and Cuatrecasas, (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 3059.

10 In addition to covalent bonding, various methods for noncovalently binding an assay component can be used. Noncovalent binding is typically nonspecific absorption of a compound to the surface. Typically, the surface is blocked with a second compound to prevent nonspecific binding of labeled assay components. Alternatively, the surface is designed such that it nonspecifically binds one component but does not significantly bind another. For example, a surface bearing a lectin such as concanavalin A will bind a carbohydrate containing compound but not a labeled protein that lacks glycosylation.

15 Various solid surfaces for use in noncovalent attachment of assay components are reviewed in U.S. Patent Nos. 4,447,576 and 4,254,082.

Where the binding partner is a nucleic acid or a polypeptide, the molecule can be chemically synthesized *in situ*. This involves essentially standard chemical synthesis methods substituting photo-labile protecting groups for the usual protecting groups (e.g. dimethoxy trityl group (DMT) used in nucleic acid synthesis). Irradiation of the microchannel at discrete locations results in selective coupling of the monomer (e.g. amino acid or nucleotide) to the growing polypeptide(s) or nucleic acid(s) at the irradiated site. Methods of light-directed polymer synthesis are well known to those of skill in the art (see, e.g., U.S. Patent No. 5,143,854; PCT Publication Nos. WO 90/15070, WO 92/10092 and WO 93/09668; and Fodor *et al.* (1991) *Science*, 251, 767-77).

20 In preferred embodiments, the binding partner is immobilized by the use of a linker (e.g. a homo- or heterobifunctional linker). Linkers suitable for joining biological

WO 01/07653

PCT/US00/19502

binding partners are well known to those of skill in the art. For example, a protein or nucleic acid molecule may be linked by any of a variety of linkers including, but not limited to a peptide linker, a straight or branched chain carbon chain linker, or by a heterocyclic carbon linker. Heterobifunctional cross linking reagents such as active esters of N-ethylmaleimide have been widely used (*see, for example*, Lerner *et al.* (1981) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78: 3403-3407 and Kitagawa *et al.* (1976) *J. Biochem.*, 79: 233-236, and Birch and Lennox (1995) *Chapter 4 in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Wiley-Liss, N.Y.).

In one preferred embodiment, the binding partner is immobilized utilizing a biotin/avidin interaction. In this embodiment, biotin or avidin with a photolabile protecting group can be placed in the channel. Irradiation of the channel at a distinct location results in coupling of the biotin or avidin to the channel at that location. Then, the binding agent bearing a respective biotin or avidin is placed into the channel whereby it couples to the respective binding partner and is localized in the irradiated site. The process can be repeated at each distinct location it is desired to attach a binding partner.

Another suitable photochemical binding approach is described by Sigrist *et al.* (1992) *Bio/Technology*, 10: 1026-1028. In this approach, interaction of ligands with organic or inorganic surfaces is mediated by photoactivatable polymers with carbene generating trifluoromethyl-aryl-diazirines that serve as linker molecules. Light activation of aryl-diazirine functions at 350 nm yields highly reactive carbenes and covalent coupling is achieved by simultaneous carbene insertion into both the ligand and the inert surface. Thus, reactive functional groups are not required on either the ligand or supporting material.

In a most preferred embodiment, fused silica capillaries (50 μm i.d. are coated with a thin layer of epoxy (Epotek 350) in order to cover the fused silica surface with an organic coating. The organic coating of the surface not only minimizes DNA adsorption on the walls of the capillary, but also provides a polymerized surface to which DNA-probes can be immobilized directly. A protocol for coating the capillary surface with the epoxy is described by Liu *et al.* (1996) *J. Chromatogr.* 723: 157-167. Briefly, the capillary was rinsed first with acetone for 15 min., then dried in an oven at 100°C for 1 h under a nitrogen pressure of 20 psi. Epoxy 314 ND (Epo-Tek, Billerica, MA) was dynamically coated onto the capillary surface by aspirating a solution of an epoxy mixture

WO 01/07653

PCT/US00/19502

in acetone. The residual solvent was removed from the epoxy-coated capillaries by flushing with nitrogen at room temperature for 30 min. The epoxy coating is cross-linked at 80°C for 30 min, then at 150°C for 2 h under a nitrogen pressure of 20 psi. The coated capillaries are washed with buffer for 30 min prior to use.

- 5 A 1 cm section of the epoxy-coated capillary is then flushed with a specific DNA-probe solution. The DNA-probe solution is allowed to react with the capillary piece overnight to bind the DNA-probe to the capillary walls via hydrophobic and electrostatic interactions. Other DNA-probes are attached to similar one cm long pieces of coated capillaries in a similar manner. Once they are immobilized onto the capillary walls, these
- 10 hybridization regions are rinsed with deionized water, and are then ready to assemble into a capillary biosensor having different binding partners at different locations.

C) Analyte detection methods.

- Virtually any method of biological molecule detection can be used in accordance with the methods of this invention. Since the identity of the various analytes is
- 15 determined by their spatial position in the flow moving through the channel, there is not need for different labeling systems on each analyte. To the contrary, one advantage of the present assay system is that there is no need to label the analyte at all.

- Methods of detecting analytes are well known to those of skill in the art. Were the analyte is labeled (*e.g.* with a radioactive, fluorescent, magnetic, or mass label),
- 20 the analyte is detected by detecting the label. However, in a preferred embodiment, the analyte is not labeled and preferred detection methods do not rely on the use of labels attached to the analyte. Such detection means include, but are not limited to detection of optical signals (*e.g.* emission and/or absorption spectroscopy), detection of electrical and magnetic signals, detection of changes of the electrical properties (*e.g.*
- 25 conductance/resistance, capacitance, impedance, *etc.*) of the medium containing the analyte.

- In one simple embodiment, the optical absorption of the fluid containing the analyte is monitored (*e.g.* with a standard ultra-violet) detector. However, in a preferred embodiment, an electroanalytic detector is utilized. In a most preferred embodiment, the
- 30 electroanalytic detector utilizes time-varying (*e.g.* sinusoidal) voltammetry.

In a particularly preferred embodiment, sinusoidal voltammetry involves providing a small amount of the analyte of interest to a voltammetric electrode. A

WO 01/07653

PCT/US00/19502

sinusoidal (or other time-varying) voltage is applied to the electrode. The time-varying (e.g., sinusoidal) voltage has an amplitude large enough to sweep through the formal potential of the redox species of interest in a single cycle at a given frequency. The response of the analyte to the sinusoidal voltage is selectively detected at a harmonic of the fundamental frequency of the time-varying voltage. Methods of performing time-varying voltammetry are provided in U.S. Patent 5,650,061 and the references cited therein.

While a particularly preferred embodiment utilizes sinusoidal voltammetry, other voltammetric methods are well suited to this invention. As indicated above, time-varying voltammetric methods are particularly preferred and such voltammetric methods are not limited to the use of sinusoidal time-varying voltages. Other wave forms are also suitable. Such methods include, but are not limited to, the use of square waves and triangle waves. Such time-varying voltammetric methods are well known to those of skill in the art (see, e.g., Cullison and Kuhr (1996) *Electroanalysis*, 7(1): 1-6).

It was a discovery of this invention that combination of sinusoidal voltammetry detection with spatially encoded analyte separation provides highly specific analyte detection/quantitation at extremely low levels in a complex sample (e.g. serum).

III. Integrated assay device.

State-of-the-art chemical analysis systems for use in chemical production, environmental analysis, medical diagnostics and basic laboratory analysis are preferably capable of complete automation. Such total analysis systems (TAS) (Fillipini *et al.* (1991) *J. Biotechnol.* 18: 153; Garn *et al.* (1989) *Biotechnol. Bioeng.* 34: 423; Tshulena (1988) *Phys. Scr.* T23: 293; Edmonds (1985) *Trends Anal. Chem.* 4: 220; Stinshoff *et al.* (1985) *Anal. Chem.* 57:114R; Guibault (1983) *Anal. Chem. Symp. Ser.* 17: 637; Widmer (1983) *Trends Anal. Chem.* 2: 8) automatically perform functions ranging from introduction of sample into the system, transport of the sample through the system, sample preparation, separation, purification and detection, including data acquisition and evaluation.

Recently, sample preparation technologies have been successfully reduced to miniaturized formats. Thus, for example, gas chromatography (Widmer *et al.* (1984) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 18: 1), high pressure liquid chromatography (Muller *et al.* (1991) *J. High Resolut. Chromatogr.* 14: 174; Manz *et al.* (1990) *Sensors & Actuators* B1:249; Novotny *et al.*, eds. (1985) *Microcolumn Separations: Columns, Instrumentation and Ancillary Techniques J. Chromatogr. Library*, Vol. 30; Kucera, ed. (1984) *Micro-*

WO 01/07653

PCT/US00/19502

Column High Performance Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam; Scott, ed. (1984) *Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses*, Wiley, N.Y.; Jorgenson *et al.* (1983) *J. Chromatogr.* 255: 335; Knox *et al.* (1979) *J. Chromatogr.* 186:405; Tsuda *et al.* (1978) *Anal. Chem.* 50: 632 and capillary electrophoresis (Manz *et al.* (1992) *J. Chromatogr.* 593: 253; Olefirowicz *et al.* (1990) *Anal. Chem.* 62: 1872; Second Int'l Symp. High-Perf. Capillary Electrophoresis (1990) *J. Chromatogr.* 516; Ghowsi *et al.* (1990) *Anal. Chem.* 62:2714) have been reduced to miniaturized formats.

Similarly, in another embodiment, this invention provides an integrated assay device (e.g., a TAS) for detecting and/or quantifying a multiplicity of analytes. The assay device comprises the channel(s) with attached binding partners as described above. In addition, preferred integrated assay devices also include one or more of the following: a detection system (e.g. voltammetry system including electrodes and/or associated electronics), one or more reservoirs to provide buffers and/or flushing fluids, sample application well(s) and/or injection port(s), a computer controller (for control of pumps, reservoir flow switching, detector, and signal analysis system, and the like.

In a particularly preferred embodiment, the integrated assay device contains the channels in a "removable" unit. Thus, for example, where the capillaries can be provided as channels in a module that can be easily inserted and removed from the ancillary equipment thereby readily allowing the device to be run with assay for different sets of analytes.

Where the channel used in the device is a tube (e.g. a capillary electrophoresis tube), a conventional capillary electrophoresis device contains much of the ancillary plumbing, sample handling and delivery components, and computer controller(s) for an "integrated" assay device according to the present invention. Little more is required than fairly straightforward introduction/addition of a detector (e.g. a sinusoidal voltammetry detector) and associated electronics in accordance with this invention to provide an integrated assay device well suited to detection and/or quantitation of a wide variety of analytes.

IV. Running assays.

In general, assays are run by introducing the sample into the channel having affixed binding partners. The sample is preferably held under conditions that allow the respective binding partners to specifically bind to the target analytes that may be present in

WO 01/07653

PCT/US00/19502

the sample. The sample is then flushed out of the channel, typically by introduction of a buffer that facilitates release of the bound analyte. The released analyte is then detected at a downstream detection point and the identity of the analyte is determined by the time from release to detection.

5 **A) Sample preparation.**

Virtually any sample can be analyzed using the devices and methods of this advantage. However, in a preferred embodiment, the sample is a biological sample. The term "biological sample", as used herein, refers to a sample obtained from an organism or from components (e.g., cells) of an organism. The sample may be of any biological tissue or fluid. Frequently the sample will be a "clinical sample" which is a sample derived from 10 a patient. Such samples include, but are not limited to, sputum, cerebrospinal fluid, blood, blood fractions (e.g. serum, plasma), blood cells (e.g. white cells), tissue or fine needle biopsy samples, urine, peritoneal fluid, and pleural fluid, or cells therefrom. Biological samples may also include sections of tissues such as frozen sections taken for histological 15 purposes.

Biological samples, (e.g. serum) may be analyzed directly or they may be subject to some preparation prior to use in the assays of this invention. Such preparation can include, but is not limited to, suspension/dilution of the sample in water or an appropriate buffer or removal of cellular debris, e.g. by centrifugation, or selection of 20 particular fractions of the sample before analysis.

B) Sample delivery into system

The sample can be introduced into the devices of this invention according to standard methods well known to those of skill in the art. Thus, for example, the sample can be introduced into the channel through an injection port such as those used in high 25 pressure liquid chromatography systems. In another embodiment the sample can be applied to a sample well that communicates to the channel. In still another embodiment the sample can be pumped into the channel. Means of introducing samples into channels are well known and standard in the capillary electrophoresis and chromatography arts.

C) Binding conditions

30 Once in the channel, the sample is held under conditions that promote specific binding between the sample and the binding partner. Conditions compatible with specific binding between a binding partner and an analyte are well known to those of skill

WO 01/07653

PCT/US00/19502

in the art. For example, buffers suitable for promoting binding between an antibody and a target protein are well known in the immunoassay art (*see, e.g.*, U.S. Patents 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; and 4,837,168, Asai (1993) *Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition). Similarly conditions under which a nucleic acids specifically hybridize to each other are also well known to those of skill in the art (*see*, Tijssen (1993) *supra.*). The particular binding conditions are optimized for particular sets of binding partners and target analytes according to standard methods well known to those of skill in the art (*see, e.g.*, Tijssen (1993) *supra.*, U.S. Patents 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; and 4,837,168, Asai (1993) *Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition).

D) Release conditions.

After the analyte(s) in the sample are specifically bound to the binding partner attached to the channel, they are released. Release is preferably accomplished by contacting the binding partner/analyte complex with a buffer or with temperature conditions that disrupt the binding partner/analyte interaction. Depending on the particular analyte/binding partner pair such associations can be disrupted by the use of high temperature, denaturants (*e.g.* urea, formamide, *etc.*), high or low pH, high or low salt, and various chaotropic agents (*e.g.*, guanidine HCl).

E) Analyte/flow through the channel.

Samples and/or carrier/buffer fluids can be introduced into and/or moved through the channel according to standard methods. For example, fluid can be introduced and moved through the channel by a simple gravity feed from a "reservoir". Alternatively, fluids can be moved through the channel by gas pressure, or by fluid pressure produced by any of a variety of suitable pumps (*e.g.* peristaltic pumps, metering pumps, *etc.*), pressure on a deformable chamber/diaphragm, *etc.*. Analytes can also be driven through the channel by electroosmotic methods.

F) Detection.

As indicated above, analyte detection can be by any of a number of methods well known to those of skill in the art as indicated above. In a preferred

WO 01/07653

PCT/US00/19502

embodiment, electrochemical detection methods are utilized and in a most preferred embodiment, detection is by sinusoidal voltammetry.

The protocol for performing sinusoidal voltammetry has been described previously (Singhal *et al.* (1997) *Anal. Chem.* 69: 4828-4832; and U.S. Patent 5,650,061).

- 5 Briefly, a sine wave at 2 Hz, 0.7 Vp-p, +0.35 V D.C. offset is generated digitally using a software program. This sine wave serves as the applied potential for a copper electrode. The current response from the electrode is collected by the software in real time for the entire length of a single elution run. This time domain current response is then converted into the frequency domain with fast Fourier transforms. The protocol for analyzing
- 10 frequency spectra has been explained previously (Singhal *et al.* (1997) *Anal. Chem.* 69: 1662-1668). The spectrum corresponding to the analyte is obtained after background subtraction and digital phase locking as described previously (Singhal *et al.* (1997) *supra.*).

V. Kits for multiple analyte detection.

- In one embodiment this invention provides kits for screening for identifying
- 15 the presence or absence, or quantifying a multiplicity of analytes in a sample. The kits include of the channels of this invention bearing affixed to their surfaces various binding partners as described herein. The channels can be designed for simple and rapid incorporation into an integrated assay device, e.g. a device comprising electrochemical detector (e.g. sinusoidal voltammetry) circuitry, appropriate plumbing for administration
- 20 of a sample and maintenance of a fluid flow through the channel, and computer control system(s) for control of sample application, fluid flow, and analysis of signal output as described herein. The kit can additionally include appropriate buffers and other solutions and standards for use in the assay methods described herein.

- In addition, the kits may include instructional materials containing
- 25 directions (*i.e.*, protocols) for the practice of the methods of this invention. While the instructional materials typically comprise written or printed materials they are not limited to such. Any medium capable of storing such instructions and communicating them to an end user is contemplated by this invention. Such media include, but are not limited to electronic storage media (*e.g.*, magnetic discs, tapes, cartridges, chips), optical media (*e.g.*, CD ROM), and the like. Such media may include addresses to internet sites that provide
- 30 such instructional materials.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

EXAMPLES

The following examples are offered to illustrate, but not to limit the claimed invention.

Example 1**Nanoliter Volume Electrochemical Sensing of DNA-Hybridization****Materials and methods.****Reagents.**

The water used was deionized and then passed through a Milli-Q Water Purification System (Millipore Corp., Bedford, MA). The biotinylated DNA-probe and the complementary DNA-target specific to *Tuberculosis* (TB) and *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) identification were custom synthesized through Genemed Synthesis, Inc., San Francisco, CA (Table 1). DNA-probe solutions were made by diluting a 100 µg/ml solution of DNA-probe dissolved in deionized water into a 1:1 mixture with DNA-binding solution (Pierce Chemicals, CA). This binding solution facilitates binding DNA to polymerized surfaces via hydrophobic and electrostatic interactions. Fused silica capillaries (Polymicro Technologies, Inc., AZ) were used for making the capillary biosensors. These capillaries were not flushed with acetone and dried before any derivatization was done to the capillary surface.

Capillary Derivatization and Immobilization of DNA-probes.

Fused silica capillaries (50 µm i.d. x 150 µm o.d., one meter in length) were used for the biosensor. The capillary was coated with a thin layer of epoxy (Epotek 350) in order to cover the fused silica surface with an organic coating. Organic coating of the surface not only minimizes DNA adsorption on the walls of the capillary, but also provides a polymerized surface to which DNA-probes can be immobilized directly. The protocol for coating the capillary surface with the epoxy was exactly as described by Liu *et al.* (1996) *J. Chromatogr.* 723: 157-167. Briefly, the capillary was rinsed first with acetone for 15 min., then dried in an oven at 100°C for 1 h under a nitrogen pressure of 20 psi. Epoxy 314 ND (Epo-Tek, Billerica, MA) was dynamically coated onto the capillary surface by aspirating a solution of an epoxy mixture in acetone. The residual solvent was removed from the epoxy-coated capillaries by flushing with nitrogen at room temperature for 30 min. The epoxy coating was cross-linked at 80°C for 30 min, then at 150°C for 2 h

WO 01/07653

PCT/US00/19502

under a nitrogen pressure of 20 psi. The coated capillaries were washed with buffer for 30 min prior to use.

A 1 cm section of the epoxy-coated capillary was then flushed with a specific DNA-probe solution. The DNA-probe solution was allowed to react with the capillary piece overnight to bind the DNA-probe to the capillary walls via hydrophobic and electrostatic interactions. Other DNA-probes were attached to similar one cm long pieces of coated capillaries in a similar manner. Once the probes were immobilized onto the capillary walls, these hybridization regions were rinsed with deionized water, and then were ready to assemble into the capillary biosensor. These hybridization regions were epoxied into a "separation column" at two different locations, where the distance from the inlet to the first probe (TB probe) was about 25 cm, and the two probes were spaced 15 cm apart. This left a distance of approximately 60 cm from the second probe (HIV probe) to the detector. The different segments of capillary were linked together by epoxying the capillaries into sleeves (180 x 360 μ m capillary sections) which were also approximately one cm in length each. The total length of the capillary biosensor was approximately one meter.

Hybridization, Elution and Detection of DNA-Target.

The capillary was mounted in a commercial capillary electrophoresis instrument (Biorad Instruments Inc, Hercules, CA), which was used for its pressure flow and autosampler capabilities. The protocols used for hybridizing complementary targets to these DNA-probes with high stringency have been described extensively in the literature. The specific procedures used for this experiment are as follows:

The capillary was initially flushed with prehybridization buffer (0.75 M NaCl, 75 mM sodium citrate, pH=7.0, 0.1% N-lactoyl sarcosine, 0.02% SDS, in 50% formamide, 40°C) in order to selectively bind complementary DNA-targets to the probe. DNA-target solutions for both TB and HIV targets were dissolved in Prehybridization Buffer, and flushed and incubated in the capillary for nearly 30 minutes in order to achieve complete hybridization and saturation of the surface immobilized probes.

The excess target solution was then rinsed out with Hybridization Buffer (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate, pH=7.0, 0.1% SDS). A stringent wash was subsequently done with Stringent Wash Buffer (75 mM NaCl, 7.5 mM sodium citrate, pH=7.0, 0.1% SDS, at 40°C) in order to remove any non-specifically bound DNA-targets).

WO 01/07653

PCT/US00/19502

This stringent wash ensured that only perfectly complementary DNA-targets remained behind inside the capillary biosensor, as everything else is washed out under these stringent conditions.

5 The capillary was then filled up with Electrochemical Wash Buffer (89 mM TRIS, 89 mM boric acid, and 1 mM EDTA, pH = 10), in order to rinse out the high stringency wash buffer which was not compatible with the copper electrode (due to the presence of surfactants).

10 Once the capillary was filled with Electrochemical Wash Buffer, the copper electrode was placed at the biosensor capillary outlet. The electrode was automatically aligned with the capillary outlet due to a two-part machined design (Kuhr (1993) U.S. Patent 5,650,061). The capillary was then filled rapidly (at 100 psi) with Elution Buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, and 1 mM EDTA, pH = 11), and incubated for 30 minutes at room temperature. The Elution Buffer promoted denaturation of the hybridized DNA-targets, thereby releasing the oligomers into solution inside the capillary at specific
15 locations.

The Elution Buffer, containing the dehybridized target DNA was then pumped at a constant flow rate using pressure induced flow at nearly 5 psi, thereby eluting the released DNA-targets as they moved with the buffer. As the DNA-target oligomers flowed past the detector, the DNA was electrocatalytically oxidized at the copper
20 electrode, and thereby generated a signal which could be detected using sinusoidal voltammetry as described previously (see U.S. Patent 5650,061). Each separate zone of DNA was then detected at the copper electrode at the outlet as it moves past the detector.

Electrochemical Detection.

25 Forty-micron diameter copper microelectrodes were fabricated inside a 5 cm, 50 x 360 µm fused silica capillary. The capillary was filled with gallium using a syringe. Next, a small length of copper wire was inserted into the capillary at one end, and then sealed in place using 5-minute epoxy. Another wire was inserted in from the back end of the capillary to provide an electrical connection to the copper wire. The gallium inside the capillary provided an electrical connection between the two wires. These
30 capillary microelectrodes were very rugged, and reusable after polishing. These electrodes were not pretreated in any form except for a manual polish using 600-grit sand paper.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

Sinusoidal voltammetry was used to detect the dehybridized DNA target at the copper microelectrode as it eluted from the capillary. The protocol for performing sinusoidal voltammetry has been described previously (Singhal *et al.* (1997) *Anal. Chem.* 69: 4828-4832; and U.S. Patent 5,650,061). Briefly, a sine wave at 2 Hz, 0.7 V_{p-p}, +0.35 V D.C. offset was generated digitally using a in-house software program. This sine wave served as the applied potential for the copper electrode. The current response from the electrode was collected by the software in real time for the entire length of a single elution run. This time domain current response was then converted into the frequency domain with fast Fourier transforms. The protocol for analyzing frequency spectra has been explained previously (Singhal *et al.* (1997) *Anal. Chem.* 69: 1662-1668). The spectrum corresponding to the analyte was obtained after background subtraction and digital phase locking as described previously (Singhal *et al.* (1997) *supra.*).

Results and Discussion

Low volume, direct detection of DNA hybridization is desirable due to the clinical importance of DNA as an indicator of disease. Once a specific nucleotide sequence has been shown to be uniquely or distinguishably associated with a given marker (e.g. an infectious agent, genetic trait, tumor type), that sequence can be synthesized in large quantity and used as a probe for nucleic acid from other sources to determine if the specific sequence is present. DNA assays based on hybridization have been developed for a number of different applications, and in many cases, multiple tests need to be performed on every sample to completely fingerprint and identify the DNA present.

Sinusoidal Voltammetry, a frequency domain voltammetric detection technique, can be used to detect nucleic acids under experimental conditions similar to those used for the detection of sugars. Since nucleotides also contain amine moieties on the nucleobases, and these are also electroactive at a copper surface, it was possible that some signal on the nucleotides could be contributed by these bases apart from that due to the sugar backbone.

Detection of underivatized DNA is highly desirable in order to avoid any sample handling losses and contamination problems. Electrochemical detection is particularly suited for the generally sample-limited case of DNA analysis, as it can be miniaturized with ease (capable of working in nanoliter to picoliter volumes) without sacrificing its capabilities as a sensitive detector.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

In the development of this capillary biosensor, specific sequences of DNA have been immobilized in different regions inside a continuous microfluidic channel (*i.e.*, a fused silica capillary). A 1-cm section of a 50 μm i.d. capillary, corresponding to a sample volume of 20 nL, was used to provide the recognition region of the sensor. The sample was pumped through each region sequentially, where the appropriate DNA targets (if present) could bind to each immobilized DNA probe independently. Once the sample had a chance to interact with each immobilized target, it was eluted from the capillary and the entire capillary was washed with a series of stringent washes, thereby removing any potential contaminating materials. The target DNA that remained bound to each region of immobilized probe was then eluted in a spatially encoded manner.

Figure 1 shows the fundamental approach used in this design to enable the possibility of observing multiple hybridization events in a single experiment. Zones 1 and 2 are immobilization zones to which DNA-probes for TB and HIV were attached, respectively. These zones were subsequently combined to make a single capillary system, so as to use only one injection of a sample containing the DNA targets. The reagents needed to wash a more complex sample with very high stringency (*i.e.*, a clinical sample which contains many other biomolecules like proteins, other cell lines *etc.*) can be introduced via pressure-induced flow from reservoirs at the head of the capillary. The copper microelectrode is poised at the outlet end of the capillary; it is positioned using a machined two-part system that allows automatic alignment of the capillary with the electrode (Kulr *et al.* U.S. Patent 5,650,061). Thus the system is very easy to put together, and robust once in operation.

The sequence of steps used to achieve specific hybridization, washing, and elution of the denatured targets oligonucleotides is shown in Figure 2. Similar steps can be utilized for any kind of stringent hybridization of DNA-targets to their complementary probes. In this scheme:

- 1) Hybridization is carried out under stringent conditions to avoid any non-specific binding of the targets to the capillary walls or to probes that are not perfect complements to the target analyte. Consequently, the TB-target (the oligomer which has a sequence characteristic of DNA coding for TB, Zone 1) only hybridizes to the immobilized TB-probe (the complementary sequence), and the HIV-target only hybridizes to the immobilized HIV-

WO 01/07653

PCT/US00/19502

probe (Zone 2) under stringent conditions. These zones are spatially segregated and stringent washes remove all interfering components from each zone, as well as from the capillary separating the zones.

2) The final wash with Elution Buffer (TBE, pH = 11) denatures the hybridized complementary nucleic acids simultaneously, thereby releasing the bound DNA targets into the solution immediately adjacent to the immobilized probe(s) in the capillary. The spatial selectivity for these two targets is conserved since this buffer is rapidly moved into place (on a time scale much faster than dehybridization can take place), then flow within the capillary is halted, and the denaturation process is complete after 30 minutes of incubation.

3) Finally, the solution containing the "free" spatially-resolved target-DNA oligomers was eluted. Since the zones containing the two targets are spatially distinct, they flow past the copper electrode poised at the outlet at different times. The scheme shown in Figure 3 illustrates this aspect of detecting the eluting DNA-targets. The elution time of each target at the detector indicate its identity, thereby encoding the site of DNA-hybridization.

The detection of HIV-target DNA using a capillary biosensor with a 1-cm zone of immobilized DNA-probe is shown in Figure 4. A sample containing 100 μ L of 10 μ g/ml of a synthetic HIV-target was flushed through the capillary biosensor, where the HIV-probe was immobilized. The sequence of steps described in Figure 2 was followed to allow the detection of HIV-oligonucleotide target in the sample. Originally, the sequence did not include the electrochemical wash buffer (89 mM TRIS, 89 mM boric acid, and 1 mM EDTA, pH = 10). This was added to minimize the artifact observed when the Elution Buffer hits the copper electrode. The pH of this buffer is critical, since too high a pH will lead to dehybridization of the target DNA and result in loss of signal, while too low a pH will result in a large artifact when the Elution Buffer reaches the detector.

As shown in Figure 4, the signal obtained with sinusoidal voltammetry demonstrates the elution of the DNA-target after dehybridization in Elution Buffer. The elution of a blank solution shows that the signal is very stable, but it is difficult to assess

WO 01/07653

PCT/US00/19502

the specificity of binding of the HIV-target with a single probe system. Thus, this kind of detection could lead to false positives in DNA testing.

A multiple probe system can not only address the issues of parallel processing of nucleic acid samples, but also provides an internal standard against non-specific hybridization in its inherent design. If non-specific hybridization occurs in a given sample, it would give more than one peak in a multiple probe system. This would immediately indicate the need for an even more stringent hybridization protocols, until a single peak is detected for a single injected target. The specificity of hybridization for the current system is demonstrated in Figure 5(A), with the detection of hybridization of TB and HIV-specific targets simultaneously present in the same sample. The sample was allowed to interact with each DNA-probe only once, but the two targets can be detected simultaneously in one run. The migration times for the two zones match with internal standards for TB and HIV targets shown in Figures 5(B) and 5(C) respectively. Thus, not only does this illustrate that the two targets can be detected simultaneously, but also that there was no non-specific hybridization occurring under the hybridization conditions being used. Otherwise, the internal standard runs would have shown not one, but two peaks (*i.e.*, the TB-specific target would have hybridized to its perfect complement probe, and to the HIV-specific probe, and similarly for the HIV-specific target). Thus, the detection of two peaks in figure 5(A) definitely indicates the detection of synthetic TB and HIV-specific targets simultaneously and demonstrates the absence of non-specific hybridization, reducing the likelihood of the generation of any false positive results.

DNA sequencing by hybridization relies on the molecular recognition imparted via the hybridization of a sample (*e.g.* target) DNA molecule to an immobilized probe DNA. Preferred probe oligonucleotides are at least about 7 nucleotides in length more preferably at least about 10 nucleotides in length, more preferably at least 15 or 20 nucleotides in length and most preferably at least 30, 40 or 50 nucleotides in length. This probe has a known sequence that is complementary to at least one region of the target. While there are many different assay formats, the probe is typically immobilized to nitrocellulose, agarose, plastic or other inert substrate that can be placed in contact with the sample, washed clean of non-recognized DNA, then assayed for content. The assay of hybridized DNA can be accomplished in the system described here following denaturation

WO 01/07653

PCT/US00/19502

of the DNA, elution from the capillary or channel and detection with SV at a copper microelectrode.

Conclusions

5 A new capillary-based DNA-biosensor has been developed utilizing direct electrochemical detection which is capable of detecting multiple DNA oligomers simultaneously. This detection scheme utilized the flow-encoded hybridization assay of DNA-targets in a sample with various DNA-probes immobilized at various positions on a capillary surface. The simultaneous hybridization of various types of DNA-targets is complemented by the direct detection of these targets once they are eluted, at a copper
10 electrode by using sinusoidal voltammetry. Such parallel, and native detection of disease-specific oligonucleotide sequences can pave the way for a multi-disease DNA-sensor which is robust, rugged, and cheap. Thereby, it avoids the problems with existing DNA-sensors which are based on various optical detection schemes that are operator intensive and expensive to perform.

Example 2

Sensitive and Selective Detection of Amino Acids and Peptides with Sinusoidal Voltammetry

Experimental Parameters

Reagents.

20 The water used was deionized and then passed through a Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA). The amino acids and Insulin (98-99%, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO), and the remaining peptides (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA) were used as received. All experiments were done with 0.10 M sodium hydroxide (A.C.S. Grade, Fisher Scientific, Fair Lawn NJ) as the
25 running electrolyte. Stock solutions of 0.10 M were prepared in deionized water. Subsequent dilutions were made using the running electrolyte.

Copper Microelectrodes.

Copper microelectrodes were prepared by first pulling glass capillaries with a microelectrode puller (Model PE-2, Narishige, Tokyo Japan). Then, under a microscope
30 the end of the capillary was clipped with a scalpel. A 20µm diameter copper wire

WO 01/07653

PCT/US00/19502

(99.99%, Goodfellow, Cambridge, England) was then inserted into the freshly clipped end and sealed with epoxy (Epoxy Technology, Billerica, Massachusetts). The electrode was polished on a diamond-polishing wheel and cleaned by sonication in deionized water. To make electrical connection with the copper wire, the back end of the capillary was filled with gallium (Sigma Chemical Co.) and a 150 μ m diameter copper wire inserted into the gallium. Alternatively, the back end of the capillary was filled with epoxy and the larger diameter copper wire was placed in the epoxy filled capillary until it physically made contact with the 20 μ m wire. No electrochemical pretreatment was performed and the electrode was allowed to stabilize under experimental conditions for about an hour or until a stable response was observed.

Electrochemical instrumentation and experimental conditions.

The flow cell was constructed of Plexiglass and the tubing was matched so that diffusional broadening was avoided. The introduction of the sample plug was controlled via a pneumatic actuator, which is controlled by a solenoid valve. The flow rate was maintained by gravity flow by keeping the buffer reservoir 19 cm above the flow cell. The flow rate was determined to be 0.5 ml/min and the volume of the sample was determined from the flow rate and length of the injection. The injection time was determined so that the electrode saw the full concentration of the analyte.

The conditions for the experiments reported are described here. For the amino acids and peptides a 2 Hz sine wave (0 to 690 mV vs Ag/AgCl) was applied with software written by the author in Labview (National Instruments, Austin, TX). The waveform was filtered with a 4-pole low pass filter using a cyberamp (Model 380, Axon Instruments Inc., Foster City, CA) with a 3-db point of three times the fundamental frequency (6 Hz). The output current was filtered with a 4-pole low pass filter. The filter was set at 40 Hz (4 times the maximum frequency observed, 10th harmonic or 20 Hz). The current was converted from digital to analog with a 16 bit analog to digital converter (PCI-4451, National Instruments) using a 300 MHz Pentium II personal computer. A single scan comprised 4 sinusoidal cycles.

The time domain collected was converted into the frequency domain by Labview software (National Instruments) and further processed by using Matlab programming (The Mathworks, Inc., Englewood Cliffs NJ). The signal only spectra were obtained by subtracting the background vector obtained prior to injection from the

WO 01/07653

PCT/US00/19502

instantaneous signal current vector. A digital lock-in amplification method was used to acquire the time domain spectra. The time spectra were Fourier transformed at a rate of 512 points to generate the magnitude and phase angle of each frequency harmonic (up to the 10th harmonic). The phase information at each harmonic was obtained by using the signal only vector and projecting it onto the background-subtracted signal vector. Lastly, the phase resolved vectors were low-passed filtered using a moving average smooth (boxcar integration).

Results.

Figure 6 shows the background subtracted frequency spectrum for Arginine at a copper microelectrode. The experiment was performed using 1 μ M Arginine. The excitation signal was a sine wave: 2 Hz, 0-690 mV vs. Ag/AgCl. Current from four sinusoidal periods which consisted of 512 points (total time = 1 sec) was used to generate each frequency spectrum. The three dimensional graph consists of the frequency (x-axis), magnitude (z-axis) and phase angle (y-axis) information out to the 10th harmonic.

Figure 7 shows the sinusoidal time domain response from 1 μ M arginine at the fifth harmonic (10 Hz). This harmonic gave the highest signal/noise and a limit of detection (S/N = 3) of 39nM.

Figure 8 demonstrates the linear dynamic range of various arginine concentrations. Arginine concentrations of 1, 10, 100, and 1000 μ M were injected into the flow injection analysis system. The magnitudes at the fifth harmonic (10 Hz) are plotted against the four different concentrations injected. This plot shows excellent linearity (R=0.9997) over three orders of magnitude at the fifth harmonic.

Figure 9 shows the subtracted frequency spectra for asparagine and glutamine at a copper microelectrode. The squares represent 10 μ M asparagines, while the circles represent 10 μ M glutamine. The experimental conditions are the same as those used to generate Figure 1.

Figures 10A and 10B show the sinusoidal time domain response of asparagine and glutamine at the sixth harmonic (12 Hz). Figure 10A shows 10 μ M asparagines, while Figure 10B shows 10 μ M glutamine. The sixth harmonic is where these two amino acids optimized phase angles are closest to 90 degrees apart. This harmonic

WO 01/07653

PCT/US00/19502

gives the greatest selectivity between these two analytes. The limit of detection at this harmonic ($S/N = 3$) for asparagine is 400nM and 500nM for glutamine.

Figure 11 shows the background subtracted frequency domain spectrum for 10 μ M Insulin B-chain. The same conditions as figure 1 were used.

5 Figure 12 shows the sinusoidal time domain component of insulin B-chain at the fourth harmonic (8 Hz). The fourth harmonic gave the greatest signal/noise and a limit of detection ($S/N = 3$) of 500nM.

Figure 13 shows the subtracted frequency spectra for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (circles) and Bradykinin (squares) at a copper microelectrode.

10 Figures 14A and 14B show the time domain response of Bradykinin and Luteinizing Hormone-Releasing Hormone at the second harmonic (4 Hz), respectively.

Figure 15 shows the background subtracted frequency domain response for Neurotensin (squares) and Substance P (circles), respectively.

15 Figure 16A and 16B show the time domain response of Neurotensin and Substance P, respectively, at the first harmonic (2 Hz).

20 It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

CLAIMSWhat is claimed is:

1. A method of detecting two or more target analytes in a sample, said method comprising:
 - 5 i) providing a channel having affixed therein a binding partner for each of said two or more analytes, where the binding partners for each of said two or more analytes are located in different regions of said channel and said channel has a cross-sectional area small enough such that when analytes are released from said two or more binding partners into a fluid flowing through said channel, said analytes remain spatially
 - 10 segregated until they reach a detection point in said channel downstream from said binding partners;
 - ii) passing a fluid comprising a sample through said channel under conditions where said target analytes present in said fluid bind to their respective binding partners thereby spatially encoding said analytes along said channel;
 - 15 iii) releasing said analytes from said binding partners into fluid flow passing along said channel; and
 - iv) detecting said analytes at a position along said channel downstream from said binding partners.
 2. The method of claim 1, wherein said analytes are not labeled.
 - 20 3. The method of claim 1, wherein said channel is a capillary tube.
 4. The method of claim 3, wherein said capillary tube is a capillary electrophoresis tube.
 5. The method of claim 1, wherein said channel is a channel etched in a surface.
 - 25 6. The method of claim 5, wherein said channel is a channel etched in a glass surface.
 7. The method of claim 1, wherein said channel is molded.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

8. The method of claim 7, wherein said channel is molded in a polymeric material.
9. The method of claim 1, wherein said channel has a cross-sectional area that provides a Reynold's number (Re) of less than about 1.
- 5 10. The method of claim 1, wherein said channel has a cross-sectional diameter less than about 100 μm .
11. The method of claim 1, wherein said two or more target analytes comprise at least three different analytes.
12. The method of claim 1, wherein said binding partners are selected
10 from the group consisting of antibodies, binding proteins, and nucleic acids.
13. The method of claim 12, wherein said binding partners are nucleic acids.
14. The method of claim 1, wherein said passing a fluid is fluid flow induced by a pressure difference.
- 15 15. The method of claim 1, wherein said passing a fluid is electroosmotic fluid flow.
16. The method of claim 1, wherein said fluid comprises a sample selected from the group consisting of blood, plasma, serum, urine, oral fluid, cerebrospinal fluid, and lymph.
- 20 17. The method of claim 1, wherein said detecting comprises absorbance spectroscopy.
18. The method of claim 1, wherein said detecting comprises sinusoidal voltammetry.
19. The method of claim 1, wherein said analytes are nucleic acids and
25 said detecting detects target analytes at a concentration of less than 1×10^{-9} M.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

20. A device for detecting a two or more analytes in a sample, said device comprising:
- 5 a channel having affixed therein a binding partner for each of said two or more analytes, where the binding partners for each of said two or more analytes are located in different regions of said channel and said channel has a cross-sectional area small enough such that when analytes are released from said two or more binding partners into a fluid flowing through said channel, said analytes remain spatially segregated until they reach a detection point along said channel downstream from said binding partners; and
- 10 a detector that detects said analytes within said channel at said detection point.
21. The device of claim 20, wherein said channel is a capillary tube.
22. The device of claim 21, wherein said capillary tube is a capillary electrophoresis tube.
- 15 23. The device of claim 20, wherein said channel is a channel etched in a surface.
24. The device of claim 23, wherein said channel is a channel etched in a glass surface.
25. The device of claim 20, wherein said channel has a cross-sectional area that provides a Reynold's number (Re) of less than about 1.
- 20 26. The device of claim 20, wherein said channel has a cross-sectional diameter less than about 100 μm .
27. The device of claim 20, wherein said two or more target analytes comprise at least three different analytes.
- 25 28. The device of claim 20, wherein said binding partners are selected from the group consisting of antibodies, binding proteins, and nucleic acids.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

29. The device of claim 28, wherein said binding partners are nucleic acids.

30. The device of claim 20, wherein said detector comprises an absorbance spectrometer.

5 31. The device of claim 20, wherein said detector comprises a sinusoidal voltammeter.

32. A kit for the detection of two or more target analytes in a fluid, said kit comprising a channel having affixed therein a binding partner for each of said two or more analytes, where the binding partners for each of said two or more analytes are located
10 in different regions of said channel and said channel has a cross-sectional area small enough such that when analytes are released from said two or more binding partners into a fluid flowing through said channel, said analytes remain spatially segregated until they reach a detection point in said channel downstream from said binding partners.

33. The kit of claim 32, wherein said kit comprises a plurality of said
15 channel.

34. The kit of claim 33, wherein the channels comprising the plurality of channel each have a unique collection of binding partners.

35. The kit of claim 33, wherein said channel is a capillary tube.

36. The kit of claim 35, said capillary tube is a capillary electrophoresis
20 tube.

37. The kit of claim 33, wherein said channel is a channel etched in a surface.

38. The kit of claim 37, wherein said channel is a channel etched in a glass surface.

25 39. The kit of claim 33, wherein said channel has a cross-sectional area that provides a Reynold's number (Re) of less than about 1.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

40. The kit of claim 33, wherein said channel has a cross-sectional diameter less than about 100 μm .
41. The kit of claim 33, wherein said channel contains at least 3 different species of binding partner.
- 5 42. The kit of claim 33, wherein said binding partners are selected from the group consisting of antibodies, binding proteins, and nucleic acids.
43. The kit of claim 42, wherein said binding partners are nucleic acids.

WO 01/07653

PCT/US00/19502

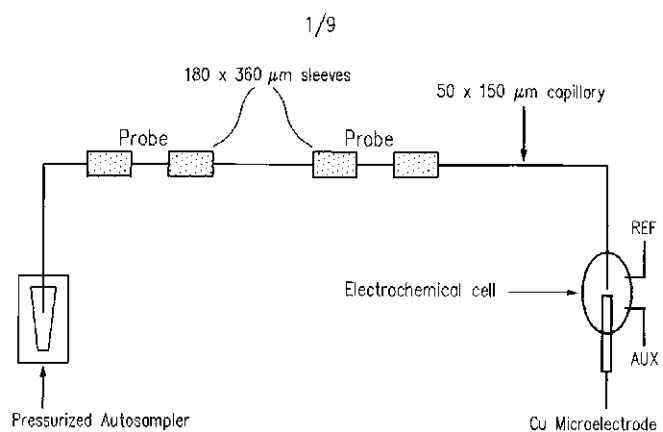


FIG. 1

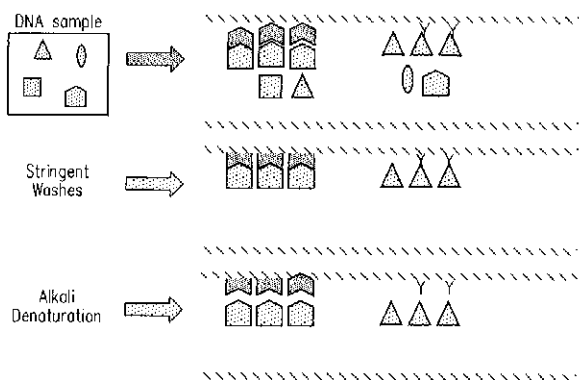


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

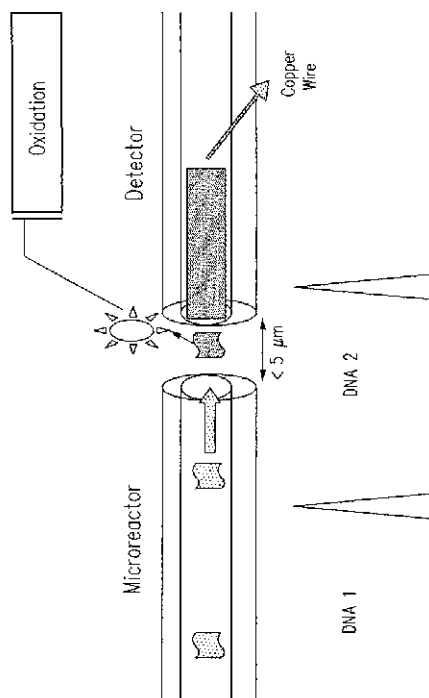
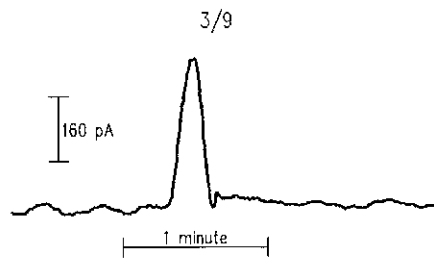


FIG. 3

WO 01/07653

PCT/US00/19502



Capillary DNA-biosensor with TB+HIV Probes Immobilized.
Length of each probe zone = 1 cm. Distance between zones = 7 inches
Elution of Target with TBE buffer, pH = 11, after 30 minute incubation
Detection: Sinusoidal voltammetry with 40 μ m Copper electrode
2 Hz, 0-700 mVp-p sine wave. Response shown at 5th Harmonic.

FIG. 4

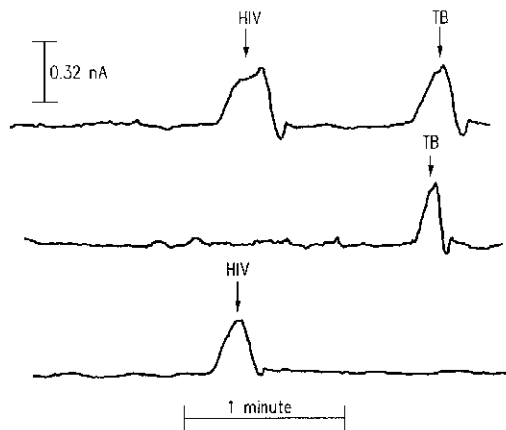


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/07653

PCT/US00/19502

4/9

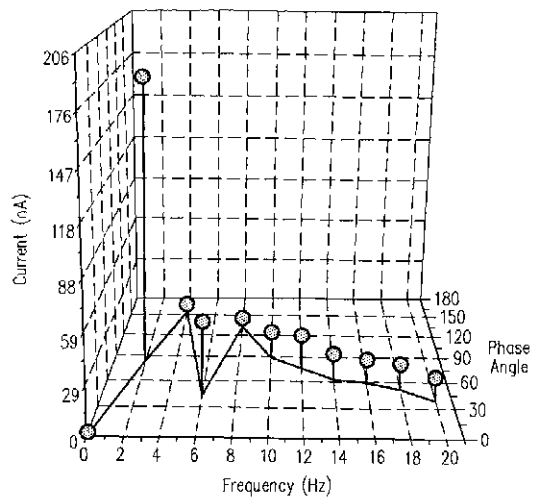


FIG. 6

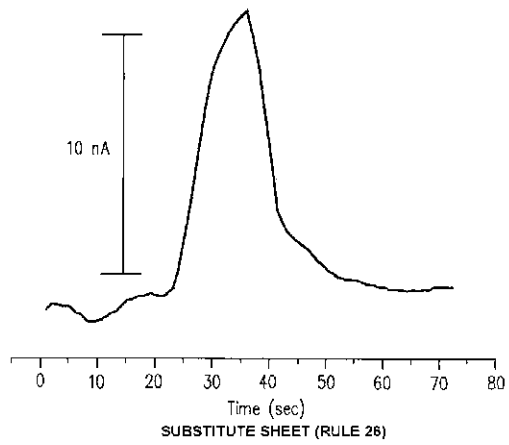


FIG. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/07653

PCT/US00/19502

5/9

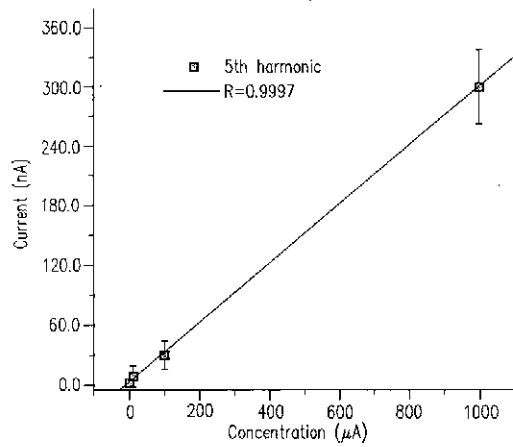


FIG. 8

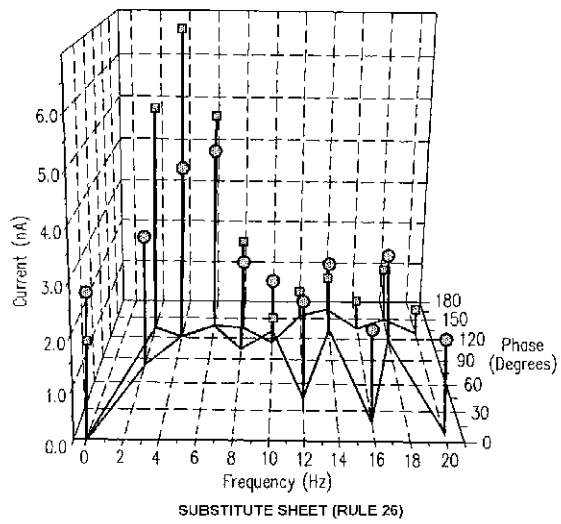


FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/07653

PCT/US00/19502

6/9

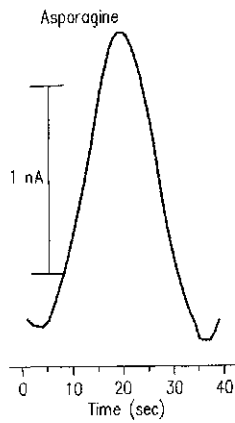


FIG. 10A

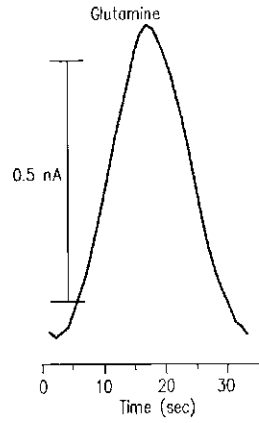


FIG. 10B

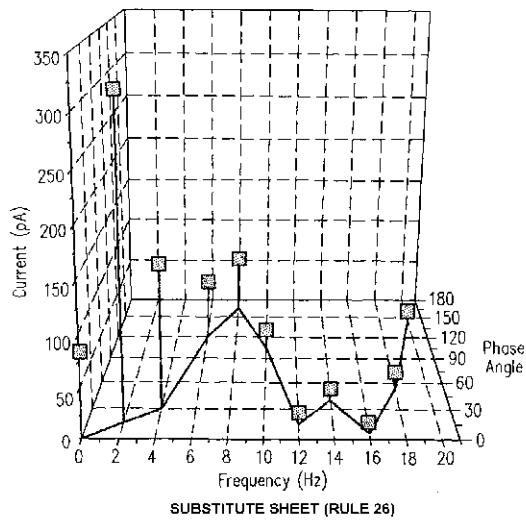


FIG. 11

WO 01/07653

PCT/US00/19502

7/9

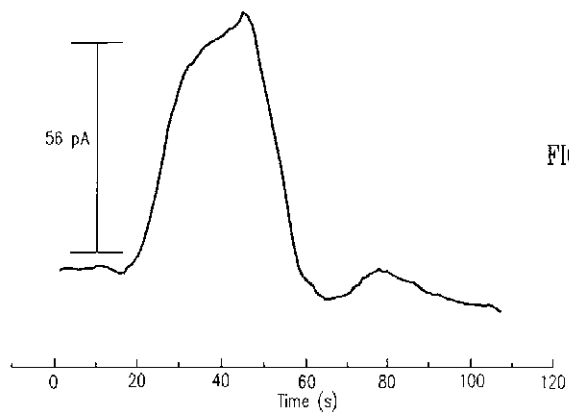


FIG. 12

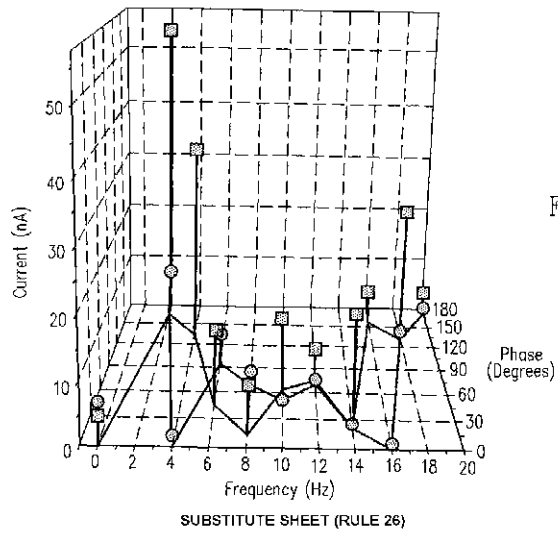


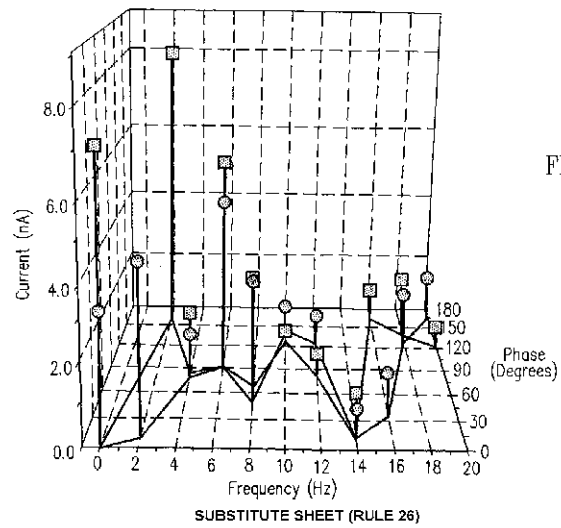
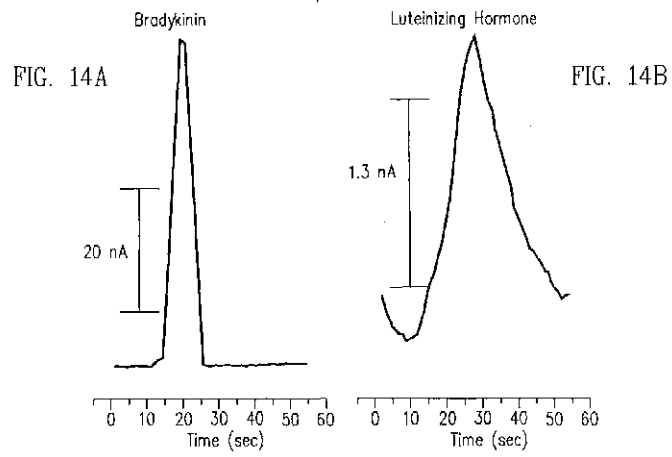
FIG. 13

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/07653

PCT/US00/19502

8/9



WO 01/07653

PCT/US00/19502

9/9

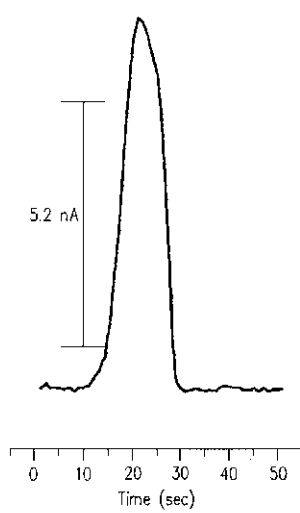


FIG. 16A

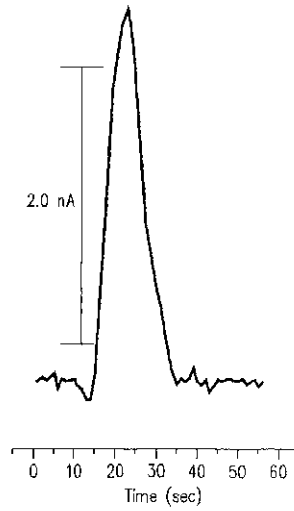


FIG. 16B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/19502
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68 US CL : 435/3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS CAPLUS MEDLINE SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,607,646 A (OKANO et al) 04 March 1997, especially column 3, line 24 to column 4, line 10, and claims 1 and 4.	1-43
Y	WOOLLEY et al. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. November 1994, Vol. 91, pages 11348-11352, especially page 11348.	1-43
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 AUGUST 2000		Date of mailing of the international search report 07 SEP 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JEFFREY S. LUNDGREN Telephone No. (703) 308-0196

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

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/48	G 0 1 N 27/48	3 0 1
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 27/26	3 3 1 K
	G 0 1 N 27/46	3 8 6 G
	G 0 1 N 27/46	3 3 6 G

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA08 QA13 QA18 QA19 QQ01 QQ42 QR08 QR14 QR32
 QR41 QR42 QR50 QR55 QR56 QR58 QR62 QR63 QS25 QS34
 QS39 QX02 QX05

专利名称(译)	检测空间编码的分析物		
公开(公告)号	JP2004500549A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001512919	申请日	2000-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	クーアーワーナージー		
发明人	クーアー, ワーナー ジー.		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/00 C12M1/00 C12Q1/68 G01N27/30 G01N27/416 G01N27/447 G01N27/48 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/54366 B01L3/5027 B01L2200/16 B01L2300/0838 C12Q1/6825 G01N27/447		
FI分类号	G01N27/26.331.E C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N27/30.B G01N27/30.F G01N27/48.301 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N27/26.331.K G01N27/46.386.G G01N27/46.336.G		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/CC01 4B029/FA02 4B029/FA10 4B029/FA15 4B029/GB01 4B029/GB06 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QR63 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX05		
优先权	09/358204 1999-07-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于通过将样品中的多种不同分析物（例如核酸，蛋白质，糖等）与“互补”结合配偶体（例如互补核酸，配体，抗体等）组合进行检测流过微通道（例如毛细管）描述了生物传感器。结合配偶体固定在微通道的不同部分（例如熔融石英毛细管）。在制造生物传感器之后，样品流入毛细管，样品中包含的任何目标分析物与微通道壁的固定的结合配偶体结合并形成结合的复合物。最后，沿毛细管的整个长度通过检测器部署下游的分析物浓度（例如，通过使用正弦伏安法）进行测量流入的结合的复合物被同时变性。

