

(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2004-532404  
(P2004-532404A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2 G O 5 4
C 1 2 M 1/00	GO 1 N 33/53	F 4 B O 2 4
C 1 2 M 1/34	GO 1 N 33/53	M 4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09	GO 1 N 33/53	U 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 M 1/00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-576595 (P2002-576595)	(71) 出願人	503352464 ジェネテック・バイオテクノロジー・(シ ャンハイ)・カンパニー・リミテッド 中華人民共和国、200233 シャンハ イ、グイチン・ロード、ビルディング・2 5、6/エフ、ナンバー・69
(86) (22) 出願日	平成14年3月28日 (2002.3.28)	(74) 代理人	100064746 弁理士 深見 久郎
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月26日 (2003.9.26)	(74) 代理人	100085132 弁理士 森田 俊雄
(86) 国際出願番号	PCT/CN2002/000209	(74) 代理人	100083703 弁理士 仲村 義平
(87) 国際公開番号	W02002/077152	(74) 代理人	100096781 弁理士 堀井 豊
(87) 国際公開日	平成14年10月3日 (2002.10.3)		
(31) 優先権主張番号	01105795.5		
(32) 優先日	平成13年3月28日 (2001.3.28)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		
(31) 優先権主張番号	01112783.X		
(32) 優先日	平成13年4月27日 (2001.4.27)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		
(31) 優先権主張番号	01113323.6		
(32) 優先日	平成13年7月11日 (2001.7.11)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多数のアナライトを検出するための装置および方法

(57) 【要約】

少なくとも1つのサンプルにおける多数のアナライトの検出のための装置が提供される。装置は、テスト表面を備えた固体基板を含む。テスト表面には、少なくとも1つのアレイの離散したテスト部位を含む少なくとも1つの反応領域が規定される。これらのテスト部位の各々にはテスト分子が固定され、異なったテスト部位は異なったテスト分子を固定される。仕切りが固体基板に装着するために設けられる。仕切りは装着表面に複数の穴を含む。装着表面は、固体装置のテスト表面と相補であり、これら2つの部品が装着された場合に各穴がテスト表面の一部と接合して複数の漏れが防止されたチャンバを作るように、リバーシブルな装着に対して適合される。チャンバ内のテスト表面は、チャンバ内に露出する複数のテスト部位を含む。各チャンバは好ましくは、チャンバに導入される流体がテストのために露出したテスト部位に接触し得るように外部からアクセス可能である開口部を設けられる。この発明の別の局面においては、同じサンプル中の多数のアナライトを分析するための方法が提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

固体基板と仕切りとを含む多数のアナライトを検出するための装置であって、前記基板は複数の離散したテスト部位が規定されたテスト表面を有し、各前記テスト部位はテスト分子を固定され、

前記仕切りは装着表面に設けられる予め定められた位置に複数の穴を有し、前記装着表面は前記テスト表面と相補的であって前記テスト表面への装着に対して適合され、前記仕切りは、各前記穴が前記テスト表面の一部と接合して複数の漏れが防止されたチャンバを作るように前記固体基板にリバーシブルに装着可能であり、前記チャンバ内の前記テスト表面はその中に露出する複数のテスト部位を有し、前記チャンバはさらに、前記チャンバに導入される流体がテストのために前記露出するテスト部位と接触するように外部からアクセス可能である開口部を有する、装置。

10

**【請求項 2】**

前記テスト分子は抗原または抗体である、請求項 1 に記載の装置。

**【請求項 3】**

カバーが設けられ、前記カバーは、こぼれまたは異なったチャンバの溶液間の汚染を防止するために前記チャンバの前記開口部を閉鎖するよう適合されるカバー表面を有する、請求項 1 に記載の装置。

**【請求項 4】**

前記カバーはポリエステルシートである、請求項 3 に記載の装置。

20

**【請求項 5】**

多数のアナライトを検出するための装置であって、

(a) 平坦な表面を備えたチップを含み、前記平坦な表面には複数の反応領域が規定され、各前記反応領域はさらに、少なくとも 1 つのアレイの離散したテスト部位を含み、各前記テスト部位はテスト分子を固定され、さらに

(b) フレーム内に規定される複数の穴を有する仕切りシートを含み、各前記穴は反応領域に対応し、前記フレームは、複数の漏れが防止されたウェルが前記平坦な表面との間に作られ、各反応領域が対応のウェルの底を形成し、かつ前記シートのフレームが近接するウェルとの間に仕切り壁を形成するように、前記平坦な表面とのリバーシブルな結合に対して適合される、装置。

30

**【請求項 6】**

前記テスト分子は抗原または抗体である、請求項 5 に記載の装置。

**【請求項 7】**

サンプル中の多数のアナライトを分析するための方法であって、

(a) 複数の離散しかつ空間的に離れたテスト部位を、テスト表面の少なくとも 1 つのテスト領域に規定するステップと、

(b) テスト分子を、複数のテスト分子が固定されるように、各前記テスト部位に固定するステップと、

(c) 各前記テスト領域の周りに流体に耐性のあるバリアを設けるステップと、

(d) 各前記テスト領域を分析のために適切なテスト試薬およびサンプルで接触するステップと、

40

(e) 反応しないサンプルおよび試薬を除去するステップと、

(f) 前記バリアを除去するステップと、

(g) 前記サンプル内のアナライトと前記テスト分子との間の反応について前記テスト表面を分析するステップとを含む、方法。

**【請求項 8】**

請求項 7 に記載の同じサンプルからの多数のアナライトを分析する方法であって、前記テスト表面はチップの一方側であり、前記テスト分子は抗体またはリガンドであり、前記ステップ (d) および (e) はさらに、

前記サンプルを各テスト領域内に固定したテスト分子とインキュベートして前記アナライ

50

トをそこへ結合させるステップを含み、前記アナライトは交差反応リガンドまたは抗体であり、さらに

結合しない材料を除去するステップと、

前記反応領域に適切な二次分子の混合物を加えてそこでインキュベートするステップとを含み、各前記二次分子は信号分子を結合され、前記二次分子はさらに、適切なアナライトに特異的に結合するよう適合され、さらに

結合しない二次分子を除去するステップと、

各前記テスト部位の前記信号分子の存在を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 9】

前記テスト分子はホルモン、薬剤、受容体、酵素、核酸、抗生物質またはリガンドである、請求項 7 に記載の方法。 10

【請求項 10】

前記二次分子は前記適切なアナライトと交差反応する二次抗体であり、前記信号分子は励起光子の励起の際に放出光子を放出可能である蛍光分子であり、前記信号分子の存在を検出するステップはさらに、前記信号分子を前記励起光で励起するステップと、蛍光検出器を用いた放出光子の放出を検出するために検出器を用いるステップとを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記信号分子は酵素であり、前記信号分子の存在を検出するステップはさらに、前記酵素に適切な基板を与えてインキュベートするステップを含み、前記酵素は前記基板を、前記テスト部位に堆積される着色物に変換するよう適合される、請求項 8 に記載の方法。 20

【請求項 12】

前記二次分子は前記適切なアナライトと交差反応する二次抗体であり、前記信号分子はピオチンであり、前記信号分子の存在を検出するステップはさらに、前記信号分子をストレプトアビジンまたはアビジンで接触してそこへ結合させるステップと；結合しないストレプトアビジンまたはアビジンを除去するステップと；前記結合したストレプトアビジンまたはアビジンを二次ピオチンを含む溶液で接触するステップとを含み、前記二次ピオチンは蛍光分子と結合し、前記蛍光分子は放出光子を放出することが可能であり、さらに；前記チップに励起光子を照射するステップと、前記蛍光分子からの放出光子の放出を検出するために検出器を用いるステップとを含む、請求項 8 に記載の方法。 30

【請求項 13】

前記テスト分子は、A 型肝炎ウイルス抗原、C 型肝炎ウイルス抗原、D 型肝炎ウイルス抗原、B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎「e」抗原、B 型肝炎コア抗原、E 型肝炎ウイルス抗原、B 型肝炎表面抗原に対する抗体、B 型肝炎「e」抗原に対する抗体、 $\alpha$ -フェトプロテイン抗原に対する抗体、および D 型肝炎ウイルス抗原に対する抗体からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 14】

前記テスト分子は、トキソプラズマ、風疹ウイルス、サイトメガロウイルス、I 型単純ヘルペスウイルスおよび II 型単純ヘルペスウイルスからなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。 40

【請求項 15】

前記テスト分子は、抗 $\alpha$ -フェトプロテイン、抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼアイソザイム I 抗体、抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼアイソザイム I' 抗体、抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼアイソザイム II 抗体、抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼアイソザイム II' 抗体、抗 des- カルボキシプロトンピン抗体、抗 $\alpha$ -L-フコシダーゼ抗体、抗 5'ヌクレオチドホスホジエステラーゼアイソザイム V 抗体、抗グルタチオン S-トランスフェラーゼ胎盤型抗体、抗 $\alpha$ -1-抗トリプシン抗体、抗フェリチン抗体、抗酸性イソフェリチン抗体、および抗 B 型肝炎表面抗原抗体からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 16】

前記テスト分子は、一本鎖核酸、二本鎖核酸、S M I T H 抗原、アセチルコリン受容体、チログロブリン、マイクロゾーム抗原、異常ヒト I g G および赤血球タンパク質からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

この発明は、サンプル中の 1 つ以上のアナライトを検出するための、および / または定量化するための装置および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

さまざまな疾病および人体の症状を検出するための、診断用テスト装置が多くの論文および特許文献に記載されている。治療および診断の発展とともに、疾病症状の早期診断のために人体の健康状態を観察することが、ますます重要になった。同じサンプル中の異なったアナライトをテストできる機能は、多くの者が追求している目標である。理想的には、必要な試薬および人的資源を節約するために、単一のテスト装置を用いた単一のサンプルを分析するための方法が、多数のアナライトについての診断用情報をもたらすべきである。

【0003】

ウーデンバーグ (Woudenberg) 他の特許文献 1 は、1 つ以上のサンプルアナライトの存在または不在についてサンプルを同時にテストするための方法および装置に向けられる。装置は、一連のチャンバを有し、かつ各チャンバがアナライトと反応するのに有効である特定の試薬を有する、サンプル分配ネットワークを規定する基板を有すると記載される。上述のシステムを用いて多数のアナライトを分析し得るかもしれないが、装置はこのために特に固体の基板が製造されることが必要になるであろういくつかのチャンバおよび溝を有する。

【0004】

フィツジェラルド (Fitzgerald) 他の特許文献 2 は、基板と多数の離散した反応部位とがリガンドで共有結合される、多数のアナライトアッセイを行なう固体状態の装置を記載する。この出願は、分析されるべきサンプルを収容するためのさまざまな溝およびチャンバを備えた装置を開示する。この発明はさらに、多数のアナライトを有するフォーマットにおける異なったアナライトを同時に検出するための統合された分析システムを提供する。

【0005】

上述のシステムはサンプルから多数のアナライトを分析することが可能であるが、装置を製造するためのおよびサンプルをテストするためのコストを削減する改良されたシステムを提供する必要性が引き続き存在する。また、サンプルおよび試薬の量を減じる必要性もある。

【特許文献 1】

米国特許第 6 1 2 6 8 9 9 号明細書

【特許文献 2】

欧州特許出願第 E P 0 8 7 4 2 4 2 号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、この発明の目的は、多数のアナライトに対する改良された診断システムを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の要約

10

20

30

40

50

この発明の一局面に従うと、少なくとも1つのサンプルにおける多数のアナライトを検出するための装置が提供される。装置は、テスト表面を備えた固体基板を含む。テスト表面上には、少なくとも1アレイの離散テスト部位を含む少なくとも1つの反応領域が規定される。これらの各テスト部位上にはテスト分子が固定され、異なったテスト部位上には異なったテスト分子が固定され得る。固体基板に装着するための仕切りが設けられる。仕切りは、装着表面に設けられる複数の穴を含む。装着表面は、固体装置のテスト表面と相補的なものであり、かつ2つの部品が組み立てられたときに各穴がテスト表面の部分と接合して複数の漏れが防止されたチャンバを作るように、リバーシブルにテスト表面に装着されるよう適合される。チャンバ内のテスト表面は、チャンバ内に露出する複数のテスト部位を含む。各チャンバは、好ましくはチャンバに導入される流体がテストのために露出したテスト部位と接触するように、外部からアクセス可能である開口部を設けられる。

10

**【0008】**

好ましい実施の形態においては、チャンバは、底としての役割を果たす固体基板のテスト表面と、保持壁としての役割を果たす仕切りの一部とによって作られるウェルであり、それにより、複数のテスト部位がチャンバ内のウェルの底に露出する。

**【0009】**

この発明の別の局面においては、テスト分子は少なくとも1つのリガンドと少なくとも1つの抗体とからなる。同じサンプル内の対応の交差反応するアナライトの結合反応が同じ反応領域内で同時に達成されるように、リガンドは1つのテスト部位に固定され、抗体は同じチャンバ内の異なったテスト部位に固定される。

20

**【0010】**

この検出装置の好ましい実施の形態においては、固体基板は複数の反応領域が規定された平坦な頂部表面を備えたチップである。各テスト領域は、テスト分子が固定された少なくとも1アレイの離散テスト部位を含む。仕切りは、フレームによって規定される穴を有するシートであって、各穴は反応領域に対応する。シートのフレームは、チップの平坦表面との間に漏れが防止されたウェルが作られるように、チップの平坦表面とのリバーシブルな結合に対して適合される。結合は、これに限定されるものではないが、クリップおよびねじなどの機械的手段、ならびに、にかわおよび接着剤などの化学的手段を含むどのような従来的手段を用いて行われてもよい。各ウェル内に、チップの頂部表面の1つの反応領域はウェルの底を形成し、シートのフレームの対応の部分はウェルの間の仕切り壁を形成する。シートは、サンプル反応の後でシートを取り外してチップを結果読出および分析のために標準チップリーダーに挿入できるように、取り外し可能である。この好ましい実施の形態の1つの利点は、多くの標準チップリーダーをテスト結果の分析のために用い得ることである。取り外し可能仕切りシートは、チップに装着されると、異なったサンプルの反応が生じ得るウェルのシステムを含む組み立てられた装置を形成する。ウェルの数は、ユーザの要件と、それに従って製作された必要な穴を備えた仕切りシートとに従って決定することができる。この発明は、標準チップフォーマットにおいて多数のアナライトおよびサンプルを検出するための真に多用途のバイオチップおよび方法を提供した。

30

**【0011】**

この発明の別の局面に従うと、同じサンプル内の多数のアナライトを分析するための方法が提供される。方法は、テスト表面上に、複数の離散した、および空間的に離れたテスト部位を規定するステップと、複数のテスト分子が固定されるように、1つのテスト分子を各テスト部位に固定するステップとを含む。次いで各テスト領域の周りの流体防止バリアが作られ、分析のためのサンプルが適切なテスト試薬とともに各テスト領域に加えられる。

40

**【発明を実施するための最良の形態】****【0012】**詳細な説明

ここでの定義では、サンプルは、これらに限定するものではないが、テストされるべきいかなるアナライトをも含む、いかなる溶液、混合物または生物学的流体をも含む。サン

50

ルは、陽性対照血清と、陰性対照血清と、生物学的流体とを含む。漏れが防止されたチャンバは、流体の体積がチャンバのサイズで収容されるように適合されていれば、チャンバが漏れやこぼれなしに少なくとも1方向において流体を保持可能であることを意味する。漏れが防止されたチャンバは、封鎖された構造または開口部を備えた構造を含む。リガンドは、抗体-抗原結合反応において抗体と反応可能であるいかなる抗原または分子、酵素-基板結合反応における基板、またはこれらに限定するものではないが、核酸、染色体断片、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、脂質、ポリペプチド、抗生物質、ステロイドおよび他の有機分子を含む、受容体によって認識され結合されることができ分子をも指す。

#### 【0013】

この発明の好ましい実施の形態において、図1Aから図1Dを参照して、ガラススライド20からなるバイオチップには分離頂部仕切りシート22が設けられる。図1Bに示される仕切りシート22は、どのような不活性な物質からなってもよく、好ましくはプラスチック、メンブレン、ラテックス、セラミック、ゴム、樹脂、PVCまたはシリコンなどの可撓性材料からなる。穴22aが、フレーム22bが各穴の周りに形成されるように、仕切りシートに打抜かれる。するとフレーム22bは側壁としての役割を果たし、スライドの頂部表面は底としての役割を果たして、図1Dに示すように、それらの間にウェルまたはチャンバ24を形成する。頂部仕切りシートのサイズは、好ましくはスライドと同じ寸法であるか、または僅かに短く、ガラススライド20に直接にかわ付けされるように、下側ににかわを含む。好ましい実施の形態においては、にかわは頂部仕切りシートをガラススライドに装着させてそれらの間にウェル24を形成させるのに十分に強度がある。ウェルは、適切な量の流体が各ウェルに加えられた場合に流体が接合する領域を通して隣接するウェルに流れ込まないように、漏れを防止するべきである。にかわはまた、不活性であって、ユーザの都合で仕切りシートをスライドから取り外すことを可能にする材料からなるべきである。テスト部位の各アレイにおける行または列の数は、ユーザの必要性に応じてさまざまであり得る。仕切りシートの厚さは、各ウェルにおいて要求される反応の量に依存し、過度の実験を行なうことなく当業者が決定し得る。たとえば、シートは1~3mm厚さであり得る。穴およびフレームは、ユーザの必要性に応じたどのようなサイズまたは形状でもあり得る。例示のために、内径が0.3cm×0.3cm~0.4cm×0.6cm~1.2cm×1.2cmの穴を用い得る。22bまたは34aなどの仕切り壁の幅は、0.15cmから0.6cmに渡り得る。従って穴の数もさまざまであってよく、たとえば1×2、2×3、3×10、3×5、2×5、3×8および4×8アレイフォーマットである。

#### 【0014】

最も簡単な実施の形態においては、単一のテスト分子が、特定のウェルに対応するガラススライドの1つのテスト領域20aに固定され得る。たとえば、図1Bにおいて、穴H1の位置は、図1Aに示されるテスト領域TA1の位置に対応するであろう。頂部仕切りシートがスライド20上に装着されてにかわ付けされた場合に、ウェルW1が形成され、そのウェルの底が図1Cに示すテスト領域TA1に対応するように、1つのテスト分子がテスト領域TA1上に固定される。この特定の例においてはテスト分子は1つしかなく、従って各テスト領域内には1つのテスト部位しかない。図1Eに示すように任意のカバーシート21もまた、結合反応のインキュベーションの間に溶液を覆って蒸発、こぼれまたは汚染を防ぐために仕切りの外側表面上に置くことができる蓋として設けられる。するとカバーシートは、ユーザの必要に応じて取り除くことができる。カバーシートは仕切りのために用いられる材料などの、どのような不活性材料から作られてもよい。例は、ポリエステルフィルムである。

#### 【0015】

別の実施の形態においては、複数のテスト分子が各チャンバまたはウェル内に見出されるように、複数のテスト部位が各テスト領域に規定される。まず図2Aを参照して、この発明に従った別のガラススライド29がその上に2つのテスト領域を規定されて示される。

10

20

30

40

50

各テスト領域は、点線の矩形として示される。各テスト領域内にあるのは、 $3 \times 3$  アレイに規定されて円形で示されるテスト部位 3 2 である。図 2 B は、2 つのより大きな穴 3 6 が打ち抜かれた相補的仕切りシート 3 4 を示す。シートの残りはフレーム 3 4 a を形成する。図 2 C および図 2 D は、2 つの大きなウェル 4 0 が仕切り 3 4 とガラススライド 2 9 との間に形成された、この発明のこの実施の形態に従った組立てられた装置を示す。示される図から、この特定の例において、最大 9 つの異なったテスト分子を同じテスト領域に固定することができ、このフォーマットを用いて多数のアナライトを検出し得ることが明らかである。

【0016】

図 3 A は、一方のテスト領域 4 1 (1 つのチャンバの底に対応) が 9 アレイの  $4 \times 4$  テスト部位を含む、この発明の別の実施の形態を示す。図示をわかりやすくするために、他方のテスト領域および固体装置は図示しない。同様の種類の異なったチャンバまたはテスト領域がユーザの要件に応じて規定され得ることが明らかである。さらに、同じテスト表面上の異なったテスト領域が異なったテスト部位配置を有してもよい。この例においては、白抜き円 4 2 はアッセイ分子が固定されたテスト部位を規定する一方、塗りつぶし円 4 4 は陽性対照分子が固定された陽性対照部位である。点線円 4 6 は陰性対照が固定されたテスト部位を規定する。陽性対照分子はサンプル中に存在することがわかっているアナライトと反応することが期待される一方、陰性の方はサンプル中のどのアナライトとも反応することが期待されないテスト分子を含む。アッセイ分子は、サンプル中未知のレベルでアナライト (説明をわかりやすくするためにアッセイアナライトと称する) と交差反応するものである。アッセイアナライトは診断用テストの対象である。この例のこの単一のテスト領域 (すなわち単一ウェル) は、3 行の  $4 \times 4$  アレイのテスト部位 (行 A から C) および 3 列の  $4 \times 4$  アレイのテスト部位 (列 A から C) を含む。アレイ A 1、A 2、A 3、B 1、B 2、B 3 および C 1 は同一である。陽性対照およびアッセイ分子は補間的な位置に配置される。陰性対照はアレイ C 2 および C 3 のテスト部位に固定される。ウェル 4 1 の全体が、すべてのテスト部位に対する反応が同時に、かつ同じ反応領域内で生じるように、1 つのサンプルを受けるとして適合される。こうしてこの例においては、3 つの異なったテスト分子が、分析のために同じテスト領域に固定される。さらに、テスト分子ごとにテスト部位を多数繰返すことは、極めて正確な検出を行なうことを可能にする。

【0017】

上述の例はアレイ A 1、A 2、A 3、B 1、B 2、B 3 および C 3 に同じ 3 つのアッセイ分子が同一のフォーマットで配置されるのを示すが、異なったアッセイ分子が同じ反応領域におけるこれらのアレイの各々に固定されてもよいことは明らかである。たとえば、1 つのアッセイ分子 (たとえば陽性対照分子) がアレイ A 1 の 8 つの反応部位に固定される一方、第 2 のおよび異なったアッセイ分子 (たとえば陰性アッセイ分子) がアレイ B 3 の 8 つの反応部位に固定されてもよい。さらに、所望のレベルの精度をもたらすために要求される重複の数に依存して、さまざまな異なったアッセイ分子がこれらの 7 つのアレイに固定されてもよいことは明らかである。

【0018】

図 3 B は、1 つのウェルまたはチャンバに対応するテスト領域 4 8 が、4 つの四半分に囲まれる中心行および中心列を有する  $9 \times 9$  アレイを含む、この発明の別の実施の形態を示す。陰性対照 5 4 は中心列および中心行に沿って「十字 (cross)」または十字型 (cruciform) 構成に固定される一方、陽性対照 5 0 およびアッセイ分子 5 2 は 4 つの四半分内に補間的な位置で配置される。このフォーマットを使用すれば、陰性対照が期待通りに無のまたは低い信号を生じる成功した実験例においては、4 つの四半分がはっきりと解明されることは明らかである。こうして、このフォーマットには、簡単な目視検査によってさえも明らかで曖昧さのない結果をもたらす利点がある。

【0019】

以下の実施例は、この発明のさまざまな特定の実施の形態を示し、本発明を実施し使用することを当業者に教示することを意味するものである。これらの実施例は例示のみを意味

10

20

30

40

50

し、前掲の特許請求の範囲を限定することを意図しない。以下の実施例においては、テスト分子はプローブまたはマーカーとも称する。テスト領域はしばしば、グリッドと称し、テスト部位はサブグリッドと称する。

【0020】

#### 実施例 1

リガンドをテスト部位に固定する方法

マイクロアレイヤーによって微小サイズの固体基板上に予め定められたグリッドおよびサブグリッドパターンでプローブをプリントおよび固定することにより、タンパク質チップを調製した。プローブは、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの形の抗原であっても抗体であってもよく、テストサンプル中のターゲットタンパク質に結合することが可能である。マイクロ固体基板はガラス顕微鏡スライド由来物、ニトロセルロースメンブレン、またはシリカであり得る。ガラス基板の1cm×1cm面積ごとに2390個のタンパク質スポットをプリントし得る。反応において用いられたサンプルは、プラズマ、血清、血液または他の体液の形であり得る。全反応工程は固体基板上でそのままの場所で行なわれる。

10

【0021】

バイオチップの作製：

1. 適切な希釈溶液中のプローブを、ソースプレートとしても公知であるマイクロタイタープレートの個々のウェルに加える。

【0022】

2. ソースプレートをロボットマイクロアレイヤー（米国カリフォルニア州Cartesian TechnologyのProsys4510）の適切なスロットに置く。

20

【0023】

3. ソフトウェアがマイクロアレイピンを制御してソースプレートからサンプルを引出す。

【0024】

4. スライドの表面にサンプルを満たしたピンを置くことにより、顕微鏡スライド由来物上にサンプルがプリントされる。

【0025】

5. プリントされたバイオチップを37℃で1時間インキュベートしてタンパク質プローブを基板表面に固定する。

30

【0026】

6. 基板の残りの表面をTBS緩衝剤（0.02M Tris-HCl、0.137M NaCl、pH7.6）中のウシ血清アルブミン（BSA）およびTween 20によって37℃で1時間ブロックする。

【0027】

7. 二回蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させる。

【0028】

8. バイオチップを0.3%水酸化ホウ素ナトリウム（NaBH<sub>4</sub>）で37℃で5～10分間インキュベートし、ガラス表面の遊離アルデヒド基を減じる。

40

【0029】

9. 二回蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させる。

【0030】

10. 作製されたバイオチップを4℃の暗所で密封する。

【0031】

装置の組立て方法：

1. マルチチャンバプラスチック装置（仕切りシート）を作るためのプラスチック材料の外側寸法は、固体基板の外側寸法と一致するべきである。

【0032】

2. 装置ごとのチャンバの数は1×2から4×10の範囲にわたり得る。

50

## 【0033】

3. 2つの隣接するチャンバの各々の中心間の距離は、4.5 mmの倍数であり、これは384および96マイクロタイタープレートのジオメトリ、マイクロアレイのピンヘッドのピン距離およびマルチチャンネルピペットマンと一致する。

## 【0034】

4. 各チャンバの深さを決定するプラスチックの厚さは少なくとも1 mmであるべきで、1~3 mmの範囲にわたり得る。

## 【0035】

5. マルチチャンバプラスチック装置の一方は粘着性があるべきで、固体基板にしっかりと接着することができ、反応のための漏れが防止されたウェルを形成する。そのような装置は、水性溶液に浸され水圧下で用いられた場合に、耐水性があり、漏れが防止され、剛性があり、かつ不活性であるべきである。

10

## 【0036】

6. タンパク質プローブは、多数のマーカー、多数の標本の用途のためのバイオチップ作製のために、各チャンバ上にマイクロアレイ化される。

## 【0037】

7. マルチチャンバプラスチック装置の外側寸法と一致するサイズであり、片側に接着部を備えるポリエステルフィルムを、任意でマルチチャンババイオチップを覆うために用いて、ウェルで隔離され封鎖された反応のためのチャンバを形成する。

## 【0038】

8. マルチチャンババイオチップにおける完全なセットアップは-40°~95°の反応温度、UV処理に耐えることができ、耐水性がある。

20

## 【0039】

9. ポリエステルフィルムとマルチチャンバ装置のプラスチックとの間の結合は、装置と固体基板との間の結合よりも弱いべきである。各反応ステップにおけるフィルムの除去は、マルチチャンババイオチップの構造を変更してはならない。

## 【0040】

10. 反応が完了すると、従来のマイクロアレイスキャナ(Scanarray4000、Packard Bioscience(現在はPerkinElmer Life Sciences)、米国コネティカット州)で分析するために、プラスチック装置を固体基板からはずし得る。タンパク質の固体基板への固定は、物理的相互作用、たとえば帯電により(たとえば負に帯電したタンパク質が正に帯電したメンブレンまたは正に帯電した金属表面と結合する)、疎水性相互作用により(疎水性タンパク質が疎水性メンブレンと結合する)、滞留により(ある大きさのタンパク質が、メンブレンのまたはゲルタイプの基板などの多孔性基板によって妨げられる)、または化学相互作用(たとえば、エポキシスライド、シラン化スライド、シリル化スライドとの結合)により達成されてもよい。

30

## 【0041】

実施例 2

バイオチップ上に固定された交差反応抗原を用いたヒト血清中の抗体を検出する方法  
反応および検出：

40

1. バイオチップをパッケージから取出す。

## 【0042】

2. テストサンプル(患者サンプル、陽性および陰性血清対照)を別々に、バイオチップ内の個々のチャンバに加え、37°で1時間反応させる。

## 【0043】

3. 結合していない反応物をPBSまたはTBSなどのナトリウム塩を含む洗浄緩衝剤で洗浄する(PBS: 0.137 M NaCl, 0.027 M KCl, 0.0043 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0014 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3)(TBS: 0.002 M Tris-Cl, 0.137 M NaCl, pH 7.6)。

## 【0044】

50

4. 余分な緩衝剤を除去して5分間室温で乾燥させる。

【0045】

5. ブロック溶液 (TBSまたはPBS中の1%ウシ血清アルブミン) をバイオチップに加える。

【0046】

6. バイオチップを洗浄して乾燥させる。

【0047】

7. 蛍光標識した化合物 (二次抗体または抗原) をブロック溶液で希釈し、バイオチップに加えて37で0.5時間インキュベートする。

【0048】

8. 洗浄してバイオチップから仕切りシートを取り除き、遠心脱水する。

【0049】

9. 画像をマイクロアレイスキャナでスキャンする。各スポットの蛍光強度を記録し、データ分析および診断に用いる。

【0050】

別の実施の形態においては、上述のステップ7~9は、以下のステップ7a~13aに置きかえられる。

【0051】

7a. ビオチン結合二次抗体をブロック溶液で希釈し、バイオチップに加えて37で0.5時間インキュベートする。

【0052】

8a. バイオチップを洗浄して乾燥させる。

【0053】

9a. ブロック溶液中のストレプトアビジン分子を加えて37で0.5時間インキュベートする。

【0054】

10a. 洗浄して乾燥させる。

【0055】

11a. ブロック溶液で蛍光化合物 (ビオチンまたは抗ストレプトアビジン抗体) を希釈して37で0.5時間インキュベートする。

【0056】

12a. 洗浄してバイオチップから仕切りシートを取り除き、遠心脱水する。

【0057】

13a. 画像をマイクロアレイスキャナでスキャンする。各スポットの蛍光強度を記録し、データ分析および診断に用いる。

【0058】

### 実施例3

交差反応抗体を固定したチップを用いた抗原の検出方法

反応および検出:

1. バイオチップをパッケージから取出す。

【0059】

2. テストサンプル (患者血清、陽性および陰性血清対照) をバイオチップに加え、37で1時間反応させる。

【0060】

3. 結合していない反応物をPBSまたはTBSなどのナトリウム塩を含む洗浄緩衝剤で洗浄する (PBS: 0.137M NaCl、0.027M KCl、0.0043M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.0014M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.3) (TBS: 0.002M Tris-Cl、0.137M NaCl、pH7.6)。

【0061】

4. 余分な緩衝剤を除去して5分間室温で軽く乾燥させる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

5 . ブロック溶液 ( T B S または P B S 中の 1 % ウシ血清アルブミン ) をバイオチップに加える。

## 【 0 0 6 3 】

6 . バイオチップを洗浄して乾燥させる。

## 【 0 0 6 4 】

7 . ブロック溶液で希釈した 2 番目の一次抗体をバイオチップに加えて 3 7 °C で 0 . 5 時間インキュベートする。

## 【 0 0 6 5 】

8 . 洗浄し、遠心脱水して再びブロックする。

## 【 0 0 6 6 】

9 . ブロック溶液で希釈したアルカリホスファターゼ ( A P ) またはホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ヒト I g G 抗体 ( 二次抗体 ) を加えて 3 7 °C で 0 . 5 時間インキュベートする。

## 【 0 0 6 7 】

1 0 . 適切な化学ルミネセンス基板 ( I C N Biomedicals Inc ( 米国カリフォルニア州 ) の H R P のためのルミノール、または、Pierce Chemical Company ( 米国イリノイ州 ) の A P のための 1 , 2 - ジオキセタン系基板 ) を加えて室温で 1 分間インキュベートする ( 製造元のマニュアルに従う ) 。

## 【 0 0 6 8 】

1 1 . 画像をマイクロアレイスキャナでスキャンする。各スポットの化学ルミネセンス強度を記録し、データ分析および診断に用いる。

## 【 0 0 6 9 】

実施例 4 A

## ヒト血清中の肝炎の診断

この実施の形態は、タンパク質チップの作製と、肝炎ウイルス感染によって引き起こされる急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、および肝臓ガンの診断における、その適用とを含む。

## 【 0 0 7 0 】

A 型肝炎感染診断のためのマーカーは、A 型肝炎抗体 ( 抗 H A V I g G または I g M A b ) であり ; B 型肝炎については B 型肝炎表面抗原 ( H B s A g )、B 型肝炎「e」抗原 ( H B e A g )、B 型肝炎表面抗体 ( H B s A b )、B 型肝炎「e」抗体 ( H B e A b )、および肝炎コア抗体 ( H B c A b ) であり ; C 型肝炎については C 型肝炎抗体 ( 抗 H C V I g G または I g M ) であり ; D 型肝炎については D 型肝炎抗体 ( 抗 H D V I g G または I g M ) であり ; E 型肝炎については E 型肝炎抗体 ( 抗 H E V I g G または I g M ) である。 - フェトプロテイン ( A F P ) は、肝臓ガン診断のためにバイオチップに含めるマーカーである。これらのマーカーに特異に反応し得るプローブまたはテスト分子を、バイオチップ作製の間に固体基板にプリントする。

## 【 0 0 7 1 】

テスト領域の例を図 4 A、図 4 B、図 4 C、図 4 D、および図 4 E に示す。この例はデータ分析のために同じチップ ( 図 4 A ) 上の 2 つのテスト領域 5 6 および 5 8 に設けられる多数の繰返しを用いることを示す。これらのテスト領域は、このバイオチップ上にサンプル導入のために 2 つの対応する穴を備えた適切な仕切りが置かれた場合に、2 つのウェルの底としての役割を果たす。この配置の利点は、以下の図面の説明から明らかとなるであろう。各テスト分子を多く繰返すと、データ分析における信頼性を高めデータ収集の間の地理的および機械ばらつきを最小化するので、各バイオチップ実験における精度を高める。さらに、以下に示す明確なパターンは、高密度アレイにおけるスポットの識別を容易にする。

## 【 0 0 7 2 】

この実施例においては、このバイオチップ上に規定される 2 つのテスト領域またはグリッド 5 6 および 5 8 がある。グリッドまたはテスト領域 5 6 はテスト部位の 7 つのサブグリ

10

20

30

40

50

ッドまたはアレイ 5 6 a を含む。各サブグリッド 5 6 a 内に、陽性対照およびアッセイ分子がアレイ構成になるよう多数繰返されて固定される。点線 5 6 b は陰性対照が規定される多数のテスト部位の位置を表す。

【 0 0 7 3 】

図 4 B を参照して、テスト領域またはグリッド 5 6 がより詳細に示される。点線 6 2 は陰性対照を表すが、これは各サブグリッドの境界を描く行および列をわたって多数繰返してスポットされるのが見出される。各サブグリッドにおいて、陽性対照 6 0 およびテスト分子（肝炎抗原の 1 つ）が固定される。各サブグリッドに固定されるテスト分子は異なった肝炎ウイルス抗原である。

【 0 0 7 4 】

たとえば、アレイ A 1 には、ヒト I g G を陽性対照 6 0 とした、4 × 4 配置の 1 6 個のテスト部位があり；テスト分子 A 型肝炎抗原（H A V A g）6 4 が補間的に配置されて固定される。他の 6 個のアレイ（A 2 - A 7）が示されるが、固定されるテスト分子のみが異なる（H A V 抗原 6 4、H C V 抗原 6 6、H D V 抗原 6 8、H B s 抗原 7 0、H B e A g 7 2、H B 抗原 7 4、および H E V 抗原 7 6 が、それぞれサブグリッド A 1 ~ A 7 に固定される）。

【 0 0 7 5 】

図 4 C に示されるテスト領域 5 8 を参照すると、この領域のテスト部位配置はテスト領域 5 6 とは異なる。テスト領域 5 8 においては、陰性対照は図 4 A の線 5 8 a に沿ってテスト領域の中心を横切る十字形構成に配置される多数のテスト部位に固定される。陰性対照テスト部位の十字形構成は、テスト領域を 4 つの四半分に分割する。4 つの他のアレイまたはサブグリッド（B 1 ~ B 4）がその周りに設けられる。図 4 C に示すアレイ B 1 内には、陽性対照 B 型肝炎表面抗原 6 0 a およびテスト分子抗 B 型肝炎表面抗原抗体（H B s A b）7 8 は補間的関係で別々の離散した 1 6 個のテスト部位に固定される。他の 3 つの四半分（B 2 ~ B 4）はそれぞれ、陽性対照 B 型肝炎 B e A g 6 0 b および抗 B 型肝炎「e」抗体 8 0 と、陽性対照 A F P 6 0 c および抗 A F P 抗体 8 2 と、陽性対照 D 型肝炎ウイルス抗原 6 0 d および抗 D 型肝炎ウイルス抗体 8 4 とを含む。

【 0 0 7 6 】

結合反応のための方法

表 1 は、バイオチップ上のテスト分子ごとのスポット条件を示す。第 2 欄は、スポットのために用いられたタンパク質溶液の濃度を示し、第 3 欄は各スポットの推定サイズを示す。各テスト部位に実際に固定されたタンパク質の量は、各反応部位に半球状スポットが与えられたと仮定して推定される。全スポットを乾燥させて、ほとんどのタンパク質がテスト部位の表面に固定されたと考えられる。

【 0 0 7 7 】

【表 1】

10

20

30

表 1

スポット	スポット濃度	スポットサイズ	結合反応に要する時間
HBsAG	0.4mg/ml	160um	60-90分
HBsAb	2mg/ml	160um	60-90分
HBeAg	0.8mg/ml	160um	60-90分
HBeAb	2mg/ml	160um	60-90分
HBcAb	0.15mg/ml	160um	60-90分
HAV IgG	0.8mg/ml	160um	60-90分
HCV IgG	0.1mg/ml	180um	60-90分
HDV IgG	0.125mg/ml	160um	60-90分
HEV IgG	0.8mg/ml	150um	60-90分

10

20

30

40

50

## 【0078】

結合反応中に、患者の血清をそれぞれ実施例 2 および実施例 3 に説明した方法と同様の方法を用いてチャンバ 5 6 および 5 8 に加えた。この実施例においては、バイオチップには 2 つのテスト領域しか示されず、一方は肝炎抗体をテストするものであり、他方は血清中の肝炎抗原の存在をテストするものであるから、1 つのテスト血清だけをテストできる。陽性および陰性対照血清などの他のテスト血清を、2 つの別々で同様のバイオチップに与えて陰性および陽性結果を得ることができる。反応が完了した後で、チップをスキャンして各スポットからの蛍光信号強度を記録する。

## 【0079】

## 実施例 4 B

多数のウェルを用いたヒト血清中の肝炎の診断

この実施例は、どのように実施例 4 A に説明したシステムを多数のウェルを含むバイオチップの使用に適合して、同じバイオチップでテストされ得るサンプルの数を増大させるかを示す。この実施例においては、図 1 A に示すもののような 3 行および 8 列のアレイが患者の肝炎の診断に用いられる。説明を容易にするために、テスト領域の行を上から下に向かって行 A、B、C と称し、テスト領域の列をそれぞれ行 1 ~ 8 と称する。この実施例においては、バイオチップの列 1 ~ 4 内の 1 2 個のテスト領域は、図 4 B のテスト領域 5 6 に示すものと同一のテスト部位を含む。列 5 ~ 8 内の 1 2 個のテスト領域は各々が図 4 C のテスト領域 5 8 に見出されるものと同一のテスト部位のアレイを含む。この配置を用いて、血清中の肝炎抗原の診断のために、合計 1 2 個のテスト領域（すなわちウェル）があることが明らかにわかる。この実施例においては、既知の肝炎感染の患者から得られた陽性対照血清がテスト領域 A 1 に加えられる。肝炎に感染していない健康な個人から得た陰性対照血清がウェル B 1 において診断的反応のために用いられる。残りの 1 0 個のウェル（ウェル A 2 ~ A 4、B 2 ~ B 4、および C 1 ~ C 4）は肝炎抗原の存在が未知である患者の血清をテストするために用い得る。同様の態様で、陽性対照血清をウェル A 5 で用いて肝炎抗体に対する陽性対照を提供する一方、陰性対照血清をウェル B 5 に加え得る。残りのウェル（A 6 ~ A 8、B 6 ~ B 8、および C 5 ~ C 8）は、未知の血清をテストするために用い得る。用いられる結合反応と検出システムは、実施例 4 A で説明したものと同様である。

## 【0080】

結果分析の方法

R 値 = 95% ガウス分布内に入るテストプローブの信号強度の平均値を、同じサブグリッド内の陽性対照プローブのもので除算したものを。

【0081】

テストチャンバにおけるテストサンプルからの R 値は  $R_s$  である。

【0082】

陽性参照チャンバにおける陽性対照サンプルからの R 値は  $R_p$  である。

【0083】

陰性参照チャンバにおける陰性対照サンプルからの R 値は  $R_n$  である。

【0084】

$R_{co} = 1/2 (R_n + R_p)$  である。

【0085】

データを解釈する3つのアプローチがある。

【0086】

a. 方法 I :  $R_s$  が 0.05 よりも大きい個々のサンプルがテストプローブに対して陽性であると規定される ; 0.02 と 0.05 との間の  $R_s$  はボーダーラインであり、テストを繰返すべきである ; 0.02 よりも小さなものは陰性である。

【0087】

b. 方法 II :  $R_s / R_n$  が 2.1 よりも大きい個々のサンプルが陽性であると規定され、1.5 と 2.1 との間の  $R_s / R_n$  はボーダーラインであり ; 1.5 よりも小さな  $R_s / R_n$  は陰性である。

【0088】

c. 方法 III :  $R_{co}$  よりも大きい  $R_s$  の個々のテストサンプルが陽性であり ;  $R_{co}$  よりも小さなものが陰性である。

【0089】

この発明は、チャンバ内の、および同じチップにわたるチャンバ間のデータ比較を容易にする。マイクロアレイおよびデータ操作方法においてこの設計を用いることにより、信号強度に影響を与える恐れのある地理的ばらつきは最小化される。

【0090】

上述の方法を採用して、中国国家薬品监督管理局 (S D A) から肝炎標準血清を得て、本件に従った方法および装置の精度および感度を調べるためにテスト血清として用いた。

【0091】

中国における診断キットの精度および精密度を確実にするために、S D A は感度および特異度の標準を設定している。感度テストは、診断キットの最も弱い反応範囲を設定する。この発明に従った方法は、100%の精度で感度テストに合格した。表2の第2欄は、中国国家薬品监督管理局から、臨床用途で中国で登録されているすべての診断キットの感度を調べるために用いなければならない参照サンプルとして提供されたサンプルを示す。H b s A g および H b s A b については、1 n g / m l および 1 0 m I U / m l の参照標準をそれぞれ用いた。

【0092】

【表2】

10

20

30

40

表2: SDA 感度標準を用いた感度テスト

肝炎 マーカー	SDA 感度参照 <sup>1</sup>	バイオチップ <sup>2</sup> 診断の結果 (蛍光強度)		
		方法 I	方法 II	方法 III
HbsAg <sup>2</sup>	≤1ng/ml	0.09	2.2	+
HbsAb <sup>3</sup>	≤10mIU/ml	0.12	2.4	+
HbeAg <sup>4</sup>	1# ≥ 1:64	0.10	2.4	+
	2# ≥ 1:128	0.07	2.2	+
	3# ≥ 1:32	0.10	2.3	+
HbeAb <sup>5</sup>	55# ≥ 1:32	0.08	2.2	+
	57# ≥ 1:32	0.07	2.1	+
	61# ≥ 1:32	0.07	2.2	+
HbcAb <sup>6</sup>	2# ≥ 1:32	0.08	2.2	+
	3# ≥ 1:8	0.11	2.4	+
	4# ≥ 1:16	0.09	2.2	+

['+'はテスト陽性, '-'はテスト陰性]

【0093】

1. SDA 標準パネルキットロット番号9909

2. HbsAg (B型肝炎表面抗原); 3. HbsAb (B型肝炎表面抗原に対する抗体); 4. HbeAg (B型肝炎「e」抗原); 5. HbeAb (B型肝炎「e」抗原に対する抗体); 6. HbcAb (B型肝炎コア抗原に対する抗体)。

【0094】

【表3】

10

20

30

表3: SDA標準を用いた特異度テスト

マーカー	SDA特異度参照 (本方法により決定 した陰性の数/対 分析された全陰性 標準) <sup>1</sup>	バイオチップ診断の結果		
		方法 I	方法 II	方法 III
HbsAg <sup>2</sup>	20/20	0-0.018	0-1.38	-
HbsAb <sup>3</sup>	20/20	0-0.019	0-1.49	-
HbeAg <sup>4</sup>	15/15	0-0.016	0-1.46	-
HbeAb <sup>5</sup>	15/15	0-0.016	0-1.46	-
HbcAb <sup>6</sup>	15/15	0-0.016	0-1.48	-

脚注: ['+'はテスト陽性; '-'はテスト陰性]

10

20

【0095】

1. SDA標準パネルキットロット番号9909
2. HbsAg (B型肝炎表面抗原); 3. HbsAb (B型肝炎表面抗原に対する抗体); 4. HbeAg (B型肝炎「e」抗原); 5. HbeAb (B型肝炎「e」抗原に対する抗体); 6. HbcAb (B型肝炎コア抗原に対する抗体)。

【0096】

上述のこれらの3つの方法を用いた結果をその次の3つの欄に示す。HbeAg、HbeAbおよびHbcAbについては、3つの別々の未知のサンプルがSDAにより提供され、第2欄に示すように血清を希釈するためにさまざまな希釈剤を用いた (HbeAgについてはサンプル番号1、2および3; HbeAbについては番号55、57および61; HbcAbについては番号2、3および4)。結合反応後の蛍光強度検出の結果を、次の対応の欄に示す。

30

【0097】

表3は、SDAによって要求される特異度テストの結果を示す。これらのテストにおいて、第1欄に示すように、それぞれの抗原または抗体をテストするためにSDAにより陰性血清が提供された。結果をその次のいくつかの欄に示す。第2欄において、分数の分母はSDAによって提供されたサンプルの数を示し、比の分子は陰性と判定されたサンプルの数を示す。SDA要件に従うと、偽陽性は許容できない。

【0098】

こうして、この発明に従った方法を用いると、特異度は極めて高く、さまざまな非特異性抗原または抗体を備えた患者の血清の間に交差反応はほとんどない。

40

【0099】

図4Dは、HAV感染患者の期待される結果の例である。陽性信号は、テスト領域56のみのテスト部位64および両方のテスト領域56および58のすべての陽性対照で記録される。そのような結果は、テスト血清抗体が他のテスト分子ではなくHAV Agに対して向けられ、テストの特異度が良好であることを示すであろう。

【0100】

図4Eは、HBV感染患者の期待される結果の例である。陽性信号がテスト領域56のテスト部位74およびテスト領域58のテスト部位78および80において; かつテスト領

50

域 5 6 およびテスト領域 5 8 のすべての陽性対照において期待される。

【 0 1 0 1 】

#### 実施例 5

##### 妊娠患者の出産前テスト

この実施の形態は、出産前テスト目的での妊婦の血清をテストするために用いるべきバイオチップを説明する。集合的に T o R C H として公知であるトキソプラズマ、風疹ウイルス、サイトメガロウイルス ( C M V )、ならびに I 型および I I 型単純ヘルペスウイルスについて、これらの疾病の罹患率が高い妊婦の検診が定期的に行なわれる。疾病は妊娠中または出産時に胎児に伝染し、新生児に重篤な障害をもたらす。これらの合併症のために、妊婦および妊娠可能年齢の女性の免疫状態を評価することは重要である。5 つの T o R C H マーカーについて特異的である抗原に対応するプローブならびに陽性および陰性対照が、上述のようにマルチチャンパチップの上にプリントされる。バイオチップは、それぞれのチャンパに蛍光標識した抗ヒト I g G 抗体または蛍光標識した抗ヒト I g M 抗体のいずれかを加えることにより、近接するチャンパにおいて I g G および I g M を同時に検出することを可能にする。T o R C H 診断における I g M の検出は、疾病の早期診断を可能にするが、なぜならば I g M は感染の直後に生成する抗体である一方、I g G はより長いラグタイムの後で生成されるからである。しかしながら I g G 標識は、感染症が治癒した後でさえもより長い期間に渡って高く留まる。よって、患者の血清中の高いレベルの I g M と低いレベルの I g G との組合せは、進行中の急性感染症を示す。

10

【 0 1 0 2 】

方法：

1 . トキソプラズマから分離された抗原に対応するプローブ 8 6、風疹ウイルス 8 8、サイトメガロウイルス ( C M V ) 9 0 ならびに単純ヘルペスウイルス I 型 9 2 および I I 型 9 4、ヒト I g G 陽性対照 9 6 およびヒト血清アルブミン ( H S A ) 陰性対照 9 8 を、3 × 3 アレイにまたは図 5 A に示すように配置されるテスト部位に繰返しプリントする。これらの異なったサブグリッドを、適切な仕切りを上に装着した場合に単一のウェルに見出される同じテスト領域 1 0 0 内に規定する。好ましい実施の形態においては、この実施例のバイオチップは図 5 A に示すものと同一である 8 個のテスト領域を含む。2 つのテストされた領域を陽性血清でのインキュベーションに用いる一方、他の 2 つを陰性対照血清のために用いる。すると、患者の血清をさらに 2 つ、このバイオチップで重複してテストし得る。

20

30

【 0 1 0 3 】

2 . 実施例 2 に記載の通り、固定、乾燥、ブロック、反応、洗浄を行なう。

【 0 1 0 4 】

3 . 血清中の T o R C H I g G を検出するために、蛍光標識した抗ヒト I g G 抗体を、上述のように血清でインキュベートしたウェルの 1 つに用いる。

【 0 1 0 5 】

4 . T o R C H I g M を検出するために、蛍光標識した抗ヒト I g M 抗体をそれぞれの血清で以前にインキュベートしておいた重複ウェルに加える。

【 0 1 0 6 】

5 . 図 5 B は風疹ウイルス感染患者からの血清を用いたアッセイの実験結果を示す。陽性信号はテスト分子 8 8 および陽性対照 9 6 において検出可能であった。

40

【 0 1 0 7 】

6 . 図 5 C は C M V 感染患者の血清を用いたアッセイの実験結果を示す。陽性信号はテスト分子 9 0 および陽性対照 9 6 において検出可能であった。

【 0 1 0 8 】

#### 実施例 6

汎用増幅システムとしてのストレプトアビジン / ビオチンシステムの使用

この実施の形態は、タンパク質チップ分析における増強された報告システムとして蛍光 / 酵素標識したストレプトアビジンおよびビオチン方法 ( F L S A B / E L S A B ) を用い

50

る。現在のタンパク質チップ技術においては、蛍光または酵素結合抗体が報告システムにおいて一般に用いられる。この実施の形態はこの報告システムに信号増幅ステップを導入する。この増幅システムを用いると、タンパク質チップの感度は10倍に増大する。従って、プリントにより少ない量のプローブを用い得る。これにより、バックグラウンドが低減され、信号対ノイズ比は向上し、偽陽性結果の可能性は最小化される。これは酸性タンパク質への蛍光染色標識における困難なステップを省略することをも容易にする。

【0109】

タンパク質チップの作製：

1．アルデヒドスライド、ニトロセルロースまたはナイロンメンブレンなどの固体基板上にタンパク質プローブをアレイする。

10

【0110】

2．スライド上のタンパク質プローブを室温で一晩、または37℃で1時間乾燥させて固定する。

【0111】

3．ウシ血清アルブミン(BSA)およびTween 20を含む緩衝剤で基板表面を37℃で1時間ブロックする。

【0112】

4．二回蒸留水で洗浄し、乾燥させて室温で保存する。

【0113】

方法：

20

1．標本サンプルをタンパク質チップの各チャンバに加えて37℃で1時間インキュベートする。

【0114】

2．余分な標本を洗浄緩衝剤で洗浄して、遠心脱水する。

【0115】

3．上述のようにチップをブロック緩衝剤でブロックして洗浄緩衝剤で洗浄する。

【0116】

4．洗浄して遠心脱水する。

【0117】

5．ターゲットマーカーに特異的に結合するビオチン結合生体分子をブロック緩衝剤で希釈して各チャンバに加え、37℃で30分間インキュベートする。

30

【0118】

6．洗浄して遠心脱水する。

【0119】

7．ストレプトアビジンをブロック緩衝剤で希釈してチップに加え、37℃で30分間インキュベートする。

【0120】

8．洗浄して遠心脱水する。

【0121】

9．ブロック緩衝剤で希釈した酵素アルカリペルオキシダーゼ(AP)またはホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、または蛍光結合ビオチンをチップに加えて暗所で37℃で30分間インキュベートする。

40

【0122】

10．もし(9)で酵素結合ビオチンを用いるのであれば、適切な化学ルミネセンス基板である、Pierce Chemical Company(米国イリノイ州)のHRPのためのルミノール、または、ICN Biomedicals Inc(米国カリフォルニア州)の1,2-ジオキセタン系基板を加えて室温で1分間インキュベートする(製造元のマニュアルに従う)。完了した後で、チップを洗浄して仕切りシートを取り除き、チップを遠心脱水してマイクロアレイスキャナでスキャンする。

【0123】

50

実施例 7

## ガン診断のための方法および装置

この実施の形態は、ガンのための高いスループットおよび高感度の診断方法およびバイオチップを説明する。このチップは、ガンの早期診断を可能にすると同時に、ガンのタイプおよびサブタイプを判断する。プローブは、組織特異腫瘍マーカーに対応する抗体であり；陽性対照は対応の腫瘍マーカーである。ヒト血清アルブミンは陰性対照である。

## 【0124】

ガンチップは、臓器/組織タイプに従ってカテゴリ化される。ガンチップの各タイプは、組織特異腫瘍マーカーに反応する抗体のパネルからなる。各抗体パネル内の発現プロファイルはガンをさらにサブタイプに分類することを可能にする。たとえば、 $\alpha$ -GTI'、 $\alpha$ II、 $\alpha$ II' は肝臓ガンにしか見出されず；コンカナバリンA反応 $\alpha$ -フェトプロテイン (R Con A AFP) は主に原発性肝臓ガンの血清サンプルに見出される一方、続発性肝臓ガン、性腺および性腺外胚細胞腫瘍においては顕著にR Con A AFPが低減し無反応型が増大した。従って、ガンバイオチップにおいて腫瘍マーカーのパネルを用いるとガンの診断ならびに、タイプおよびサブタイプの分類が容易になる。

10

## 【0125】

図6Aは、16アレイ(A1~D4)のガンチップにおける1つのテスト領域を示す。各アレイは、同じテスト分子が固定された9個の離散したテスト部位を含む。アレイA1はテスト分子抗 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)抗体をプリントされ；A2は抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼ( $\alpha$ -GT)アイソザイムI抗体をプリントされ；A3は抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼ( $\alpha$ -GT)アイソザイムI'抗体をプリントされ；A4は抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼ( $\alpha$ -GT)アイソザイムII抗体をプリントされ；B1は抗 $\alpha$ -グルタミルトランスフェラーゼ( $\alpha$ -GT)アイソザイムII'抗体をプリントされ；B2は抗des-カルボキシプロトンピン(DPC)抗体をプリントされ；B3は抗 $\alpha$ -L-フコシダーゼ抗体をプリントされ；B4は抗5'ヌクレオチドホスホジエステラーゼアイソザイムV抗体をプリントし；C1は抗グルタチオンS-トランスフェラーゼ胎盤型抗体をプリントし；C2は抗 $\alpha$ -1-抗トリプシン抗体をプリントし；C3は抗フェリチン抗体をプリントし；C4は抗酸性イソフェリチン(AIF)抗体をプリントし；D1は抗B型肝炎表面抗原抗体をプリントし；D2およびD3は13種の腫瘍マーカーおよびヒトIgGに対応する陽性対照をプリントし；D4は陰性対照をプリントする。

20

30

## 【0126】

図6Bは肝臓ガン患者から得られる診断結果の種類を示し、たとえば、アレイA1、A3、A4、A5およびD1ならびに陽性対照D2およびD3において陽性信号が検出される。

## 【0127】

実施例 9

## 自己免疫疾患の診断

自己免疫疾患は、患者の血清中に循環する高レベルのIgMおよびIgG自己抗体の存在によって特徴付けられる。自己免疫疾患には2つのカテゴリがある：単器官または細胞タイプ、および全身性タイプである。前者の例は、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)、すなわちIgG自己抗体およびIgM抗体が高まり、体が自身の赤血球(RBC)を攻撃するもの；重症筋無力症、すなわちアセチルコリン受容体に対する自己抗体が高まり、患者が重篤な筋肉の弱さを被るもの；および橋本甲状腺炎、すなわち抗チログロブリン抗体および抗マイクロゾーム抗体が高まるもの、である。後者の例は、全身性エリテマトーデス(SLE)、すなわち抗核リボヌクレオタンパク質抗体(抗-dsDNAおよび抗SM)が検出されるもの；およびリウマチ様関節炎、すなわちリウマチ因子が検出されるもの、である。

40

## 【0128】

方法：

50

1. 自己免疫タンパク質チップは患者の血清中の自己抗体を検出すべきものである。自己免疫疾患マーカーの抗原に対応するプローブを製作のためにマルチチャンバチップにプリントする。マーカーは抗核リボヌクレオタンパク質抗体、リウマチ因子、抗アセチルコリン受容体抗体、抗赤血球抗体、抗チログロブリン抗体および抗マイクロゾーム抗体である。

【0129】

図7Aに、自己免疫診断タンパク質チップの設計の例を示す。同じテスト領域（組立てられた装置の1つのウェルまたはチャンバを代表する）内に、9個の離散したアレイ（A1～C3）を規定する。各アレイには、他のアレイとは互いに異なる1つのタイプの分子を固定する。同じアレイ内で、16個のテスト部位（4×4）は同一のテスト分子を含む。A1は二本鎖DNA分子をプリントし；A2はSMITH抗原をプリントし；A3はアセチルコリン受容体をプリントし；B1はチログロブリンをプリントし；B2はマイクロゾーム抗原をプリントし；B3は異常IgGをプリントし；C1はヒトIgG陽性対照をプリントし；C2は陰性対照をプリントし；C3は赤血球をプリントする。SMITHはDNAを正しい形状に保つ助けをする、RNAおよび非ヒストン核タンパク質の複合体であり；細胞の溶解時にDNAとともに血流中に放出されるものであって、SLEのマーカーである。

10

【0130】

2. 自己免疫タンパク質チップは、間接的な免疫に基づくアッセイである。患者の血清を個々のチャンバに加える。上述の実施例8に記載のように、IgMの検出と比較してIgGを検出するために、各血清を重複チャンバに加え得る。血清中の自己抗体は定常期プローブと反応する。洗浄後に、蛍光標識した抗ヒトIgG抗体をチャンバに加えて交差反応IgGを検出する。

20

【0131】

3. 交差反応二価または多価IgMを検出するために、二重抗原サンドイッチ法をも自己免疫タンパク質チップに適用し得る。血清との反応後に、蛍光標識抗原を反応チャンバに加えて検出する。

【0132】

4. 反応が完了した後で、バイオチップをマイクロアレイスキャナでスキャンする。

【0133】

図7Bに全身性エリテマトーデス患者の診断結果の例を示す。陽性信号がテスト部位A1およびA2、ならびに陽性対照部位C1に現れるであろう。

30

【0134】

図7Cにリウマチ様関節炎患者の診断結果の例を示す。陽性信号がテスト部位B3および陽性対照部位C1に現れるであろう。

【0135】

上述の特定の実施の形態についての詳細な説明は、例示および説明の目的で提供された。提供される教示に鑑みて多くの変形例および展開例が可能であるので、これは排他的であること、または開示される厳密な形に発明を限定することを意図しない。たとえば、図4Aから図4Cに示す配置は例示のためのものであって、同じバイオチップにより小さなテスト領域を規定し得ることは明らかである。展開例として、テスト領域56および58と同様のものを3つ同じチップに設けて、テスト血清ならびに陽性および陰性血清を同じバイオチップでテストできるようにしてもよい。さらに、対応する数の穴を備えた好適な仕切りとともにさらなるテスト領域をもバイオチップに規定して、多数の患者のサンプルを同じバイオチップ上でテストできるようにしてもよい。

40

【0136】

さらなる例として、患者の抗体プロファイルを分析することによる急性感染症の診断のために抗ヒトIgMおよび抗ヒトIgG抗体を用いることを、実施例5に開示されるものに加えて多くの疾病に適用し得る。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 1 3 7 】

【 図 1 A 】 この発明の 1 つの実施の形態に従った、固体基板の頂部図である。

【 図 1 B 】 同じ実施の形態に従った、図 1 A に示す基板と相補な仕切りシートの頂部図である。

【 図 1 C 】 図 1 B に示す頂部仕切りシートが図 1 A に示す基板に装着された、この発明に従った装置の頂部平面図である。

【 図 1 D 】 図 1 C の線 A - A に沿った断面図である。

【 図 1 E 】 図 1 C に示す装置をカバーするための、同じ実施の形態に従ったカバーシートの図である。

【 図 2 A 】 この発明の第 2 の実施の形態に従った、基板の頂部図である。テスト部位の位置を点線円で示す。 10

【 図 2 B 】 同じ実施の形態に従った、図 2 A に示す基板と相補な仕切りシートの頂部図である。

【 図 2 C 】 固体基板の頂部表面に仕切りシートが装着された、この発明の第 2 の実施の形態に従った組み立てられた装置の頂部図である。やはり、テスト部位の位置を点線円で示す。

【 図 2 D 】 図 2 C の線 B - B に沿った断面図である。

【 図 3 A 】 この発明の第 3 の実施の形態に従ったテスト領域を示す図である。

【 図 3 B 】 この発明の第 4 の実施の形態に従ったテスト領域を示す図である。

【 図 4 A 】 1 つの好ましい実施の形態に従った肝炎バイオチップの頂部図である。 20

【 図 4 B 】 同じ好ましい実施の形態の、さまざまな肝炎抗体を検出するための肝炎タンパク質チップにおけるテスト領域の図である。60：ヒト Ig G 陽性対照；62：ヒト血清アルブミン ( H S A ) 陰性対照；64：H A V A g；66：H C V A g；68：H D V A g；70：H B s A g；72：H B e A g；74：H B c A g；76：H E V A g。

【 図 4 C 】 同じ好ましい実施の形態の、さまざまな肝炎抗体を検出するための肝炎タンパク質チップにおけるテスト領域の図である。60 a：H B s A g 陽性対照；60 b：H B e A g 陽性対照；60 c：A F P 陽性対照；60 d：H D V A g 陽性対照；62：陰性対照；78：H B s A b；80：H B e A b；82：A F P A b；84：H D V A b。 30

【 図 4 D 】 図 4 A から図 4 C に示すチップを用いた血清中に存在する抗 H A V - I g G の H A V 感染患者の診断の期待される結果の例を示す図である。チップの 2 つの領域を示す。

【 図 4 E 】 図 4 A から図 4 C に示すチップを用いた H B s A g、H B e A g、H B c A b を含む血清での H B V 感染患者の診断の期待される結果の例を示す図である。チップの 2 つの領域を示す。

【 図 5 A 】 この発明のさらなる好ましい実施の形態に従った T o R C H タンパク質チップのテスト領域を示す図である。86：トキソプラズマ；88：風疹ウイルス；90：C M V；92：H S V 1；94：H S V 2；96：陽性対照；98：陰性対照。

【 図 5 B 】 T o R C H タンパク質チップを用いた、風疹ウイルス感染患者の診断における図 5 A の期待される結果の例を示す図である ( 図示をわかりやすくするために、1 つのテスト領域またはウェルのみを示す；R V I g G を含む患者血清を用いてテストを行なった )。 40

【 図 5 C 】 C M V 感染患者の診断における図 5 B の結果の例を示す図である ( 図示をわかりやすくするために、1 つのテスト領域またはウェルのみを示す；C M V I g M を含む患者血清を用いてテストを行なった )。

【 図 6 A 】 この発明のさらに別に実施の形態に従った、ガンタンパク質チップのテスト領域を示す図である。

【 図 6 B 】 患者の血清を用いた肝臓ガン患者の診断における図 6 A の期待される結果の例を示す図である。 50

【図 7 A】自己免疫疾患タンパク質チップのテスト領域を示す図である。

【図 7 B】自己免疫疾患タンパク質チップを用いた全身性エリテマトーデスの診断における図 7 A の期待される結果の例を示す図である（図示をわかりやすくするために、1 つのテスト領域のみを示す）。

【図 7 C】自己免疫疾患タンパク質チップを用いたリウマチ様関節炎の患者の診断における図 7 A の期待される結果の例を示す図である。（図示をわかりやすくするために、1 つのテスト領域のみを示す）。

## 【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  
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/077152 A1(51) International Patent Classification: C12M 1/20,  
G01N 33/50, 33/53, C12Q 1/70, 1/68Shanghai 200233 (CN). **DING, Li** [CN/CN]; 6/F, Building  
25, No.69, Guaijing Road, Shanghai 200233 (CN). **LI,  
Hongmei** [CN/CN]; 6/F, Building 25, No.69, Guaijing  
Road, Shanghai 200233 (CN). **CAI, Qifeng** [CN/CN];  
6/F, Building 25, No.69, Guaijing Road, Shanghai 200233  
(CN). **CHEN, Ying** [CN/CN]; 6/F, Building 25, No.69,  
Guaijing Road, Shanghai 200233 (CN).

(21) International Application Number: PCT/CN02/00209

(22) International Filing Date: 28 March 2002 (28.03.2002)

(25) Filing Language: English

(74) Agent: **BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROP-  
ERTY AGENT LTD.**, No.40 North Sanhaanzhonglu  
Road, Beijing 100088 (CN).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

01105795.5 28 March 2001 (28.03.2001) CN  
01112783.X 27 April 2001 (27.04.2001) CN  
01113323.6 11 July 2001 (11.07.2001) CN  
01126115.3 12 July 2001 (12.07.2001) CN  
01126480.2 14 August 2001 (14.08.2001) CN  
01126929.4 29 September 2001 (29.09.2001) CN  
01126932.4 29 September 2001 (29.09.2001) CN  
01132292.6 23 November 2001 (23.11.2001) CN(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IT, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US):  
**GENETECH BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI)  
COMPANY LIMITED** [CN/CN]; 6/F, Building 25,  
No.69, Guaijing Road, Shanghai 200233 (CN).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **CHEUNG, To**  
[CN/CN]; Flat D, 30/F., Tower 6, Island Resort, 28 Siu  
Sai Wan Road, Hong Kong (CN). **LI, Bin** [CN/CN]; 6/F,  
Building 25, No.69, Guaijing Road, Shanghai 200233  
(CN). **PENG, Yongji** [CN/CN]; 6/F, Building 25, No.69,  
Guaijing Road, Shanghai 200233 (CN). **REN, Yiping**  
[CN/CN]; 6/F, Building 25, No.69, Guaijing Road, Shang-  
hai 200233 (CN). **GE, Haipeng** [CN/CN]; 6/F, Building  
25, No.69, Guaijing Road, Shanghai 200233 (CN). **DENG,  
Fuqiao** [CN/CN]; 6/F, Building 25, No.69, Guaijing Road,Declaration under Rule 4.17:  
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US onlyPublished:  
— with international search reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/077152 A1

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTION OF MULTIPLE ANALYTES

(57) Abstract: A device is provided for the detection of multiple analytes in at least one sample. The device contains a solid substrate with a test surface. On the test surface is defined at least one reaction area containing at least one array of discrete test sites. Each of these test sites have a test molecule immobilized on to it, and different test sites may have different test molecules immobilized thereon. A divider is provided for attachment onto the solid substrate. The divider contains a plurality of holes provided on an attachment surface. The attachment surface is complementary to the test surface of the solid device and is adapted for reversible attachment thereto such that when the two parts are attached, each of the holes is adjoined with a portion of the test surface to create a plurality of leak-proof chambers. The test surface within the chamber contains a plurality of test sites exposed within the chambers. Each of the chamber is preferably provided with an opening that is accessible from the exterior such that fluid introduced into the chambers may be contacted with the exposed test sites for testing. In another aspect of the present invention, a method is provided for analysing multiple analytes in the same samples.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

**DEVICE AND METHOD FOR DETECTION OF  
MULTIPLE ANALYTES**

**FIELD OF INVENTION**

5           The present invention relates to a device and method for detecting and/or  
quantifying more than one analyte in a sample.

**BACKGROUND OF INVENTION**

10           Diagnostic testing device and method for detecting various diseases and human  
conditions have been described in many literature and patent documents. With the advances  
of medical treatment and diagnostics, it has become increasingly important to monitor the  
state of health of a person for early diagnosis of disease conditions. The ability to test for  
different analytes in the same sample is a goal that many have been pursuing. Ideally, a  
method for analysing a single sample using a single test device should provide diagnostic  
15           information for multiple analytes in order to conserve reagents and human resources  
required.

          US Patent No. 6126899 to Woudenberg et al. is directed to a method and device for  
simultaneously testing a sample for the presence or absence of one or more sample analytes.  
The device is described as having a substrate that defines a sample – distribution network  
20           having a series of chambers with each chamber having a specific reagent effective to react  
with an analyte. Although, multiple analytes may be analysed using the aforementioned  
system, the device contains numerous chambers and grooves that would require a solid  
substrate to be manufactured specifically for this purpose.

          European Patent Application No. EP0874242 to Fitzgerald et. al. describes a solid  
25           state device for performing multi-analyte assays in which a substrate and a multiplicity of  
discrete reaction sites are covalently bonded with a ligand. This application discloses a  
device with various channels and chambers for accommodating samples to be analysed.  
The invention further provides an integrated analytical system for the simultaneous  
detection of different analytes in a multi-analyte format.

30           Although, the above-described systems are capable of analysing multiple analytes  
from a sample, there is a continual need to provide improved systems that have reduce costs

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

for manufacturing the device and for testing the samples. There is also a need to reduce sample and reagent volume. It is therefore an object of the present invention to provide improved diagnostic systems for multiple analytes.

## 5 SUMMARY OF INVENTION

According to one aspect of the present invention, a device is provide for the detection of multiple analytes in at least one sample. The device contains a solid substrate with a test surface. On the test surface is defined at least one reaction area containing at least one array of discrete test sites. Each of these test sites have a test molecule  
10 immobilized on to it, and different test sites may have different test molecules immobilized thereon. A divider is provided for attachment onto the solid substrate. The divider contains a plurality of holes provided on an attachment surface. The attachment surface is complementary to the test surface of the solid device and is adapted for reversible attachment thereto such that when the two parts are assembled, each of the holes is adjoined  
15 with a portion of the test surface to create a plurality of leak-proof chambers. The test surface within the chamber contains a plurality of test sites exposed within the chambers. Each of the chamber is preferably provided with an opening that is accessible from the exterior such that fluid introduced into the chambers may be contacted with the exposed test sites for testing.

20 In the preferred embodiment, the chamber is a well that is created with the test surface of the solid substrate acting as a base and part of the divider acting as the retaining wall such that a plurality of test sites are expose on bottom of the well within the chamber.

In another aspect of the present invention, the test molecules consist of at least one ligand and at least one antibody. The ligand is immobilized onto one test site and the  
25 antibody immobilized onto a different test site within the same chamber, such that the binding reaction of the corresponding cross-reactive analytes in the same sample is achieved simultaneously within the same reaction area.

In the preferred embodiment of the present detection device, the solid substrate is a chip with a flat top surface having a plurality of reaction areas defined thereon. Each test  
30 area contains at least one array of discrete test sites having a test molecule immobilized thereon. The divider is a sheet having holes defined by a frame with each hole corresponding to a reaction area. The frame of the sheet is adapted for reversible coupling onto the flat surface of the chip such that a leak-proof well is created therebetween. The

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

coupling may be done by any conventional means, including mechanical means such as, but not limited to, clips and screws, and chemical means such as glue and adhesives. Within each well, one reaction area of the top surface of the chip forms the base of the well and the corresponding parts of the frame of the sheet forms the dividing walls between the wells.

5 The sheet is detachable such that after sample reaction, the sheet may be removed and the chip may be inserted into a standard chip reader for result reading and analysis. One advantage of this prefer embodiment is that many standard chip readers may be used to analyse test results. The removable divider sheet, when attached to the chip, creates an assembled device containing a system of wells where reactions of different samples may occur. The number of wells can be determined according to the user's requirements and the divider sheet with the required holes produced accordingly. The present invention has provided a truly versatile biochip and method for detecting multiple analytes and samples in a standard chip format.

In another aspect of the present invention, a method is provided for analysing multiple analytes in the same samples. The method comprises the steps of defining a plurality of discrete and spatially separate test site on a test surface, and immobilizing one test molecule onto each test site such that a plurality of test molecule are immobilized thereon. A fluid proof barrier around each test area is then created and a sample for analysis is added to each test area with the appropriate test reagents.

20

#### **BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS**

Figure 1A is a diagram to show a top view of a solid substrate according to one embodiment of the present invention.

Figure 1B is a diagram to show a top view of a divider sheet complementary to the substrate shown in Figure 1A according to the same embodiment.

Figure 1C is a diagram to illustrate the top plan view of a device according to the present invention with the top divider sheet showing Figure 1B attached to the substrate shown in Figure 1A.

Figure 1D is a diagram to show a cross sectional side view across line A-A of Figure 1C.

Figure 1E is a diagram to show a cover sheet according to the same embodiment for covering the device shown in Figure 1C.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

Figure 2A is a diagram to illustrate the top view of a substrate according to a second embodiment of the present invention. The positions of the test sites are shown by dotted circles.

Figure 2B is a diagram to illustrate the top view of a divider sheet complementary to the substrate shown in Figure 2A according to the same embodiment thereof.

Figure 2C is a diagram to illustrate the top view of the assembled device according to the second embodiment of the present invention with the divider sheet attached to the top surface of the solid substrate. The positions of the test sites are again shown by dotted circles.

Figure 2D is a diagram to illustrate the cross sectional side view along line B-B of the device in Figure 2C.

Figure 3A shows a test area according to a third embodiment of the present invention.

Figure 3B shows a test area according to the fourth embodiment of the present invention.

Figure 4A is a diagram to illustrate the top view of a hepatitis biochip according to one preferred embodiment.

Figure 4B illustrates a test area in a hepatitis protein chip for detecting various hepatitis antibodies of the same preferred embodiment. 60: human IgG Positive control; 62: human serum albumin (HSA) Negative control; 64: HAV Ag; 66: HCV Ag; 68: HDV Ag; 70: HBs Ag; 72: HBe Ag; 74: HBc Ag; 76: HEV Ag.

Figure 4C illustrates a test area in hepatitis protein chip for detect various hepatitis antigens of the same preferred embodiment. 60a: HBsAg Positive control; 60b: HBeAg Positive control; 60c: AFP Positive control; 60d: HDVAg Positive control; 62: Negative control; 78: HBs Ab; 80: HBe Ab; 82: AFP Ab; 84: HDV Ab.

Figure 4D is an example of the expected result of the diagnosis of a HAV infected patient with Anti-HAV-IgG present in the serum using the chip shown in Figure 4A – Figure 4C. The two test areas of the chip are shown.

Figure 4E is an example of the expected result of the diagnosis of a HBV infected patient with serum containing HBsAg, HBeAg and HBcAb using the chip shown in Figure 4A – Figure 4C. The two test areas of the chip are shown.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

Figure 5A illustrates a test area of a ToRCH protein Chip according to a further preferred embodiment of the present invention. 86: Toxoplasma gondii; 88: Rubella virus; 90: CMV; 92: HSV 1; 94: HSV 2; 96: Positive control; 98: Negative control.

5 Figure 5B is an example of the expected result of Figure 5A in the diagnosis of a rubella virus infected patient using a ToRCH protein Chip. (For ease of illustration, only one test area or well is shown; test performed using a patients serum containing RV IgG)

Figure 5C is an example of the result of Figure 5B in the diagnosis of a CMV infected patient. (For ease of illustration, only one test area or well is shown; test performed using a patient serum containing CMV IgM)

10 Figure 6A illustrates a test area of a cancer protein chip according to yet another embodiment of the present invention.

Figure 6B is an example of the expected result of Figure 6A in the diagnosis of a liver cancer patient using serum of the patient.

Figure 7A illustrates a test area of autoimmune disorder protein chip.

15 Figure 7B is an example of the expected result of Figure 7A in the diagnosis of a systemic lupus erythematosus patient using the autoimmune disorder protein chip. (For ease of illustration, only one test area is shown)

20 Figure 7C is an example of the result of Figure 7A in the diagnosis of a rheumatoid arthritis patient using the autoimmune disorder protein chip. (For ease of illustration, only one test area is shown).

#### **DETAILED DESCRIPTION**

As defined herein, sample includes, but is not limited to, any solution, mixture or biological fluid that contains any analytes to be tested. Sample includes positive control and negative control serum and biological fluid. A leak-proof chamber means that the chamber is capable of holding fluid in at least one direction without leakage or spillage provided that the volume of fluid is adapted to be contained within the size of the chamber. A leak-proof chamber includes enclosed structures or structures with openings. Ligand refers to any antigen or molecule that is capable of reacting with an antibody in an antibody-antigen binding reaction, a substrate in an enzyme-substrate binding reaction, or a molecule that can be recognised and bound by a receptor including but not limited to nucleic acids,

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

chromosomal fragments, proteins, peptides, glycoprotein, lipid, polypeptides, antibiotics, steroids and other organic molecules.

In the preferred embodiment of the present invention, and referring to Figures 1A to 1D, a biochip consisting of a glass slide **20** is provided with a separate top divider sheet **22**.  
5 The divider sheet **22** as shown in Figure 1B, may be made of any inert material and preferably of a flexible material such as plastic, membrane, latex, ceramic, rubber, resin, PVC or silicon. Holes **22a** are punched into the divider sheet such that a frame **22b** is formed around each hole. Frame **22b** then acts as side walls and the top surface of the slide acts as the base to create a well or chamber **24** therebetween as shown in Fig. 1D. The size  
10 of the top divider sheet is preferably of the same dimension as or slightly shorter than the slide and contains glue on the bottom side such that it may be glued directly on the glass slide **20**. In the preferred embodiment, the glue is strong enough to allow the top divider sheet to be attached to the glass slide such that wells **24** are created therebetween. The wells should be leak-proof such that when the appropriate amount of fluid is applied into each  
15 well the fluid would not flow into an adjacent well through the adjoining area. The glue should also be inert and of a material that allows the divider sheet to be detached from the slide at the convenient of the user. The number of rows or columns in each array of test sites may vary according to the user's need. The thickness of the divider sheet is dependant on the volume of reaction that is required in each well and may be determined by one skill in  
20 the art without undue experimentation. For example the sheet may be 1 to 3 mm thick. The holes and frame can be any size or shape according to the user's need. As an illustration, holes with inner dimensions from 0.3cm x 0.3cm to 0.4cm x 0.6cm to 1.2cmx1.2cm may be used. The width of the dividing wall such **22b** or **34a** can range from 0.15cm to 0.6 cm. The number of holes can also be varied accordingly, such as in a 1x2, 2x3, 3x10, 3x5, 2x5, 3x8  
25 and 4x8 array format.

In the simplest embodiment, a single test molecule may be immobilized into one test area **20a** of the glass slide that correspond to a specific well. For example, in Figure 1B, the position of hole **H1** would correspond to the position of test area **TA1** as shown in Figure 1A. One test molecule is immobilized onto test surface **TA1** such that when the top  
30 divider sheet is attached and glued onto slide **20**, a well **W1** is created with the bottom of the well corresponding to test area **TA1** as shown in Figure 1C. In this particular example, there is only one test molecule and therefore only one test site that is found within each test area. An optional cover sheet **21** as shown in Figure 1E is also provided as a lid that can be placed onto to the outer surface of the divider to cover the solutions during incubation of the

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

binding reaction to prevent evaporation, spillage or contamination. The cover sheet can then be removed according to the user's needs. The cover sheet may be made from any inert material such as the material used for the divider. An example is polyester film.

In another embodiment, a plurality of test sites are defined in each test area such that a plurality of test molecule may be found within each chamber or well. Referring first to Figure 2A, another glass slide 29 according to the present invention is shown with two test areas 30 defined thereon. Each test area is shown as a square with dotted lines. Within each test area are test sites 32 defined in a 3x3 array and shown as circles. Figure 2B shows a complementary divider sheet 34 with two larger holes 36 punched therein. The remainder of the sheet forms a frame 34a. Figures 2C & 2D show the assembled device according to this embodiment of the present invention in which two large wells 40 are formed between the divider 34 and the glass slide 29. From the illustration shown, it is clear that in this particular example, a maximum of nine different test molecules may be immobilized into the same test area and that multiple analytes may be detected using this format.

Figure 3A shows another embodiment of the present invention in which one test area 41 (corresponding to the base of one chamber) contains nine arrays of 4x4 test sites. The other test area and the solid device are not shown for ease of illustration. It is clear that different chambers or test areas of a similar kind may be defined according to the user's requirement. Furthermore, different test areas on the same test surface may have different test site arrangements. In this example, the open circles 42 define test sites with an assay molecule immobilized thereon whilst the solid circles 44 are positive control sites with a positive control molecule immobilized thereon. The dotted circles 46 define test sites in which the negative control is immobilized thereon. The positive control molecule is expected to react with an analyte known to be present in the sample while the negative control contain a test molecule that is not expected to react with any analyte in the sample. The assay molecule is one that cross reacts with an analyte (referred to as the assay analyte for ease of explanation) with unknown levels in the sample. The assay analyte is the subject of the diagnostic test. This single test area (i.e. a single well) in this example contains three rows of the 4x4 array of test sites (rows A to C) and three columns of the 4x4 arrays of test sites (columns 1 to 3). Arrays A1, A2, A3, B1, B2, B3 and C1 are identical. The positive control and assay molecule are arranged in interpolating positions. The negative control is immobilized onto test sites in Arrays C2 and C3. The entire well 41 is adapted to receive one sample such that the reaction for all the test sites can occur simultaneously and within the same reaction area. Thus in this example, three different test molecules are immobilized

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

in the same test area for analysis. Furthermore, the multiple repetition of test sites for each test molecule allows for extremely accurate detection to occur.

Although, the examples described above show Arrays **A1**, **A2**, **A3**, **B1**, **B2**, **B3** and **C3** as having the same three assay molecules arranged in an identical format, it is clear that a different assay molecule may be immobilized onto each of these arrays in the same reaction area. For example, one assay molecule (e.g. the positive control molecule) may be immobilized into the 8 reaction sites in Array **A1** while a second and different assay molecule (e.g. the negative assay molecule) is immobilized onto the 8 reaction sites in Array **B3**. Furthermore, it is clear that numerous different assay molecules may also be immobilized into these seven arrays depending on the number of duplicates that are required to produce the accuracy of the desired level.

Figure 3B shows another embodiment of the present invention in which the test area **48** corresponding to one well or chamber contains a 9x9 array having a center row and a center column surrounded by four quarters. The negative control **54** is immobilized into a "cross" or cruciform configuration along the center column and center row while the positive control **50** and assay molecule **52** are arranged in interpolating positions within the four quarters. Using this format, it is clear that upon a successful experimental run in which the negative control produces no or low signal according to expectations, the four quarters would be elucidated distinctly. There is thus an advantage of this format in providing clear and unambiguous results even on simple visual inspection.

The following examples illustrate various specific embodiments of the present invention and is meant to teach one of ordinary skill in the art to make and use the present invention. These examples are meant to be illustrations only and are not intended to the limit scope of the claims as appended herewith. In the following examples, test molecules are also referred to as probes or markers. Test areas are sometimes referred to as grids and test sites as subgrids.

#### **EXAMPLE 1**

##### **METHOD OF IMMOBILIZING A LIGAND ONTO A TEST SITE**

Protein chip is prepared by printing and immobilized probes in a predefined grid and sub-grid pattern on microscopic solid substrate by microarrayer. The probes can be either antigens or antibodies, in the form of proteins, polypeptides or peptide, and are capable of

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

binding to target proteins in test samples. The micro solid substrate can be derivatized glass microscopic slide, nitrocellulose membrane or silica. As much as 2390 protein spots can be printed one every 1cmx1cm area on glass substrate. Samples used in the reaction can be in the forms of plasma, serum, blood or other body fluid. The entire reaction procedure will be carried out in situ on the solid substrate.

Fabrication of biochip:

1. Probes in appropriate dilution are added in individual well in microtitre plate, also known as source plate.
2. The source plate is placed in the appropriate slot in a robotic microarrayer (Prosys4510, from Cartesian Technology, CA, USA)
3. Software controls microarray pin to draw sample from the source plate.
4. Samples are printed on derivatized microscopic slide by dwelling the sample-filled pin on the surface of the slides.
5. The printed biochip is incubated at 37°C for 1 hour to immobilize protein probes on the surface of substrate.
6. The remaining surface of substrate is blocked by Bovine Serum Albumin (BSA) and Tween 20 in TBS buffer [0.02M Tris-HCl, 0.137M NaCl, pH 7.6] for 1h at 37°C.
7. Wash in double distilled water and dry at room temperature
8. Incubate the biochip in 0.3% sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>) at 37°C for 5 to 10 min. to reduce free aldehyde groups on glass surface.
9. Wash with double distilled water and dry at room temperature.
10. The fabricated biochip is sealed under darkness at 4°C.

Methods of assembling the device:

1. The outer dimension of plastic material for making multi-chamber plastic device (the divider sheet) should match that of the solid substrate.
2. Number of chambers per device can be ranging from 1x2 to 4x10.
3. The distance between the centers of each two adjoining chambers is the multiple of 4.5mm which matches the geometry of 384 and 96 microtitre plates, pin distance of pin head of microarray and multichannel pipetmen.
4. The thickness of the plastic, determining the depth of each chamber, should be at least 1mm and can be ranging from 1 to 3mm.
5. One side of the multi-chamber plastic device should be sticky and can tightly adherent to the solid substrate to form leak-proof wells for the reaction. Such a

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

device should be water-resistance, leak-proof, rigid and inert when soak in aqueous solution and used under hydraulic pressure.

6. Protein probes are microarrayed onto each chamber for biochip fabrication for multi-marker, multi-specimen usage.
- 5 7. A polyester film, which size matches the outer dimension of the multi-chamber plastic device, with single-sided adhesive is optionally used to cover on the multi-chamber biochips, forming well-isolated and enclosed chambers for the reaction.
8. The whole set up in the multi-chamber biochip can tolerate reaction temperature between  $-40^{\circ}\text{C}$  and  $95^{\circ}\text{C}$ , UV treatment and is water-resistance.
- 10 9. The bonding between the polyester film to the plastic of the multi-chamber device should be weaker than that of the device to the solid substrate. The removal of the film at each reaction step should not alter the structure of multi-chamber biochips.
10. Upon reaction completion, the plastic device can be disassembled from the solid substrates for analysis in a conventional microarray scanner (Scanarray4000, Packard Bioscience (now known as PerkinElmer Life Sciences, CT, USA))
- 15 Immobilization of protein to solid substrate can also be achieved through physical interaction e.g. by charge (e.g. negative charged protein bonds with positively charge membrane or positively charged metal surface) by hydrophobic interaction (hydrophobic protein bonds to hydrophobic membrane), by detention (protein of a certain size being impeded in porous substrates such as membranous or gel type of substrates) and through chemical interaction (e.g. bonding with epoxy slide, silanized slide, silyated slide.)
- 20

## **EXAMPLE 2**

### **METHOD OF DETECTING AN ANTIBODY IN HUMAN SERUM USING A CROSS-REACTIVE ANTIGEN IMMOBILIZED ONTO A BIOCHIP**

Reaction and detection:

1. Remove the biochip from its package.
2. Test samples (patient sample, positive and negative sera controls) are added separately to individual chambers in a biochip and allowed to react at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h.
- 30 3. Unbound reactants are washed with washing buffer with sodium salt like PBS or TBS. [PBS: 0.137M NaCl, 0.027M KCl, 0.0043M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0014M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH7.3] [TBS: 0.02M Tris-Cl, 0.137M NaCl, pH7.6]
4. Remove excess buffer and allowed to dry at room temperature for 5 min.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

5. Blocking solution [1% bovine serum albumin in TBS or PBS] is added to the biochip
  6. Wash and dry the biochip
  7. Fluorescence labeled compound (secondary antibodies or antigens) is diluted in blocking solution is added to the biochip and incubated at 37°C for 0.5h.
  8. Wash, remove the divider sheet from the biochip and spin-dry.
  9. The image is scanned by microarray scanner. Fluorescence intensity of each spot is recorded and used in data analysis and for diagnosis.
- In another embodiment, steps 7 to 9 above are replaced by step 7a to 13a as described below :
- 7a. Biotin conjugated secondary antibody is diluted in blocking solution is added to the biochip and incubated at 37°C for 0.5h.
  - 8a. Wash and dry the biochip.
  - 9a. Streptavidin molecule in blocking solution is added and incubated at 37°C for 0.5h.
  - 10a. Wash and dry.
  - 11a. Fluorescence compounds (biotin or anti-streptavidin antibody) is diluted in blocking solution and incubated at 37°C for 0.5h.
  - 12a. Wash, remove the divider sheet from the biochip and spin-dry.
  - 13a. The image is scanned by microarray scanner. Fluorescence intensity of each spot is recorded and used in data analysis and for diagnosis.

### EXAMPLE 3

#### METHOD OF DETECTING AN ANTIGEN USING A CHIP WITH A CROSS-REACTIVE ANTIBODY IMMOBILIZED THEREON

Reaction and detection:

1. Remove the biochip from its package.
2. Test samples (patient sera, positive and negative sera controls) are added onto the biochip and allowed to react at 37°C for 1 h.
3. Unbound reactants are washed with washing buffer with sodium salt like PBS, TBS. [PBS: 0.137M NaCl, 0.027M KCl, 0.0043M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0014M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3] [TBS: 0.02M Tris-Cl, 0.137M NaCl, pH7.6]
4. Remove excess buffer and is allowed to dry briefly at room temperature for 5min.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

5. Blocking solution [1% bovine serum albumin in TBS or PBS] is added to the biochip
6. Wash and dry the biochip
7. A second primary antibody diluted in blocking solution is added to the biochip and incubated at 37°C for 0.5h.
8. Wash, spin-dry and block again.
9. Alkaline phosphatase (AP) or horse radish peroxidase conjugated anti-human IgG antibody (secondary antibody) diluted in blocking buffer is added and incubated at 37°C for 0.5h.
10. Appropriate chemiluminescent substrates (Luminol for HRP from ICN Biomedicals Inc (CA, USA) or 1,2-dioxetane-based substrate for AP from Pierce Chemical Company (IL, USA)) are added and incubated at room temperature for 1 min. (according to the manufacturer's manual)
11. The image is scanned by microarray scanner. Chemiluminescence intensity of each spot is recorded and used in data analysis and for diagnosis.

#### **EXAMPLE 4A**

##### **DIAGNOSIS OF HEPATITIS IN HUMAN SERUM**

This embodiment includes the fabrication of a protein chip and its application in diagnosis for acute hepatitis, chronic hepatitis, liver cirrhosis and liver cancer that is caused by hepatitis virus infection.

Markers for hepatitis A infection diagnosis are hepatitis A antibodies (anti-HAV IgG or IgMAb); for hepatitis B are hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B 'e' antigen (HBeAg), hepatitis B surface antibody (HBsAb), hepatitis B 'e' antibody (HBeAb) and hepatitis core antibody (HBcAb); for hepatitis C are hepatitis C antibodies (anti-HCV IgG or IgM); for hepatitis D are hepatitis D antibodies (anti-HDV IgG or IgM); and for hepatitis E are hepatitis E antibodies (anti-HEV IgG or IgM). Alpha-fetoprotein (AFP) is the marker to include in the biochip for liver cancer diagnosis. Probes or test molecules that can specifically react to these markers are printed on solid substrate during biochip fabrication.

An example of a test area is shown in Fig. 4A, 4B, 4C, 4D and 4E. This example illustrates the use of multiple repetitions provided in two test areas 56 and 58 on the same chip (Figure 4A) for data analysis. These two test areas would serve as the bottom of two wells when an appropriate divider with two corresponding holes is placed onto this biochip for sample introduction. The advantages of this arrangement will be apparent upon

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

explanation of the figures below. The high number of repetitions of each test molecule increases the confidence in data analysis and minimizes the geographic and machine variation during data collection, hence improving the accuracy in each biochip experiment. Moreover, the distinct pattern as illustrated below facilitates the identification of spots in a high density array.

5 In this example, there are two test areas or grids **56** and **58** defined on this Biochip. Grid or test area **56** contains seven subgrids or arrays **56a** of test sites. Within each sub-grid **56a**, a positive control and a assay molecule are immobilized with multiple repetitions in an array configuration. Dotted line **56b** represents the positions on which multiple test sites of  
10 the negative control are defined.

Referring to Figure 4B the test area or grid **56** is shown in greater detailed. The dotted circle **62** represent the negative controls that are found spotted in multiple repetitions across rows and columns that delineate the boundaries of each sub-grid. In each sub-grid, a positive control **60** and a test molecule (one of the hepatitis antigens) are immobilized. The  
15 test molecule immobilized into each subgrid is a different hepatitis viral antigen.

For example, in array A1, there are 16 test sites arranged in a 4 x 4 arrangement with the Human IgG as the positive control **60**; and the test molecule hepatitis A antigen (HAV Ag) **64** immobilized in an interpolating arrangement. Six other arrays (A2 -- A7) are illustrated with the only difference being the test molecule immobilized thereon (HAV  
20 antigen **64**, HCV antigen **66**, HDV antigen **68**, HBs antigen **70**, HBeAg **72**, HBc antigen **74** and HEV antigen **76** immobilized onto subgrids A1 to A7 respectively).

Referring now to test area **58** as shown in Figure 4C, the test site arrangement in this area is different from that of test area **56**. In test area **58**, the negative control is immobilized onto multiple test sites that are arrange in a cruciform configuration across the  
25 center of the test area along line **58a** of Figure 4A. The cruciform arrangement of the negative control test sites divide the test area into four quarters. Four other arrays or subgrids (B1 to B4) are provided therearound. In array B1 as shown in Figure 4C, the positive control hepatitis B surface antigen **60a** and the test molecule anti-hepatitis B surface antigen antibody (HBs Ab) **78** are immobilized onto 16 separate and discreet test sites in an interpolating relationship. The other three quarters (B2 to B4) contain the  
30 positive control hepatitis BeAg **60b** in combination with the anti-hepatitis B "e" antibody **80**, positive control AFP **60c**, the anti-AFP antibody **82** and the positive control hepatitis D virus antigen **60d**, the anti-hepatitis D virus antibody **84** respectively.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

Method for binding reaction:

Table 1 shows the spotting conditions for each of the test molecule on the biochip. Column 2 shows the concentration of the protein solution used for spotting while column 3 indicates the estimated size of each spot. The amount of protein that is actually immobilized onto each test site may be estimated based on the assumption that a semi-spherical spot is provided on each reaction site. The entire spot is allow to dry and most of the protein is considered immobilized onto the surface of the test site.

Table 1

spots	spot concentration	spot size	Time for binding reaction
HBsAG	0.4mg/ml	160um	60 – 90 min
HBsAb	2mg/ml	160um	60 – 90 min
HBeAg	0.8mg/ml	160um	60 – 90 min
HBeAb	2mg/ml	160um	60 – 90 min
HBcAb	0.15mg/ml	160um	60 – 90 min
HAV IgG	0.8mg/ml	160um	60 – 90 min
HCV IgG	0.1mg/ml	180um	60 – 90 min
HDV IgG	0.125mg/ml	160um	60 – 90 min
HEV IgG	0.8mg/ml	150um	60 – 90 min

10 During a binding reaction patient serum is added into chambers 56 and 58 using a method similar to the one described for Example 2 and Example 3 respectively. In this example there are only two test areas shown in the biochip, one testing for hepatitis antibodies and the other for the presence of hepatitis antigen in the serum and therefore only one test serum can be tested thereon. The other test sera such as the positive and negative  
 15 control sera can be applied to two separate and identical biochips in order to obtain the negative and positive results. After reaction completion, the chip is scanned and a fluorescence signal intensity from each spot is recorded.

**EXAMPLE 4B****20 DIAGNOSIS OF HEPATITIS IN HUMAN SERUM USING MULTIPLE WELLS**

This example shows how the system described in Example 4A may be adapted for use in a biochip that contains multiple wells to increase the number of samples that may be

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

tested in the same biochip. In this example, an array of three rows and eight columns such as the one shown in Figure 1A is used for diagnosis of hepatitis in patients. For the ease of explanation, the rows of test areas are denoted as rows A, B and C from top to bottom and the columns of test areas are denoted as columns 1 to 8 respectively. In this example, the 12 test areas within columns 1 to 4 of the biochip contains test sites that are identical to the one shown in test area 56 of Figure 4B. The 12 test areas in columns 5 to 8 each contains an array of test sites that are identical to that found in test area 58 of Figure 4C. Using this arrangement, it can be clearly seen that for diagnosis of hepatitis antigens in the serum, there are a total of 12 test areas (i.e. wells) available. In this example, a positive control serum obtained from a patient with known hepatitis infection is added to test area A1. A negative control serum obtained from a healthy individual with no hepatitis infection is used for diagnostic reaction in well B1. The remaining 10 wells (wells A2 to A4, B2 to B4 and C1 to C4) may be used to test unknown patient sera for the presence of hepatitis antigens. In the same manner, a positive control sera is used in well A5 to provide a positive control for hepatitis antibodies while a negative control sera may be added to well B5. Their remaining wells (A6 to A8, B6 to B8, C5 to C8) may be used for testing unknown sera. The binding reaction and detection system used is the same as the one described in example 4A.

Method for result analysis:

R value = mean value of signal intensity of test probes falling within the 95% Gaussian distribution divided by that of positive control probe within the same subgrid.

R values from test samples in test chambers are  $R_s$ .

R value from positive control sample in positive reference chamber is  $R_p$ .

R value from negative control sample in negative reference chamber is  $R_n$ .

$R_{co} = \frac{1}{2}(R_n + R_p)$ .

There are three approaches to interpret the data

- a. Method I: Individual sample with its  $R_s$  greater than 0.05 is defined as positive to the test probe;  $R_s$  between 0.02 and 0.05 is border-line and test should be repeated; and less than 0.02 is negative.
- b. Method II: Individual test sample with its  $R_s/R_n$  greater than 2.1 is defined as positive,  $R_s/R_n$  between 1.5 and 2.1 is borderline; and  $R_s/R_n$  less than 1.5 is negative.
- c. Method III: Individual test sample with its  $R_s$  greater than  $R_{co}$  is positive; and less than  $R_{co}$  is negative.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

This invention facilitates data comparison within chamber and between chambers across the same chip. The geographic variation that may affect the signal intensity is minimized using this design in microarraying and data manipulation method.

Employing the method described above, hepatitis serum standards were obtained from the State Drug Administration of China (SDA) and used as test sera to check the accuracy and sensitivity of the method and device according to the present issues.

To ensure accuracy and precision of diagnostic kits in China, SDA sets the standard of sensitivity and specificity. The sensitivity test sets the weakest reactive range of diagnostic kits. The method invention according to the present passed the sensitivity test with 100% accuracy. Column 2 of Table 2 represents samples that were provided by the States Drug Administration of China as reference samples that have to be used to check the sensitivity of all diagnostic kits that are registered in China for clinical use. For HbsAg and HbsAb, a reference standard of 1 ng/ml and 10 mIU/ml are used respectively.

15 Table 2 : Sensitivity test using SDA sensitivity standards

Hepatitis Markers	SDA sensitivity reference <sup>1</sup>	Results of biochip diagnosis (fluorescence intensity) [Inventor: please verify]		
		Method I	Method II	Method III
HbsAg <sup>2</sup>	≤1ng/ml	0.09	2.2	+
HbsAb <sup>3</sup>	≤10mIU/ml	0.12	2.4	+
HbeAg <sup>4</sup>	1# ≥1:64	0.10	2.4	+
	2# ≥1:128	0.07	2.2	+
	3# ≥1:32	0.10	2.3	+
HbcAb <sup>5</sup>	55# ≥1:32	0.08	2.2	+
	57# ≥1:32	0.07	2.1	+
	61# ≥1:32	0.07	2.2	+
HbcAb <sup>6</sup>	2# ≥1:32	0.08	2.2	+
	3# ≥1:8	0.11	2.4	+
	4# ≥1:16	0.09	2.2	+

[ '+' is test positive, '-' is test negative

1. SDA standard panel kit lot number. 9909

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

2. HbsAg (hepatitis B surface antigen); 3.HBsAb (antibody against hepatitis B surface antigen); 4. HBeAg (hepatitis B 'e' antigen); 5. HbeAb (antibody against hepatitis B 'e' antigen); 6. HbcAb (antibody against hepatitis B core antigen)

5 Table 3 : Specificity test using SDA standards

Markers	SDA specificity reference (no. of negative determined by the current method verse total negative standard analysed) <sup>1</sup>	Results of biochip diagnosis		
		Method I	Method II	Method III
HbsAg <sup>2</sup>	20/20	0-0.018	0-1.38	-
HbsAb <sup>3</sup>	20/20	0-0.019	0-1.49	-
HbeAg <sup>4</sup>	15/15	0-0.016	0-1.46	-
HbeAb <sup>5</sup>	15/15	0-0.016	0-1.46	-
HbcAb <sup>6</sup>	15/15	0-0.016	0-1.48	-

Footnotes: [ '+' is test positive, '-' is test negative

1. SDA standard panel kit lot number. 9909  
 2. HbsAg (hepatitis B surface antigen); 3.HBsAb (antibody against hepatitis B surface antigen); 4. HBeAg (hepatitis B 'e' antigen); 5. HbeAb (antibody against hepatitis B 'e' antigen); 6. HbcAb (antibody against hepatitis B core antigen).

Using these three methods described above, the result are shown in the next three columns. For HbeAg, HbeAb and HbcAb, three separate unknown samples were provided by SDA and various dilutions were used to dilute the serum as indicated under column 2 (sample Nos. 1, 2 and 3 for HbeAg; Nos. 55, 57 and 61 for HbeAb; Nos. 2, 3 and 4 for HbcAb). The results of fluorescence intensity detection after the binding reaction are shown in the next corresponding column.

Table 3 shows the results of specificity test that are required by the SDA. In these test, negative sera were provided by the SDA for testing of the respective antigens or antibodies as indicated in the first column. The results are shown in the next few columns. In column 2, the denominator of the fraction indicate the number of samples that were provided by the SDA while the numerator of the ratio represents the number of sample that were tested negative. According to SDA requirements, no false positives are tolerated.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

Thus, using the method according to the present invention, specificity is very high and there is little cross reactivity among patient's sera with various non-specific antigen or antibody.

Figure 4D is an example of the expected result of a HAV infected patient. Positive signals are recorded only in test sites 64 in test area 56 and all positive controls in both test areas 56 and 58. Such a result would show that the test sera antibody is directed against HAV Ag and not other test molecules and specificity of the test is good.

Figure 4E is an example of the expected result of a HBV infected patient. Positive signals are expected in test sites 74 in test area 56, and test sites 78 and 80 in test area 58; and also all the positive controls in test areas 56 and 58.

10

### EXAMPLE 5

#### ANTENATAL TESTING IN PREGNANT PATIENTS

This embodiment describes a biochip to be used to test the serum of pregnant women for antenatal testing purposes. *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, Cytomegalovirus (CMV) and Herpes Simplex Virus I and II, collectively known as ToRCH, are routinely checked in pregnant women in which the prevalence of these diseases is high. The diseases will transmit to the fetus during pregnancy or at birth, causing severe damages to newborn infants. Because of these complications, assessment of the immune status among pregnant women and women of child-bearing age is important. Probes corresponding to antigens specific for the five ToRCH markers, together with positive and negative controls are printed onto a multi-chamber chip as described previously. The biochip allows detection of IgG and IgM simultaneously in neighbouring chambers by adding either fluorescence labeled anti-human IgG antibodies or fluorescence labeled anti-human IgM antibodies to the respective chambers. The detection of IgM in ToRCH diagnosis is to allow early diagnosis of the diseases since IgM is an antibody that is produced soon after infection, while IgG is produced after a longer lag time. However IgG levels remain high for a much longer period of time even after the infection has been cured. Hence, a high level of IgM combined with a low level of IgG in a patient's sera is indicative of an on-going acute infection.

Methods:

1. Probes corresponding to the antigens isolated from *Toxoplasma gondii* 86, Rubella virus 88, Cytomegalovirus (CMV) 90 and Herpes Simplex Virus I 92 and II 94, human IgG positive control 96 and Human Serum Albumin (HSA) negative control 98 are printed repetitively onto test sites that are arranged in a 3x3 array or as shown

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

- in Figure 5A. These different subgrids are defined within the same test area 100 that will be found in a single well when an appropriate divider is attached thereon. In the preferred embodiment, the biochip in this example contains eight test areas that are identical to the one shown in Figure 5A. Two tested areas are used for incubation with a positive serum while two others are used for the negative control serum. Two additional patient's sera can then be tested in this biochip in duplicates.
2. Immobilization, drying, blocking, reaction, washing are carried out as described in Example 2.
  3. To detect ToRCH IgG in serum, fluorescence labeled anti-human IgG antibodies are used in one of the wells that has been incubated with the serum as indicated above.
  4. To detect ToRCH IgM, fluorescence labeled anti-human IgM antibodies are added to the duplicate well that has been incubated previously with the respectively serum.
  5. Figure 5B shows the experimental results of an assay using serum from a rubella virus infected patient. Positive signal was detectable in test molecule 88 and positive control 96.
  6. Figure 5C shows the experimental results of an assay using serum of a CMV infected patient. Positive signal was detectable in test molecule 90 and positive control 96.

## 20 **EXAMPLE 6**

### **USE OF THE STREPTAVIDIN/BIOTIN SYSTEM AS A UNIVERSAL AMPLIFICATION SYSTEM**

This embodiment uses the fluorescence/enzyme labeled streptavidin and biotin method (FLSAB/ELSAB) as an enhanced reporting system in protein chip analysis. In the current protein chip technology, fluorescence or enzyme conjugated antibodies are commonly used in the reporting system. This embodiment introduces a signal amplification step to the present reporting system. Sensitivity of protein chip increases by ten folds when using the amplification system. Therefore, less amount of probes may be used in printing. In return, background is reduced, signal to noise ratio increases and the chance of false positive results is minimized. It also facilitates the omission of a difficult step on labeling of fluorescence dye to acid protein.

Fabrication of protein chip:

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

1. Arraying of protein probes on solid substrates such as aldehyde slides, nitrocellulose or nylon membrane.
2. Protein probes on slides are dried to fix for overnight at room temperature or 1 hour at 37°C.
- 5 3. Substrate surface is blocked by blocking buffer containing bovine serum albumin (BSA) and tween 20 for 1 hour at 37°C.
4. Riase with double distilled water and store dried at room temperature.

## Methods:

- 10 1. Specimen sample is added into each chamber of protein chip and incubated at 37°C, 1hour.
2. Excessive specimen is washed with washing buffer and spun dry.
3. The chip is blocked with blocking buffer and washed with washing buffer as described before.
4. Wash and spin dry.
- 15 5. Biotin conjugated biomolecules which bind specifically to the target markers are diluted in blocking buffer, added into each chamber and incubated for 30min at 37°C.
6. Wash and spin dry.
7. Streptavidin is diluted in blocking buffer, added to the chip and incubated for 30min at 37°C.
- 20 8. Wash and spin dry.
9. Enzyme alkaline peroxidase (AP) or horse raddish peroxidase (HRP), or fluorecence conjugated biotin diluted in blocking buffer is added to the chip and incubated for 30min at 37°C in darkness.
- 25 10. If enzyme conjugated biotin is used in (9), appropriate chemiluminescent substrates, Luminol, Pierce Chemical Company (IL, USA) for HRP or 1,2-dioxetane-based substrate for ICN Biomedicals Inc. (CA, USA), are added and incubated at room temperature for 1 min. (according to the manufacturer's manual) After completion, the chip is washed, divider sheet is removed, and chip was spun dry and scanned with micoarray scanner.
- 30

**EXAMPLE 7****METHOD AND DEVICE FOR CANCER DIAGNOSIS**

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

This embodiment describes a high throughput and sensitive diagnostic method and biochip for cancers. This chip allows the detection of cancer at early stage and at the same time, determines the type and subtype of cancer. Probes are antibodies corresponding to tissue specific tumor marker; positive controls are the corresponding tumor markers.

5 Human serum albumin is the negative control.

Cancer chips are categorized according to the organ/tissue type. Each type of cancer chip consists of a panel of antibodies that react to tissue specific tumor markers. The expression profile in each antibody panel allows further subtyping of the cancer. For example,  $\gamma$ -GT I', II' are found only in liver cancer; Concanavalin A reactive alpha-fetoprotein (R Con A AFP) are predominantly found in serum samples of primary liver cancer while in secondary liver cancer, gonadal and extra gonadal germ cell tumors had a significant reduction of R ConA AFP with elevation of nonreactive form. Therefore, the use of panels of tumor markers in cancer biochips will facilitate cancer diagnosis, typing and subtyping.

15 Figure 6A shows one test area in a cancer chip with 16 arrays (A1 to D4). Each array contains 9 discrete test sites with the same test molecule immobilized thereon. Array A1 has test molecule anti alpha-fetoprotein (AFP) antibody printed thereon; A2 is printed the anti gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) isozyme I antibody; A3 is printed the anti gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) isozyme I' antibody; A4 is printed the anti gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) isozyme II antibody; B1 is printed the anti gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) isozyme II' antibody; B2 is printed the anti des-gamma carboxy prothrombin (DPC) antibody; B3 is printed the anti alpha-L-fucosidase antibody; B4 prints the anti 5' nucleotide phosphodiesterases isozyme V antibody; C1 prints the anti glutathione S-transferase-placental form antibody; C2 prints the anti apha-1-antitrypsin antibody; C3  
20 prints the anti ferritin antibody; C4 prints the anti acidic isoferitin (AIF) antibody; D1 prints the anti hepatitis B surface antigen antibody; D2 and D3 print the positive controls corresponding to the 13 tumour markers and also human IgG; and D4 prints the negative control.

30 Figure 6B shows an example of the kinds of the diagnostic result that can be obtained from a liver-cancer patient, for example with positive signals detected in array A1, A3, A4, A5 and D1, and positive controls D2 and D3.

#### **EXAMPLE 9**

#### **DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE DISORDER**

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

Autoimmune diseases are characterized by the presence of high levels of circulating IgM and IgG autoantibodies in patient serum. There are two categories of autoimmune diseases: single organ or cell type, and systemic type. Example of the former type are autoimmune hemolytic anemia (AIHA) in which the body attacks its own red blood cells (RBC) with elevated level of IgG autoantibody and IgM antibody; Myasthenia gravis in which patient suffers from severe muscular weakness with elevated in autoantibodies to acetylcholine receptors; and Hashimoto thyroiditis in which anti-thyroglobulin antibody and antimicrosomal antibody are elevated. Examples of the later are systemic lupus erythematosus (SLE) in which antinuclear ribonucleoprotein antibody (anti-dsDNA and anti-SM) are detected; and rheumatoid arthritis in which rheumatoid factor is detected.

Methods:

1. Autoimmune protein chip is to detect autoantibodies in sera of patients. Probes corresponding to antigens of autoimmune disease markers are printed on the multi-chamber chip for fabrication. The markers are antinuclear ribonucleoprotein antibody, rheumatoid factor, anti acetylcholine receptor antibody, anti red blood cell antibody, anti thyroglobulin antibody and antimicrosomal antibody.

Example of the design of autoimmune diagnosis protein chip is illustrated in Figure 7A. Within the same test area (representing one well or chamber in the assembled device), 9 discrete arrays (A1 to C3) are defined. Each array is immobilized one type of molecule which is different from the other arrays. Within the same array, the 16 test sites (4x4) contain the identical test molecule. A1 prints the double stranded DNA molecule; A2 prints the SMITH antigen; A3 prints the acetylcholine receptor; B1 prints thyroglobulin; B2 prints microosomal antigen; B3 prints abnormal IgG; C1 prints the human IgG positive control; C2 prints the negative control; and C3 prints red blood cell. SMITH is a complex of RNA and non-histone nuclear protein that helps DNA stay in its correct shape; it is released into the blood stream together with DNA upon cell lysis and is a marker for SLE.

2. Autoimmune protein chip is an indirect immuno-based assay. Patient sera are added into individual chamber. As in the previous example 8, each serum may be added to duplicate chambers for the detection of IgG as compared to the detection of IgM. Autoantibodies in the serum react with the stationary phase probes. After washing, a fluorescence labeled anti-human IgG antibody is added to the chamber for detection of cross-reaction IgG.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

3. For the detection of cross-reaction bivalent or multivalent IgM, a double-antigen-sandwich method can also be applied in the autoimmune protein chip. After the reaction with serum, fluorescence label antigens are added to the reaction chamber for detection.
4. After reaction completion, biochips are scanned by a microarray scanner.

5        Figure 7B shows an example of the diagnostic result of a systemic lupus erythematosus patient. Positive signals will appear in test sites A1 and A2, and positive control site, C1.

          Figure 7C shows an example of the diagnostic result of rheumatoid arthritis patient. Positive signals will appear in test site B3 and positive control C1.

10        The detailed description for the specific embodiment above have been presented for the purposes of illustration and explanation. It is not intended to be exhaustive or to limit the invention to the precise forms disclosed, as many modifications and variations are possible in the light of the teaching provided. For example, it is clear that the arrangement shown in, Figures 4A to 4C is for illustration only and that smaller test areas may be defined  
15        onto the same biochip. As an variation, three duplicates of test areas 56 and 58 may be provided on the same chip such that the test serum and the positive and negative sera may also be tested on same biochip. Furthermore, additional test area may also be defined on the biochip in combination with a suitable divider with the corresponding number of holes such that multiple patients' samples may be tested on the same biochips.

20        As a further example, the use of anti-human IgM and anti-human IgG antibodies for the diagnosis of acute infections by analysing the antibody profile of the patient may be applied to many diseases in addition to the one disclosed in example 5.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

**CLAIMS**

1. A device for detecting multiple analytes comprising a solid substrate and a divider,  
said substrate having a test surface with a plurality of discrete test sites defined  
thereon, each said test site having a test molecule immobilized thereon;  
5 said divider having a plurality of holes at predetermined positions provided on an  
attachment surface, said attachment surface complementary to said test surface and  
adapted for attachment thereto, said divider reversibly attachable onto said solid  
substrate such that each said hole is adjoined with a portion of said test surface to  
10 create a plurality of leak-proof chambers, said test surface within said chamber having  
a plurality of test sites exposed therein, said chamber further having an opening that is  
accessible from the exterior such that fluid introduced into said chamber may be  
contacted with said exposed test sites for testing.
2. A device according to Claim 1 where in said test molecule is an antigen or an  
15 antibody.
3. A device according to Claim 1 where in a cover is provided, said cover having a  
covering surface adapted for closing said opening of said chamber to prevent spillage  
or contamination between solutions in different chambers.
4. A device according to Claim 3 herein said cover is a polyester sheet.
- 20 5. A device for detection of multiple analytes comprising:
  - (a) a chip with a flat surface, said flat surface having a plurality of reaction areas  
defined thereon, each said reaction area further containing at least one array of  
discrete test sites, each said test site having a test molecule immobilized thereon,  
and
  - 25 (b) a divider sheet having a plurality of holes defined within a frame, each said hole  
corresponding to a reaction area, said frame adapted for reversible coupling onto  
said flat surface such that a plurality of leak-proof wells are created therebetween  
with each reaction area forming the base of a corresponding well and the frame of  
said sheet forming dividing walls between neighbouring wells.
- 30 6. A device according to Claim 5 where in said test molecule is an antigen or an  
antibody.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

7. A method of analysing multiple analytes in a sample comprising :
- (a) defining a plurality of discrete and spatially separate test sites on at least one test area on a test surface;
  - (b) immobilizing a test molecule onto each of said test sites such that a plurality of test molecules are immobilized thereon;
  - 5 (c) providing a fluid-proof barrier around each said test area;
  - (d) contacting each said test area with the appropriate test reagents and the sample for analysis;
  - (e) removing unreacted sample and reagent;
  - 10 (f) removing said barrier; and
  - (g) analysing said test surface for reaction between the analyte in said sample and said test molecule.
8. A method of analysing multiple analytes from the same sample according to claim 7 wherein said test surface is one side of a chip, said test molecule is an antibody or a ligand, and said steps (d) and (e) further comprises the steps of :
- 15 incubating said sample with the immobilized test molecules in each test area for said analytes to bind thereto, said analyte being a cross-reacting ligand or antibody;
  - removing unbound material;
  - 20 adding a mixture of appropriate secondary molecules to said reaction area and incubating therein, each said secondary molecule having a signal molecule coupled thereto, said secondary molecule further adapted to bind specifically with the appropriate analyte;
  - removing unbound secondary molecules; and
  - detecting the presence of said signal molecule on each of said test sites.
- 25 9. A method according to Claim 7 wherein said test molecule is a hormones, drug, receptor, enzyme, nucleic acid, antibiotic or ligand.
10. A method according to claim 7 wherein said secondary molecule is a secondary antibody that cross-reacts with said appropriate analyte; said signal molecule is a fluorescence molecule capable of emitting an emission photon upon excitation of an
- 30 excitation photon, and said step of detecting the presence of said signal molecule

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

further comprises the steps of exciting said signal molecule with said excitation light, and using a detector to detect emission of the emission photon using a fluorescence detector.

11. A method according to claim 8 wherein said signal molecule is an enzyme, and said  
5 step of detecting the presence of said signal molecule further comprises the steps of providing an appropriate substrate for said enzyme and incubating therewith, said enzyme adapted to convert said substrate into a coloured product that is deposited onto said test site.
12. A method according to Claim 8 wherein said secondary molecule is a secondary  
10 antibody that cross reacts with said appropriate analytes, said signal molecule is biotin, and said step of detecting the present of said signal molecule further comprises contacting said signal molecule with strepavidin or avidin to allow binding thereto; removing unbound strepavidin or avidin; contacting said bound strepavidin or avidin with a solution containing secondary biotin, said secondary biotin conjugated with a  
15 fluorescence molecule, said fluorescence molecule capable of emitting an emission photon; shining an excitation photon onto said chip and using a detector to detect the emission of an emission photon from said fluorescence molecule.
13. A method according to claim 6 wherein said test molecule is selected from a group  
20 comprising Hepatitis A viral Antigen, Hepatitis C viral Antigen, Hepatitis D viral antigen, Hepatitis B surface antigen, Hepatitis B 'e' antigen, Hepatitis B Core antigen and Hepatitis E viral Antigen, antibody against Hepatitis B surface antigen, antibody against Hepatitis B 'e' antigen, antibody against alpha-fetoprotein antigen and antibody against Hepatitis D viral antigen.
14. A Method according to claim 6 wherein said test molecule is selected from a group  
25 comprising Toxoplasma gondii, Rubella virus, Cytomegalovirus , Herpes Simplex Virus I and Herpes Simplex Virus II.
15. A method according to Claim 6 where in said test molecule is selected from a group  
30 comprising: anti-alpha-fetoprotein, anti-gramma-glutamyl transferase isozyme I antibody, anti-gamma-glutamyl transferase isozyme I' antibody, anti-gamma-glutamyl transferase isozyme II antibody, anti-gamma-glutamyl transferase isozyme II' antibody, anti-des-gamma carboxy prothrombin antibody, anti-alpha-L-fucosidase antibody, anti-5' nucleotide phosphodiesterases isozyme V antibody, anti-glutathione S-transferase-placental form antibody, anti-apha-1-antitrypsin antibody, anti-ferritin

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

antibody, anti-acidic isoferritin antibody, and anti-hepatitis B surface antigen antibody.

16. A method according to Claim 6 where in said test molecule is selected from a group consisting of: single stranded nucleic acid, double stranded nucleic acid, the SMITH antigen; acetylcholine receptor, thyroglobulin, microsomal antigen, abnormal human  
5 IgG and red blood cell protein.

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

1/9

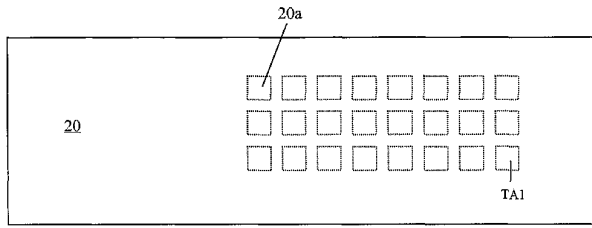


Fig. 1A

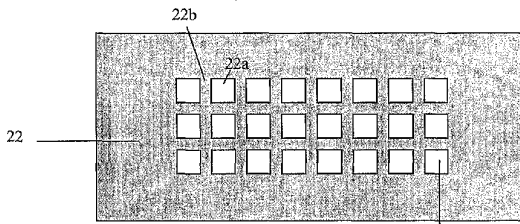


Fig. 1B

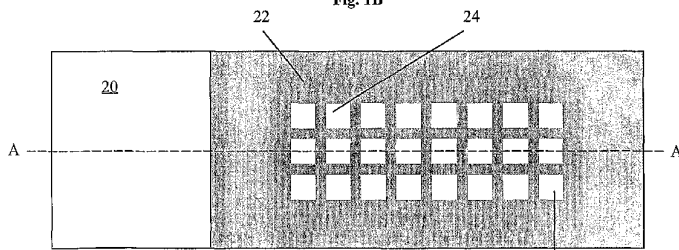


Fig. 1C

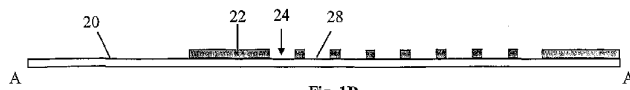


Fig. 1D

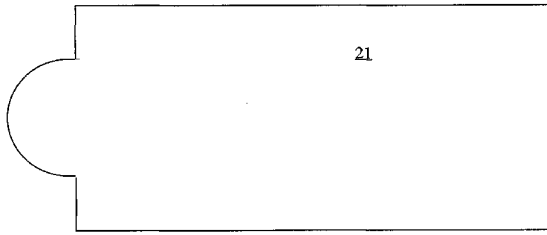


Fig. 1E

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

3/9

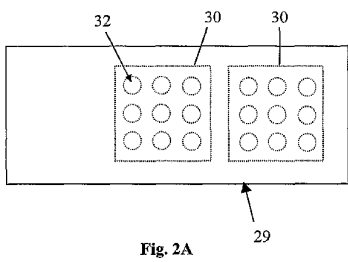


Fig. 2A

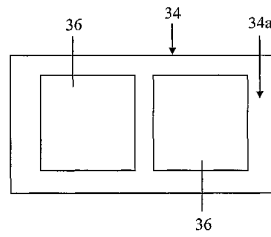


Fig. 2B

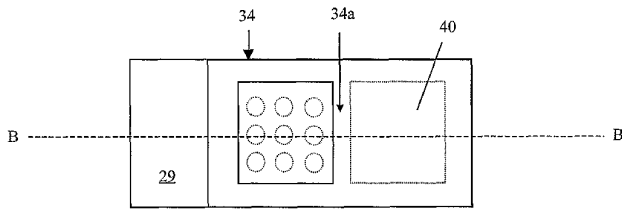


Fig. 2C

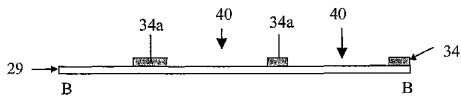


Fig. 2D

4/9

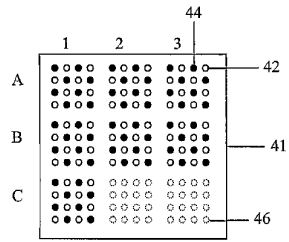


Fig. 3A

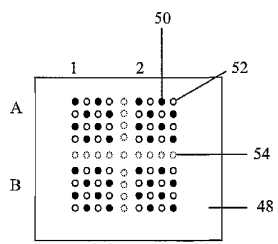
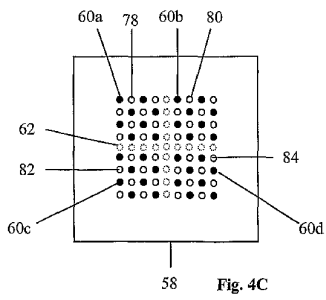
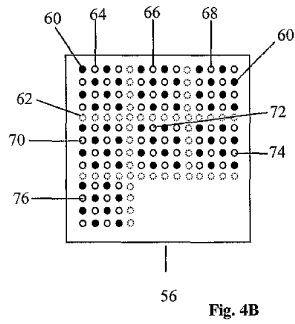
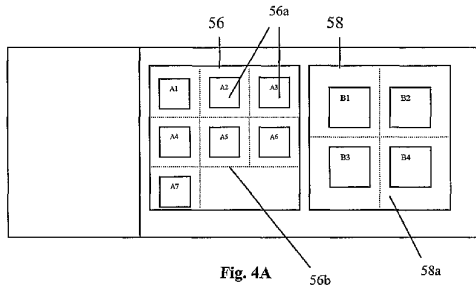


Fig. 3B

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

5/9



WO 02/077152

PCT/CN02/00209

6/9

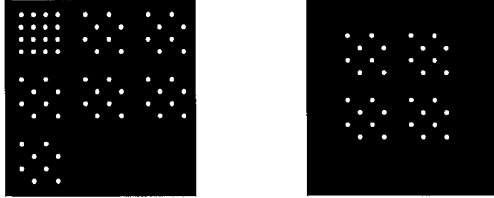


Fig. 4D



Fig. 4E

WO 02/077152

PCT/CN02/00209

7/9

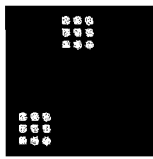
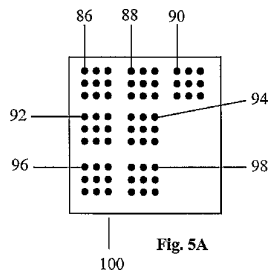


Fig. 5B

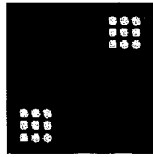


Fig. 5C

8/9

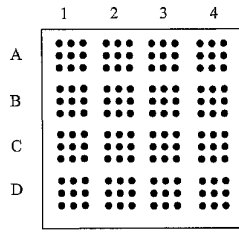


Fig 6A

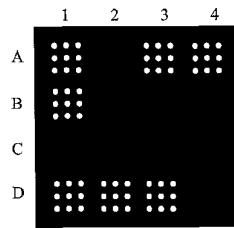


Fig. 6B

9/9

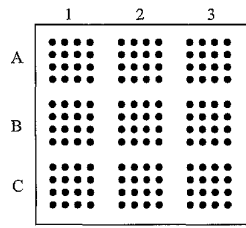


Fig. 7A

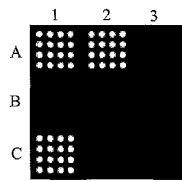


Fig. 7B

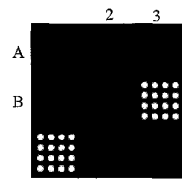



Fig. 7C

## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN02/00209
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC <sup>7</sup> : C12M1/20,G01N33/50,G01N33/53,C12Q1/70,C12Q1/68		
According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)		
IPC <sup>7</sup> : C12M1/20,G01N33/50,G01N33/53,C12Q1/70,C12Q1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched		
Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI,CNPT,PAJ,EPODOC		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	US 5874219 A, (AFFYMETRIX INC), C12Q1/68, 1999-02-23. See the abstract.	1-16
P,A	WO 01/34846 A2, (UNIV MINNESOTA), C12Q1/68, 2001-05-17. See the abstract.	1-16
P,A	CN2438121 Y, (WANG, Bin, and WANG, Mei), G01N33/53, 2001-07-04 See the abstract.	1-16
A	WO 99/04696 A1, (QUIAGEN GENOMICS INC., RAPIGENE INC.), B01J19/00, 1999-02-04. See the abstract.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"Z" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
04 June 2002 (04.06.02)	27 JUN 2002	
Name and mailing address of the ISA/ The Chinese Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China	Authorized officer	
Facsimile No. 86-010-62019451	ZENG,Fanhui Telephone No. 62093733	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/CN02/00209	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US5874219 A	1999-02-23	NONE	
WO01/34846 A2	2001-05-17	AU200136403 A	2001-06-06
CN2438121 Y	2001-07-04	NONE	
WO99/04896 A1	1999-02-04	AU8582598 A	1999-02-16
		EP0998347 A1	2000-05-10
		CN1265049 A	2000-08-30
		US6150103 A	2000-11-21
		HU200002488 A2	2000-11-28
		AU735546 B	2001-07-12
		JP2001510727T	2001-08-07
		NZ501968 A	2001-09-28

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78	C 1 2 M 1/34	Z
G 0 1 N 33/543	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 21/78	Z
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/543	5 4 5 B
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 33/569	
	G 0 1 N 33/574	E
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	A

- (31)優先権主張番号 01126115.3  
(32)優先日 平成13年7月12日(2001.7.12)  
(33)優先権主張国 中国(CN)  
(31)優先権主張番号 01126480.2  
(32)優先日 平成13年8月14日(2001.8.14)  
(33)優先権主張国 中国(CN)  
(31)優先権主張番号 01126929.4  
(32)優先日 平成13年9月29日(2001.9.29)  
(33)優先権主張国 中国(CN)  
(31)優先権主張番号 01126932.4  
(32)優先日 平成13年9月29日(2001.9.29)  
(33)優先権主張国 中国(CN)  
(31)優先権主張番号 01132292.6  
(32)優先日 平成13年11月23日(2001.11.23)  
(33)優先権主張国 中国(CN)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (74)代理人 100098316  
弁理士 野田 久登  
(74)代理人 100109162  
弁理士 酒井 將行  
(72)発明者 チェウン, トー  
中華人民共和国、ホンコン、スー・サイ・ワン・ロード、28、アイランド・リゾート、タワー・6、30/エフ、フラット・ディ  
(72)発明者 リー, ビン  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6/エフ、ナンバー・69  
(72)発明者 ペン, ヨンジ  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6/エフ、ナンバー・69  
(72)発明者 レン, イーピン

- 中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6 / エフ  
、ナンバー・69
- (72)発明者 ゴー, ハイボン  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6 / エフ  
、ナンバー・69
- (72)発明者 ドン, フーチャオ  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6 / エフ  
、ナンバー・69
- (72)発明者 ディン, リー  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6 / エフ  
、ナンバー・69
- (72)発明者 リー, ホンメイ  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6 / エフ  
、ナンバー・69
- (72)発明者 ツァイ, チーフオン  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6 / エフ  
、ナンバー・69
- (72)発明者 チェン, イン  
中華人民共和国、200233 シャンハイ、グイチン・ロード、ビルディング・25、6 / エフ  
、ナンバー・69

F ターム(参考) 2G054 AA07 AB04 AB05 BB13 CA22 CA23 CB02 CB03 CE03 EA03  
FA10 FA50 GA04 GB02  
4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 CA11 HA13 HA14  
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15  
4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR38 QR56 QR84 QS34 QS39  
QX02

专利名称(译)	用于检测多种分析物的装置和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004532404A</a>	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2002576595	申请日	2002-03-28
申请(专利权)人(译)	基因生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	チェウントー リービン ペンヨンジー レンイーピン ゴーハイボン ドンフーチャオ デインリー リーホンメイ ツアイチーフオン チェンイン		
发明人	チェウン,トー リー,ビン ペン,ヨンジー レン,イーピン ゴー,ハイボン ドン,フーチャオ デイン,リー リー,ホンメイ ツアイ,チーフオン チェン,イン		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/20 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N21/78 G01N33/50 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/54313		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.F G01N33/53.M G01N33/53.U C12M1/00.A C12M1/34.Z C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N21/78.Z G01N33/543.545.B G01N33/566 G01N33/569 G01N33/574.E G01N37/00. 102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/BB13 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CB02 2G054 /CB03 2G054/CE03 2G054/EA03 2G054/FA10 2G054/FA50 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029 /AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063 /QR56 4B063/QR84 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	森田俊夫 堀井裕 酒井 将行		
优先权	01105795.5 2001-03-28 CN 01112783.X 2001-04-27 CN 01113323.6 2001-07-11 CN 01126115.3 2001-07-12 CN 01126480.2 2001-08-14 CN 01126929.4 2001-09-29 CN		

外部链接

[Espacenet](#)

## 摘要(译)

提供了一种用于检测至少一个样品中的多种分析物的装置。该装置包括具有测试表面的固体基底。在测试表面处，限定至少一个反应区，其包括至少一个阵列的离散测试位点。将测试分子固定在这些测试位点的每一个上，并用不同的测试分子固定不同的测试位点。提供隔板用于附接到固体基板。隔板包括安装表面中的多个孔。安装表面与固态装置的测试表面互补，并且当安装这两个部件时，每个孔连接到测试表面的一部分以使多个防漏室可逆适合安装。腔室内的测试表面包括在腔室中暴露的多个测试位置。每个腔室优选地设置有外部可接近的开口，使得引入腔室的流体可以接触暴露的测试部位以进行测试。在本发明的另一方面，提供了一种用于分析同一样品中的多种分析物的方法。

スポット	スポット濃度	スポット径	結合反応時間
HBsAG	0.4mg/ml	160um	60-90分
HBsAb	2mg/ml	160um	60-90分
HBcAg	0.8mg/ml	160um	60-90分
HBcAb	2mg/ml	160um	60-90分
HBcAb	0.15mg/ml	160um	60-90分
HAV IgG	0.8mg/ml	160um	60-90分
HCV IgG	0.1mg/ml	180um	60-90分
HDV IgG	0.125mg/ml	160um	60-90分
HEV IgG	0.8mg/ml	150um	60-90分