

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 528311

(P2003 - 528311A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N 21/47		G 0 1 N 21/47	A 2 G 0 5 4
21/77		21/77	Z 2 G 0 5 9
33/53		33/53	M
33/566		33/566	
37/00	102	37/00	102
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 56数)			

(21)出願番号 特願2001 - 569258(P2001 - 569258)

(86)(22)出願日 平成13年3月22日(2001.3.22)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月19日(2002.9.19)

(86)国際出願番号 PCT/CA01/00367

(87)国際公開番号 W001/071322

(87)国際公開日 平成13年9月27日(2001.9.27)

(31)優先権主張番号 60/191,344

(32)優先日 平成12年3月22日(2000.3.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ゴー , エム . , シンシア
カナダ国 エム6ジー 1ヴィ8 オンタリオ
 , トロント , パルマーストン ガーデンス
11

(71)出願人 ゴー , ジェーン , ビー .
カナダ国 エム5アール 3ビー7 オンタリ
オ , トロント , ハウランド アヴェニュー
265

(71)出願人 マカロニー , リチャード
カナダ国 ケー1アール 7エス7 オンタリ
オ , オタワ , スラター ストリート 1614 -
400

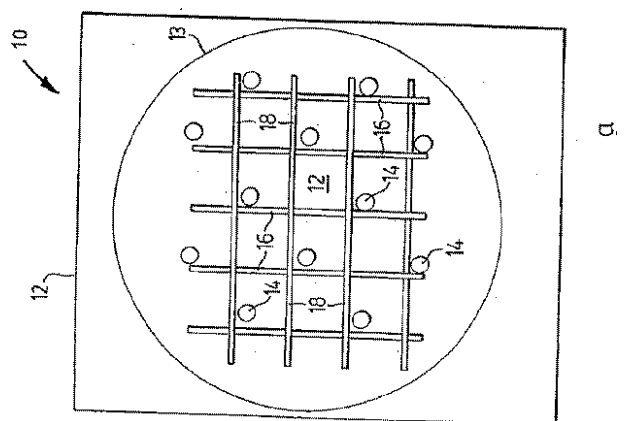
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 複数アナライトのアクセイ方法およびアクセイ装置

(57)【要約】

複数アナライトのアクセイのための方法および装置。本方法は、その上に複数の識別素子が配置されていて、各々の素子は所定のパターンで配置されている基板を含んでなるセンサーを使用するものである。各パターンは、本アクセイにおいて、特徴的な回折パターンを生じさせることができるという点において特有なものである。本パターンは、基板表面上で互いに貫き合ってもよく、また貫き合っていないてもよい。複数アナライトを検出する本方法は、アナライトの媒体を、パターニングされた基板と接触させる段階；光源によって該基板を照射する段階；および生じる回折像を検出する段階を含んでなる。回折パターンおよび回折シグナルの強度によって、特定のアナライトの存在およびその量に関する情報が得られる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも2種類のアナライトの有無を検出する光回折法アッセイで使用されるセンサーにおいて、

表面を有し、該表面上に、第1のアナライト特異的受容体を含んでなる第1のパターンおよび、少なくとも、第2のアナライト特異的受容体を含んでなる第2のパターンを有する基板であって、該各パターンが互いに異なる回折パターンに対応している基板を有することを特徴とする、上記センサー。

【請求項2】 前記少なくとも2種類のパターンが、該基板表面上の所定領域で互いに貫き合っている、請求項1に記載のセンサー。

【請求項3】 前記少なくとも2種類のパターンが、互いに近接した位置にあるが、該基板表面上で互いに貫き合っていない、請求項1に記載のセンサー。

【請求項4】 前記少なくとも2種類のパターンが該表面上の1つの選択された領域内に形成されており、該基板の表面の上に複数の選択された領域を有する場合は該基板表面の各選択された領域がその上に少なくとも2種類のパターンを有する、請求項1に記載のセンサー。

【請求項5】 前記アナライト特異的受容体が、抗体 - 抗原、酵素 - 阻害物質、核酸またはオリゴヌクレオチドの相補鎖、受容体 - ホルモン、受容体 - エフェクタ、酵素 - 基質、酵素 - 補因子、糖タンパク質 - 炭水化物、結合性タンパク質 - 基質、抗体 - ハプテン、タンパク質 - リガンド、タンパク質 - 核酸、タンパク質 - 小分子、タンパク質 - イオン、細胞 - 細胞に対する抗体、小分子 - その小分子に対する抗体、キレート剤 - 金属イオンおよび空気感染病原体 - 関連する空気感染病原体受容体、からなる群から選択される結合対の構成員の一方である、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項6】 前記アナライト特異的受容体のうちの 하나가、該アナライトに関してスクリーニングされる媒体中に存在する既知標準についてのアッセイを行う、請求項1～3のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項7】 前記アナライト特異的受容体が、該基板の表面に直接形成された表面凹凸パターンを有する、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項 8】 前記基板の該表面上に直接配置された介在層を有し、該アナライト特異的受容体パターンが該介在層上に設けられている、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のセンサー。

【請求項 9】 前記介在層が、あるパターンでのアビジン層であり；該アナライト特異的受容体が、該パターンニングされたアビジン層と結合するようビオチン処理されたアナライト特異的受容体である、請求項 8 に記載のセンサー。

【請求項 10】 前記基板が、ガラス、シラン処理ガラス、シリコン、二酸化ケイ素、ポリマー、金属、金属酸化物、金属フィルム、金属酸化物フィルム、金属を含む部分もしくは全反射基板、ならびに金属コーティング基板からなる群から選択される、請求項 1 に記載のセンサー。

【請求項 11】 前記基板が対向する表面を有し、該対向する表面の両方にアナライト特異的受容体パターンが形成されている、請求項 1 に記載のセンサー。

【請求項 12】 前記基板がディップスティックである、請求項 1 に記載のセンサー。

【請求項 13】 前記基板がその上に、該少なくとも 2 種類のパターンにどのアナライト特異的受容体が存在するかを識別する、コード化された指示を有する、請求項 1 に記載のセンサー。

【請求項 14】 媒体中の少なくとも 2 種類のアナライトを同時に検出する回折結合アッセイ方法において、

表面を有し、該表面上に、第 1 のアナライト特異的受容体を含んでなる第 1 のパターンおよび少なくとも、第 2 のアナライト特異的受容体を含んでなる第 2 のパターンを有する基板であって、該各パターンが互いに異なる回折パターンに対応している基板を提供する段階；

溶液中に存在する所定のアナライトがそのアナライト特異的受容体と結合できるだけの時間にわたって、該基板の該表面を該媒体と接触させる段階；ならびに

該基板に光照射し；該基板表面からの回折光を検出し；1 以上のアナライトのそのアナライト特異的受容体との結合を表示する回折像の存在に関して該回折

光を分析し；該回折像から該媒体中に存在する1以上のアナライトを同定する段階

を有することを特徴とする方法。

【請求項15】 前記基板の光照射が、該少なくとも2種類の各パターンの少なくとも一部を照射するのに十分な領域の該基板を照射するものである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記基板の光照射が、該パターンを一度に照射するものである、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 1以上のアナライトのそのアナライト特異的受容体との結合を表示する回折像の存在に関して該回折光を分析する操作に、該光照射領域からの該回折像を保存する操作が含まれる、請求項15に記載の方法。

【請求項18】 前記媒体への該基板表面の曝露に先だって該基板表面からの光回折を検出して、アナライト非存在下での該基板およびアナライト特異的受容体パターンによる基底線回折像を得る段階を有し、該基底線回折像を保存する段階を有する、請求項15または17に記載の方法。

【請求項19】 1以上のアナライトのそのアナライト特異的受容体との結合を表示する回折像の存在に関して前記回折光を分析する操作に、該回折像と前記基底線回折像とを比較する操作が含まれる、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記光源が、実質的にコヒーレントで単色のレーザー光線を発するレーザーである、請求項15に記載の方法。

【請求項21】 前記レーザーが、赤外、可視または紫外の光を発する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記基板が実質的に透明であり、前記表面を前記基板の片側から光照射し、前記基板からの該回折光を該基板の反対側で検出する、請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】 前記基板が部分反射性であり、該表面をその片側から光照射し、該基板の同じ側で回折光を検出する、請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】 前記基板が反射性であり、該表面をその片側から光照射し

、該基板の同じ側で回折光を検出する、請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】 前記基板の該表面と所定のアナライトについてスクリーニングが行われる媒体とを接触させた後、該基板を洗浄し、乾燥させてから光照射する、請求項14～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】 前記基板の表面を媒体と接触させる段階が、該基板を、アナライトのスクリーニングが行われる媒体が入ったセル内に置く操作を含み、該セルが、in situで該媒体中のアナライトを検出するための光が通過する少なくとも1個の光学窓を有している、請求項14～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】 前記得られる回折像の選択領域の強度を、時間の関数としてモニタリングする、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記基板を照射する光を、有効な角度で該基板の方向に向けて、該光が該基板/媒体界面で全反射するようにする、請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】 前記アナライト特異的受容体が、抗体-抗原、酵素-阻害物質、核酸またはオリゴヌクレオチドの相補鎖、受容体-ホルモン、受容体-エフェクタ、酵素-基質、酵素-補因子、糖タンパク質-炭水化物、結合性タンパク質-基質、抗体-ハプテン、タンパク質-リガンド、タンパク質-核酸、タンパク質-小分子、タンパク質-イオン、細胞-細胞に対する抗体、小分子-その小分子に対する抗体、キレート剤-金属イオンおよび空気感染病原体-関連する空気感染病原体受容体、からなる群から選択される結合対の構成員の一方である、請求項14～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】 前記基板が、ガラス、雲母、研磨シリコン、二酸化ケイ素、ポリマー材料、実質的に透明なポリマー材料、金属を含む部分もしくは全反射性基板および金属コーティング基板からなる群から選択される、請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】 前記基板の表面とスクリーニングが行われる前記媒体との接触の後で、且つ前記表面の選択された領域を光照射する前に、該基板の表面と

該結合したアナライトに結合する標準材料を含む媒体とを接触させる段階を有する、請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】 前記標準材料が、タンパク質、金属コロイド、ポリマーコロイド、コロイド状シリカ、量子ドットまたはそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項33】 前記媒体が、血液、血清、血漿、尿からなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項34】 光の回折を使用する媒体中のアナライト検出のための装置において、

光源；

表面を有し、該表面上に、第1のアナライト特異的受容体の第1のパターンおよび、少なくとも、第2のアナライト特異的受容体を含んでなる第2のパターンを有し、該各パターンが互いに異なる回折パターンに対応している基板を含むセンサーであって、該光源が該基板表面を光照射するように配置されているセンサー；

該センサーとの関係において、該光照射表面からの回折光を検出するように配置された検出手段；ならびに

1以上のアナライトと、そのアナライト特異的受容体との結合を表示する回折像の存在について該回折光を分析し、該回折像から、該媒体中に存在する1以上のアナライトを同定するための処理手段

を有することを特徴とする装置。

【請求項35】 前記処理手段が該検出手段に接続されており、該回折光に相当する、該検出手段からの出力であるシグナルを保存する保存手段を有し；該処理手段が、該回折像をデコンボリューション（逆重畳）する画像解析手段を有する、請求項34に記載の装置。

【請求項36】 前記処理手段が、時間の関数として、保存された該回折光から、該アナライトとアナライト特異的受容体との結合の相互作用の動力学を計算するシグナル処理手段を有する、請求項35に記載の装置。

【請求項37】 前記光源が、コヒーレントで単色の平行光線を発生する、

請求項34に記載の装置。

【請求項38】 前記光源が、UV、可視、近赤外または赤外波長での発光を行うレーザーである、請求項34に記載の装置。

【請求項39】 前記基板表面を照射する光が光ファイバーによって送られる、請求項34に記載の装置。

【請求項40】 アナライトについてのスクリーニングが行われる前記媒体を入れるためのチャンバーを内包するセルを有し；該セルが、前記基板の前記選択領域が該媒体と接触した状態で前記基板を受け入れるよう作製されており；該セルが、in situで該媒体中のアナライトを検出するための光が通過する少なくとも1個の光学窓を有する、請求項34～38のいずれか1項に記載の装置。

【請求項41】 前記基板の表面の光照射に使用される光が、該基板/媒体界面で全反射する、請求項34～40のいずれか1項に記載の装置。

【請求項42】 前記セルが、該セルを通る媒体の連続流用の流体導入口および流体排出口を有する、請求項40または41に記載の装置。

【請求項43】 前記基板が、ガラス、シラン処理ガラス、シリコン、二酸化ケイ素、ポリマー、金属、金属酸化物、金属フィルム、金属酸化物フィルム、金属を含む部分もしくは全反射性基板および金属コーティング基板からなる群から選択される、請求項34に記載の装置。

【請求項44】 前記検出手段が撮像装置である、請求項34に記載の装置。

【請求項45】 前記撮像装置が、電子撮像装置である、請求項44に記載の装置。

【請求項46】 前記撮像装置がカメラである、請求項44に記載の装置。

【請求項47】 前記検出手段が、フォトダイオード検出器、光電子増倍管、アバランシェフォトダイオードおよび位置感応フォトダイオードのうちのいずれかを含む、請求項34に記載の装置。

【請求項48】 前記撮像装置がマトリクスアレイ検出器である、請求項45に記載の装置。

【請求項49】 前記マトリクスアレイ検出器がCCD検出器アレイである、

請求項48に記載の装置。

【請求項50】 前記アナライト特異的受容体が、抗体 - 抗原、酵素 - 阻害物質、核酸またはオリゴヌクレオチドの相補鎖、受容体 - ホルモン、受容体 - エフェクタ、酵素 - 基質、酵素 - 補因子、糖タンパク質 - 炭水化物、結合性タンパク質 - 基質、抗体 - ハプテン、タンパク質 - リガンド、タンパク質 - 核酸、タンパク質 - 小分子、タンパク質 - イオン、細胞 - 細胞に対する抗体、小分子 - その小分子に対する抗体、キレート剤 - 金属イオンおよび空気感染病原体 - 関連する空気感染病原体受容体、からなる群から選択される結合対の構成員の一方である、請求項34に記載の装置。

【請求項51】 前記アナライト特異的受容体の一つが、前記アナライトについてスクリーニングが行われる媒体中に存在する一つの既知のアナライトに関するアッセイを行う、請求項34に記載の装置。

【請求項52】 前記アナライト特異的受容体が、該基板上に直接、前記パターンで配置されている、請求項34に記載の装置。

【請求項53】 前記基板の表面上に直接形成された介在層を有し、前記アナライト特異的受容体パターンが該介在層上に配置されている、請求項34に記載の装置。

【請求項54】 前記介在層が、あるパターンでのアビジン層であり；前記アナライト特異的受容体が該パターンニングされたアビジン層と結合するためビオチン処理されたアナライト特異的受容体である、請求項53に記載の装置。

【請求項55】 光回折法アッセイで使用されるセンサーの製造方法において、

基板表面上の選択された領域内に、第1のアナライト特異的受容体の第1のパターンをデポしてそこに固定化し、且つ、少なくとも、第2のアナライト特異的受容体を含んでなる第2のパターンをデポしてそこに固定化する段階を有し、該各パターンが他のものとは異なる回折パターンに対応していることを特徴とする方法。

【請求項56】 前記少なくとも2種類のパターンが、前記基板表面上の所定の領域で互いに貫き合っている、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 前記少なくとも2種類のパターンが、互いに近接してデポされているが、前記基板表面上で互いに貫き合っていない、請求項55に記載の方法。

【請求項58】 各パターンが、アナライト特異的受容体を含む材料を液体中で混合し、前記基板表面上に各パターンを印刷してから、乾燥を行うことで形成される、請求項55に記載の方法。

【請求項59】 各パターンが、アナライト特異的受容体を含む材料を液体中で混合し、各パターンを前記基板表面上に印刷してから、各パターンを、該基板に該材料を共有結合的に結合させる作用物質に曝露させることで形成される、請求項55に記載の方法。

【請求項60】 前記作用因子が光である、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 パターンの印刷を、前記パターンに対応する表面形状を有するエラストマー製スタンプを用いるマイクロ接触印刷によって行う、請求項53～55のいずれか1項に記載の方法。

【請求項62】 前記パターンを、インクジェット印刷を用い、ロボット操作を用いて形成する、請求項55～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】 前記基板表面上に直接介在層を成膜する段階を有し、前記アナライト特異的受容体パターンを該介在層の上面にデポさせる、請求項55に記載の方法。

【請求項64】 前記介在層が、あるパターンでのアビジン層であり、且つ、前記アナライト特異的受容体が、該パターンニングされたアビジン層と結合するビオチン化アナライト特異的受容体である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】 前記基板の表面全体に前記光源をラスター走査する手段を有する、請求項34に記載の装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、媒体中の複数のアナライトを検出するための方法および装置に関するものであり、詳細には本発明は、基板上のパターンに配置された特異的受容体へのアナライトの結合によって生じるまたは変化する光回折に基づくアッセイ方法に関する。

【0002】**発明の背景**

多くの場合、溶液（「媒体」）中の特定の材料の存在および量を測定するのが望ましい。表面に基づくアッセイは、アッセイされる物質（「アナライト」）と表面との相互作用であって、何らかの測定可能な特性における検出可能な変化を生じる相互作用に依存するものである。本特許出願に関して、「アナライト」という用語はアッセイ対象の物質を指す。アナライトの例には、イオン；小分子；タンパク質もしくはDNAなどの大分子または大分子集合体；細胞または細胞集合体；細菌もしくはウィルスなどの生物などがある。「アナライト特異的受容体」または「識別素子」とは、相手アナライトに優先的に結合する相補的要素を指す。それには、分子または分子の集合；タンパク質もしくはDNAなどの生体分子または生体分子の集合；相補的幾何形状および／または相互作用を有する基板上の溝、などがあると考えられる。一般に特異的アナライトについてのアッセイを行うためには、表面を修飾して、適切な化学的相互作用を提供するようにする。イムノアッセイでは例えば、抗体 - 抗原相互作用の特異性を利用する。つまり、表面を抗原でコーティングして、溶液中でのその対応する抗体の存在についてアッセイを行うことができる。同様に、デオキシリボ核酸（DNA）鎖を基板に結合させ、それを用いて溶液中でその相補鎖の存在を検出することができる。これらのいずれの場合でも、アナライトと、その表面上にあるその識別素子への結合が起こると、すなわちこのことは溶液中に特異的アナライトが存在することを確認することになるが、それには検出可能な変化が伴う。例えばこの結合は、その界面層における屈折率変化を生じさせることができる。これは、偏光解析法ま

たは表面プラスモン共鳴によって検出することができる。これとは別に、前記の結合したアナライト分子が発光する場合がある。この発光は、蛍光に基づくセンサーの場合のように、集光して検出することができる。ラジオイムノアッセイおよび音波感知装置の場合のように、非光学的シグナルも使用可能である。

【0003】

回折は、光の波動性によって生じる現象である。光が端部に当たるあるいは、小さい開口を通過すると、様々な方向に散乱する。しかし、光波は干渉して互いに加算（構築的）および減算（破壊的）することから、光が非ランダムパターンの障害物に当たると、これらの構築的および破壊的干渉は、明瞭で識別可能な回折パターンを生じる。具体的な例は、回折格子の回折パターンがあるが、この回折格子は、代表的には表面上に直線で平行な溝を引くことによって作られる均一間隔に配置された線からなるものである。そのような表面への入射光は、高い光強度の等間隔に分離されたスポットのパターンを生じる。これはブラッグ散乱と称され、スポット（または「ブラッグ散乱ピーク」）間の距離は、回折パターンおよび光源波長の固有関数である。パターンとその回折像との間には固有の対応がある。ただし実際には、回折は周期的パターンを用いることで最も良く示される。それは、それらのパターンが高光強度および低光強度の明瞭に規定される領域の容易に識別される回折像を生じるからである。

【0004】

回折法は一般には、分子構造の研究に用いられる。具体的にはX線回折は、化合物の同定およびタンパク質構造の決定に用いられる。しかしながらこれまで、特に光学分野での回折の原理が、アッセイでの使用に供されることは希であった。

【0005】

米国特許第4647544号（光干渉検出を用いるイムノアッセイ）には、リガンドもしくは抗体を基板上で所定のパターン、好ましくはストライプ状で配置し、リガンドと抗リガンドとの間または抗体と抗原との間の結合を、光干渉によって生じると予想されるブラッグ散乱角に設定された光検出器によって検出する光学装置および方法が記載されている。リガンドまたは抗体のパターンは、先ず基板上

に抗体の均一層を配置し、次にその被覆層の部分を失活させることで形成する。

【0006】

米国特許第4876208号（回折イムノアッセイ装置および方法）には、結合対象となり得る生体プローブの等間隔配置された線のパターン（「生体回折格子」）を有するシリコンもしくはポリシリコン基板に基づくイムノアッセイ用の装置および試薬について記載されている。そのパターンは、最初に基板を均一な抗体層でコーティングし、次にマスクおよび紫外（UV）光を用いて領域の失活を行うことで形成する。その考え方は、米国特許第5089387号（DNAプローブ回折アッセイおよび試薬）におけるDNAのアッセイに応用され、その特許は生成回折格子およびその製造方法を記載しており、その製造方法は、最初に平滑表面上にハイブリダイゼーション剤の均一層を固定化し、次にこの表面を、回折格子線を有するマスクを通してUV照射に曝露することにより行われる。UV露光によってハイブリダイゼーション剤が失活して、活性ハイブリダイゼーション剤の線のパターンが残る。

【0007】

回折によるアッセイに関する上記特許は必然的に、単一アナライトの場合に限定される。米国特許第4876208号および5089387号では、基板のいくつかの領域上に、異なるアナライト特異的受容体の同一パターンで生体格子を形成し、次に他のものとは独立に測定される各パターンによる回折を測定することによって、上記の方法を複数アナライトの場合に応用している。

【0008】

米国特許第5922550号（回折像を形成する生物感知装置）には、金属でコーティングされたポリマー膜上に、受容体を含む自己集合単層の所定パターンを有することに基いた、媒体中のアナライトの検出および定量のための装置および方法について記載されている。アナライトの大きさが、透過光の波長と同レベルであることで、その結合によって肉眼で観察される回折パターンが生じる。この特許にはさらに、金属コートポリマー上の受容体の自己集合単層のマイクロ接触印刷によるパターンニング表面の製造方法も記載されている。これは、米国特許第6060256号（光学回折バイオセンサー）における受容体（必ずしも自己集合性とは

限らない)の所定パターンの場合に応用されている。金属基板上への自己集合単層のマイクロ接触印刷の技術は、米国特許第5512131号(表面および派生品上でのマイクロスタンプパターンの形成)に記載されている。

【0009】

マイクロ接触印刷は、エラストマー製スタンプを用いて表面上にマイクロメートルレベルの寸法のパターンを形成する技術である。パターンニング形成される材料は「インク」として使われ、スタンプを表面に接触させることで転写される。シリコン、二酸化ケイ素、ポリスチレン、ガラスおよびシラン処理ガラス上でのタンパク質のマイクロ接触印刷は、ベルナルドらの報告(Bernard, A; Delamarche, E.; Schmid, H.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Biebuyck, H.; "Printing Patterns Of Proteins" Langmuir (1998), 14,2225-2229)に報告されている。

【0010】

表面に基づくアッセイにおいて回折技術を利用するには、受容体でパターンニングされた材料を製造できることが重要であり、上記5特許にそれを行う方法が説明されている。さらに、文献にある他の方法をパターンニングに利用することが可能である場合もある。例えば、フォトリソグラフィー法を用いて、各列が異なる種類の物質であるような列状に、基板上にオリゴヌクレオチドを固定化している。米国特許第5831070号および5599695号には、気相で脱保護剤を用いることでそれを行う方法が示してある。この手法は回折アッセイのパターン形成には今まで用いられていないが、適切なマスクを設計することでそれに適応可能である。

【0011】

光の回折を利用して複数のアナライトを同時にアッセイする方法を提供することは非常に有利であると考えられる。

【0012】

発明の概要

本発明の目的は、光の回折を用いて複数アナライトの同時アッセイを行う方法を提供することにある。

【0013】

この目的によれば本発明は、媒体中の複数のアナライトを検出する方法を提供

する。その方法には、各種類の受容体が別個のパターンを画定するように、固体基板表面上にアナライト特異的受容体を配置する段階がある。1以上のアナライトを含む媒体への本基板の曝露により、各アナライトとそのアナライト特異的受容体との間に結合事象が生じる。その結合事象によって、アナライトの存在を導くことができる回折像が得られる。

【0014】

本発明の1態様においては、少なくとも2種類のアナライトの有無を検出する光回折法アッセイで使用するセンサーにおいて、

表面を有し、前記表面上に第1のアナライト特異的受容体を含んでなる第1のパターンおよび少なくとも第2のアナライト特異的受容体を含んでなる第2のパターンを有する基板であって、前記各パターンが互いに異なる回折パターンに対応している基板を有することを特徴とするセンサーが提供される。

【0015】

本発明の別の態様においては、媒体中の少なくとも2種類のアナライトを検出する回折結合アッセイ方法において、

表面を有し、前記表面上に第1のアナライト特異的受容体の第1のパターンおよび少なくとも第2のアナライト特異的受容体を含んでなる第2のパターンを有する基板であって、前記各パターンが互いに異なる回折パターンに対応している基板を提供する段階；

溶液中に存在する所定のアナライトがそのアナライト特異的受容体と結合できるだけの時間にわたって、前記基板の前記表面を前記媒体と接触させる段階；
ならびに

前記基板に光照射し；前記基板表面からの回折光を検出し；1以上のアナライトのそのアナライト特異的受容体との結合を代表する回折像の存在に関して前記回折光を分析し；前記回折像から前記媒体中に存在する1以上のアナライトを同定する段階

を有することを特徴とする方法が提供される。

【0016】

本発明のこの態様においては、前記基板の光照射には、前記少なくとも2種類

の各パターンの少なくとも一部もしくは全てを照射するだけの前記基板の領域を照射する手法があり得る。別法として、前記基板の光照射は、1回で前記パターンを光照射することを含み得る。

【0017】

本発明の別の態様では、光の回折を利用する媒体中のアナライト検出のための装置において、

光源；

表面を有し、前記表面上に第1のアナライト特異的受容体の第1のパターンおよび少なくとも第2のアナライト特異的受容体を含んでなる第2のパターンを有し、前記各パターンが互いに異なる回折パターンに対応している基板を含むセンサーであって、前記光源が前記基板表面を光照射するよう配置されているセンサー；

前記センサーとの関係において、前記被光照射表面からの回折光を検出するように配置された検出手段；ならびに

1以上のアナライトのそのアナライト特異的受容体に対する結合を代表する回折像の存在について前記回折光を分析し、前記回折像から前記媒体中に存在する1以上のアナライトを同定するための処理手段

を有することを特徴とする装置が提供される。

【0018】

前記センサー基板は、透明であって、アナライト-特異的受容体がパターンニングされた2つの対向表面を有していてもよい。このアッセイは、前記基板の両面と前記媒体を、例えば浸漬によって接触させることで行う。

【0019】

図面の簡単な説明

以下、例示のみを目的として添付の図面を参照しながら本発明を説明する。

【0020】

図1aは、基板表面上の同一領域に交互配置された3種類のパターンを用いて、アナライト特異的受容体の3種類のパターンを有する2種類以上のアナライトを検出する回折アッセイ用のセンサーの平面図である。

【0021】

図1bは、基板表面上に互いに隔てて配置された3種類のパターンを用いて、アナライト特異的受容体の3種類のパターンを有する2種類以上のアナライトを検出する回折アッセイ用のセンサーの平面図である。

【0022】

図2aは、透過型構成を用いる本発明によるアッセイを行うための装置を模式的に示す図である。

【0023】

図2bは、反射型構成を用いるアッセイを行うための装置を模式的に示す図である。

【0024】

図2cは、シグナルを検出器に向かわせる回転ミラー型構成を用いるアッセイを行うための装置を模式的に示す図である。

【0025】

図3aは、静的モードでのアッセイを行うためのセルの斜視図である。

【0026】

図3bは、本発明のアッセイを行うために構築されたフローセルの1実施形態を示す断面図である。

【0027】

図3cは、本発明によって構築されたフローセルの別の実施形態の透視図である。

【0028】

図3dは、全反射を用いるフローセルの断面図である。

【0029】

図4は、ミクロ接触印刷によってヤギ免疫グロブリンG(IgG)でパターンニングされ、原子間力顕微鏡観察によって目視できるようにされたガラス基板を示す。

【0030】

図5は、同じパターンを有するが互いに関して約90°回転しているヤギIgGお

よびウサギIgGの両方用のスタンプを用いたマイクロ接触印刷によって得られた、両IgGでパターンニングされたガラス基板を示す図であって、像は原子間力顕微鏡観察によって得たものである。

【0031】

図6は、同じパターンを有するが互いに関して約30°回転されているマウスIgGおよびウサギIgGの両方用のスタンプを用いたマイクロ接触印刷によって得られる両IgGでパターンニングされたガラス基板を示す図であって、像は原子間力顕微鏡観察によって得たものである。

【0032】

図7は、ウサギおよびマウスIgG交差スタンプ基板を、図に示した溶液で順次処理した場合の効果を示す図である。

【0033】

図8は、ビオチンおよびフルオレセイン（いずれもウシ血清アルブミン（BSA）コンジュゲートとして）交差スタンプ基板を、図に示した溶液で順次処理した場合の効果を示す図である。

【0034】

図9は、図に示された溶液で順次処理することで1本鎖DNAの検出を行う上で、アビジンがスタンプ印刷された基板の使用を示す図である。

【0035】

図10は、抗ウサギIgGの濃度を上昇させていったときのウサギIgGでパターンニングした基板の力価測定を示す図である。

【0036】

図11は、ビオチン - BSAでパターンニングされた基板をストレプトアビジン溶液で処理したことで生じるシグナルの経時変化を示す図である。

【0037】

発明の説明

本発明は、光回折を用いて、基板の同じ領域にある複数のアナライトのアクセシを行う方法を提供する。その方法は、1つのパターンとその回折像との間の固有の対応関係を利用して、特異的アナライトの有無を評価するものである。ア

ナライト特異的受容体は、各種類の受容体が特有のパターンを画定するように、直接または介在層を介して、固体基板表面上に配置される。本特許の目的のために、2種類のパターンが互いに区別できる回折パターンに対応している場合に、それらのパターンは「区別可能」または「特有」であると考える。本固体基板は、透明であるか、部分透明であるか、あるいは入射光の波長で反射することができる。透明基板の場合、アナライト特異的受容体を、基板の片面または両面にパターンニングすることができる。

【0038】

図1 aおよび1 bは、基板上の識別素子の2種類の可能なパターンの配置の代表的な図を示すものである。図1 aについて説明すると、10で示したセンサーは、複数の識別素子を有する基板12を含む。この例では、3種類の異なる識別素子14、16および18があり、各識別素子が基板表面上で特有のパターンに配置されている。この実施形態においては、パターン14、16および18は、基板12の所定の領域で互いに貫き合っている。円13によって画定される光照射下では、円形13内の異なるパターンの各部分が同時光照射される。図1 bには、互いに区別可能な3種類の異なる特有のパターン21、23および25で配置された（この場合各パターンは互いに貫き合っていない）3種類の異なるアナライト特異的受容体を有する基板12'を有する別のセンサー20を示してある。

【0039】

特異的結合が可能である識別素子（例：タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体など）が所定パターンで表面上に配置されたら、アッセイ対象の媒体を本基板と接触させて、媒体中に存在するアナライトがその相補的識別素子に結合できるようにする。特定のアナライトが媒体中に存在すると、アナライトとその相補的識別素子との間のその後の結合事象には、基板上の層の局所厚さおよび／または局所屈折率の変化が伴う。厚さ変化および屈折率変化のいずれも、結合が起こった領域における基板と媒体との間の界面での光学特性に変化を与える。識別素子は所定のパターンで基板上に存在することから、基板上に入射する光は均一には散乱されずに、回折される。本発明の1実施形態では、パターンニングされた基板は非回折性であり、結合事象は結果的に観察可能な回折像になる。別の実施

形態では、パターンニングされた基板自体が観察可能な回折像を生じるが、結合事象が回折シグナルの強度を変える。

【0040】

回折光のパターン（「回折像」）は、基板上の特有のパターンに対応する。アッセイは次のように行う。基板を複数のアナライト特異的受容体、例えばRA、RB、RCでパターンニングして、各種類の受容体がそれぞれ異なるパターンPA、PB、PCを画定するようにする（パターンは、それらが個別に識別可能な回折像、例えばそれぞれDA、DB、DCに対応する場合、区別可能であると見なされる。1種類のみのアナライト、例えば受容体RAに対して相補的であるAAが存在する場合、前記アナライトはその相手に結合することから、受容体RAのパターンに対応するパターンが、その結合事象による屈折率および/または基板より上の高さにおける変化によって強調表示される。パターンニングされた基板が最初に非回折性である場合、結合事象によって、DAのように見える回折像が出現する。それゆえ、DAのように見える回折像が観察されたら、受容体RAに結合したアナライトAAの存在を直ちに特定することになり、従って、元の媒体中でのAAの存在を特定することになる。明領域でのシグナル強度（例えば、パターンが格子状であった場合のブラッグピーク）は結合の量を反映し、そして検定を行って結合アナライトの定量を行うことができる、すなわち定量的アッセイに寄与する。複数のアナライト、例えばそれぞれRA、RB、RCに対する相補的相手であるAA、AB、ACが存在する場合、結合事象によって、DA、DBおよびDCの非加算合成画像である回折像が得られる。すなわち、パターンDA、DBおよびDCがその観察された回折像で存在するが、別の形体のものも存在する。その場合、アッセイは以下のいずれかの方法によって行うことができる。（1）完全回折像をコンピュータに保存し、画像処理および計算手段を用いて、その像を個々のパターンにデコンボリューション（逆重畳）する。（2）本発明の好ましい実施形態では、回折像の特定領域におけるシグナルの出現または変化は、特定のアナライトの存在を表している。例えば、DAに特徴的であるがDBやDCにそうではない明領域の出現は、AAの存在に対するよい指標である。同様な領域をABおよびACに対しても位置決めすることができ、電子的な検出を用いる場合は、それらのシグナル強度を検定して（1種類のみのアナライトの

場合のように)、定量的アッセイを行うことができる。アナライトおよびアナライト特異的受容体パターンが多く存在するほど、観察される回折像は複雑となる。それゆえ、互いにできるだけ区別可能なパターンを選択して、アッセイを容易にすることが重要である。また、簡単な場合には、肉眼観察でパターンの区別を示すのに十分な場合がある。すなわち、その回折像がDBではなくてDAに対応するものであることを明瞭に視認することができる。しかしながら、複雑さが増すと、本発明の好ましい実施形態は、より効果的な比較を可能とする撮像装置を用いる。1実施形態では、検出器が回折像を電子シグナルとして得、そしてこれはコンピュータに保存され、そして画像処理が行われる。別の実施形態では、そのような解析を円滑に行うコンピュータの中にデータが直接保存される。例えば、画像の特定画素での強度変化は、特定の結合事象を表す。その後者の場合、そのデータは、コンピュータにプログラム化されているか、あるいは基板自体にコードされていて、アッセイの際に装置によって読み取ることができる。

【0041】

図2aを参照するに、本発明に従ってアッセイを行う装置が30で示してある。装置30は透過用に構成されており、光源32、表面に設けられたパターンニングされた識別素子を有する基板10、ならびに光が基板を透過した後にその光を検出するための検出器34を有する。図2bには、反射モードで動作する構成となっている、本発明に従って構築される装置の1つの実施形態を40で示してある。図2cには、基板10を透過したシグナルを検出器34の方向に向けるための回転ミラー11を含む透過モードで使用される装置50の1つの実施形態を示してある。同様の設計を、反射型構成の別の実施形態で用いることができる。

【0042】

光源32は、単色光線、代表的には紫外から赤外の範囲の波長を有する光を発生させることができるが、好ましくはレーザー(例:ダイオード、He-Ne、Nd:YVO₄、アルゴンイオン)から発生すると考えられるものなどのコヒーレントな平行光線である。それは、低パワーの連続波レーザーであってもよい。基板10は、図2aで使用される光の波長に関して光学的に透過性または半透過性の基板であることができるか、あるいは図2bおよび2cに示したように反射性または部分反射

性であることができる。本発明の1実施形態では、入射光は光ファイバーによって基板に送られる。本発明の別の実施形態では、入射光が基板上で走査（ラスタ）されて、1回で1以上の識別素子が光照射される。各パターンは異なっており、またどのアナライトがそのパターンと結合するかは事前にわかっていることから、そのパターンに関連する回折像における変化の検出によって、直ちにそのアナライトの存在が特定される。

【0043】

基板は好ましくは、衝突光が回折シグナルを不明瞭にするか低下させる程度まで散乱されないだけの平坦または平滑なものとする。使用可能な基板の例としては、シートとしてまたは支持体上の薄い膜としてのガラス、雲母、研磨シリコン、二酸化ケイ素、各種の平滑ポリマー材料、反射表面を有する金および他の金属があるが、これらに限定されるものではない。基板はいかなる大きさのものであることもできるが、活性領域、すなわちアナライト特異的受容体のパターンまたは識別素子を含む領域の面積は、入射ビームは基板表面を探索するので、入射ビームの少なくとも断面の大きさでなければならない、好ましくは同等の大きさとする（図1aおよび1bで円13によって示されている）。このようにして、各アナライト特異的受容体パターンが同時光照射されて、生じる回折像は、基板の照射部分におけるアナライト特異的受容体パターンの数に応じて、2以上のアナライトの有無に関する情報を同時に提供する。

【0044】

水分が問題を生じうる利用分野では、基板は、部分排気して水分を減らしたセルに入れることができる。それは、水の凝縮によって上昇するシグナル強度を減らすことが望ましい場合に有利である。しかしながら、アナライトが親水性であるがその相手受容体はそうではない場合、水の凝縮の存在（「凝集像」とも称される）を利用して、回折シグナルを高揚させることができる。本発明の別の実施形態では、本アッセイは、媒体を導入することができるチャンバーに基板を入れることでin situで行うこともできる。図3aには、フロー（流れ）のない静的な構成で1以上のアナライトの存在について調べられる液体に浸漬した基板52を有するセル50を示してある。アナライト特異的受容体が、基板52の片側または両

側表面にパターンニングされている。

【0045】

図3bには、各壁の内面に形成されたアナライト特異的受容体パターンを有する互いに隔たった平行な壁58および60を有するセル56があるフロー構成を示してある。操作の間、セルを液体が連続的に流れ、矢印によって示したように、反射モードまたは透過モードを用いることができる。図3cには、互いに隔たった平行な壁68および70を有し、壁70が導入口72および排出口74を有するフローセル66の別の実施形態を示してある。アナライト特異的受容体パターン76が壁68の内表面に形成されており、Oリング78を用いて、フローチャンバーを密封する。これらの各実施形態ではチャンバーは、入射光に対して透明な少なくとも1個の窓を有していなければならない。チャンバー内の基板は、照射光の直線上にあり、アッセイは前述のように反射または透過で行う。別の実施形態において流体チャンバーは、1以上のチャンバーの窓としてパターンニングされた基板を有することができる。これらの実施形態において、結合事象の時間依存性を、全てのアナライトについて同時にモニタリングすることができる。これは、相対的結合親和性の測定において有用となり得る。

【0046】

検出器34は、選択光に対して感度がよくなければならない。検出器34は、位置感応フォトダイオード、光電子増倍管(PMT)、フォトダイオード(PD)、アバランシェフォトダイオード(APD)、電荷結合素子(CCD)アレイ、肉眼、カメラ、写真乾板または他の撮像機器であることができる。本発明の1実施形態では、透過シグナルまたは反射シグナルを画像光ファイバーによって集めて、画像検出器に送る。検出器34は適切な補助器具に取り付けて、電力供給やシグナル収集およびデータ処理ができるようにする。位置官能フォトダイオードを用いる場合、最初にそれを較正する。シグナルの強度は、検出器に当るパターンの位置を反映する。

【0047】

フォトダイオード、光電子増倍管またはアバランシェフォトダイオードは、平行移動台上に取り付けられる。台上で検出器を移動させることで、高光レベルお

および低光レベルのパターンが描かれる。別法として、PMTまたは(APD)を固定位置に保持することができる。基板からPMT、PDまたはAPDに光が向かうようミラーを位置合わせする。このミラーは回転台に取り付け、台を回転させることで、低光レベルおよび高光レベルのパターンを、図2cに示したようにPMT、PDまたはAPD上に描くことができる。

【0048】

CCDアレイまたは他の画像機器を用いる場合、全回折像またはその一部が集まるように位置合わせを行う。後者の場合、画像装置を平行移動台上に取り付けて、回折像の選択された領域を調べることができるようにする。強度変化は結合事象を意味する。

【0049】

いくつかのケースでは、後述の実施例に記載のように、回折シグナルは適切な照明条件下で肉眼によって観察可能となるだけの強度を有する。その場合、唯一必要なものは観察者の目であるか、あるいは永久的な記録を行うには、カメラまたは同様の撮像機器である。低強度シグナルを定量するには、高感度のCCDアレイ検出器またはPMTを用いることができる。さらにシグナルを増強するには、当業者に公知のロックイン検出ならびに増幅機構を用いることができる。前述のように、検出器からの電子シグナルとして得られた画像またはその一部をコンピュータに保存し、その後画像解析ソフトウェアを用いて観察された回折像を増加させた基板上的パターンを特定して、その結果どのアナライトが媒体中に存在するかを特定する。どのアナライト特異的受容体が存在するかを識別するコードを、基板自体に書き込むことができる。回折像内で標準コード位置に対して特定の位置にシグナルが存在するということは、特異的なアナライトが存在するということに対応する。確定位置でのシグナルの定量によって、異なるアナライトの量を定量することができる。

【0050】

操作においては、特異的結合を行うことができる識別素子(例:タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体など)を、所定パターンで表面上に配置する。アッセイ対象の媒体を基板と接触させて、媒体中に存在するアナライトがその相補的

識別素子に結合できるようにする。留意すべき点として、識別素子は、細菌などの対象標的を捕捉する寸法を有する基板の上側表面に形成された溝などの構造的なまたは形状的な形体のものでもよいと考えられる。本発明の1実施形では、基板を洗浄および乾燥し、前述のいずれかの機器中で、アナライトが結合した基板が光源32からの光線の直線上にあるように置く。基板は、ディップスティックであることができる。

【0051】

水溶液などの透明媒体を用いることが最も簡単であるが、この方法は、その他の媒体中に存在するアナライトのアッセイにも用いることができる。媒体は気体または液体を含めて流体であることができ、アナライトは各種の生物病原体、環境毒物または空気中に分散した化学兵器物質などがあり得る。本発明の1実施形態では、尿、血液、血清、血漿その他の濁った媒体などの複雑な媒体中に存在するアナライトのアッセイを行う。媒体が入射光に対して完全に透明でない場合、アッセイは反射型構成下で行うのが最も良い。複雑な媒体中のアナライトのアッセイは、媒体による入射光の散乱および/または吸収による信号対ノイズ比の低下によって複雑なものとなる可能性がある。それゆえ本発明の1実施形態では、アッセイを行うのに用いられる装置は、基板-媒体界面からの入射光の全反射を使用する。図3dを参照するに、アナライト特異的受容体パターン86を有する基板84は、チャンバー80内に入っている被験媒体82と、基板の片方の面上で接触している。光は、基板84と媒体82との界面から全反射する。セルは、流体が管路90からチャンバー90にポンプ送りされ、管路92から送り出されるときに、フローセルとして動作する。本発明の別の実施形態では、入射光を選択して、複雑な媒体がその光の波長で透明となるようにする。例えば、血液などの流体のアッセイに、近赤外レーザー波長を用いる。

【0052】

本発明の方法の重要な長所は、各種類の識別素子が特有のパターンを画定するように複数のパターンを用いることで、反射モードまたは透過モードのいずれかで基板上に当る簡単な光源からの光を用いて、所定のアナライトが結合したパターンによって回折される光の検出を用いて、複数のアナライトを同時にアッセイ

することができるというものである。

【0053】

使用可能なアナライト特異的受容体または識別素子の標本のリストは、特異的結合対の一方の構成員からなることができるが、例えば、ほんのいくつかを言及すると以下の対：抗体 - 抗原、酵素 - 阻害物質、核酸またはオリゴヌクレオチドの相補鎖、受容体 - ホルモン、受容体 - エフェクタ、酵素 - 基質、酵素 - 補因子、レクチン - 炭水化物、結合性タンパク質 - 基質、抗体 - ハプテン、タンパク質 - リガンド、タンパク質 - 核酸、タンパク質 - 小分子、タンパク質 - イオン、細胞 - 細胞に対する抗体、小分子 - 小分子に対する抗体、キレート剤 - 金属イオンおよび空気感染病原体 - 空気感染病原体受容体、のいずれか一方の構成員であるが、これらに限定されるものではない。従って、アッセイされるアナライトは、特異的結合対の相補的構成員である。アナライトは、例えば精製、単離、増幅などの処理操作の後の媒体中に存在する場合がある。あるいは、アナライトは、血液、血清、血漿、尿その他の体液などの流体中に存在している場合がある。

【0054】

同様に、利用分野および同定する必要のあるアナライトに応じて、識別素子は、非特異的であるが選択的結合事象に関与する小分子からなっていてよく、例えば、非水素結合形成性化学種より優先的に水素結合形成性化学種と相互作用することができる水素結合形成性化合物、あるいは反対の電荷を選択的に認識する荷電化学種であってよい。この場合に注意すべき重要な点は、複数の識別素子を有する基板内で、それらの識別素子が、化学種間で所望の差異を有することができるものであるということである。例えば基板上には、水素結合形成性相互作用を有する一つの識別素子と、疎水性形成性相互作用を有する別の識別素子があってもよい。

【0055】

各特異的識別素子は、本基板上では別個のパターンを形成するように配置され、その結果、光照射される基板表面の同じ活性領域に、異なる識別素子が異なるパターンを形成する。それらのパターンの存在は好ましくは、光源に対して不可視またはほぼ不可視である（すなわち、基板による光源の透過または反射が、そ

の 패턴の存在によって影響されないかわずかに影響される。すなわち 패턴が非回折性である)。しかしながら、その 패턴の可視性は、光源強度の適切な調節(例えば、フィルターを用いて)または検出器シグナルの適切な調節(例:電子フィルターまたはソフトウェアにより)によって調節することができるが、それによって本発明の範囲は限定されない。

【0056】

本発明において本発明者らは、互いに異なる回折 패턴に対応する 패턴を利用している。それは基本的な問題ではないが、単に検出が容易となる。すなわち、無限の解像度に対して全回折像を捕捉することができる完全な検出器を考慮すると、その画像は、画像を生じた表面 패턴の組み合わせにデコンボリューション(逆重畳)することができる。実際には、容易に区別でき、しかも妥当な容易さでつくることのできる表面 패턴を選択すべきである。簡単で明瞭な 패턴の例として、次のようなものがあるが、本発明はこれらに限定されるものではない。(1)それらの 패턴は、異なる幾何学的成分(直線、円など)から構成されている。(2)それらの 패턴は、同じ幾何学的成分からのものであるが、異なる周期性で配置されている。(3)それらの 패턴は、同じ周期性を有する同じ幾何学的成分であるが、互いの関係において回転されている(ただし、それらの 패턴は回転対称性はない)。(4)それらの 패턴は、上記のものが混在したものである。ある 패턴にある前記素子の大きさおよび形状ならびにその周期性によって、得られる回折像が決まる。これらは光学関係の多くの教科書で解説され(例えば、E. Hecht, "Optics", 2nd edition, Addison-Wesley, 1987)、また当業者には公知である。

【0057】

識別素子の層が非常に薄いとか、その屈折率が基板の屈折率に非常に近いなどのいくつかの理由によって、パターンニング層自体が光源に対して不可視となる場合がある。識別素子の層が元の基板表面に対してあまり薄くない場合、不活性材料を追加して、その不活性材料が基板の残りの部分を覆い、パターンニングされた層の有効厚みを減らすことができる。その場合、パターンニングされた層および不活性材料の屈折率は非常に近いものでなければならない。パターンニングされた

層が光源に対して可視とすることができない別の理由は、識別素子の層が非常に薄く、基板、薄層および媒体の屈折率が非常に近似しているというものである。

【0058】

上記の条件が満足されない場合、パターンニングされた層は、アナライトを加える前は弱い回折シグナルを生じることがある。その場合、結合事象には回折シグナルの増加が伴い、アナライトの検出は、回折像の選択された部分のシグナル強度における変化を観察することで行われる。代わりに、入力パワーを調節したり、あるいは光学フィルターを使用することで、光源の強度を低下させて、識別素子から生じるバックグラウンド回折パターンをゼロとすることができる。その結果、結合によって増加したシグナルにより、検出器にプラスのシグナルが発生する。

【0059】

アナライトの非存在下での基板およびアナライト特異的受容体パターンによる基準となる回折像を得るために、スクリーニング対象の媒体への基板表面の曝露に先だって、基板表面からの回折光を検出することが非常に有用な場合がある。次に、その基底線回折像を保存し、媒体への基板の曝露後に得られる回折像と適切な方法で比較する。

【0060】

あるいは、最初のパターンニングされた基板が回折像をつくり、その後アナライトがその基板上の識別素子と相互作用する場合があるが、この場合回折シグナルの低下を生じる。一つの例を挙げると、識別素子がアナライトによって分解されるプローブ分子である場合である。別の例としては、識別素子が、基板上の溝またはその他のタイプの表面凹凸パターンあるいは形状的形体である場合であって、これらはアナライトの結合によって満たされる。そのような相互作用は、それゆえ回折像内の特定領域の明るさの消失または低下によって検出可能になると考えられる。

【0061】

本装置は、回折像の適切な部分の強度を測定することで、元の溶液中のアナライトの量を定量的に測定することができる。各種類のアナライトは、その相手受

容体と結合すると、特定の回折パターンを画定し、その結果、得られる回折像にいくつかの特徴的な部分が生じる。それゆえ、その回折像の適切な部分の強度を調べることで、各種アナライトを定量することができる。定量を行う方法は、既知濃度の標準アナライトサンプルを用いる検定によるものである。定量を目的とした検定曲線の利用は、イムノアッセイ法ではよくあることである。

【0062】

回折シグナル強度は、すでに固定化されているアナライト上に局在するように選択された1以上の第2の化学種を加えることで強化することができる。この第2の化学種は、屈折率の変化を増大させる物質（発色団、光源波長と共鳴性のプラズモン帯域を有する金属コロイド、または適切な試薬を加えた時に沈殿を形成させることができる酵素など）、または基板上での高さの変化を大きくする物質（大粒子、金属コロイド、ポリマーコロイド、量子ドット、タンパク質など）、またはその両方を含む。

【0063】

あるいは、アナライトを前処理して、屈折率変化もしくは高さ変化またはその両方によって、結合時に得られるシグナルを増強する材料に最初に結合するようにすることができる。その材料は、ポリマーコロイド、大分子、発色団または金属コロイドであることができる。発色団または金属コロイドは好ましくは、光源光の波長で照射光を吸収するものである。

【0064】

本表面上の識別素子のパターンは、アッセイ対象のその特異的なアナライトに応じて、いくつかの方法のいずれかによって形成することができる。その方法の例としては、ミクロリソグラフィーおよびその変法、ミクロ接触印刷、インクジェット印刷、ロボットスポットデポ、ディップペンナノリソグラフィー、原子間力顕微鏡法によるナノリソグラフィー、近視野光学走査リソグラフィーなどがある。それらの各種方法について、以下でより詳細に説明する。

【0065】

ミクロリソグラフィー法は当業者には公知である。例えば、米国特許第5599695号、同5753788号、同5831070号、同4867208号および同5089387号に記載の、DNA

アレイ作製のために開発されたマスキング方法および反応を、本発明においても使用可能である。主要な相違は、これらの以前の特許では、1回で対象とする領域1つを曝露するマスクを用いることで、基板上の異なる空間領域に異なる種類のオリゴヌクレオチドを置くという点である。本発明においては、各種パターンに対応するマスクを用いて、同じ全領域上に複数のオリゴヌクレオチドのパターンを形成する。

【0066】

マイクロソグラフィを用いて、金の上にあるチオール自己集合単層(SAM)上にパターンを形成することもできる。適切なマスクを用いて、金上のチオールのSAMをUV光に曝露することができる。マスクによって覆われていない領域は反応を起こし、そしてチオールが脱着されて、それを洗い流すことで露出金表面を残すことができる。そして、異なるチオールをそれらの露出金領域上に吸着させることができる。これらのチオールはすでに受容体素子を含むことができるか、あるいはその後一般的な方法によって誘導体化することができる。それゆえ、各種マスクおよび各種チオールを用いる反復処理によって、同じ領域に複数のパターンが得られる。

【0067】

マイクロ接触印刷は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)などのエラストマー製スタンプから所望の基板ヘインクを転写するスタンプ法である。スタンプは、原板上で前駆物ポリマーを鋳造し、その後キュアリングしてそれを硬化させることで製造される。原板は代表的には、所望のパターンに対応する形状的な形体を有する硬い物質である。

【0068】

インクとして自己集合単層を用い、マイクロスタンプまたはマイクロ接触印刷によって金などの金属上にパターンニングされた単層を形成させることが、米国特許第5512131に記載されている。自己集合単層によるポリマー基板のパターンニングが、ポリマー上にデポされた金属薄膜の使用によって可能である。それは、米国特許第6020047号に記載されている。特に、ベルナルドらの報告(Bernard, A; Delamarche, E.; Schmid, H.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Biebuyck, H.; "Pr

inting Patterns Of Proteins " Langmuir (1998), 14,2225-2229) に記載されているように、スタンプ法を用いて、シリコン、ポリスチレンおよびシラン処理ガラス上にタンパク質のパターンが作製されている。

【0069】

同じ基板上に複数の識別素子を形成するため、各素子に対し異なるスタンプが用いられる。それらのスタンプは、それが有する幾何学的構造（線、円など）および／またはパターンの周期性が異なっている。しかしながら、同一面内回転対称性のないパターン（例えば線）の場合は、全く同じパターンを用いることができるが、この場合異なる識別素子が互いに関して異なる角度でスタンプされる。

【0070】

パターンは、先端技術のインクジェットプリンター技術を用いて、あるいはコンピュータ制御のロボットアームを使用して、あるいは微細先端を有するアナログプロッターによって基板上に「書き込み」させてもよい。これらのいずれの場合においても、パターニングされるべき物質、すなわち識別素子またはその前駆物質のどちらかは液体媒体中にあり、その溶液を所望の位置に滴下することでデポ(添着)される。この溶液は、識別素子が基板上に吸着されるように乾燥され、過剰の物質は洗い流される。あるいは、パターンを書き込んだ後に、化学反応または光化学反応を用いて、識別素子を適切な場所に共有結合で結合させる。その方法の1実施形態では、本基板表面が、反応性の層でコーティングすることで最初に活性化される。その方法は、素子が最も小さい寸法で数十ミクロンのレベルのものであるパターンを作製するのに適している。

【0071】

比較的小さいパターンを用いるのが好ましい場合、例えば所定領域内におけるパターンの数を増やすことが好ましい場合、走査型プローブ顕微鏡観察手法における先端技術が利用される。ディップペンナノリソグラフィーは、例えば金属（例えば金）に結合したチオールのように、ある種の分子の強力な選択的吸着による自己集合単層形成に基づくものである。従って、チオールの希薄溶液に浸漬されたペンがいくつかの分子を拾い上げることができる。そのような「インク」を金表面に接触させることで、チオールの単層が接触箇所ですばやく固定化される。

原子間力顕微鏡のプロブ先端のような細い先端を用いることで、大きさが数十ナノメートル程度の構造（物質の単層で構成される）を金属基板上に「書き込む」ことができる。ディップペンナノリソグラフィーの技術は、ピナーらの報告に記載されている（Piner, R. D.; Zhu, J.; Xu, F.; Hong, S. H.; Mirkin, C. A. Science 1999, 283, 661-663）。特に、ジチオール結合を有するビオチンの誘導体は、このようにしてパターニングすることができる。公知のアビジン - ビオチン相互作用を用いることで、最初のビオチン層によって描かれたパターン中に他の物質を固定化することができる。

【0072】

原子間力顕微鏡法（AFM）を用いることができ、タンパク質を吸着させ、その後AFMプロブ先端を用いて所望のパターンが形成されるよう領域を掻き取るという簡単な方法により、表面上にタンパク質をパターニングすることができる。次にこのサンプルは、別の識別素子の溶液と接触させることで、埋め戻しされる。この手法に関しては（但し、チオール類およびカルボン酸類の場合）、米国特許第5922214号に記載があり、ワズ - メスリゲらの報告（Wadu-Mesthrige, K.; Xu, S.; Amro, N. A.; Liu, G. Y.; Langmuir 1999, 15, 8580-8583）で蛋白質に応用されている。

【0073】

パターン形成の1実施形態では、識別素子が上記のいずれかの方法または他の手段によって基板上に直接配列される。パターン形成の別の実施形態では、パターニングにおいて助けとなる介在層が用いられる。1例は、以下のように、公知のビオチン - アビジンの親和性を用いるものである。ビオチンのパターンが基板上に「書き込み」される。次にそれをストレプトアビジンの溶液と接触させるが、ストレプトアビジンがビオチン層に選択的に結合する。過剰のタンパク質を洗い落とした後、次にストレプトアビジン - ビオチンのパターニング層がついたこのサンプルを、パターニングされたストレプトアビジンに結合するビオチン化識別素子の溶液と接触させて、パターニングされた識別素子が作製される。そしてその工程を繰り返して、第2の識別素子の第2のパターンが作製され、そして第3と続く。

【0074】

最初のビオチン層のパターニングは、上述した多くの方法で作製することができる。好ましい実施形態では、ジチオール化合物を使用する、基板としての金属または金属膜上へのマイクロ接触印刷またはディップペンナノリソグラフィーのどちらかが用いられる。他には、リソグラフィー法に関連して、光活性化された形態であるフォトビオチンを用いるものがあるが、これは、Hengsakul, M.; Cass, A. E. G.; Bioconjugate Chemistry, 1996, 7, 249-254を参照されたい。

【0075】

別の実施形態では、活性化された形態にあるビオチンの、ビオチンが相互作用できる、好ましくは反応できる基板上へのマイクロ接触印刷が用いられる。この基板の例は、アミノシラン層をコーティングしたガラスである。

【0076】

本発明の別の実施形態では、基板上に重ねられる識別素子のパターンが、クレバス(隙間)の形によっても形状的にパターニングされる。その基板は好ましくは、いくつかの形状的パターンを有するポリマーである。その形状パターンは、微細加工またはマイクロリソグラフィーとエッチングによって作製される。各パターン上に、1つの識別素子が固定化される。ポリマー基板の選択は、その屈折率がアナライト溶液のものと一致するようにする。あるいは、媒体の屈折率を調節して、パターニングされた基板のものと一致させる。いずれの場合も、アッセイは以下のように行う。パターニングされた基板を、平坦な窓を有するセル中に入れ、セルを光源によって光照射する。その後、アッセイ対象のアナライトを含む媒体を導入する。最初は、基板と媒体間の屈折率の一致のために、回折像は観察されない。結合事象が起こるに連れて回折パターンが生じるが、これは、適切なアナライトが結合しているパターンに特徴的なものである。

【0077】

本発明は、特異的アナライトの有無の指標として用いることができる。本発明の1実施形態では、ある特異的アナライトに対応する回折像の部分の光の強度を測定することで、そのアナライトの量が求められる。それは好ましくは、最初に検量曲線を作成することで行われる。別の実施形態では、そのシグナル強度が、

アナライト導入後、時間の関数としてモニタリングされる。それから、その結合の反応速度論についての情報が得られる。2種類以上のアナライトのそれらのアナライト特異的受容体への結合を、同じ基板内で比較することができる。本発明のこの実施形態では、特異的アナライトによるとすることができる回折パターンの各部分の強度の時間依存性が比較される。

【0078】

本明細書に記載の装置および方法は、アナライト間の各種組み合わせに対するアッセイに応用可能である。従って、各種アナライト特異的受容体の組み合わせでパターンニングした基板を作製し、同一装置内で使用することができる。本発明の1実施形態では、どの種類の受容体が基板の内部にパターンニングされているか、従ってそれがどのアナライトのアッセイに対して使用することができるかを識別するマークが基板にコードされる。本発明の別の実施形態では、回折像内の標準的な場所に対してどの特定の場所が、特異的アナライトのアッセイに用いられるべきかに関する情報が基板にコードされる。このようにして記録された回折像は、すでにその装置で利用可能な前記事前情報を用いて解析することができる。

【0079】

本明細書に開示の複数アナライトの検出方法は、いくつかの理由で有利である。パターン印刷法の解像度に応じて、非常に小さいサンプルを用いて、複数アナライトのアッセイを行うことが可能である。例えば基板の活性領域は、片側で1mmという小さいもの、あるいはそれ以下であることができる。それゆえ必要なサンプル量は、 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times$ パターンの厚さという小さいもの、あるいはそれ以下となる。その方法は、パターン内の素子の繰り返しによって信頼性が高められていることから有利であり、その方法は非常に低コストでできる。センサー10は大量に製造することができるが、アナライト特異的受容体は、使用者が必要とするアナライトによって決まる。

【0080】

本明細書に開示の方法は、多くの利用分野に用いることができる。それは、DNAアレイの代替物として、あるいはその相補的なものとして用いることができる。それぞれがオリゴヌクレオチドまたは核酸の特定の配列を有する複数のパタ

ーンを小さい領域（代表的にはミリメートル、またはそれ以下）に配置する。その方法は、迅速医学診断の用途に用いてもよく、例えば体液の迅速分析に用いると、いくつかの異なる検査を、同じ（小）サンプルで、同時に行うことができる。

【0081】

この方法は、複数のマーカーを有する特定の症候群を診断する場合に非常に有用である。例えば赤潮発生は、いくつかの毒物のうちのいずれかの存在が指標となる。それは示差分析に非常に有用である。すなわち、同一サンプル中で、A、B、Cなどの量の間の比較が必要な場合である。それは、複数アナライトの結合アッセイに用いることができる。本発明の1実施形態では、アナライト特異的受容体のうちの一つを、物質を識別する標準として役立つアナライト用マーカー、あるいは装置の検定に役立つアナライト用マーカーとすることができる。本発明の方法は、結合事象の時間依存性をモニタリングできるようにすることもできる。以下の非限定的実施例は本発明を説明するためのものであり、決して本発明の範囲の限定と解釈されるべきでない。

【0082】

実施例

実施例1

マイクロ接触印刷によるパターンニングされた基板の製造

ベルナルドらの報告（Bernard, A; Delamarche, E.; Schmid, H.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Biebuyck, H.; "Printing Patterns Of Proteins" Langmuir (1998), 14,2225-2229）に記載の手順に従って、マイクロ接触印刷によって基板のパターンニングを行った。鋳型としてアクリル製回折用光学原板（G1007AおよびG1008A、Thor Labs）を用い、凡そ10%の架橋を行い（ペーズリー・プロダクツ社（Paisley Products, Ontario Canada）から購入したダウ・コーニング社（Dow Corning Corporation）のシルガード（Sylgard）184シリコーンエラストマーキット）、50～60 で14～18時間キュアリングを行うことで、ポリ（ジメチルシロキサン）（PDMS）スタンプを作製した。このようにして作製したPDMSスタンプは、約50mm²の回折表面を有する。PDMSスタンプを、蒸留・脱イオン水（ddH₂O

) / エタノールの2 : 1 溶液中で5 ~ 10分間超音波洗浄し、次に窒素ガス (N_2) 気流下で乾燥し、スタンプ表面に新しい粘着テープを貼った。数分後にテープをスタンプ表面から剥がし、スタンプ表面に直ちに、50 ~ 100 μ g / mLのタンパク質のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液150 ~ 200 μ L を塗布し、室温で放置した。30分後、タンパク質の溶液を除去し、このインクがつけられたスタンプ表面をPBS (2 mLで2回)、ddH₂O (2mLで2回) で洗浄し、最後に N_2 気流下で乾燥させた。そしてこのスタンプを、予め2 : 1ddH₂O / EtOH中で超音波洗浄され、 N_2 気流下で乾燥された基板に軽く押圧して張り付け、数秒間そのままの状態を続けた。次に、このスタンプが押された基板をPBS (2mL)、ddH₂O (2mL) で洗浄し、 N_2 気流下で乾燥した。このようにして得た基板を図4に示してあるが、デポ (添着) された物質が、原子間力顕微鏡を用いて視覚化されている。

【0083】

以降のパターンは、同一基板上に、上記と同様にしてクリーニングされ、インクが施こされ、スタンプが押されるさらなるPDMSスタンプを用いて作製されたが、既に存在するパターンからは外れた角度で該基板上に交差スタンプされた。図5には、原子間力顕微鏡によって目視化されているように、同一だが互いに関して回転されているスタンプパターンを用いて、同一領域上に2種類のアナライトがスタンプされて作製された基板の例を示してある。

【0084】

実施例2

シグナル測定

基板は、Nd:YVO₄レーザー ($\lambda = 532\text{nm}$) または赤色ダイオードレーザー ($\lambda = 650\text{nm}$) のいずれかで光照射した。両レーザーによる照射で生じる交差スタンプ基板の回折像は、アナライト添加前は、透過モードでも反射モードでも肉眼で見ることができる。視覚用および写真用のシグナル検出においては、アナライトを加える前に、中性フィルターを用いて、肉眼で回折像が識別できなくなるまで回折光の強度を低下させた。電子的なシグナルの検出においては、該強度は、アナライトを加える前に、検出装置のシグナル範囲を最大とするために、中性フィルターで、小さいが測定可能な値まで下げられた。

【0085】

実施例3

「ドライ」測定

「ドライ」測定方式では、基板を、アナライトを含む溶液中に、所定の期間にわたり浸漬した。次に、その基板をアナライト溶液から取り出し、PBS (2mL) およびddH₂O (2mL) で洗浄し、N₂気流下に乾燥した。基板をレーザーで照射したところ、可視回折像を肉眼で識別することができ、その強度は、コンピュータに接続されたCCD線型アレイまたはCCD面積アレイ検出器を用いて測定することができた。また、x - y 平行移動台上に取り付けられた光電子増倍管を用いて、回折像の特定のスポットのシグナル強度を、そのスポットを横切るように該光電管を動かし、その強度をオシロスコープ上に記録することで測定した。

【0086】

実施例4

in situ測定

in situ測定を、低容量 (10 ~ 20 μ L) または高容量 (100 ~ 200 μ L) 配置のいずれかで行った。低容量構成は、顕微鏡のスライドガラス面に2枚の両面テープで固定され、スタンプが押されたほうの基板表面が顕微鏡のスライドガラス面に対向させられている、10mm $\times$ 10mm基板から構成された。1mm $\times$ 5mm $\times$ 10mmの流路を2枚の両面粘着テープによって形成したが、この中を通してアナライト溶液を基板のスタンプを押した表面と接触するように流し込むことができる。高容量構成では、基板は、例えば図3cに示されているようなゴム製Oリングで、プラスチック裏材から離されている。2個の穴をプラスチック裏材に開けたが、これを通してアナライト溶液を添加および除去することができる。このセルの総容量は、約100 ~ 200 μ Lである。これらの構成のいずれにおいても、回折シグナルは、反射モードのレーザーで基板を照射してから測定される。

【0087】

回折像の強度は、基板が水溶液に浸漬されている場合は、基板が乾燥状態にあり且つ空気中にある場合と比較すると、低くなる。オシロスコープに連結されたCCD線型アレイで測定されるように、空気中での900mVシグナルは、セルに1 $\times$ PB

S溶液を加えると、580mVに低下する。

【0088】

実施例5

抗ヤギおよび抗ウサギ金コンジュゲートを用いた、ヤギおよびウサギIgGスタンプ基板の試験

前述の方法に従って、ヤギおよびウサギのIgGをガラス基板上に交差スタンプした。交差スタンプ基板のAFM像については図5を参照されたい。得られた交差スタンプスライドガラスを、抗ヤギIgG金コンジュゲート溶液に30～60分間浸漬した後、該抗ヤギIgG金コンジュゲート溶液から取り出し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。基板上的ヤギIgGに対応する透過モードおよび反射モードの両方で見られる回折像の形成を、肉眼観察した（データは示されていない）。次にスタンプを、抗ウサギIgG金コンジュゲート溶液に30～60分間浸漬した後、該抗ウサギIgG金コンジュゲートの溶液から取り出し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。基板上的ウサギIgGに対応する透過モードおよび反射モードの両方で認められる回折像の形成を、肉眼観察した（データは示していない）。

【0089】

実施例6

抗ヤギおよび抗ウサギIgGを用いた、ヤギおよびウサギIgGスタンプ基板の試験

前述の方法に従って、基板上にヤギおよびウサギIgGを交差スタンプした。得られた交差スタンプ印刷されたスライドガラスを、抗ヤギIgG溶液に30～60分間浸漬し、抗ヤギIgGの溶液から取り出し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。基板上的ヤギIgGに対応する透過モードおよび反射モードの両方で認められる回折像の形成を、肉眼観察した（データは示していない）。次にスタンプを、抗ウサギIgG溶液に30～60分間浸漬し、抗ウサギIgGの溶液から取り出し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。基板上的ウサギIgGに対応する透過モードおよび反射モードの両方からの回折像の形成を、肉眼観察した（データは示していない）。

【0090】

実施例7

抗ウサギおよび抗マウスIgGを用いた、ウサギおよびマウスIgGスタンプ基板の試験

前述の方法に従って、基板上にウサギおよびマウスIgGを交差スタンプした。図6は、交差スタンプ基板のAFM像である。得られた交差スタンプ印刷されたスライドガラスを、ヤギ抗ウサギIgG溶液に60分間浸漬し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。次に基板を、ヤギ抗マウスIgG溶液に60分間浸漬し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。最後に基板を、ウサギ抗ヤギIgG溶液に60分間浸漬し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。抗ヤギIgG処理を用いて、「サンドイッチ」アッセイによる既存のシグナルの増強を行った。回折像における特徴的スポットの強度を、各インキュベーション/洗浄サイクル後に測定した。

【0091】

図7には、ウサギおよびマウスのIgGが交差スタンプ印刷された基板を、表示されている溶液で順次処理した場合の効果を示してある。回折像は、互いに垂直な2つの明るいドットの列からなる（他の周期的なドットパターンが認められるが、それらは強度的にずっと弱い）。一方のドット列はウサギIgGパターンに特徴的なものであり、他方はマウスIgGによるものである。この回折像における2つの場所での強度、すなわウサギIgGに相当する明ドットのもものとマウスIgGに相当するものを、オシロスコープに取り付けられた線型CCDアレイ検出器を用いて測定した。アナライト導入の前は、基板は両方のスポットについて低い強度読取値を与える。ヤギ抗ウサギIgGを加えると、スタンプ印刷されたウサギIgGから生じるシグナルが上昇するが、マウスIgG由来のシグナルでは変化はほとんど認められない。次に、ヤギ抗マウスIgGで基板を処理することで、スタンプされたマウスIgGから生じるシグナルに上昇が生じ、ウサギIgGについてのシグナルは、前回の処理のものと比べて一定のままである。最後に、前に処理された基板に抗ヤギIgGを加えることで、両方のシグナルにさらに上昇が生じるが、これは、最初

の2回の処理で用いられたヤギ由来の抗体の存在を確認するものである。さらにそれは、第2の化学種、すなわち抗ヤギ抗体を用いることでアナライト検出のためのシグナルが増強されることも示している。

【0092】

実施例8

アビジン金コンジュゲートを用いるBSAおよびBSA - ビオチンコンジュゲートがスタンプ印刷された基板の試験

BSAおよびBSA - ビオチンコンジュゲートを上記の方法に従って基板上に交差スタンプ印刷した。得られた交差スタンプ印刷済スライドガラスを、アビジン - 金コンジュゲートの溶液に30～60分間浸漬し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。この基板上のBSA - ビオチンに対応する透過モードおよび反射モードの両方での回折像の形成を、肉眼で観察した（データは示していない）。BSAによる回折パターンは認められなかった。

【0093】

実施例9

抗フルオレセインおよびアビジンを用いたBSA - フルオレセインおよびBSA - ビオチンコンジュゲートでスタンプ印刷された基板の試験

前述の方法に従って、基板上にBSA - フルオレセインおよびBSA - ビオチンコンジュゲートを交差スタンプ印刷した。得られた交差スタンプスライドガラスを、BSA（100 μg / mLのPBS溶液）に60分間浸漬し、その後PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。次に基板を、抗フルオレセイン抗体の溶液（モレキュラー・プローブス（Molecular Probes）からのA-889の10%PBS溶液）に60分間浸漬し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。次に基板を、アビジン溶液（約30 μg / mLのPBS溶液）に60分間浸漬し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。回折像中の特徴的なスポットの強度を、オシロスコープに取り付けた線型CCDアレイ検出器を用いて、各インキュベーション / 洗浄サイクル後に測定した。図8に結果を示してある。パターンニングされた基板は、最初は低強度の回折シグナルを示している（アナライト導入前）。BSAで処理す

ると、スタンプ印刷されたBSA - コンジュゲートによってまだ覆われていない露出ガラスの領域が部分的に満たされ、シグナルがさらに低減される。抗フルオレセイン抗体の溶液を加えることで、スタンプ印刷されたフルオレセイン - BSAコンジュゲートから生じる回折シグナルに急激な上昇が生じるが、パターンニングされたビオチン - BSAコンジュゲートに由来するシグナルにはほとんど変化が認められない。最後に、アビジンの溶液を加えることで、スタンプ印刷されたビオチン - BSAコンジュゲートから生じる回折シグナルに上昇が生じるが、フルオレセイン - BSAコンジュゲートのシグナルは変化しない。

【0094】

実施例10

DNAハイブリダイゼーション

上記の方法に従って、ガラス製スライドグラスにアビジンのスタンプ印刷を行った。得られたパターンニング済みスライドグラスをBSAの溶液（50 μ g / mLのPBS溶液）に60分間浸漬し、PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。次にこの基板を、ビオチン化オリゴヌクレオチド2590BT（5' CAGTCAGTCAGTCAGTCAGT - ビオチン-3'）の10 μ M水溶液中に室温で60分間浸漬した。PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた後、基板をコロイド状金標識相補的オリゴヌクレオチド鎖2593T（5' ACTGACTGACTGACTGACTG-S-金-3'）の10 μ M水溶液に、室温で60分間浸漬した。サンプルを再度PBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた後、1.0M NaCl中で最後の60分間インキュベーションを行った。第1の鎖として、2590BTに代えてビオチン化オリゴ - dG（5' -G₂₀ - ビオチン-3'）を用いて対照実験も実施した。図9に結果を示してある。パターンニングされたアビジン層に相当する回折像中の特徴的なスポットの強度を、オシロスコープに取り付けた線型CCDアレイ検出器を用いて、各インキュベーション / 洗浄サイクル後にモニタリングした。このアビジンがパターンニングされた基板を最初にビオチン化オリゴヌクレオチド2590BTで処理した。前記の特徴的なスポットで小さいシグナルが認められた。相補的オリゴヌクレオチド2593T（金 - コンジュゲート）を加えることで、シグナルに上昇が生じる。1.0M NaCl洗浄液で基板をさらに処

理することで、シグナルにさらなる上昇が生じる。最後に対照として、アビジンでパターンニングした基板を、最初に、2590BTに代えてビオチン化ポリ-dGオリゴヌクレオチドで処理した。同じ処理順序を行っても、シグナル強度には対応する上昇は生じなかった。

【0095】

実施例1.1

抗ウサギIgGを用いたウサギIgGスタンプ基板の力価測定

上記の方法に従って、基板にウサギIgGのスタンプ印刷を行った。得られたパターンニング済みスライドガラスを、毎回濃度が上昇していく抗ウサギIgG溶液で、室温で15分間インキュベートすることで順次処理した。各インキュベーション後、基板をPBS（2mLで2回）およびddH₂O（2mLで2回）で洗浄し、N₂気流下で乾燥させた。得られた回折像からの2つの特徴的なスポットの強度は、各処理後に測定され、平均化された。図10に結果を示してある。

【0096】

実施例1.2

ビオチン-BSA基板へのストレプトアビジン結合の時間依存性

前述の方法に従って、ガラス製スライドガラスにビオチン-BSAのスタンプ印刷を行った。得られたパターンニング済みスライドガラスを、図3cに示すように、液体フローセルに入れた。ストレプトアビジンの溶液（500μL、200μg/mLのPBS溶液）をフローセルに加え、得られた回折像からの特徴的なスポットの強度を、種々の時間間隔で測定した。図11に、ビオチン-BSAパターンニング済み基板のストレプトアビジン溶液処理によって生じる経時的なシグナル変化を示してある。

【0097】

本発明の好ましい実施形態についての上記の記載は、本発明の原理を説明するために提供したものであって、説明された特定の実施形態に本発明を限定するものではない。本発明の範囲は、本発明の特許請求の範囲に包含される全ての実施形態およびそれらと均等のものによって規定されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

センサーの平面図であり、図1 aは、基板表面上の同一領域に交互配置された3種類のパターンを用いて、アナライト特異的受容体の3種類のパターンを有する2種類以上のアナライトを検出する回折アッセイ用のセンサーの平面図であり、図1 bは、基板表面上に互いに隔てて配置された3種類のパターンを用いて、アナライト特異的受容体の3種類のパターンを有する2種類以上のアナライトを検出する回折アッセイ用のセンサーの平面図である。

【図2】

本発明によるアッセイ装置を示す図であり、図2 aは、透過型構成を用いる本発明によるアッセイを行うための装置を模式的に示す図であり、図2 bは、反射型構成を用いるアッセイを行うための装置を模式的に示す図であり、図2 cは、シグナルを検出器に向かわせるための回転ミラー型構成を用いるアッセイを行うための装置を模式的に示す図である。

【図3】

アッセイ用セルを示す図であり、図3 aは、静的モードでのアッセイを行うためのセルの斜視図であり、図3 bは、本発明のアッセイを行うために構築されたフローセルの1実施形態を示す断面図であり、図3 cは、本発明によって構築されたフローセルの別の実施形態の透視図であり、図3 dは、全内面反射を用いるフローセルの断面図である。

【図4】

マイクロ接触印刷によってヤギ免疫グロブリンG (IgG) でパターンニングされ、原子間力顕微鏡観察によって目視できるようにされたガラス基板を示す。

【図5】

同じパターンを有するが互いに関して約90°回転しているヤギIgGおよびウサギIgGの両方用のスタンプを用いたマイクロ接触印刷によって得られた、両IgGでパターンニングされたガラス基板を示す図であって、像は原子間力顕微鏡観察によって得たものである。

【図6】

同じパターンを有するが互いに関して約30°回転されているマウスIgGおよび

ウサギIgGの両方用のスタンプを用いたマイクロ接触印刷によって得られた両IgGでパターンニングされたガラス基板を示す図であって、像は原子間力顕微鏡観察によって得たものである。

【図 7】

ウサギおよびマウスIgG交差スタンプ基板を、図に示した溶液で順次処理した場合の効果を示す図である。

【図 8】

ビオチンおよびフルオレセイン（いずれもウシ血清アルブミン（BSA）コンジュゲートとして）交差スタンプ基板を、図に示した溶液で順次処理した場合の効果を示す図である。

【図 9】

図に示された溶液で順次処理することで1本鎖DNAの検出を行う上での、アビジンがスタンプ印刷された基板の使用を示す図である。

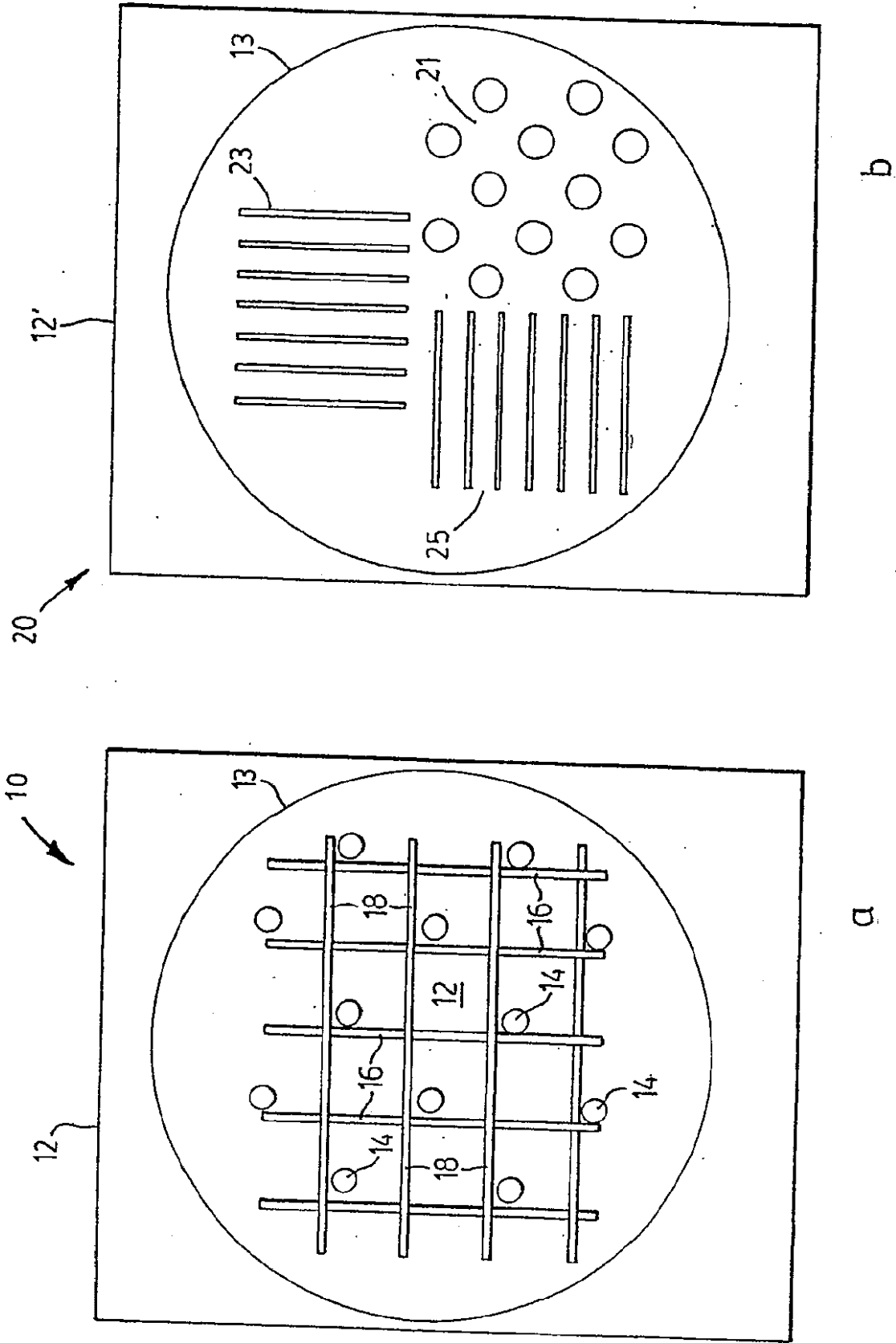
【図 10】

抗ウサギIgGの濃度を上昇させていったときのウサギIgGでパターンニングした基板の力価測定を示す図である。

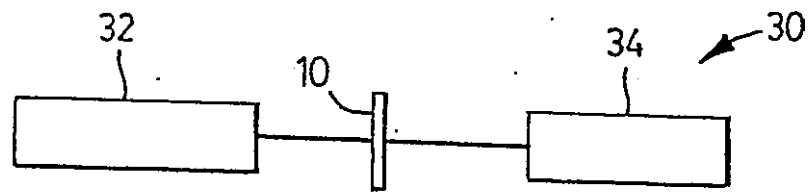
【図 11】

ビオチン - BSAでパターンニングされた基板をストレプトアビジン溶液で処理したことで生じるシグナルの経時変化を示す図である。

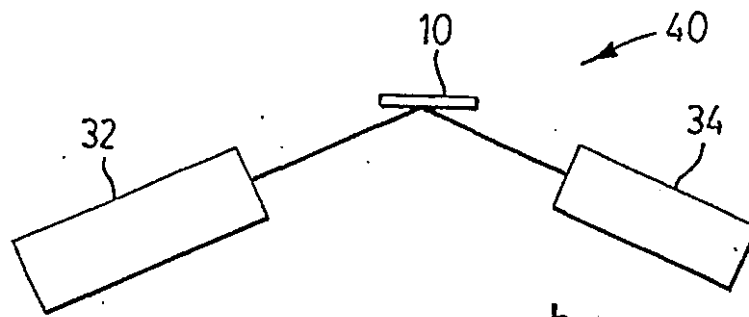
【図1】



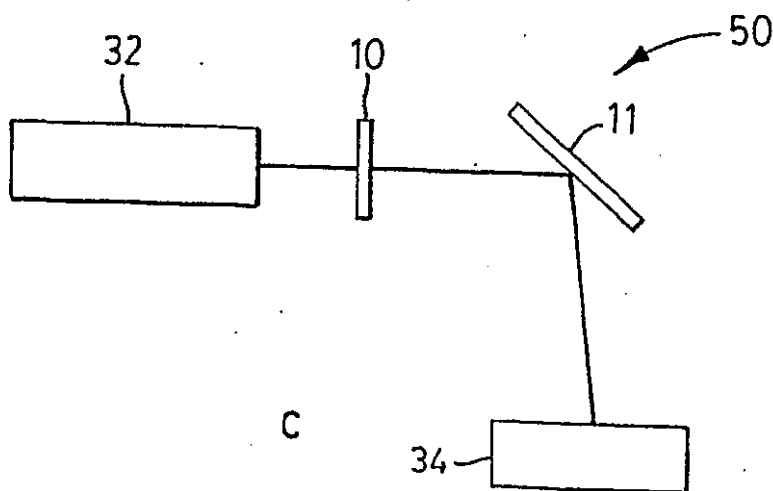
【図2】



a

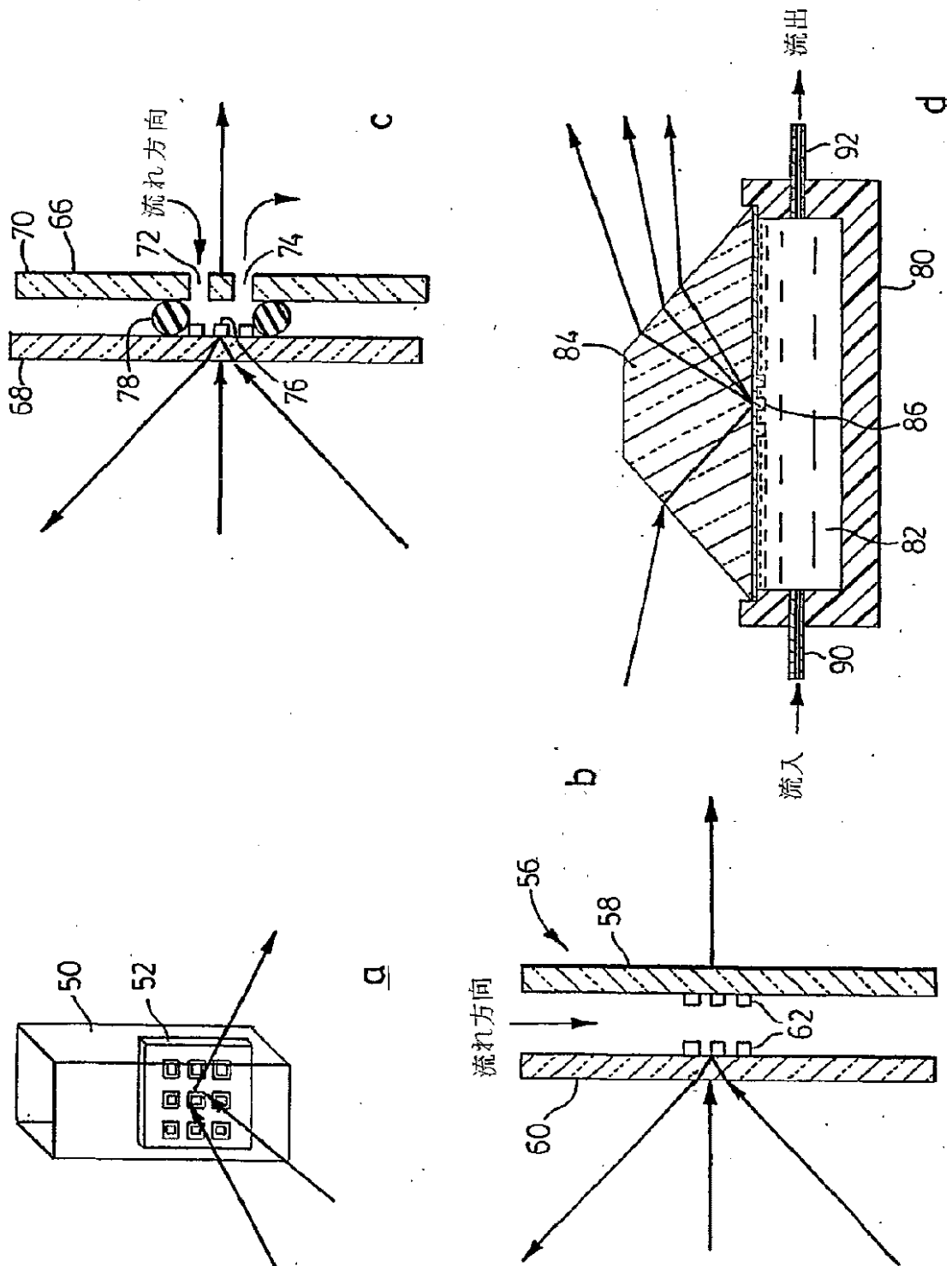


b

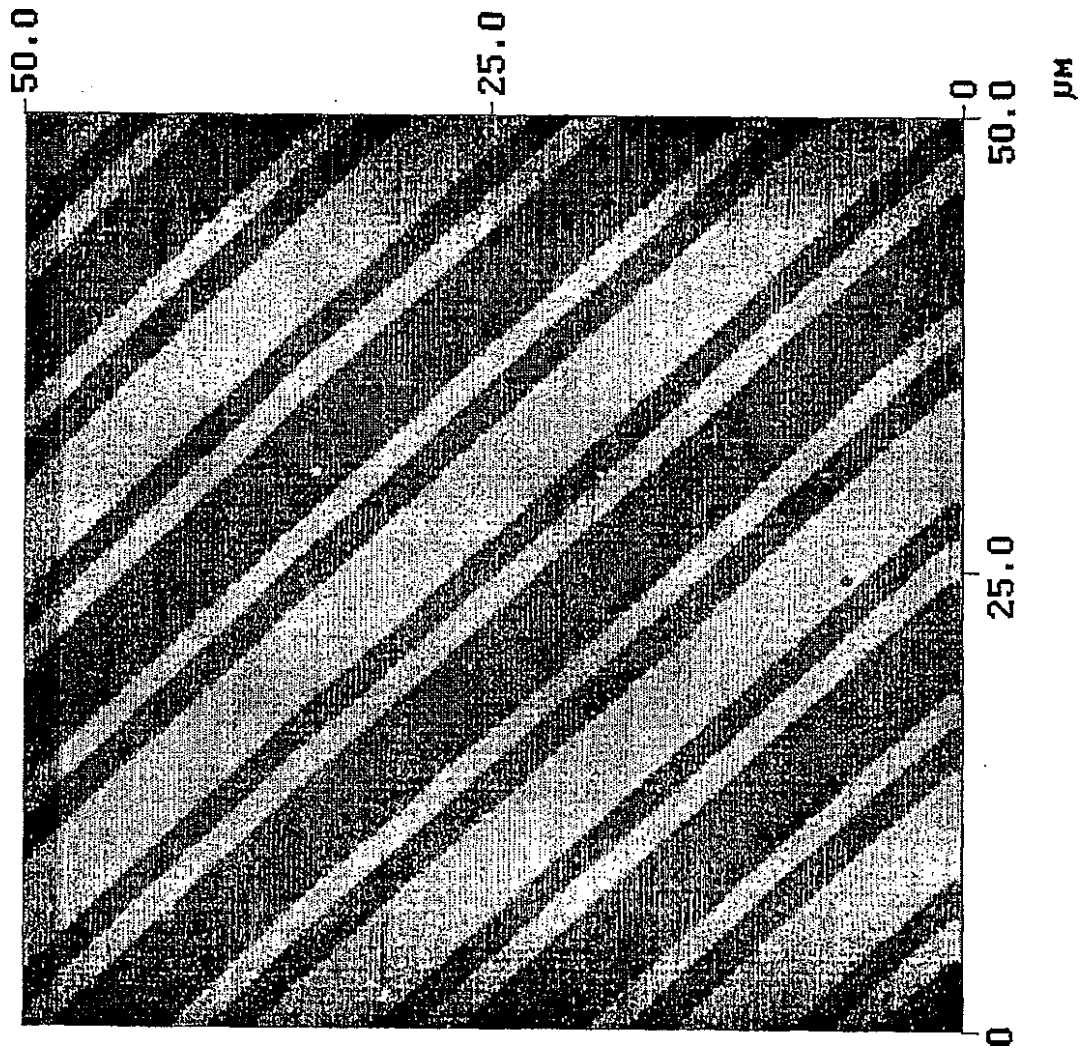


c

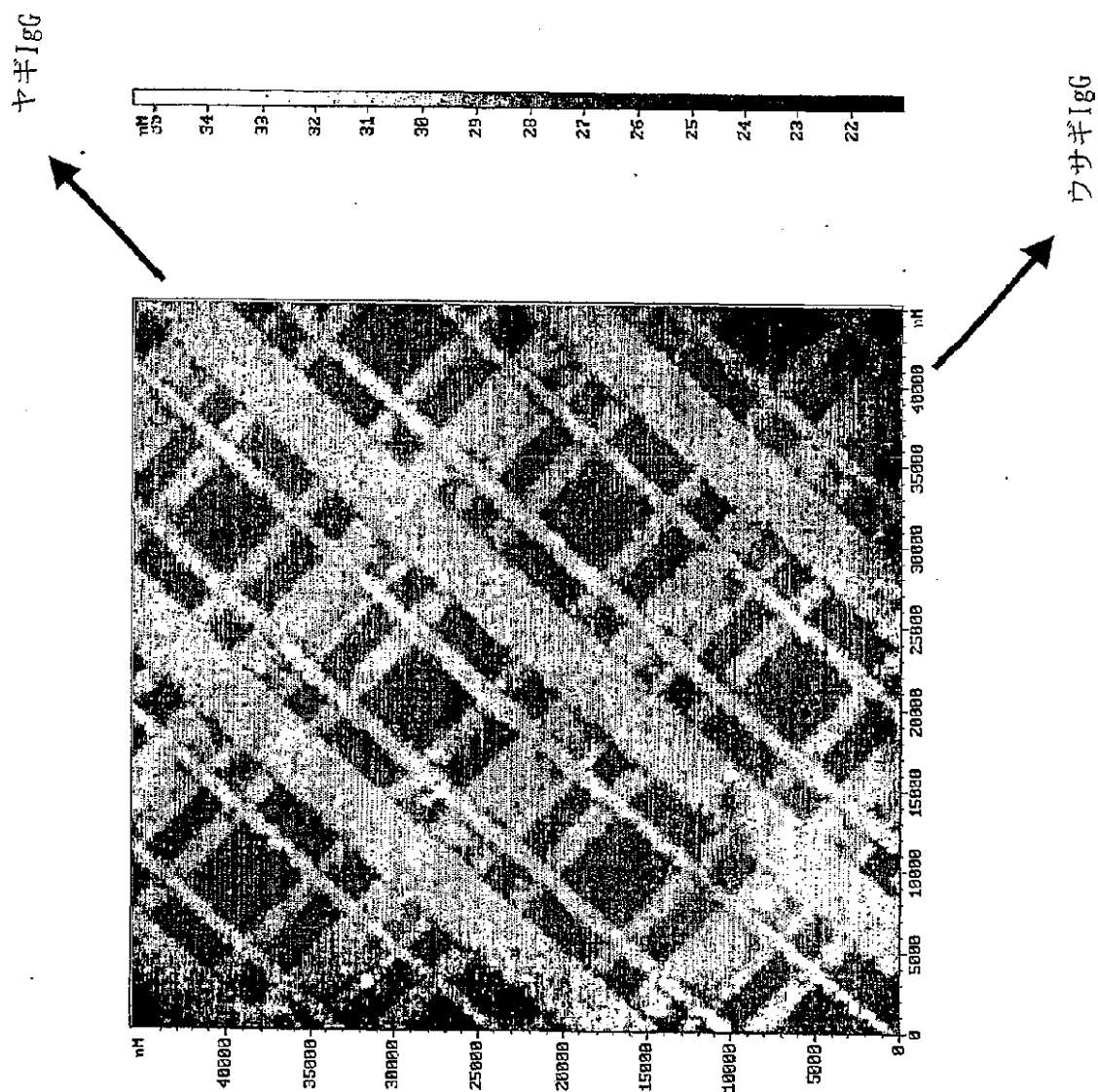
【図3】



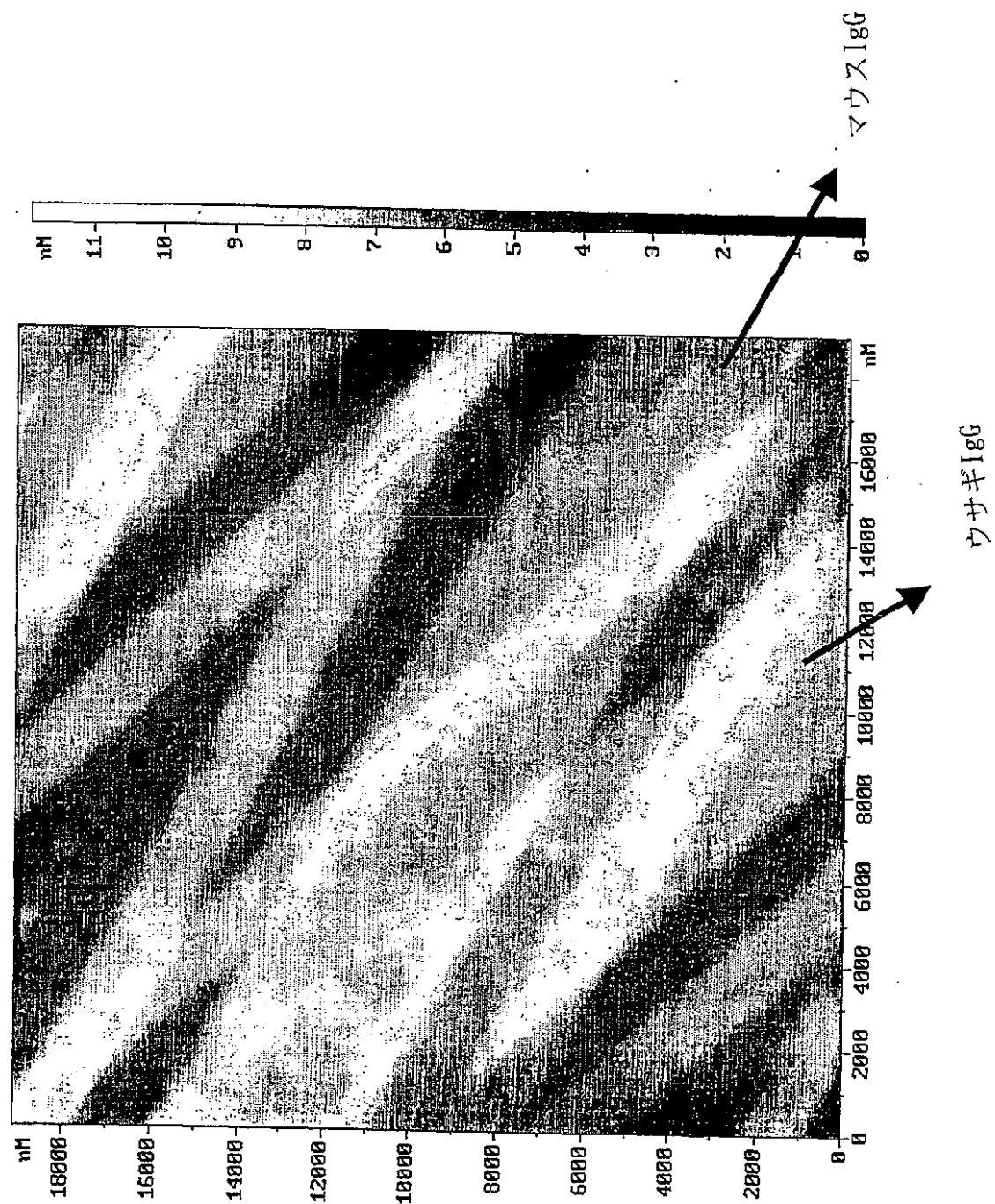
【図4】



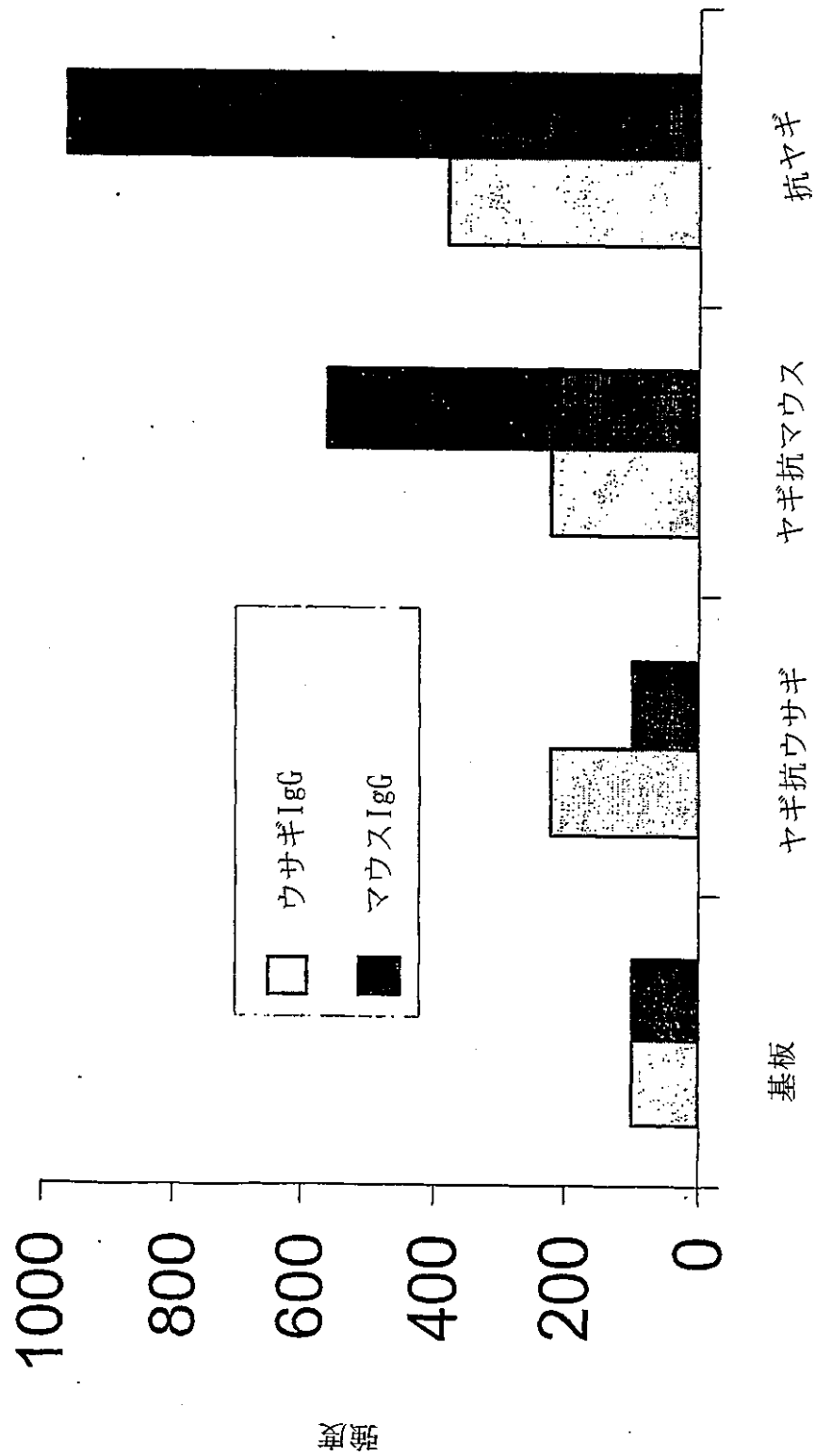
【図5】



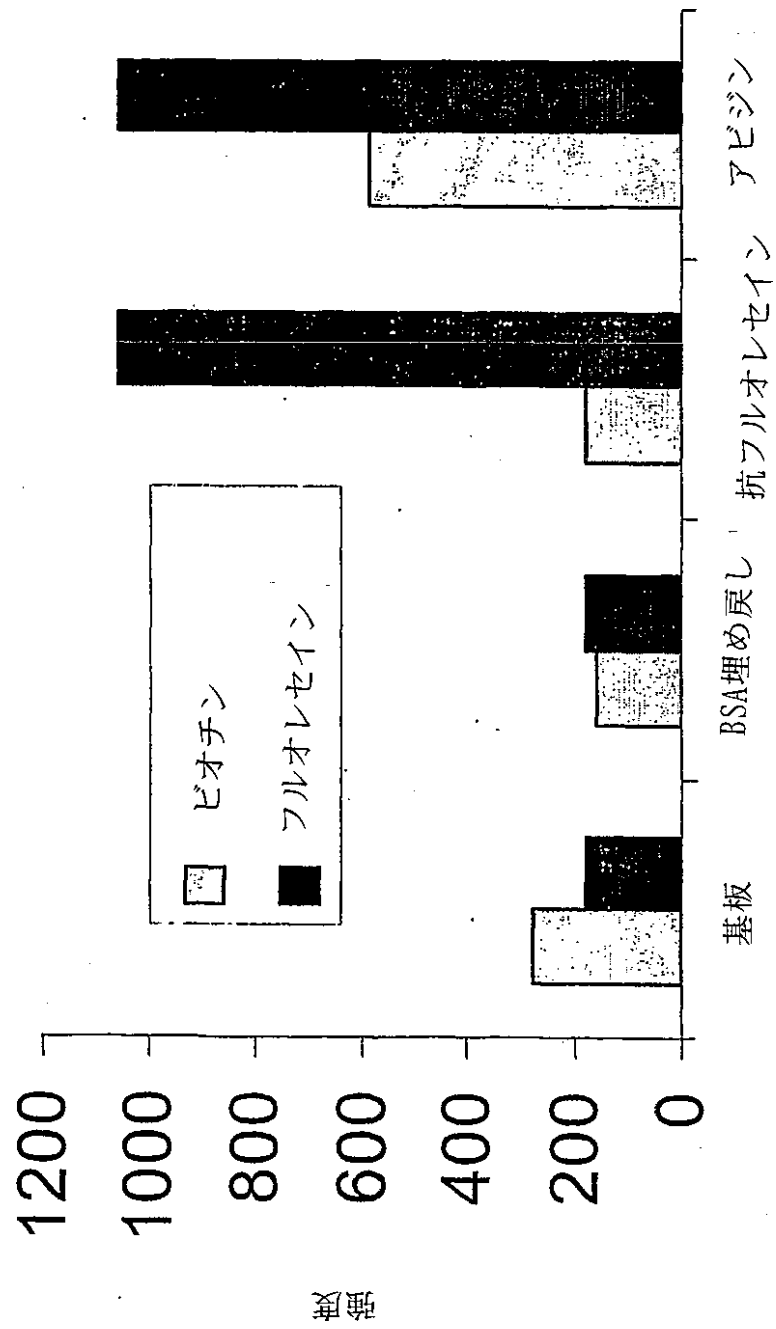
【図6】



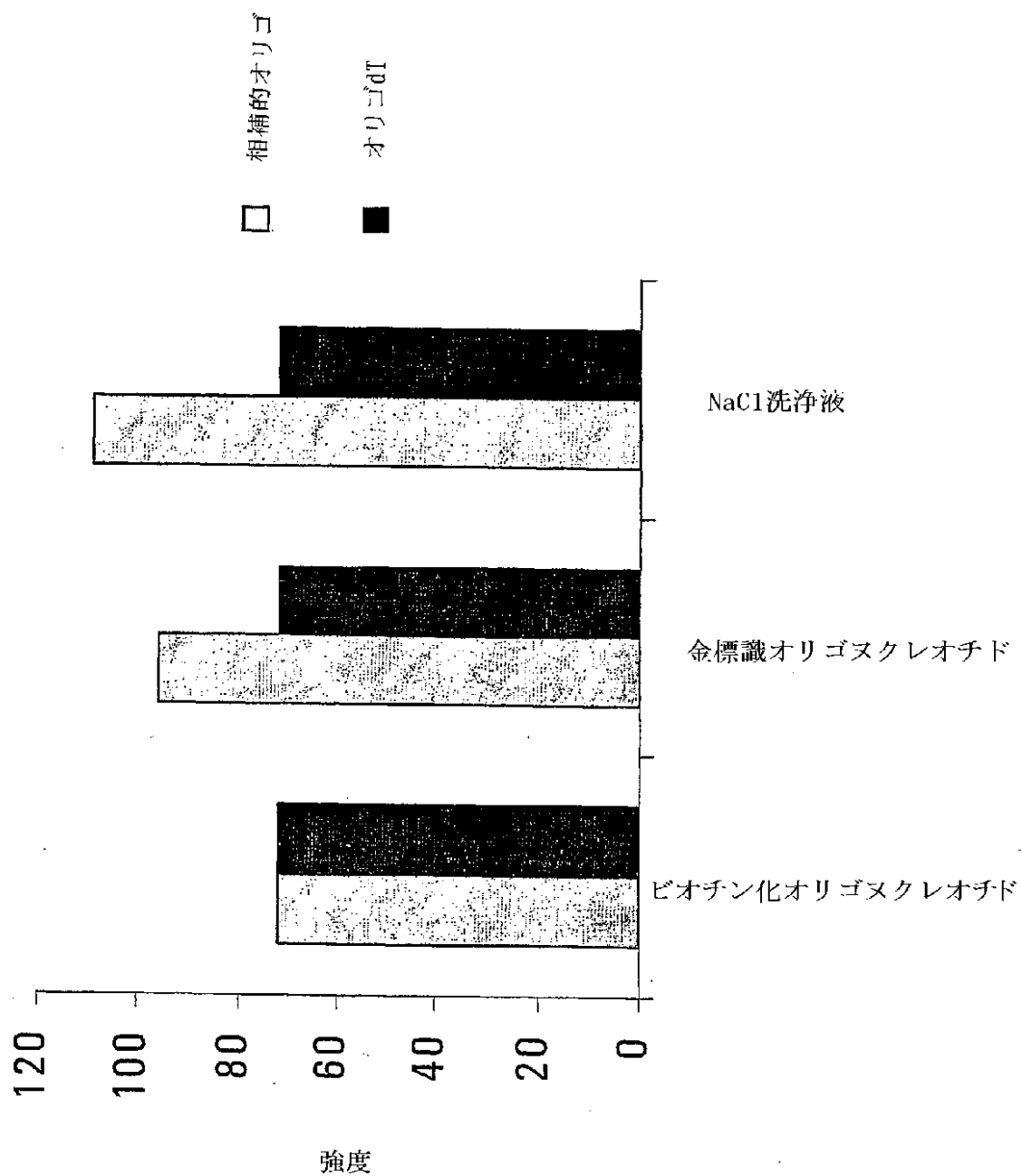
【図7】



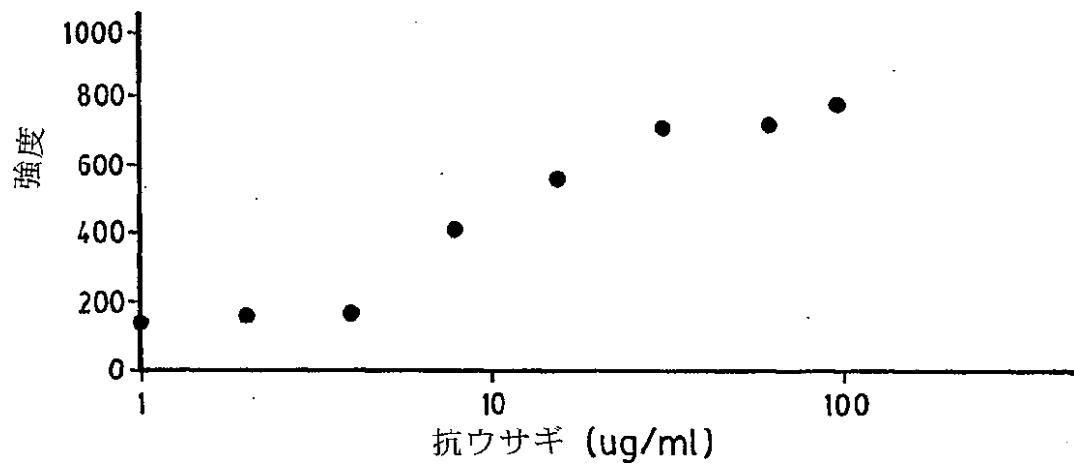
【図8】



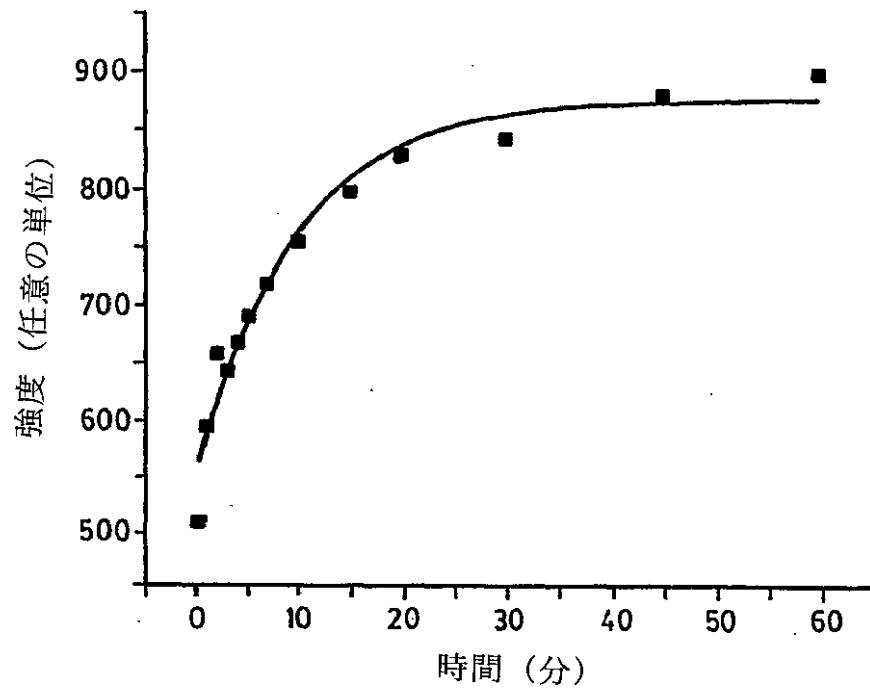
【図9】



【図10】



【図11】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatir Application No PCT/CA 01/00367		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N21/77 G01N21/47 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.	
A	US 5 989 923 A (MAYES ANDREW GEOFFREY ET AL) 23 November 1999 (1999-11-23) column 13, line 6 - line 50; figure 23	1-65
A	US 5 922 550 A (GRUNZE MICHAEL ET AL) 13 July 1999 (1999-07-13) cited in the application column 7, line 51 - column 8, line 7 column 8, line 59 - column 9, line 4	1-65
A	WO 98 43086 A (KIMBERLY CLARK CO) 1 October 1998 (1998-10-01) page 5, line 12 - line 28 page 10, line 26 - page 11, line 21 page 18, line 29 - page 19, line 3 page 47, line 15 - line 22 figure 6	1-65
☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 October 2001	Date of mailing of the international search report 06/11/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Navas Montero, E	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International	Application No
PCT/CA	01/00367

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5989923 A	23-11-1999	AU 2076795 A	17-10-1995
		CA 2186603 A1	05-10-1995
		EP 0753139 A1	15-01-1997
		WO 9526499 A1	05-10-1995
		GB 2301886 A , B	18-12-1996
US 5922550 A	13-07-1999	AU 731168 B2	22-03-2001
		AU 5615698 A	15-07-1998
		CN 1246179 A	01-03-2000
		EP 0946865 A1	06-10-1999
		WO 9827417 A1	25-06-1998
WO 9843086 A	01-10-1998	US 6180288 B1	30-01-2001
		AU 6763898 A	20-10-1998
		WO 9843086 A1	01-10-1998

フロントページの続き

(81)指定国 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71)出願人 ルー, リチャード
カナダ国 エム5アール 3ビー7 オン
タリオ, トロント, ハウランド アヴェニ
ュー 265

(72)発明者 ゴー, エム., シンシア
カナダ国 エム6ジー 1ヴィ8 オンタ
リオ, トロント, パルマーストン ガーデ
ンス 11

(72)発明者 ゴー, ジェーン, ビー.
カナダ国 エム5アール 3ビー7 オン
タリオ, トロント, ハウランド アヴェニ
ュー 265

(72)発明者 マカロニー, リチャード
カナダ国 ケー1アール 7エス7 オン
タリオ, オタワ, スラター ストリート
1614 - 400

(72)発明者 ルー, リチャード
カナダ国 エム5アール 3ビー7 オン
タリオ, トロント, ハウランド アヴェニ
ュー 265

Fターム(参考) 2G054 AA06 AB04 CA21 CA22 CA23
GA05 GE01
2G059 AA05 BB13 DD03 EE02 FF01
FF04 GG01 HH01 HH02 HH03
HH06 JJ12 JJ13 JJ17 KK02
KK04 MM01

专利名称(译)	用于多种分析物的测定方法和测定装置		
公开(公告)号	JP2003528311A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001569258	申请日	2001-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	去EM辛西娅 去蜂珍 通心粉过理查德· 理查德·娄		
申请(专利权)人(译)	去吧，EM，辛西娅 走了，简，蜜蜂。 通心粉过来，理查德· 娄，理查德·		
[标]发明人	ゴーエムシンシア ゴージェーンビー マカロニーリチャード ルーリチャード		
发明人	ゴー,エム.,シンシア ゴー,ジェーン,ビー. マカロニー,リチャード ルー,リチャード		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/47 G01N21/77 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54373 B01J2219/00659 B01L2300/0636 B01L2300/0819 B82Y30/00 C12Q1/6837 C12Q2565/513 G01N21/4788 G01N21/77 G01N33/543 G01N2035/00158 G01N2035/0429 Y10S435/808 Y10S436/805 Y10T436/13		
FI分类号	G01N21/47.A G01N21/77.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/CA21 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/GA05 2G054/GE01 2G059/AA05 2G059/BB13 2G059/DD03 2G059/EE02 2G059/FF01 2G059/FF04 2G059/GG01 2G059/HH01 2G059/HH02 2G059/HH03 2G059/HH06 2G059/JJ12 2G059/JJ13 2G059/JJ17 2G059/KK02 2G059/KK04 2G059/MM01		
优先权	60/191344 2000-03-22 US		
其他公开文献	JP4999249B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于分析多种分析物的方法和设备。 该方法使用其上布置有多个识别元件的传感器，每个元件包括以预定图案布置的基板。 每种图案都是独特的，因为它可以在测定中产生特征性的衍射图案。 图案可以在衬底表面上彼此渗透或不渗透。 检测多种分析物的方法包括使分析物的介质与图案化的基底接触；用光源照射基底；以及检测所得的衍射图案。 衍射图和衍射信号的强度提供有关特定分析物的存在和数量的信息。

