

(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2009-505065

(P2009-505065A)

(43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	G 2 G O 4 3
GO 1 N 21/35 (2006.01)	GO 1 N 21/64	A 2 G O 5 9
GO 1 N 21/21 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F
GO 1 N 21/39 (2006.01)	GO 1 N 21/35	Z
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 21/21	Z

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 55 頁) 最終頁に続く

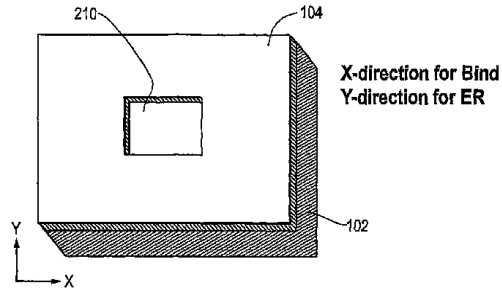
(21) 出願番号 特願2008-526030 (P2008-526030)
 (86) (22) 出願日 平成18年7月20日 (2006.7.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年4月8日 (2008.4.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/028473
 (87) 国際公開番号 W02007/019024
 (87) 国際公開日 平成19年2月15日 (2007.2.15)
 (31) 優先権主張番号 60/707,579
 (32) 優先日 平成17年8月11日 (2005.8.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/713,694
 (32) 優先日 平成17年9月2日 (2005.9.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/778,160
 (32) 優先日 平成18年2月28日 (2006.2.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503159210
 エス アール ユー バイオシステムズ,
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 01801 マサチュー
 セッツ州 ウォーバーン, ジル ストリ
 ト 14 エー
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100103115
 弁理士 北原 康廣
 (72) 発明者 スティーブン・シー・シュルツ
 アメリカ合衆国 03824 ニューハンプシ
 ャー州リー, シープ・ロード17番
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標識不使用下での結合検出と蛍光増幅を組合せた格子に基づくセンサー及びセンサー用読取システム

(57) 【要約】

格子に基づくセンサーであって、エバネッセント共鳴 (ER) 蛍光検出と標識を使用しない検出の両方の用途に適合するように設計された構造を有する該センサーが開示される。試料が乾燥状態にある空気モードでのER検出のために最適化されるいくつかの実施態様が開示される。試料が水のような液状媒体中に懸濁される液体モードでのER検出のために最適化される別の実施態様も開示される。一次元格子及び二次元格子も開示される。このような格子には中央ポスト又は中央ホールを有する単位セルによって特徴付けられる格子、及び二段状二次元格子が含まれる。この種のセンサー用の読取りシステムも開示される。1つの実施態様は、標識を使用しない検出データを収集するために最適化される第1光源及びER蛍光増幅データを収集するために最適化される第2光源及び少なくとも1つの検出器を具備する。1つの実施態様においては、検出器は結像システムであって、ERデータと標識不使用下でのデータを収集するためのCCDカメラを具備する。別の実施態様においては、少なくとも1つの検出器は、標識不使用下でのデータを収集



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センサー上に載置される試料を検査するためのセンサーであって、下記の光学的質問 1) 及び 2) の両方に対して対応できるような構造に設計された周期的な表面格子構造を有する支持体を具備する該センサー：

- 1) エバネッセント共鳴 (E R) 検出方式での光によるセンサーの光学的質問、及び
- 2) 標識不使用検出方式での光によるセンサーの光学的質問。

【請求項 2】

センサーと読取検出器との組合せであって、i) 該センサーが請求項 1 記載のセンサーを具備し、ii) 試料が空気媒体中に存在し、iii) 検出器が、E R 検出方式と標識不使用検出方式でのセンサーの光学的質問のための少なくとも 1 つの光源を具有し、iii) 少なくとも 1 つの該光源からの光が、格子構造に対して垂直な偏光を有する該組合せ。

10

【請求項 3】

センサーと読取検出器との組合せであって、i) 該センサーが請求項 1 記載のセンサーを具備し、ii) 試料が液状媒体中に存在し、iii) 検出器がセンサーの光学的質問のための少なくとも 1 つの光源を具有し、iii) 少なくとも 1 つの該光源からの光が、格子構造に対して平行な偏光を有する該組合せ。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの光源からの光が、a) 試料、b) センサーの表面、又は c) 試料及びセンサーの表面に結合した発光性物質を活性化させるように選択される波長を有する請求項 2 又は 3 記載のセンサーと読取検出器との組合せ。

20

【請求項 5】

少なくとも 1 つの光源からの光が、垂直な又はほぼ垂直な入射角でセンサーに質問する請求項 2 又は 3 記載のセンサーと読取検出器との組合せ。

【請求項 6】

読取検出器が、標識不使用検出方式での試料に対する反射光のピーク波長を計算するソフトウェアのモジュールを具有する請求項 2 又は 3 記載のセンサーと読取検出器との組合せ。

【請求項 7】

格子構造が二次元的な周期的格子構造を含み、該周期的格子構造が第 1 次元と第 2 次元において周期的であり、これらの次元が相互に直交する請求項 1 記載のセンサー。

30

【請求項 8】

周期的格子構造の第 1 次元が標識不使用検出用に設計される格子構造を含み、周期的格子構造の第 2 次元が E R 検出用に設計される格子構造を含み、第 1 次元における格子構造の深さが、第 2 次元における格子構造の深さよりも実質上大きい深さである請求項 7 記載のセンサー。

【請求項 9】

格子構造が積層体をさらに具備し、該積層体が支持体、該支持体に結合される格子構造を有する層、格子構造を有する該層上に沈着される SiO_2 層、及び該 SiO_2 層上に沈着される比較的高い屈折率を有する屈折物質の層を具有する請求項 8 記載のセンサー。

40

【請求項 10】

第 1 次元における格子構造が、 $260\text{nm} \sim$ 約 1500nm の周期及び約 $100\text{nm} \sim$ 約 3000nm の格子深さを有し、第 2 次元における格子構造が、約 $200\text{nm} \sim$ 約 1000nm の周期及び約 $10\text{nm} \sim$ 約 300nm の格子深さを有する請求項 8 記載のセンサー。

【請求項 11】

SiO_2 層が、約 $500 \sim$ 約 5000 の厚さを有する層を含む請求項 9 記載のセンサー。

【請求項 12】

高屈折率を有する屈折物質層に結合される発光性物質をさらに含む請求項 9 記載のセン

50

サー。

【請求項 1 3】

格子構造が、2 段状の 2 次元形態を有する単位セルのアレイを含む請求項 8 記載のセンサー。

【請求項 1 4】

格子構造が、0.6 ~ 1.2 の格子深さ対半周期比を有する請求項 1 記載のセンサー。

【請求項 1 5】

格子構造が単位セルのアレイを含み、各々の単位セルが、標識不使用検出方式用に設計される構造で第 1 次元方向へ延びる交互の高い領域と低い領域を有する第 1 の周期的格子構造、及び ER 検出方式用に設計される構造で該第 1 次元方向に対して直交する第 2 次元方向へ延びて第 1 の周期的格子構造上に重ね合わされる交互の高い領域と低い領域を有する第 2 の周期的格子構造を含む 2 段状の 2 次元形態を有する請求項 1 記載のセンサー。

10

【請求項 1 6】

格子構造が 2 次元単位セルのアレイを含み、各々の単位セルがバイオセンサーの表面内にホールを含む請求項 7 記載のセンサー。

【請求項 1 7】

格子構造が 2 次元単位セルのアレイを含み、各々の単位セルがバイオセンサーの表面から突出するポストを含む請求項 7 記載のセンサー。

【請求項 1 8】

格子構造が、高い領域と低い領域を交互に有するチェッカー盤形態を含む請求項 7 記載のセンサー。

20

【請求項 1 9】

直交する第 1 次元と第 2 次元内の格子構造が第 1 次元と第 2 次元において異なる周期性を有し、第 1 次元における周期性が、試料と結合する蛍光体を励起させるように同調される波長を有して第 1 光源から直角又はほぼ直角に入射する入射光に対して広域共鳴をもたらすように調整され、第 2 次元における周期性が、スペクトルの近赤外領域の第 2 光源からの照射に対して鋭い共鳴をもたらすように調整される請求項 7 記載のセンサー。

【請求項 2 0】

下記の試料群から選択される試料であって、バイオセンサー上に載置される少なくとも 1 種の該試料をさらに含む請求項 1 記載のセンサー：1000 ダルトン未満の分子量を有する分子、1000 ~ 10000 ダルトンの分子量を有する分子、アミノ酸、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウイルス粒子、ウイルス成分、細胞成分、ウイルス成分又は細胞成分の抽出物、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体 (scFv)、F(ab)フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、有機低分子、細胞、ウイルス、バクテリア、ポリマー、ペプチド溶液、タンパク質溶液、化合物ライブラリーの溶液、単鎖 DNA 溶液、二重鎖 DNA 溶液、単鎖 DNA 溶液と二重鎖 DNA の溶液との組合せ、RNA 溶液、及び生物学的試料。

30

【請求項 2 1】

生物学的試料が、下記の試料群から選択される試料を含む請求項 2 0 記載のセンサー：血液、血漿、血清、胃腸分泌物、組織又は腫瘍のホモジェネート、滑液、大便、唾液、痰、シスト液、羊水、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙及び前立腺液。

40

【請求項 2 2】

センサー上に載置される試料をさらに含み、該試料の天然蛍光が ER 検出方式によって検出される請求項 1 記載のセンサー。

【請求項 2 3】

バイオセンサー上に載置される試料をさらに含み、該試料の一部がインヒビターに結合される請求項 1 記載のセンサー。

【請求項 2 4】

インヒビターが蛍光性標識に結合される請求項 2 3 記載のセンサー。

【請求項 2 5】

50

試料がタンパク質を含有する請求項 2 3 記載のセンサー。

【請求項 2 6】

下記の過程 (i) ~ (iii) を含む少なくとも 1 種の試料の分析方法：

(i) 1) エバネッセント共鳴 (ER) 検出方式によるバイオセンサーの光学的質問、及び 2) 標識不使用検出方式によるバイオセンサーの光学的質問の両方に対して対応できるような構造に設計された周期的な表面格子構造を有する支持体を具備するセンサー上に少なくとも 1 種の試料を載置させ、

(ii) ER 検出方式用に設計される少なくとも 1 つの光源からの光を用いて読取検出器内の試料を照射すると共に、標識不使用検出方式用に設計される少なくとも 1 つの光源を用いてセンサーを照射し、次いで

(iii) センサーからの反射光を分析する。

【請求項 2 7】

少なくとも 1 種の試料を空気媒体中に存在させ、少なくとも 1 つの光源からの光が、格子構造に対して垂直な偏光を含む請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

少なくとも 1 種の試料を液状媒体中に存在させ、少なくとも 1 つの光源からの光が、格子構造に対して平行な偏光を含む請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 9】

少なくとも 1 つの光源からの光が、試料に結合される蛍光体を活性化させるように選択される波長を有する請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 0】

少なくとも 1 つの光源からの光が、試料の天然の蛍光を活性化させるように選択される波長を有する請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 1】

少なくとも 1 つの光源が、スペクトルの近赤外領域においてセンサーを照射する請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 2】

第 1 光源と第 2 光源からの光を組み合わせることで入射ビームを形成させ、該ビームを用いてバイオセンサーを照射する過程をさらに含む請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 3】

反射光を集めて結像装置へ誘導する過程をさらに含む請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 4】

反射光を積分型検出器内に集める過程をさらに含む請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 5】

ビームに対してセンサーを X 方向と Y 方向において移動させてバイオセンサーの多重検出領域に問い合わせることによって、該多重検出領域の各々の領域に対して ER 検出方式のデータと標識不使用検出方式のデータを発生させる過程をさらに含む請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

少なくとも 1 つの光源が第 1 の標識不使用光源と第 2 の ER 光源を含み、該第 1 光源と第 2 光源からの光を用いてセンサーを選択的に照射する過程をさらに含む請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 7】

少なくとも 1 つの光源からの光に対してセンサーを X 方向と Y 方向において移動させてセンサーの多重検出領域に問い合わせることによって、該多重検出領域の各々の領域に対して ER 検出方式のデータと標識不使用検出方式のデータを発生させる過程をさらに含む請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

少なくとも 1 種の試料が下記の試料群から選択される試料である請求項 2 6 記載のセンサー：1000 ダルトン未満の分子量を有する分子、1000 ~ 10000 ダルトンの分

10

20

30

40

50

子量を有する分子、アミノ酸、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウイルス粒子、ウイルス成分、細胞成分、ウイルス成分又は細胞成分の抽出物、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体 (scFv)、F(ab)フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、有機低分子、細胞、ウイルス、バクテリア、ポリマー、ペプチド溶液、タンパク質溶液、化合物ライブラリーの溶液、単鎖DNA溶液、二重鎖DNA溶液、単鎖DNA溶液と二重鎖DNAの溶液との組合せ、RNA溶液、及び生物学的試料。

【請求項 39】

生物学的試料が、下記の試料群から選択される試料である請求項 38 記載の方法：血液、血漿、血清、胃腸分泌物、組織又は腫瘍のホモジェネート、滑液、大便、唾液、痰、シスト液、羊水、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙及び前立腺液。

10

【請求項 40】

試料の一部を抑制剤に結合させる請求項 26 記載の方法。

【請求項 41】

インヒビターを蛍光性標識へ結合させる請求項 40 記載の方法。

【請求項 42】

試料の成分の結合を検出する過程をさらに含む請求項 26 記載の方法。

【請求項 43】

試料の天然蛍光が ER 検出方式によって検出される請求項 26 記載の方法。

【請求項 44】

センサーからの蛍光の測定に要する時間を得る過程をさらに含む請求項 26 記載の方法

20

【請求項 45】

センサーからの蛍光偏光の測定をさらに含む請求項 26 記載の方法。

【請求項 46】

格子構造が 2 次元格子構造を含み、周期的な格子構造の第 1 次元が標識不使用検出用に設計される格子構造を含み、周期的格子構造の第 2 次元が ER 検出用に設計される格子構造を含む請求項 26 記載の方法。

【請求項 47】

格子構造がさらに支持体、該支持体上に沈着された格子構造を有する層、格子構造を有する該層上に沈着された SiO₂ 中間層、及び該 SiO₂ 層上に沈着された比較的高い屈折率を有する屈折物質の層を具有する請求項 26 記載の方法。

30

【請求項 48】

格子構造がさらに支持体、該支持体上に沈着された第 1 次元と第 2 次元における格子構造を有する層、格子構造を有する該層上に沈着された SiO₂ 中間層、及び該 SiO₂ 層上に沈着された比較的高い屈折率を有する屈折物質の層を具有する請求項 46 記載の方法

【請求項 49】

SiO₂ 層が、約 500 ~ 約 5000 の厚さを有する請求項 47 記載の方法。

【請求項 50】

第 1 次元における格子構造が、260 nm ~ 約 1500 nm の周期及び約 100 nm ~ 約 3000 nm の格子深さを有し、第 2 次元における格子構造が、約 200 nm ~ 約 1000 nm の周期及び約 10 nm ~ 約 300 nm の格子深さを有する請求項 46 記載の方法

40

【請求項 51】

試料を液滴のアレイとして格子構造上に付着させた後で乾燥させて該格子構造上に斑点のアレイを形成させ、次いで標識化試験物質を該斑点アレイ上に付着させる過程を含み、該標識化物質の付着前に該斑点アレイの標識不使用検出用測定をおこない、該標識化物質の付着後に該斑点アレイの ER 検出用測定をおこなう請求項 26 記載の方法。

【請求項 52】

50

センサー上に載置される試料の標識不使用検出とエバネッセント共鳴（ER）検出の両方に適合するように設計される周期的格子パターンを有するセンサー用の読取検出装置であって、下記の構成要素 i) ~ v) を具備する該読取検出装置：

- i) センサーから ER 検出データを得るために適合した第 1 光源、
- ii) センサーから標識不使用検出データを得るために適合した第 2 光源、
- iii) 第 1 光源からの光と第 2 光源からの光を組み合わせることによって、センサーを照射する照射ビームを発生させる光学系、
- iv) センサーからの反射光を検出するための少なくとも 1 つの検出器、及び
- v) 少なくとも 1 つの検出器からのデータを使用することによって試料に関する ER 検出データと標識不使用検出データを得るための分析モジュール。

10

【請求項 5 3】

少なくとも 1 つの検出器が、標識不使用データを得るための分光計及び ER データを得るための光検出器を具備する請求項 5 2 記載の装置。

【請求項 5 4】

第 1 光源と第 2 光源からの光を偏光させる偏光器をさらに具備する請求項 5 2 記載の装置。

【請求項 5 5】

センサーを収納して該センサーを照射ビームに対して移動させる X-Y 方向に可動性のステージをさらに具備する請求項 5 2 記載の装置。

【請求項 5 6】

一組の光学フィルターとビームの分割 / 合成アセンブリーをさらに具備する請求項 5 2 記載の装置。

20

【請求項 5 7】

センサー上に載置される試料の標識不使用検出とエバネッセント共鳴（ER）検出の両方に適合するように設計される周期的格子パターンを有するセンサー用の読取検出装置であって、下記の構成要素 i) ~ v) を具備する該読取検出装置：

- i) センサーから ER データを得るために適合した第 1 光源、
- ii) センサーから標識不使用検出データを得るために適合した第 2 光源、
- iii) 第 1 光源と第 2 光源からの光を用いてセンサーを選択的に照射する光学系、
- iv) センサーからの反射光を検出するための少なくとも 1 つの検出器、及び
- v) 少なくとも 1 つの検出器から ER 検出データと標識不使用検出データを得るための分析機器。

30

【請求項 5 8】

少なくとも 1 つの検出器が、標識不使用データを得るための分光計及び ER データを得るための光検出器を具備する請求項 5 7 記載の装置。

【請求項 5 9】

第 1 光源と第 2 光源からの光を偏光させる偏光器をさらに具備する請求項 5 7 記載の装置。

【請求項 6 0】

センサーを収納してバイオセンサーを光学系に対して移動させる X-Y 方向に可動性のステージをさらに具備する請求項 5 7 記載の装置。

40

【請求項 6 1】

一組の光学フィルターとビームの分割 / 合体アセンブリーをさらに具備する請求項 5 7 記載の装置。

【請求項 6 2】

センサー上に載置される試料の標識不使用検出と消失共鳴（ER）の両方に適合するように設計される周期的格子パターンを有するセンサー、及び下記の要素 i) ~ iv) を有して該センサーからデータを得るための装置を具備する、読取検出装置とセンサーとの組合せ装置：

- i) センサーから標識不使用データと ER データを得るために適合した光源、

50

- ii) 該光源からの光を用いてセンサーを照射する光学系、
- iii) バイオセンサーからの反射光を検出するための少なくとも1つの検出器、及び
- iv) 少なくとも1つの検出器からERデータと標識不使用データを得るための分析機器

【請求項63】

光源が広帯域光源を含む請求項62記載の装置。

【請求項64】

光源が波長可変レーザーを含む請求項62記載の装置。

【請求項65】

光源が第1活性化と第2活性化において連続的に活性化され、少なくとも1つの検出器が第1活性化におけるセンサーからの標識不使用データ及び第2活性化におけるセンサーからのERデータを得る請求項62記載の装置。

10

【請求項66】

少なくとも1つの検出器が、光源の単一の活性化から標識不使用データとERデータを得る請求項62記載の装置。

【請求項67】

少なくとも1つの検出器が結像検出器を含む請求項62記載の装置。

【請求項68】

少なくとも1つの検出器が光検出器と分光器を含む請求項62記載の装置。

【請求項69】

ビーム拡大器をさらに具備する請求項64記載の装置。

20

【請求項70】

広帯域光源からの光を受容するモノクロメーターをさらに具備する請求項63記載の装置。

【請求項71】

広帯域光源からの光を受容するフィルターステージをさらに具備する請求項63記載の装置。

【請求項72】

センサーが、格子構造の表面上に酸化ハフニウムのコーティングをさらに具有する請求項1記載のセンサー。

30

【請求項73】

標識不使用検出用測定に、斑点のアレイの画像を得る過程、及び該斑点アレイの少なくとも1つの斑点に関するピーク波長値のシフトを検出する過程が含まれる請求項51記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、次の米国仮特許出願に基づき、米国特許法(35 U.S.C.)第119条(e)による優先権の利益を請求する出願であって、これらの出願の全開示内容も本願明細書の一部を成すものである：No. 60/707597(出願日：2005年8月11日)、No. 60/713694(出願日：2005年9月2日)、No. 60/778160(出願日：2006年2月28日)、No. 60/790207(出願日：2006年4月7日)。

40

【0002】

本発明は、一般的には、格子(grating)に基づく生化学的センサー装置、及び該装置の検出装置に関する。格子に基づくセンサーは、一般的には、生物学的物質(例えば、DNA、タンパク質、ウイルス及び細胞等)、低分子量物質又は化学薬品の該センサー装置の表面又は内部への吸着を光学的に検出するために使用されている。本発明によるセンサーは、次の2種の異なる用途に適用できるように構成される格子構造(grating structure)を有する：i) 標識不使用(label-free)条件下での結合の検出、及びii) 蛍光の検出

50

(例えば、試料が蛍光体に結合するか、又は天然の蛍光を発生する場合の蛍光の検出)。

【背景技術】

【0003】

1. 標識不使用検出センサー

格子に基づくセンサーは、100nm未満の精度で被処理物の正確な沈着と腐食を可能にする半導体製造装置の最近の発達によって開発された新規な光学的装置群である。

【0004】

光子的結晶 (photonic crystal) のいくつかの特性に起因して、該結晶は、格子型光学的バイオセンサーとしての用途に対して理想的な候補となっている。第1に、光子的結晶の反射/透過挙動は、生物学的物質 (例えば、タンパク質、DNA、細胞、ウイルス粒子及びバクテリア等) の該結晶上への吸着によって容易に調整することができる。検出することができるその他のタイプの生物学的物質には、小さな低分子量分子 (即ち、分子量が1000ダルトン (Da) 未満及び1000Da~10000Daの物質)、アミノ酸、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウイルス粒子、ウイルス成分、及び細胞成分 (例えば、特に限定的ではないが、ベシクル、ミトコンドリア、構造的特徴成分、周辺質又は細胞抽出物等) 等が含まれる。これらのタイプの物質を用いた研究により、次のことが証明されている。即ち、該結晶は、該結晶を通過する光の光学距離を限定された誘電率によって変化させる特性を有する。

10

【0005】

第2に、光子的結晶の反射/透過スペクトルは非常に狭いので、簡単な照明装置と検出装置を使用する場合でも、生化学的結合に起因する該結晶の光学的特性のシフトを高分解能で決定することが可能となる。第3に、光子的結晶構造を、電磁場伝搬を高度に局現化させるように設計することができるので、単一の光子的結晶表面を使用することによって、多数の生化学的結合現象を、3~5ミクロンよりも狭い隣接領域間の光学的干渉を伴うことなく同時に測定することが可能となる。

20

【0006】

さらに、高い表面/体積比を有すると共に、生化学的試験試料と接触する領域へ電磁場強度を集中させる機能を有する実用的な光子的結晶装置を形成させるためには、広範囲の材料と製造法が利用できる。製造材料と製造法は、プラスチックに基づく材料を用いる大容量装置の製造又は半導体材料を用いる高感度性能を最適化するように選択することができる。

30

【0007】

従来技術における格子型バイオセンサーの代表的な例は下記の文献に開示されている：

1) B. T. カニングハム、P. リ、B. リン及びJ. ペパー、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ B、第81巻 (2002年)、第316頁~第328頁 (「直接的な生化学的アッセイ法としての熱量測定による共鳴反射」)、

2) B. T. カニングハム、J. キュウ、P. リ、J. ペパー及びB. フー、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ B、第85巻 (2002年)、第219頁~第226頁 (「標識の介在しない生化学的相互作用の多重同時検出のための熱量測定によるプラスチック製共鳴光学的バイオセンサー」)、及び

40

3) A. J. ヘス及びR. P. V. ドゥイン、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー、第124巻 (2002年)、第10596頁~第10604頁 (「ナノスケールの光学的バイオセンサー：三角形の銀ナノ粒子の局現化表面プラズモン共鳴スペクトロスコピーに基づくアプローチの感度と選択度」)。

【0008】

光子的結晶バイオセンサーが併有する上記の利点は、標識が介在しないその他のバイオセンサー技術によって凌駕されない。感度が高く、小型で、多数の同時検出が可能な安価なバイオセンサー及び簡単で、小型で、耐久性がある読み出し型の装置の開発が可能となれば、従来は経済的な観点から適合できなかった用途において、薬学的発見、診断試験、環境関連試験、及び食品の安全性の分野におけるバイオセンサーの利用を可能とする。

50

【0009】

光子的バンドギャップ装置をバイオセンサーとして機能するように適合させるためには、その構造の一部を液状の試験試料と接触させなければならない。生体分子、細胞、タンパク質、又はその他の物質は光子的結晶の一部へ導入され、局部的に制限された電磁場の強度が最大になる部位において吸着される。この結果、結晶内への光の共鳴カップリングが改変され、反射/透過出力（即ち、ピーク波長）が同調される（即ち、シフトする）。反射出力のシフト度は、センサー上に存在する被検試料の量と関連する。センサーは照明/検出装置と併用され、該装置は偏光をセンサー内へ方向付けると共に反射光又は透過光を捕獲する。反射光又は透過光は、ピーク波長を測定するスペクトロメーターへ送られる。

10

【0010】

高い品質係数（ Q ）、共鳴光カップリング、高い電磁エネルギー密度及び密閉した光学的閉じ込めをもたらす光子的結晶の機能を利用することによって、感度の高い生化学的センサーを製造することができる。この場合、 Q は、共鳴周波数におけるピーク波長の鋭敏さの尺度である。光子的結晶のバイオセンサーは、液状の試験試料が周期的格子を透過し、生体分子又は細胞の結合による結晶の表面誘電率の改変によって光学的共鳴カップリング条件を同調させるように設計される。共鳴の高い Q 値及び結合電磁場と表面結合物質との強い相互作用に起因して、報告されている最高感度を有するいくつかのバイオセンサー装置が光子的結晶から誘導されている（クニングハムらによる前記の論文参照）。

20

【0011】

この種の装置が、200ダルトン（Da）未満の分子量を有する分子を高い信号対雑音の許容範囲で検出する機能及び個々の細胞を検出する機能を有していることは証明されている。光子的結晶内において共鳴的に結合した光は空間的に効果的に閉じ込めることができるので、光子的結晶表面は、アレイ形式による多数の同時におこなわれる生化学的アッセイを可能にする。この場合、相互に約10 μ m以内の隣接領域は独立して測定することができる。この点に関しては次の文献を参照されたい：P.リ、B.リン、J.ゲルステンマイヤー及びB. T.クニングハム、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ B、2003年（「生体分子の相互作用の標識を介在させないイメージングに関する新規な方法」）。

30

【0012】

光子的結晶構造に基づく標識不使用バイオセンサーには多くの実用的な利点がある。蛍光団、放射リガンド又は二次的レポーターを使用しない生化学的細胞性結合の直接的検出法は、実験上の不正確さ、即ち、分子のコンフォメーションに対する標識の効果、活性な結合性エピトープの遮断、立体障害、標識サイトへの不到達性、又は実験における全ての分子に対して同等に機能する適当な標識を見出すことができないことによってもたらされる不正確さの問題を除去する。標識を使用しない検出法は、アッセイ法の開発に要する時間と労力を著しく単純化すると共に、失活、貯蔵寿命及び背景（background）蛍光のための必要な実験的道具を必要としない。

40

【0013】

標識を使用しないその他の光学的バイオセンサーに比べて、光子的結晶の機能は、広帯域の光源（例えば、白熱電球又はLED）から垂直の入射角で光を照射し、反射される色彩のシフトを測定することによって容易に調べることができる。簡単な励起/読み出しスキームの利用により、実験室用器具に使用するのに適した安価で小型の強靱なシステム、及びケア医療用診断法や環境の監視に使用される手持ちの携帯システムを得ることが可能となる。光子的結晶自体は電力を消費しないので、この種の装置は、種々の液体状又は気体状のサンプリングシステム内へ容易に埋設することができる。あるいは、この種の装置は、単一の照明/検出基地によって建物内の何千ものセンサーの状態が追跡される光学的ネットワーク中に配置させることができる。

50

【0014】

光子的結晶のバイオセンサーは広範囲の材料と方法によって製造することができるが、

連続的なフィルム状シートを用いておこなうプラスチックに基づく製法によれば、高感度の構造体を得られることが判明している。従来はその他のバイオセンサーに対しては経済的に不相当とされていたプラスチックに基づく設計と製法によれば、低コスト/アッセイが要求される用途において使用されるべき光子的結晶バイオセンサーが得られる。

【0015】

本発明の譲受人は、光子的結晶バイオセンサー及び標識不使用下での結合の検出のためのこれに関連する検出装置を開発した。このセンサーと検出装置は次の特許文献に記載されている：米国特許出願公報2003/0027327号、同2002/0127565号、同2003/0059855号及び同2003/0032039号。共鳴ピーク波長のシフトの検出法は、米国特許出願公報2003/0077660号に教示されている。これらの特許文献に記載されているバイオセンサーは、プラスチック製のフィルム又は基体の連続的シート上へ適用された一次元的又は二次元的な周期的構造化表面を含む。この結晶の共鳴波長は、垂直入射におけるピーク反射率を、0.5ピコメーターの波長分解能が得られるスペクトロメーターを用いて測定することによって決定される。三次元的なヒドロゲル表面の化学的性質を利用しないで得られた質量検出感度(1pg/mm²)よりも小さな値は、その他の市販のバイオセンサーによっては証明されていない。

10

【0016】

前記の特許出願の明細書に記載されているバイオセンサー装置の基本的な利点は、プラスチック材料を用いる連続的な工程(1~2フィート/分)によって大量生産できることである。このようなセンサーを大量生産する方法は、米国特許出願公報2003/0017581号に記載されている。

20

【0017】

図1に示すように、バイオセンサー10の周期的表面構造体は低屈折率を有する材料12から形成されており、該材料は、より屈折率の高い材料14によって被覆される。低屈折率材料12は基体16と結合される。この表面構造体は、ポリエステル製の基体16の表面上での連続的製膜法を用いることによって、シリコンウェーハ「マスター」金型(即ち、所望の複製構造体のネガティブ)からの硬化エポキシ層12の内部で複製される。液状のエポキシ12をマスター格子の形態に適合させ、次いで紫外線の照射によって硬化させる。好ましくは、硬化エポキシ12は、ポリエステル製のシート状の基体16と接着させ、シリコンウェーハから剥離させる。センサーの製造工程は、屈折率の高い材料である酸化チタン(TiO₂)を硬化エポキシ12の格子表面上へスパッター法により120nmの厚さで沈着させることによって完結する。酸化チタンを沈着させた後、マイクロプレートの切片(3×5インチ)をセンサーのシートから切り取り、該切片を、底のない96個のウェル及び384個のウェルを具有するマイクロタイタープレート(microtiter plate)の底部へエポキシを用いて結合させる。

30

【0018】

図2に示すように、マイクロタイタープレートのウェルを規定するウェル20は液状試料22を保有する。底のないマイクロプレートとバイオセンサー構造体を組み合わせたものは集合的にバイオセンサー装置26として図示する。この方法によれば、非常に低いコストで、光子的結晶のセンサーを平方ヤードの規模で大量生産することができる。

40

【0019】

光子的結晶のバイオセンサー用の検出装置は、構造が簡単で、安価で、消費電力が少なく、強靱である。このシステムの模式図を図2に示す。反射される共鳴を検出するためには、白色光源からの光を、光ファイバー32(直径:100µm)とコリメーターレンズ34を通して、通常はマイクロプレートの底部を垂直の入射角で通過させることによってセンサーの表面領域(直径が約1mmの領域)へ照射する。検出ファイバー36は、スペクトロメーター38を用いる分析用の反射光を集めるための照射ファイバー32を用いて束ねられる。8個の一連の照明/検出ヘッド40は直線上に配置されるので、反射スペクトルは、マイクロプレートの一列内の8個の全てのウェルから一度に集められる(図3参照)。

50

【 0 0 2 0 】

マイクロプレート + バイオセンサー 10 は、X - Y 軸方向でのアドレスで呼び出せる作動段階 (motion stage) にあるので (図 2 には図示せず)、マイクロプレート内の各々のウェル列は順次アドレス指定することができる。測定時間は、作動段階の速度によって制限されるが、この装置を使用する場合には、96 個の全てのウェルに関する測定は約 15 秒間でおこなわれる。図 2 及び図 3 に示すシステムの構成に関するさらに詳細な説明は、米国特許出願公報 2003 / 0059855 号に記載されている。

【 0 0 2 1 】

下記の説明と議論は、BIND 技術として先に説明した標識を使用しない技術に関する。「BIND」は、本願の譲受人である SRU バイオシステム社の商標である。

10

【 0 0 2 2 】

2. 蛍光増幅センサー

米国特許第 6707561 号明細書には、当該分野においてはしばしば「エバネッセント共鳴 (ER; evanescent resonance)」と呼ばれている格子に基づくバイオセンサー技術が記載されている。この技術においては、サブミクロンスケール (sub-micron scale) の格子構造体を使用して蛍光信号を増幅させた後、格子表面上に結合した分子であって蛍光性標識を保有する 1 つの分子へ結合させる。ER 技術は、非増幅アッセイに比べて著しく低い濃度の被検体の結合検出を可能にする蛍光体に基づくアッセイの感度を増大させる。

【 0 0 2 3 】

ER 技術においては、光学的共鳴を発生させる格子を使用することによって、結合がおこなわれる格子表面上へレーザー光を集める。実際は、レーザーキャナーが、一般的には格子の表面からの入射角 () の一部においてセンサーを掃引する。一方、検出器はセンサーの表面からの光学的波長の長い蛍光を検出する。設計により、ER 格子の光学的特性によってほぼ 100% の反射 (共鳴として知られている反射) を特定の入射角とレーザー波長 () においてもたすことができる。格子構造体によるその内部へのレーザー光の閉じ込めによって、消失場の範囲内 (一般的には 1 ~ 2 nm) に結合した蛍光体からの発光を増幅させる。従って、共鳴においては、透過光の強度はゼロ近くまで低下する。

20

【 0 0 2 4 】

前述のように、先に言及した特許出願の明細書に記載されている標識を含まないバイオセンサーにおいては、サブミクロンスケールの格子構造体を使用されるが、該格子構造体は、ER 用の格子に比べて、幾何学的形態と使用目的の点で著しく相違する。実用に際しては、標識を使用しない技術と ER 技術は、共鳴に近い光学的特性に関して異なる要求を有する。共鳴現象におけるスペクトルの幅と位置が主として相違する。共鳴幅は、波長に対して反射率又は透過率としてプロットされる共鳴特性の波長尺度での半極大における全幅に関する。また、該共鳴幅は前記の Q 因子とも呼ばれている。共鳴幅は、入射角 () の関数として反射率又は透過率を表示する曲線上にプロットされる共鳴特性の幅 (度) にも関する。

30

【 0 0 2 5 】

所望により、標識を含まない格子に基づくセンサーからできるだけ幅の狭い共鳴ピークを発生させることによって、結合性の低いことを示すピークの位置の小さな変化の検出を促進させることができる。標識を含まないセンサーは、より多くの試料を結合させるために大きな格子表面積を有するという利点を有する。現在の実用化においては、より大きな表面積は、他の方法も存在するが、格子をより深くすることによって得られる。現在市販されている標識を含まないセンサーによれば 850 nm 近くで共鳴が得られるので、標識を使用しない BIND 計測器はこの波長を読み取るように最適化されている。

40

【 0 0 2 6 】

これとは反対に、実用的な ER 格子センサーは、固定された波長のレーザー光を使用すると共に、物理的な可変因子 (例えば、格子上に蓄積する試料の種類やセンサーの製造条件の相違等) の存在下での固定入射角において共鳴が発生することを保証するために、比

50

較的幅広い共鳴が利用できるように設計されている。一般に、場の強度は共鳴幅に伴って低減するので、実用的なERセンサーの設計には共鳴幅における調和が要求される。適当な共鳴幅を選択することによって、ER信号の利得を保持すると共に、アッセイ、測定器具及びセンサーの可変範囲にわたって一定の増幅度が得られる。典型的な用途においては、Cy5として知られているような常套の蛍光性染料を励起させるために633nmの波長が使用される。一部のER掃引性計測器によれば、最大のレーザー/蛍光体カップリング(coupling)に対して共鳴を同調させるように入射角を調整することが可能である。しかしながら、このような実用的態様には、適切な調整手段を採用しない限り、許容できない変化をもたらす要因が含まれる。

【0027】

既知のER設計においては、標識を使用しない最適設計に比べて浅い深さを有する格子が採用されている。例えば、米国特許第6707561号明細書においては、「透明層」(即ち、屈折率の大きな被覆層)の厚さに対する格子の深さの比は1未満(好ましくは0.3~0.7に規定されている。標識を使用しない最適な設計においては、同様に規定される比が1よりも大きな値(好ましくは1.5よりも大きな値)の格子が採用されている。標識を使用しない設計においては、格子の深さは、一般的には格子の線幅又は半周期によって定義される。例えば、現在実用化されている市販の標識不含センサーの半周期は275nmであり、格子の深さは約276nmであり、幾何学的比は1:1である。この同じセンサーの設計においては、格子の上部面上には大きな屈折率を有する酸化物被覆層(厚さ:約90nm)が形成される。従って、米国特許第6707561号明細書に記載の定義によれば、このセンサーにおける格子の深さ:酸化物層の厚さは約3:1である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0028】

本発明は、従来の上記問題点を解決するためになされたものであって、単一の装置内において2種の検出方式(標識不使用方式及び蛍光増幅方式)に対して最適化できるように設計され、単一の製品によって可能となる用途の多様性を著しく増大させる格子に基づく新規なセンサーを提供する。

【0029】

上記の全ての引用技術は、本願明細書の一部を構成するものである。

下記の実施態様とこれらの特徴は、範囲を制限しない例示的なシステム、装置及び方法によって例証的に説明するものである。種々の実施態様においては、前述の1又は複数の問題点を軽減又は解消し、また、その他の実施態様は別の改良に向けられたものである。

【課題を解決するための手段】

【0030】

本発明の1つの観点においては、ER方式と標識を使用しない検出方式の実施に適合された格子に基づくセンサーが開示される。この種のセンサーは、小さな入射角()において広帯域の共鳴をもたらす、常套のER方式による格子型バイオセンサーの場合と類似の性能曲線を示すと共に、標識を使用しない検出方式における鋭い共鳴ピークを保持する。いくつかの典型的な実施態様を開示する。第1の実施態様は、空気試料媒体中において光(格子に対して垂直な光)のTM偏光を伴うER方式に対して最適化される。第2の実施態様は、液状試料媒体中においてほぼ垂直な入射角、633nm励起及びTE偏光を伴うER方式に対して最適化される。これらの実施態様のコンピュータによるモデリング(modeling)によれば、各々の実施態様が、標識を使用しない検出方式において鋭いピーク波長共鳴(高いQ因子)を維持することが示される。

【0031】

1つの配置態様においては、バイオセンサーは1次元又は2次元の周期的表面格子構造を有している。この場合、該周期的表面格子構造は、エバネッセント共鳴(ER)検出方式における第1光源からの光によるバイオセンサーの光学的質問(optical interrogation)を最適化するように構成されると共に、標識を使用しない検出方式における第2光源

10

20

30

40

50

からの光によるバイオセンサーの光学的質問を最適化するように構成される。1つの可能な実施態様においては、格子は2次元格子の形態を有しており、該格子は相互に直交する第1方向と第2方向において周期的である。別の実施態様においては、格子は1次元格子の形態を有しており、第1の方向（例えば、X方向）においては周期的であるが、第2の方向においては周期的ではない。

【0032】

バイオセンサーにおいて標識を使用しない検出方式の利点は、より大きな表面積をもたらすより深い格子に起因し、これによってより多量の試料の付着が可能となる。より多くの付着試料は、ピーク波長値のより大きなシフトをもたらすより多くの信号を発生させる。従来のER格子は、標識を使用しない本発明による格子センサーと同等な標識不使用感度をもたらすのに十分な表面積（深さ）を有していない。従って、最大の表面積（この場合には大きな格子深さに起因する）をもたらすと共に、所望のレーザー励起波長と小さな入射角（好ましくは10度未満、より好ましくは5度未満）において広い共鳴曲線をもたらすバイオセンサーを設計することができる。代表的な1次元態様におけるERと標識不使用性能に対する要求を満たすバイオセンサーにおいては、半周期に対する格子深さの比は約0.6～約1.2である。約160nm～約210nmの格子深さは特に要請される。もちろん、これらのパラメータは、ER又は標識不使用性能を重要視するための特定のセンサーの性能目的に対応させるために変化させてもよく、あるいは、例えば、本明細書に記載のような2次元格子においては変化させてもよい。

10

【0033】

当業者であれば、本明細書に開示される教示内容による格子の設計をコンピューターでシミュレーションすることにより、該教示内容による別の格子であって、先に例示した非制限的な第1実施態様と第2実施態様の詳細な事項とは相違する格子の設計を開発することができる。別の観点においては、ERと標識不使用検出の2つの用途に供されるバイオセンサーの設計方法が、コンピュータによるモデリング技法によって開示される。

20

【0034】

ERと標識不使用検出の両方に適した2次元直交格子構造を有する格子に基づくセンサーも開示され、該センサーは一部の機器においては好ましいものである。2次元格子はワッフル(waffle)（ホール）、ワッフルアイロン(waffle iron)（ポスト）、又は2方向において大領域と小領域が交互に出現するチェス盤のような形態を有していてもよい。2次元格子はX方向とY方向において異なる周期を有していてもよい。このような形態的特徴を有する格子はZ方向において種々の側面、例えば、傾斜状側面又は湾曲状側面等を有していてもよい。従って、ワッフル状形態の場合、キャビティ又はウェルは正方形よりも長方形の形態を有していてもよい。実用上、これらの形態はX方向とY方向において丸みを帯びていてもよい（即ち、鋭利な角を有していなくてもよい）。従って、「正方形」又は「長方形」という用語は全体的な形態について使用するものであり、このような形態は丸みを帯びていてもよい。2次元格子によってもたらされる付加的な融通性を利用することにより、標識不使用検出とER検出の両方に関する共鳴の位置が異なる波長において出現するように調整することができる。このような可能性により、既存の標識不使用検出機器との適合性を維持すると共に、ERを異なる波長での共鳴に調整できるという重要な利点が得られる。例えば、X方向の周期性は、Cy3蛍光体（緑色光）又はCy5蛍光体（赤色光）を励起するように調整された波長の光の入射角が垂直又はほぼ垂直になる条件下において広帯域共鳴をもたらすことができ、一方、Y方向の周期性は、現在市販されている標識不使用センサーの場合と同様に、820nm～850nm（近赤外）において鋭敏な標識不使用共鳴をもたらすことができる。

30

40

【0035】

ER検出と標識不使用検出の両方に対して良好な性能を発揮するように構成されて配置される格子に基づくバイオセンサーの別の実施態様として、2次元2段状(two-level)格子構造体も開示される。

【0036】

50

別の観点においては、次の過程 (i) を含む少なくとも 1 種の試料の分析方法が開示される： (i) エバネッセント共鳴 (E R) 検出方式におけるバイオセンサーの光学的質問に対して対応できるような構造に設計されると共に、標識不使用検出方式におけるバイオセンサーの光学的質問を最適化する周期的な表面格子構造を有する支持体を具備するバイオセンサー上に少なくとも 1 種の試料を載置させる。この分析方法にはさらに次の過程 (ii) 及び (iii) が含まれる： (ii) E R 検出方式用に設計される少なくとも 1 つの光源からの光を用いて読取検出器 (readout detection instrument) 内のバイオセンサーを照射すると共に、標識不使用検出方式用に設計される該光源 (又は第 2 光源) を用いて該バイオセンサーを照射し、次いで (iii) バイオセンサーからの反射光を分析する。試料の分析過程には、試料中の成分の結合性、例えば、バイオセンサーの表面上への試料中の成分の結合性又は第 1 成分 (例えば、タンパク質) への第 2 成分 (例えば、蛍光体、抑制剤又は標識等) の結合性等を検出する過程が含まれていてもよい。

10

【0037】

1 つの実施態様においては、読取り系は 2 つの光源を含んでいてもよい。即ち、第 1 光源は B I N D 用光源 (例えば、白色光源又は発光ダイオード) であり、第 2 光源は E R 測定用光源 (例えば、レーザー等) である。しかしながら、別の実施態様においては、単一の光源 (例えば、キセノン放電ランプ及び波長可変レーザー等) が使用され、2 つ又はそれよりも多くの帯域通過フィルターを用いて 2 種の検出方式に対して適当な照射波長がもたらされるように光源のサンプリングがおこなわれる。

【0038】

20

1 つの可能な実施態様においては、試料は空気媒体中に存在し、第 1 光源からの光は、格子構造に対して垂直な偏光を含む。別の可能な実施態様においては、試料は液状媒体中に存在し、第 1 光源からの光は格子構造に対して平行な偏光を含む。1 つの可能な実施態様においては、第 1 光源からの光は、試料に結合される蛍光体を活性化させるように選択される波長を有する。別の可能な実施態様においては、第 1 光源からの光は、試料の天然の蛍光を活性化させるように選択される波長を有する。さらに別の実施態様においては、試料の一部は、結合蛍光体を含んでいてもよい抑制剤と結合する。試料は、例えば、タンパク質等であってよい。

【0039】

本発明によるバイオセンサー用の読取 / 検出装置のいくつかの代表的な態様についても説明する。1 つの実施態様においては、読取 / 検出装置は下記の構成要素 i) ~ v) を具備する：

30

- i) バイオセンサーから E R 検出データを得るために適合した第 1 光源、
- ii) 標識不使用検出データを得るために適合した第 2 光源、
- iii) 第 1 光源からの光と第 2 光源からの光を合成することによって、バイオセンサーを照射するための照射ビームを発生させる光学系、
- iv) バイオセンサーからの反射光を検出するための少なくとも 1 つの検出器、及び
- v) 少なくとも 1 つの検出器からのデータを使用することによって試料から E R データと標識不使用データを得るための分析モジュール。

【0040】

40

検出器は結像検出器、例えば、電荷結合素子 (C C D イメージャー (imager)) 等であってもよい。別のタイプの検出器、例えば、光検出器若しくは分光器であってもよく、又はこれらを併用し、一方の検出器によって E R データを入手し、他方の検出器によって B I N D データを入手してもよい。

【0041】

別の代表的な態様においては、光学系は、単一光源からの光を用いてバイオセンサーを選択的に照射する。バイオセンサーは多数の検出サイト又はウェルを有していてもよく、また、上記の装置は、光源に対して検出サイトを連続的に移動させることによって全ての検出サイトから E R データと標識不使用データを連続的に入手できるようにする可動性ステージ (motion stage) を具備していてもよい。

50

【 0 0 4 2 】

要約すれば、本明細書の開示内容においては、高い蛍光能を有する光子結晶に基づく標識不使用バイオセンサーを単一装置内で組み合わせる新規な検出/定量化プラットフォームが記載される。標識不使用技術とER技術は単独でも非常に有用である。これらの2種の検出技術の組合せが可能となることにより、生物学的物質、例えば、細胞、タンパク質及び低分子等の相互作用を一般的に検出して選択的に測定するための強力なアプローチ手段がもたらされる。本明細書に開示される組み合わせられたバイオセンサーは、広範囲にわたる生物学的試料又は化学的試料の検出において有用である。

【 0 0 4 3 】

検出することができる試料群には、分子量が小さいか又は比較的小さい分子（即ち、1000Da未満の分子量を有する物質及び1000～10000Daの分子量を有する物質）、アミノ酸、核酸、脂質、炭水化物、核酸ポリマー、ウイルス粒子、ウイルス成分、細胞成分（例えば、特に限定的ではないが、ベシクル、ミトコンドリア、構造的特徴成分、周辺質又はこれらの抽出物等が例示される）等が含まれる。

10

【 0 0 4 4 】

一般液には、本発明によるバイオセンサーを用いて検出してもよい特異的に結合する物質（試料）には下記のものが含まれる：ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体（scFv）、F(ab)フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、有機低分子、細胞、ウイルス、バクテリア、ポリマー、ペプチド溶液、タンパク質溶液、化学的化合物ライブラリー（library）の溶液、単鎖DNA溶液、二重鎖DNA溶液、単鎖DNA溶液と二重鎖DNAの溶液との組合せ、RNA溶液、及び生物学的試料。

20

【 0 0 4 5 】

この種の生物学的試料は、例えば、下記の群から選択される試料であってもよい：血液、血漿、血清、胃腸分泌物、組織又は腫瘍のホモジェネート、滑液、大便、唾液、痰、シスト液、羊水、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙及び前立腺液。

【 0 0 4 6 】

本明細書に開示されるバイオセンサーは、次の結合性（a）～（c）を検出するために使用してもよい：（a）上記のいずれかの種類の試料成分とバイオセンサー表面との結合性、（b）試料と試料中の別成分（例えば、試料中の蛍光体）との結合性、及び（c）試料又は試料成分と、該試料中に添加される第2試料との結合性。結合性（b）の場合、センサーの表面は、試料中の一部の成分（例えば、ストレプトタビジン-ビオチン又はHis）と結合してよく、また、バイオセンサーは、試料中の結合成分と試料中の付加的な成分群（例えば、ポリマーゼ錯体）との相互作用を検出するために使用してもよい。結合性（c）の場合、試料は、バイオセンサーの表面に結合した成分、及びバイオセンサー上に存在する第2試料からの他の成分と特異的に結合/付着した別の成分を含んでいてもよい。

30

【 0 0 4 7 】

本明細書に開示されるセンサーは、結合又は相互作用する物質の量の定量化のために使用してもよい。

40

【 0 0 4 8 】

以下の一般的な例は、本明細書に開示される格子に基づくセンサーの併用によって可能となる新規な有用性の全てを挙げるものではなく、また、該有用性はこれらに限定されるものではない。

1) 2つの技術の結合により、混合試料の母集団（population）中に存在する蛍光体で標識化された物質の百分率が識別される。標識の存在しないシグナルは、センサーに結合したマス全体の定量的な尺度を提供する。一方、ERシグナルは、標識の存在を定量化する。

2) これらの技術の結合は、異種源からの2つの結合シグナルを提供することによって、細胞、タンパク質及び小さな分子間における相互作用の測定における統計的厳密性も高

50

める。

【0049】

3) フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)原理を利用することにより、センサーの併用によって、2つの標識度の異なる蛍光分子間の距離又は同一分子の2つの標識度の異なる部分間の距離の測定が可能となる。

4) 2つの技術の結合により、付加的な情報を提供することができる。標識のないシグナルは細胞の付着を定量化することができ、発光シグナルは、細胞に結合した蛍光体標識化リガンドの量を定量化することができる。もちろん、上述のような標識のない生物学的物質及び標識化した生物学的物質が本発明によるバイオセンサーにおいて検出される場合には、その他の方法も可能である。

5) 2つの技術の結合により、結合した全マスと分子数を識別することによって分子量の測定をおこなってもよい。

6) さらに、結合されたバイオセンサーは、抑制結合の研究のような他の方法を実施するための相互に独立した2種の定量試験を可能とする。さらに、抑制剤リガンドの結合性の直接的定量化能を含むタンパク質と支持体との間の抑制結合相互作用に関するより完全な理解と特徴付けが可能となる。付加的な例としては、バイオセンサーが非常に強い結合性相互作用に関する研究であって、弱い結合親和性を有する既知の競合性抑制剤を使用することによって、より強い結合性物質の摂動と観察をおこなう該研究を促進することが挙げられる。

【0050】

7) 組み合わせられたER/標識不使用バイオセンサーは、生物学的分子の天然の蛍光を利用することによって(即ち、結合蛍光標識の使用を必要としない)、活性、例えば、他の生物学的分子と小さな被験分子との相互作用における折畳み(folding)、積重ね(stacking)及び変化並びにこれらへの変化速度等の生物学的特徴の測定をおこなうアッセイに対して特に有用である。このような特徴の測定は、結合蛍光標識を用いておこなうことができるが、この種の結合標識は必ずしも必要ではなく、特に固有の蛍光特性を有する生物学的物質に対してはそうである。この点に関しては次の文献を参照されたい: チャールズR. カントン及びポールR. シンメル、第1部~第3部 バイオフィジカル・ケミストリー: 生物学的分子の挙動と研究、W. H. フリーマン・アンド・カンパニー、ニューヨーク(1980年)、第443頁、表8-表2(該表には、タンパク質と核酸の構成成分及び補酵素の蛍光特性、これらの吸収スペクトルと発光スペクトル及び感度が記載されている)。天然蛍光を用いるこの技法は、核酸ポリマー(DNA、RNA)(蛍光ヌクレオシド)の積重ねとハイブリッド形成、タンパク質(蛍光アミノ酸フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン)及び脂質膜(これらの異なる区画へ蛍光体を組み入れたときの発光の強化効果と抑制効果)に関して特に重要である。1つの実施態様においては、標識を使用しないBINDの特徴により、試料又は試料に結合したリガンドの量を定量することができ、また、ERの特徴により、天然の蛍光の検出と生物学的変化の高感度追跡が可能となる。

【0051】

例示的な実施態様を添付図に基づいて説明する。これらの実施態様及び添付図は、本願発明を例示的に説明するためのものであって、本願発明を限定するものではない。本発明の範囲に関連する全ての疑問は特許請求の範囲に基づいて回答されるべきである。以下において、添付図面について簡単に説明する。

【0052】

図1は、従来技術によるバイオセンサーの部分的な模式的断面図である。

図2は、従来技術によるバイオセンサー/検出システムであって、該バイオセンサーを照明すると共に、該バイオセンサーからの反射光のピーク波長のシフトを測定するための該システムの模式図である。

図3は、底のないマイクロタイプレート基底部の基部へ固定された図1に示す構造を有するバイオセンサー装置のウェルの全列を読み取る8個の照明ヘッドを具備する装置の模

10

20

30

40

50

式的構成図である。

図 4 は、E R / 標識不使用混成検出バイオセンサーの第 1 態様の断面図である。

図 5 は、E R / 標識不使用混成検出バイオセンサーの第 2 態様の断面図である。

【 0 0 5 3 】

図 6 は、従来技術による E R バイオセンサー（「ノヴァチップ (NovaChip)」）における入射角の関数としての透過率を比較するグラフである。この場合、乾燥媒体（空気）環境下における E R 検出に使用した図 4 に示す態様のコンピュータシミュレーションを用いた。

図 7 は、水性媒体環境下における標識不使用検出方式による図 4 に示す態様に対する波長の関数としての反射率を比較するグラフである。この場合、該グラフは、図 4 に示す態様のコンピュータシミュレーションから得られたものである。

図 8 は、標識不使用検出方式による図 4 に示す態様に対する波長の関数としての反射率のグラフを示す。該グラフは、表面への質量付加（例えば、バイオセンサーへの試料の添加による質量付加）に回答するピーク波長値のシフトを示す。この場合、該グラフは、図 4 に示す態様のコンピュータシミュレーションから得られたものである。

図 9 は、標識不使用 / E R 検出方式による図 5 に示す態様に対する共鳴ピークを示す波長の関数としての反射率のグラフを示す。この場合、該グラフは、図 5 に示す態様のコンピュータシミュレーションから得られたものである。

【 0 0 5 4 】

図 10 は、図 5 に示す態様に対するの関数としての透過率のグラフである。該グラフは、E R センサーの例である従来技術による「ノヴァチップ」の透過率曲線と比較される。

図 11 A 及び図 11 B は、専ら E R 検出用に設計された一次元的な直線状格子構造体であって、ブダハラによる従来技術文献に開示されている E R チップとほぼ類似するようにモデル化された格子構造体の斜視図及び断面図をそれぞれ示す。

図 12 A 及び 12 B は、波長の関数としての反射効率のグラフ及び入射角の関数としての反射効率のグラフをそれぞれ示す。これらのグラフは、X 軸方向へ偏光された光を図 11 A と図 11 B に示す構造体上へ入射させたときに得られたグラフである。

図 13 A ~ 図 13 C は、図 11 A 及び図 11 B に示す構造体（ $Z = 140 \text{ nm}$ ）の下部表面に対応する X Y 平面における電界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す（入射波長： 632 nm ）。図 13 D ~ 図 13 F は、図 13 A ~ 図 13 C に示す同じ X Y 平面における磁界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す（入射波長： 632 nm ）。

図 14 A ~ 図 14 C は、図 11 A 及び図 11 B に示す構造体（ $Z = 110 \text{ nm}$ ）の上部表面に対応する X Y 平面における電界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す（入射波長： 632 nm ）。図 14 D ~ 図 14 F は、図 14 A ~ 図 14 C に示す同じ X Y 平面における磁界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す（入射波長： 632 nm ）。

【 0 0 5 5 】

図 15 A 及び図 15 B は、格子構造中の周期的なホールによって特徴付けられる 2 次元格的格子の形態の斜視図及び断面図をそれぞれ示す。この場合、該格子構造は、X 軸方向の偏光によって照射されたときの水環境内での B I N D（標識不使用）検出に対して最適化されると共に、Y 軸方向の偏光によって照射されたときの空気環境内での E R 検出に対して最適化された構造である。

図 16 及び図 17 は、Y 軸方向の偏光を図 15 A 及び図 15 B に示す構造体上へ入射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフ及び入射角（ 632.5 nm ）の関数としてのグラフをそれぞれ示す。これらの図は E R 様式の有用性を例証する。

図 18 A ~ 図 18 C は、図 15 A 及び図 15 B に示す構造体（ $Z = 78 \text{ nm}$ ）の下部表面に対応する X Y 平面における電界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す（

10

20

30

40

50

入射波長：632.5 nm)。図18D～図18Fは、図18A～図18Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長：632.5 nm）。

【0056】

図19A～図19Cは、図15A及び図15Bに示す構造体（Z = 433 nm）の上部表面に対応するXY平面における電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長：632.5 nm）。図19D～図19Fは、図19A～図19Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長：632 nm）。

図19Gは、X軸方向の偏光を図15に示す構造体上へ照射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフを示す。この共鳴ピークは標識を使用しない検出に使用される。

図20A及び図20Bは、格子構造中の周期的なポストによって特徴付けられる2次元格子の形態の斜視図及び断面図をそれぞれ示す。この場合、該格子構造は、X軸方向の偏光によって照射されたときの水環境内でのBIND（無標識）検出のための1つの方向に対して最適化されると共に、Y軸方向の偏光によって照射されたときの空気環境内でのER検出に対して最適化された構造である。

【0057】

図21A及び図21Bは、Y軸方向の偏光を図20A及び図20Bに示す構造体上へ入射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフ及び入射角（波長：633 nm）の関数としてのグラフをそれぞれ示す。これらの図はER方式の有用性を例証する。

図22A～図22Cは、図20A及び図20Bに示す構造体（Z = 70 nm）の下部表面に対応するXY平面における電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長：633 nm）。図22D～図22Fは、図22A～図22Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長：633 nm）。

図23A～図23Cは、図20A及び図20Bに示す構造体（Z = 430 nm）の上部表面に対応するXY平面における電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長：633 nm）。図23D～図23Fは、図23A～図23Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長：632 nm）。

【0058】

図24は、X軸方向の偏光を図20に示す構造体上へ照射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフを示す。この共鳴ピークは標識を使用しない検出に使用される。

図25は、ER方式と標識不使用方式を組み合わせた格子に基づくセンサーに関する画像読取りシステムの模式図である。

図26は、ER様式と無標識様式を組み合わせた格子に基づくセンサーに関する第2の画像読取りシステムの模式図である。

図27は、図26に示す実施態様のより詳細な模式図である。

図28A～図28Cは、ER様式と無標識様式を組み合わせたセンサーのさらに別の実施態様における2段型の二次元的格子構造体を示す3種の単位セルの斜視図である。

【0059】

図29は、図28A～図28Cに示す構造体のコンピュータシミュレーションによって得られた反射スペクトル（反射光の波長の関数としての相対強度）のグラフである。

図30は、ERとBINDを組み合わせた格子に基づくセンサーの断面図である。この場合、UV-硬化プラスチック製格子層及びセンサーの上部表面を形成する高屈折率層との間には、中間のSiO₂層が介在する。

図31は、格子に基づくセンサー（該センサーは、ER測定とBIND測定の両方に対

10

20

30

40

50

して最適化させていてもよく、あるいは最適化されていなくてもよい)上に沈着されたスポットの微小配列の画像を示す。

図32は、センサー上に載置されたDNA試料の存在に起因する図31に示すスポットの1つに関するピークシフトを示すグラフである。

図33は、位置の関数としてのピーク波長値のnm単位のシフト(該シフトはスポット中に含まれるDNAの量と定量的に関連づけられる)及び消失スポット(スポット列の暗い位置)を示すスポット列を表示するグラフである。この場合、消失スポットはグラフの下部領域に示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0060】

周期的な格子構造を有する格子に基づくバイオセンサーが開示される。該格子構造は、液状環境又は乾燥環境下でのER検出、及び標識の不存在下での検出の両方に対して最適化されており、これらの検出に対して有用である。該バイオセンサーを用いる用途に適合する読取りシステムも開示される。また、本発明によるバイオセンサーを用いる試料の試験方法も開示される。

【0061】

第1の実施態様

図4は、格子に基づくセンサーのER検出と標識不使用検出に対する商業的な要求に適合することが期待される格子構造100を有する一次元的センサーの第1の実施態様を示す模式的断面図である。図4は、一次元又は一方向に延びる格子構造100の1つの周期を示す。図4においては、寸法の尺度は一定ではない。図4に示す格子構造100は積層状態で透明な材質、例えば、ポリエチレンテレフタレート(PET)若しくはその他のプラスチック、ガラス又はその他の材質から成る基材シート(図示せず)へ接合される。

【0062】

格子構造は、周期的に反復される材料102から成る。好ましくは、該材料はUV-硬化性材料(例えば、エポキシ)を含有する。該硬化性材料は格子のマスターウェーハ(master wafer)(図示せず)を用いて塗布され、これによって、支持体層の下方に位置するPET材料製の基材シート上に格子パターンが複製される。UV硬化材料102はPETシートのような支持体シート上に適用される。支持体材料はポリカーボネート又は環状オレフィンポリマー、例えば、「ゼアノール(Zeanor)」(登録商標)等も含むことができる。構造化層102のその他の製造法には、ポリマー支持体中への直接的な熱的型押法が含まれる。中間材104は、スパッター法によって形成される高屈折率を有する酸化物(例えば、 TiO_2 又は Ta_2O_5)の被覆層を示す。最上部の材料106は、試料用媒体を示す。通常は、該媒体は水性緩衝液(標識不使用検出方式の場合)又は空気(ER検出方式の場合)である。図4に示すように、この格子構造は周期的な層状構造と水平方向の遷移点を有する。もちろん、図示するデザインの特徴は、標識不使用検出方式とER検出方式の両方に対して良好な性能を保持した状態で変化させてもよい。

【0063】

図4に示すデザインの開発とその性能設計は、コンピュータとソフトウェアプログラム「G-Solver」(グレイチング・ソルバー・デベロップメン社、アレン、テキサス; www.gsolver.com)を用いておこなわれた。種々の幾何学的な寸法とパラメーター、間隔、ウェルの深さ、材料及び該材料に関連する屈折率に関するデータを用いることにより、検討すべきデザインをコンピュータ上でおこなうことができ、また、シミュレーションによって透過率対曲線及び波長曲線の関数としての反射を予測することができる。このようなシミュレーションは、試料が乾燥状態にある条件下、及び試料が水又は屈折率が既知のその他の液状媒体中に懸濁された条件下でおこなうことができる。このようなシミュレーションにより、デザイナーは、ER検出方式と標識不使用検出方式の両方に対する要求を満たすように、種々のデザイン上のパラメーター(例えば、厚さ、透過率、及び周期等)を最適化させる(即ち、変化させる)ことができる。

【0064】

10

20

30

40

50

従来のER技術においては、格子に平行な偏光入射光によって誘発される共鳴方式を採用しており、本明細書においては、該技術をTE方式又は偏光として定義する。標識不使用検出技術においては、一般的には、格子に垂直な偏光入射光によって誘発される共鳴方式を採用しており、本明細書においては、該技術をTM方式又は偏光として定義する。この方式は、試料を液状媒体中へ懸濁させたときに、最も狭い共鳴をもたらす。

【0065】

図4に示す第1の実施態様においては、格子バイオセンサーのデザインであって、液中へ懸濁させた試料の標識不使用検出及び空気環境下（乾燥環境下）でのER検出の両方に対してTM偏光を利用する該デザインが記載されている。格子上の媒体を水から空気へ変換することによって、共鳴特性の変化、即ち、標識不使用検出方式に対して有用な共鳴特性から633nmでの励起に応答する染料のER増幅に対して有用な共鳴特性への変化がもたらされる。図4に示すバイオセンサーのデザインは、水中でのER検出方式に対して特に最適なものではなく、また、水中でのER方式に対して許容できるように作動しないかもしれない。しかしながら、多くのER検出アッセイは空気環境下でおこなわれるので、図4に示すデザインはER検出に対して非常に有用である。

10

【0066】

図6は、従来技術によるER装置「ノヴァチップ」（ノヴァルチス社製）と図4に示す第1のデザイン「コンバインド400エア（ComBIND 400 Air）」に関するコンピュータによるシミュレーション又はモデルにおける透過率と θ の関係を示すグラフを比較するものである。「ノヴァチップ」に関するデータは次の文献に記載されている：1）ブダッハら、「高感度の蛍光に基づくマイクロアレイ用変換器及び遺伝子発現プロファイリングへの応用」、アナリティカル・ケミストリー、2003年、及び2）ノイシェファーら、「エパネッセント共鳴器チップ；蛍光に基づくマイクロアレイ用の高感度万能プラットフォーム」、バイオセンサーズ・アンド・バイオエレクトロニクス、第18巻（2003年）、第489頁～第497頁。曲線110及び112は類似の形状を示しており、このことは、シミュレートされた装置（コムバインド400エア）がER装置と同等に機能することを示すものである。ノヴァチップのTE共鳴は、垂直入射から約2度のところで発生する。図4に示す第1のデザインは約3度のところでTE共鳴をもたらす。この値の相違は、入射光の角度が調整できることを考慮するならば、非常に小さな相違であると考えられる。この点に関しては、この開示内容の後に記載するセンサー用の読取り/検出装置に関する説明を参照されたい。

20

30

【0067】

図7に示すグラフは、「コムバインド400エア」デザイン（図4）において、シミュレートされた反射率を波長に対してプロットしたものである。628nm付近に中心が位置する幅広い反射率ピークは、前記の透過率対 θ 曲線において約3度のところで発生するER-空気方式に対応する。標識化された「水」に関する狭いピークは、標識不使用検出方式に利用される。この場合、ピーク114が非常に鋭いことに注目すべきである。このことは、図4に示すデザインのバイオセンサーが水環境下での標識不使用検出に対して十分に機能することを示す。

【0068】

標識不使用検出方式による検出過程においては、生物学的分子はTiO₂被覆層上に付着し、その光学的厚さを効果的に増加させる。この結果、共鳴のピーク波長値（PWV）はシフトする。一定量の試料に対するPWVのシフトが大きいほど検出感度はより高くなる。コンピュータによるシミュレーションにおいて格子のデザインを比較するときには、付加的な生物学的物質のシミュレーションは、仮想的な生物学的層を付加するよりも、TiO₂層の厚さを増加させることによってモデル化することができる。この方法は、その他の格子デザインの実行においても有効であることが証明された。

40

【0069】

図8は、一定量の模擬マス（図4に示すTiO₂層104の厚さを増大させることによってシミュレートされたマス）の添加の前後における水環境中でのPWVをプロットした

50

グラフを示す。ピークの位置は、標識が存在しないバイオセンサーの操作において予想されるように、高波長側へシフトする。模擬マスに対する波長シフトの比は、本件出願人による市販のバイオセンサーの対応する値と同等である。従って、図4に示す格子は、現在使用されている標識不使用バイオセンサーの格子の場合と同等の標識不使用検出性能をもたらすことが期待される。

【0070】

要約すれば、図4に示す格子デザインに対する二用途能はシミュレーションによって予測される。乾燥条件下においては、該格子デザインは、エバネッセント共鳴(ER)として知られている技術に従って、蛍光性の結合信号を増幅させることができる。湿潤条件下においては、格子は、導波モード共鳴検出として知られている技術による標識不使用検出器、又は本件出願の譲受人であるSRUバイオシステムズ社の市販品「バインド(BIND)」(SRUバイオシステムズ社の商標)としても機能する。

10

【0071】

第2の実施態様

図5は第2の実施態様の模式的断面図である。この図においては、一次元の格子構造の1つの周期並びにUV硬化層102、高屈折率層104及び試料媒体106の構造を示す。この図には寸法と遷移点も示すが、寸法の見盛りは示さない。図5に示すデザインは、図4に示すデザインに比べて、いくつかの点で相違する。

a) 格子の周期がより短い。

b) 格子の溝又は窪みがより狭い。図5における装荷率(duty cycle)(単位セル中の上部面における格子の百分率)は88%である(0~0.85及び0.97~1.0)。装荷率が70%~95%の狭い溝は、狭い溝の実施態様の例示である。一般的には、狭い溝は良好な標識不存在下での検出結果をもたらす。狭い溝の特徴は、TE共鳴ピークの幅を狭めることであり、このことは場の強度を高めることを示す。ER効果の実用的な用途に対しては十分に広い共鳴が必要であるが、過度に広い共鳴は、有用な蛍光信号の増幅をもたらすには不十分な場の強度を示す。

20

c) 半周期に対する格子深さの比は1:1である。

【0072】

図5に示すデザインは、水又は緩衝液の環境下での標識不存在下での操作及びER操作の両方を可能にする一次元的センサーを例示する。この点は、図4に示すデザイン、即ち、空気中でのER操作及び水中での標識不存在下での操作のためのデザインとは対照的である。図9のグラフは、図5に示すデザインに関する水環境下におけるER(TE偏光)スペクトル共鳴特性と比較的狭い標識不存在(TM偏光)スペクトル共鳴特性を示す。このグラフは、図5に示す実施態様のコンピュータシミュレーションから得られたものである。

30

【0073】

図10のグラフは、図5に示すデザイン(「コムバインド 370」)に関するTE角共鳴(励起波長:633nm)を従来技術による「ノヴァチップ」の場合と比較するものである。この場合、シミュレートされた最小透過率116は、入射角が5度未満のときに出現し、この値は、現存するノヴァチップER装置の場合に近接する。入射角、周期、励起波長、高屈折率材料の厚さ、格子の装荷率、及び格子の深さは全て相互に関連する。市販の蛍光体の励起波長は知られており、検討することができる。25度未満の入射角は許容されるべきであるが、垂直に近い角度(は0に近い)が好ましい。角度と波長を狭い範囲に制限することにより、機能的で商業上有用なER性能と標識不使用性能を備えた格子を設計するためには、標識不使用検出の用途に対しては、格子の周期、装荷率及び深さ、並びに質量付着に应答して大きなPWVシフトをもたらす高屈折率材料の厚さを決定しなければならず、また、ER方式に対しては、特定の蛍光体又は染料の励起波長における高い表面場を決定しなければならない。

40

【0074】

さらに、このデザインによって、できるだけ狭いスペクトル幅を伴う標識不使用下での

50

共鳴がもたらされると共に、測定用の実用的パラメータのウィンドウ (window) をもたらずのに十分な角度幅を伴う E R 共鳴が維持されるようにしなければならない。このデザインに相殺性能を組み入れてもよい。例えば、E R 性能の最適化には、信号の増幅をもたらす場の強度とセンサー、測定器及びアッセイの変数の許容範囲との間で相殺がおこなわれる。一般的には、より狭い E R 共鳴はより高い場の強度を示し、より広い E R 共鳴は高い測定許容度をもたらす。典型的には、標識不使用性能と E R 性能の最適化には、標識不使用性能を高める格子の深さと E R 共鳴幅との間の別の相殺が含まれる。例えば、図 5 に示すデザインの場合、格子の深さの増大により、T E / E R 共鳴幅は最適幅を超えて広くなる。装荷率の増大 (溝を狭くすることに対応する) により、共鳴は最適値に向けて狭くなり、E R の場の強度は保持される。

10

【0075】

従って、E R 検出方式と標識不使用検出方式の両方に適用される二用途格子構造を見出すための 1 つの好ましい方策には、半周期に対する深さの比が約 0.6 から約 1.2 又はこれよりも大きな値の範囲にある格子であって、所望の励起波長 (例えば、633 nm) と 25 度未満の共鳴角の条件下において空気環境下での T M 方式、空気環境下での T E 方式又は水環境下での T E 方式において広い角共鳴をもたらす格子を見出すことが含まれる。好ましくは、この広い共鳴は 1 度 ~ 10 度の角度幅を有し、5 nm ~ 30 nm のスペクトル幅を有する。このようなデザインを得るための操作は、コンピュータ内において、例えば「G ソルバー・ソフトウェア」を使用することによって容易に実行することができる。より直接的には、「R - ソフト」(R ソフト・デザイン・グループ社の市販品; www. rsoftdesigngroup.com) のようなソフトウェアを使用することによって、格子表面上において場の強度を比較的容易にモデル化することができる。

20

【0076】

100 nm ~ 600 nm の格子の深さ及び 300 nm ~ 600 nm の格子の周期は例示的な値である。本発明の開示内容の利点を理解する当業者であれば、潜在的に使用可能な格子のデザインをコンピュータ上においてモデル化し、本発明による適当なデザインに到達することができる。

【0077】

二次元的格子

E R 方式と標識不使用方式の両方に対して適した二次元的 (2 - D) 格子構造の可能性も考慮することができ、このような構造は好ましいものである。二次元的格子は、二次元において高い領域と低い領域が交互に配列されたチェス盤、ワッフル (ホール) 又はワッフル焼き型 (ポスト) のような形態を有する。二次元的格子は、X 方向と Y 方向において異なる周期を有する。このような特徴を有する格子は Z 方向において種々の側面 (例えば、段状側面又は湾曲状側面等) を有する。ワッフル状パターンの場合、窪み又はウェルは正方形の形態よりも長方形の形態を有していてもよい。これによって付与される可撓性に基づいて、標識不使用検出方式及び E R 検出方式に対する共鳴位置が異なる波長において発生するように調整することができる。また、この可撓性は、E R 共鳴を異なる励起波長に対して発生するように調整できると共に、現存する標識不使用検出の計測系との適合性を維持することができるという重要な利点をもたらす。例えば、X 方向の周期性は、C Y 3 蛍光体 (緑色光) 又は C Y 5 蛍光体 (赤色光) を励起するように調整される波長を有する垂直入射角又はこれに近い入射角における共鳴をもたらし、Y 方向の周期性は、820 nm ~ 850 nm の範囲 (近赤外領域) に固定される共鳴をもたらす。

30

40

【0078】

本明細書に記載の 2 - D バイオセンサーの構造例は、市販のソフトウェアパッケージ (R ソフト社製) を用いるコンピュータシミュレーションと厳密結合波分析 (R C W A ; Rigorous Coupled Wave Analysis) によって開発されたものである。装置のデザイナーはこのコンピュータシミュレーションを用いることにより、装置の物理的パラメータ (屈折率、厚さ、幅、高さ、構造形態) を変化させることによって、1) 装置の内部及び周辺部における電磁場分布、2) 光の入射角と波長の関数としての反射率又は透過率の挙動、及

50

び3) バイオセンサーの表面上への生体分子の付着による反射スペクトル又は透過スペクトルの変化挙動を決定することができる。

【0079】

本明細書に記載の2-Dバイオセンサ-の特定の実施態様は、単一の装置内においてB I N D法とE R法との併用検出法に対して最適化される。この場合、バイオセンサーは、B I N D測定中は水と接触し、E R測定中においては空気と接触する。B I N D法とE R法に対する乾式法と湿式法のいずれの組合せ方式も同様にして最適化させることができる。例えば、B I N D法による測定とE R法による測定の両方を湿式方式によっておこなうことができる。

【0080】

E R法とB I N D法(標識不使用法)を組み合わせた二次元的装置によってもたらされる利点をさらに詳細に評価するために、最初に、E Rのみに対して最適化された線状(一次元的)構造に関する図11~図14に基づいて説明する。最初に、E Rのみの構造に関してシミュレーションをおこなった。この構造は、ブダハラによって公表されている従来のE Rチップにほぼ対応するもので、これに関しては次の文献を参照されたい:「蛍光に基づく高感度マイクロアレイ用タイプの変換器及び該変換器の遺伝子発現プロファイリングへの応用」、Anal. Chem.、第75巻(2003年)、第2571頁~第2577頁。ブダハラによる格子は線状格子であり、本明細書で用いる用語によれば、1-D構造である。ブダハラによる文献に記載されている比較的厚い Ta_2O_5 層に比べて薄い高屈折率材料(TiO_2)層(図11A及び図11B)は、この2種の材料の異なる屈折率を考慮することにより、等価な光学的厚さを有する装置をもたらす。図11A及び図11Bに示すモデルはブダハラによるものを正確に複製したものでないが、ほぼこれに対応する。

【0081】

Cy5染料のE R強化用の代表的な装置に対する角度と波長の関数としての反射率及び電磁場分布を決定するためにシミュレーションをおこなった。原則的には、図11A及び図11Bは、E R検出のみのために設計された一次元的な線状格子構造の斜視図及び断面図をそれぞれ示す。図示するように、この構造は、30nm隆起したリッジ201及び該リッジを被覆する TiO_2 層203(厚さ:110nm)から成る線状の格子状側面を有する。周期性は、Y方向において356nm毎に繰り返すリッジ201である。

【0082】

図12A及び図12Bは、図11A及び図11Bに示す構造における波長の関数としての反射効率及び入射角の関数としての反射効率をそれぞれ示すグラフである。これらのグラフはRCWAによって測定したデータに基づく。垂直入射の場合には、ピーク波長(図12Aにおける632nm)はCy5の励起波長に対応し、また、入射光を格子のライン又はリッジ201に関して平行な方向に回転させるときには、632nmの波長における高い反射効率を伴う広い範囲の角度が存在する(図12B)。

【0083】

図13A~図13Cは、図10A及び図10Bに示す構造の下部表面に対応するXY面内の電界強度のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す($Z=110nm$ 、入射波長:632nm)。図13D~図13Fは、図13A~図13Cに示す同じXY面における磁界強度のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す(入射波長:632nm)。

【0084】

図13のプロットは、装置の下部の暴露表面上のXY面内の位置の関数としての電界ベクトルの3つの成分(E_x 、 E_y 及び E_z)及び磁界ベクトルの3つの成分(H_x 、 H_y 及び H_z)の強度を示す。この場合、構造200の上部の暴露部分は陰影で表示されている。これは、上部表面が、下部表面とは異なる水平面内に位置するからである。コンピュータによるシミュレーションにおいては、センサーには、共鳴波長において1V/mの電界の大きさ及び1A/mの磁界の大きさを有する光源からの光が照射される。従って、1よりも大きな場の強度の値は、共鳴から得られるセンサー表面における場の強度の濃度を

10

20

30

40

50

示す。電磁場の力は、EとHの場の成分のクロス乗積によって計算される。構造体の表面上の所定の位置における場の力は、センサーの表面に接合された蛍光体を励起させるために利用できるエネルギーを規定する。理論的には、この力が強いほど、より強い蛍光発光がもたらされる。図中に示すプロットは、電場と磁場（従って、場の力）が構造体の表面上に均等に分布しないことを示す。しかしながら、平均的な力よりも大きな力を示す場所（カラー図面の202において示される赤色とオレンジ色の領域）及び平均的な力よりも小さな力を示す場所（カラー図面の204において示される紫色又は青色の領域）が存在する。

【0085】

図14A～図14Cは、図11A及び図11Bに示す構造体の上部表面に対応するXY面内の電界強度のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（ $Z = 140 \text{ nm}$ 、入射波長： 632 nm ）。図14D～図14Fは、図14A～図14Cに示す同じXY面における磁界強度のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す（入射波長： 632 nm ）。

10

【0086】

図14のプロットは、装置の上部の暴露表面上のXY面内の位置の関数としての電界ベクトルの3つの成分（ E_x 、 E_y 及び E_z ）及び磁界ベクトルの3つの成分（ H_x 、 H_y 及び H_z ）の強度を示す。この場合、200において示されるように、構造体の下部の暴露部分は陰影で表示されている。これは、上部表面が、下部表面とは異なる水平面内に位置するからである。図13のプロットの場合のように、コンピュータによるシミュレーションにおいては、センサーには、共鳴波長において 1 V/m の電界の大きさ及び 1 A/m の磁界の大きさを有する光源からの光が照射される。従って、1よりも大きな場の強度の値は、共鳴から得られるセンサー表面における場の強度の濃度を示す。前記のように、EとHの場の成分のクロス乗積は、蛍光体を励起させるために利用できる共鳴波長における瞬間的な力の分布を示す。

20

【0087】

A. ホールの実施態様例

複合バイオセンサーの2-D「ホール(hole)」の実施態様の特定の実施例を図15～図19に基づいて説明する。このセンサーは、単一の装置を用いるER方式と標識不使用方式(BIND)の両方による検出に対して最適化されるように二次元的に設計されたものである。

30

【0088】

図15A及び図15Bは、格子構造における周期的なホール210によって特徴付けられる二次元的な格子デザイン用の単位セルの斜視図及び断面図をそれぞれ示す。この格子デザインは、水環境下でのBIND(標識不使用)方式による検出及び空気環境下でのER方式による検出に対して最適化されている。この装置は、上部の TiO_2 層104(厚さ： 78 nm)、及び基材の支持体シート上へ適用された格子パターンを有するUV硬化材料製の下部の支持体層102を含む。

【0089】

図15A及び図15Bに示す二次元的な単位セルは、図11A及び図11Bに示す一次元的な線状格子デザインとは相違する。図15Aと図15Bに示す構造体は、図示するように、X軸に対して垂直方向に偏光された入射光がBIND信号を発生すると共に、Y軸に対して垂直方向に偏光された入射光がER測定を可能にするように設計されている。この設計方法を使用することによって、特定の入射角(好ましくは垂直に近い入射角)におけるBINDとERの共鳴波長は相互に独立して選定してもよいので、BINDとERの各々の共鳴波長は非常に異なる値であってもよい。この実施態様において記載したBINDとERの組合せ構造を最適化することによって、近赤外波長(約 $800 \sim 900 \text{ nm}$)領域においてBIND共鳴を発生させると共に、ER共鳴は、Cy5蛍光体を励起させるための 632.5 nm において発生させることができる。この実施例におけるデザインは、BIND測定中におけるセンサー上の環境としては水を想定しており、また、ER測定中におけるセンサー上の環境としては空気を想定している。

40

50

【0090】

ERとBINDに対して異なる波長が要求される場合には、矩形の「ホール」(210)を有する単位セル(unit cell)が選択される。従って、この単位セルはX方向とY方向において異なる寸法を有する。例えば、BIND波長に対するX方向の周期は550nmであるが、低波長のER共鳴に対して必要とされるY方向の周期は432nmである。製造法によって、高屈折率の誘電体の厚さをX方向とY方向において同一にすることができる。製造法を簡単化するためには、このデザインも均一な格子深さを有するようにする。また、この製造法はホールの角に丸みをもたらすが、デザインの主要な機能は維持される。当業者であれば次のことを理解することができる。即ち、図15Aと図15Bに示すようなデザインをコンピュータを用いて創作して該デザインを試験する場合、デザイナーは単位セル、格子の深さ及び被覆層の特定の寸法を変化させることによって、場の強度、ピーク波長、の関数としての反射率及びその他の試験のシミュレーションを実行し、また、許容される結果を達成すると共に、その他の寸法を選択してもよい。従って、図15Aと図15Bに示す実施例は例示的な実施態様であって、本発明の範囲を限定するものではない。

10

【0091】

図16及び図17は、図15A及び図15Bに示す構造に対する波長の関数としての反射効率のグラフ及び入射角の関数としての反射効率のグラフをそれぞれ示す。この場合、光照射は、Y軸に沿って偏光された光を用いておこなった。これらのグラフはRCWAによって作成したものであって、ER方式における操作を示す。図17は、共鳴波長における入射角の関数としての反射強度が、有意なER効果を誘発する光に対して許容される角度をもたらすことを示す。物理的測定においては、図16に示すプロットにおけるピーク間の伏角と二重ピークは分割しない。

20

【0092】

上述の1D実施例の場合と類似の方法により、RCWAによる計算を使用することによって、図15A及び図15Bに示す構造に対するER共鳴波長における電界成分(E_x 、 E_y 及び E_z)及び磁界成分(H_x 、 H_y 及び H_z)の振幅の空間的分布を決定してもよい。図18A~図18Cは、図15A及び図15Bに示す構造体の下部表面に対応するXY面内の電界強度のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す($Z = 78\text{ nm}$; 入射波長 = 632.5 nm)。図18D~図18Fは、図18A~図18Cに示すXY面内の磁界強度のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す(入射波長 = 632.5 nm)。これらの電界と磁界の振幅の分布は、X方向とY方向において反復する単位セルのホール内の下部の TiO_2 表面に対する分布である。前述のように、電界と磁界の成分EとHのクロス乗積は、下部表面における蛍光励起に起因する瞬間的な電流密度分布を示す。1V/mの電界と1A/mの磁界における共鳴波長での平面波を照射源として使用した。

30

【0093】

同様にして、単位セルの上部の TiO_2 表面に対する電界と磁界の分布を計算することができる。図19A~図19Cは、図15A及び図15Bに示す構造体の上部表面に対応するXY面内の電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す($Z = 433\text{ nm}$; 入射波長 = 632.5 nm)。図19D~図19Fは、図19A~図19Cに示す同じXY面内の磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す(入射波長 = 632 nm)。これらのプロットの説明文に示すように、各々の場の成分の最大振幅が、従来技術によるデザインの場合に比べて実質上大きいことに注目すべきである。このことは、より大きな電流密度がこの装置の表面上で得られることを示す。特に、従来技術による1Dデザインの E_z 振幅とは対照的に、実質的に大きな E_z 成分が出現するという事に注目すべきである。

40

【0094】

図19Gは、X軸に対して平行に偏光された入射光を用いてモデル化された波長の関数としてプロットした反射効率を示す。図15に示すデザインの構造体上へ入射するX軸に関する偏光は、標識を使用しない検出に対して有用な共鳴であって、最大値が830nm

50

付近に現れる幅が約 12.5 nm の共鳴を発生させる。シミュレーションによって、バルクの屈折率のシフト係数を予測することができる。この係数は $(PWV) / (n)$ によって定義される。ここで、 (PWV) は、センサーの上方の環境中の屈折率の変化 (n) によって誘発されるピーク波長値のシフトを示す。この数量は、格子表面上への試料の結合に関するセンサーの感度を示す。図 15 A と図 15 B に示す「ホール」デザインの構造体の予測されたバルクの屈折率のシフト係数は 200 であり、このことは該構造体が、標識を使用しない高感度性能をもたらすことを示す。

【0095】

B. ポスト実施態様の実施例

ポスト (post) によって特徴付けられる反復単位セルを用いる二次元的格子構造について、図 20 ~ 図 24 に基づいて説明する。図 20 A 及び図 20 B は、センサーの表面上に形成された周期的なポスト 220 によって特徴付けられる二次元的格子デザインを有する単位セルの斜視図及び断面図をそれぞれ示す。各々の単位セルは 1 つのポスト 220 を有する。ポスト 220 は、基材シート (図示せず) 上に塗布された支持体材料 103 (例えば、UV 硬化ポリマー) 内に隆起した突起である。これらの図に示すように、高い屈折率を有する被覆層 (例えば、 TiO_2) が該突起と支持体上に形成される。図示される構造体は、X 方向に偏光された光を用いる水環境下での BIND (標識不使用) 検出方式、及び Y 方向に偏光された光を用いる空気環境下での ER 検出方式に対して最適化されている。

【0096】

図 20 に示すデザインについて、RCWA コンピュータシミュレーションを用いて検討した。図 15 に示す前述の構造体の単位セルは、Z 方向においてより高い面における領域によって包囲された「ホール」領域を含んでいるが、図 20 に示す格子構造体は、Z 方向においてより低い面における領域によって包囲された中央部の「ポスト」領域を含む。上述のように、図 20 に示すデザインは、BIND / ER 組合せ構造体であって、近赤外波長領域 (約 $800 \sim 900 \text{ nm}$) において BIND 共鳴をもたらすと共に、Cy5 蛍光体を励起させる 632 nm において ER をもたらすように最適化された構造体である。この実施例においても、当該デザインは、BIND 測定中におけるセンサー上の水環境、及び ER 測定中のセンサー上の空気環境を想定している。ER と BIND に対するこれらの異なる波長に関する要求を満たすために、矩形の「ポスト」状単位セルが選択された。従って、この単位セルは X 方向と Y 方向において異なる寸法を有していてもよい。例えば、BIND 波長に関しては、X 方向の周期は 530 nm とし、より低波長の ER 共鳴に対して要求される Y 方向の周期は 414 nm にしてもよい。製造法によって、高屈折率の誘電体の厚さを X 方向と Y 方向において同一にすることができる。製造法を簡単化するためには、このデザインも均一な格子深さを有するようにする。また、この製造法はポストの角に丸みをもたせてもよいが、デザインの主要な機能は維持される。図 20 に示す実施例は例示的な実施態様であって、本発明の範囲を限定するものではない。もちろん、特定の寸法は変化させることができる。

【0097】

図 21 A 及び図 21 B は、図 20 A 及び図 20 B に示す構造に対する波長の関数としての反射効率のグラフ及び入射角の関数としての反射効率のグラフをそれぞれ示す。この場合、光照射は、Y 軸に沿って偏光された光を用いておこなった。これらのグラフは RCWA によって作成したものであって、ER 方式における操作を示す。図 21 A は、 633 nm における共鳴ピークの最大反射を示し、また、図 21 B は、 633 nm で照射したときの入射角の範囲にわたる共鳴を示す。

【0098】

RCWA コンピュータシミュレーションを使用することによって、ER 共鳴波長における電界成分 (E_x 、 E_y 及び E_z) 及び磁界成分 (H_x 、 H_y 及び H_z) の振幅の空間的分布を決定してもよい。図 22 A ~ 図 22 C は、図 20 A 及び図 20 B に示す構造体の下部表面に対応する XY 面内の電界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す (Z

= 70 nm ; 入射波長 = 633 nm)。図 2 2 D ~ 図 2 2 F は、図 2 2 A ~ 図 2 2 C に示す同じ X Y 面内の磁界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す (入射波長 = 633 nm)。図 2 2 に示すように、これらの電界と磁界の振幅の分布は、X 方向と Y 方向において反復する単位セルのポストを包囲する下部表面に対する分布である。前述のように、電界と磁界の成分 E と H のクロス乗積は、下部表面における蛍光励起に起因する瞬間的な電流密度分布を示す。1 V / m の電界と 1 A / m の磁界における共鳴波長での平面波を照射源として使用した。

【 0 0 9 9 】

同様に、単位セルの上部の TiO_2 表面に対する電界と磁界の分布を計算することができる。図 2 3 A ~ 図 2 3 C は、図 2 0 A 及び図 2 0 B に示す構造体の上部表面に対応する X Y 面内の電界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す ($Z = 430$ nm ; 入射波長 = 633 nm)。図 2 3 D ~ 図 2 3 F は、図 2 3 A ~ 図 2 3 C に示す同じ X Y 面内の磁界振幅の X 成分、Y 成分及び Z 成分のプロットを示す (入射波長 = 632 nm)。各々の場の成分の最大振幅が、従来技術によるデザイン (図 1 0) の場合に比べて、各々の場の成分に対して実質上大きいことに注目すべきである。このことは、潜在的により大きな電流密度がこの装置の表面上で得られることを示す。

【 0 1 0 0 】

図 2 4 は、X 軸に対して平行に偏光された入射光を用いてモデル化された反射効率を示す。図 1 5 に示すデザインの構造体上へ入射する X 軸に関する偏光は、標識不使用検出方式に対して有用な共鳴であって、反射の最大値が 805 nm 付近に現れる幅が約 8 nm の共鳴を発生させる。このシミュレーションによってもたらされる前述のシフト係数は 90 である。図 2 0 に示す実施態様においても、図 1 5 に示す実施態様の場合よりは低いかもしれないが、標識を使用しない高感度性能がもたらされることが期待される。2 種類の 2 D デザインに関する振幅値とシフト係数を比較することにより、次のことが提案される。即ち、格子構造体のさらなる最適化によって、一方の検出方式の性能は他方の検出方式における低い性能を相殺する。

【 0 1 0 1 】

E R 検出の増幅量は、蛍光体の励起波長内において、装置の構造からセンサー表面上に分布される蛍光体へ移動する電力に関連する。共鳴波長が励起波長の範囲内にあるという条件下においては、共鳴波長におけるセンサー表面上の出力密度分布は、異なるデザインの E R 装置の感度を比較する手段をもたさず。場の力 (field power) 又は「増幅因子 (magnification factor) 」として、クロス乗積 $E (\max) \times H (\max)$ を定義することができる。構造体の上部、底部及び側部からのエバネッセント場の強度分布のより厳密な分析、及び高出力領域と低出力領域との間の差を明らかにするための出力密度の詳細な積分によれば、一方の装置が他方の装置よりも効率的に機能するかどうかということをより正確に予測することができ、また、E 成分の最大振幅と垂直な H 成分との積によって、デザインを比較するための非常に簡単で大雑把な方法がもたらされる。装置の露出された上部面と下部面に関する R C W A 分析によれば、図 1 1 A と図 1 1 B に示す従来技術によるデザインについての E x H 増幅因子は 1 4 4 であった。一方、図 1 5 A と図 1 5 B に示す「ホール」型の単位セルについての E x H 増幅因子は 6 2 1 7 であり、また、図 2 0 A と図 2 0 B に示す「ポスト」型の単位セルについての E x H 増幅因子は 5 1 8 0 であった。この大雑把な分析に基づけば、図 1 5 と図 2 0 に示すデザインの 2 D 格子の E R 方式によって、図 1 0 に示すデザインの線状格子よりも潜在的により高い感度の E R 性能がもたらされる。さらに、コンピュータシミュレーションに基づくことにより、図 1 5 と図 2 0 に示すデザインによれば、前述のように、標識不使用検出方式に対して優れた感度がもたらされることが期待される。従って、単一の装置内における E R 検出方式と標識不使用検出方式の有用な組合せは、上述の 2 D 格子の実施態様によって達成される。

【 0 1 0 2 】

C . 二段型の 2 - D 格子

図 2 8 A ~ 図 2 8 C は、E R と標識不使用 (B I N D) の組合せ検出用に設計されて製

10

20

30

40

50

造されたバイオセンサー用の単位セル500の別の実施態様を示す3つの斜視図である。この構造のいくつかの特徴を理解するためには、エバネッセント共鳴(ER)センサーと標識不使用(BIND)センサーに適合したデザインの観点について概括することが有用である。この種のセンサーは3つの基本的なデザインの観点、即ち、共鳴波長、共鳴幅及び格子の深さの観点から相違する。

【0103】

共鳴波長

ERセンサーは、励起波長の数(約 ± 2)nm内で共鳴を発生することが好ましい。励起光が一般的にレーザーから発生されてその帯域が非常に狭い場合には、この要件は、ER共鳴の波長位置に関して高い特異性となる。操作のBIND方式にはこの制限がないので、別の波長(例えば、外部の周辺光の波長の範囲)で共鳴するという利点があり、また、BIND信号をER励起源からスペクトル的に分離させることによって潜在的な検出の重なりによる矛盾を回避することができる。

10

【0104】

共鳴幅

ERセンサーは、可変因子(例えば、生物学的被覆物の厚さ及び照射の開口数)の存在下で励起波長に重なるのに十分な共鳴幅を有していなければならない。実際上は、ER共鳴は、約5nm未満、より好ましくは10~15nm未満の半値全幅(FWHM)を有しているべきではない。一方、ピークの幅が狭くなるとピーク位置の不確実性が低減するので、BINDの感度は約 $1/\sqrt{\text{FWHM}}$ 増大する。

20

【0105】

格子深さ

BINDセンサーは、格子上により多くの生物学的物質が付着すると、より大きな共鳴波長シフトを示す。より深い格子は、生物学的物質の結合に対して、より大きな表面積を提供する。ERの格子深さが深くなると、ER効果は必ずしも改善されず、低減するかもしれない。

【0106】

先に説明した2-Dデザインの格子の深さ(例えば、ポストの実施態様の場合のポストの高さ、または、ホールの実施態様の場合のホールの深さ)は均一である。単一の格子深さを選択することには、ピーク幅と表面積の両方に関するBINDとER性能の妥協(即ち、BINDのPWVシフト)が含まれる。

30

【0107】

図28A~図28Cに示すバイオセンサーのデザインは、二段型の二次元デザインである。このデザインの特性については、以下において詳述する。このデザインは、狭いTMBIND共鳴と高いBINDシフト性能を保持すると共に、より広いTEER共鳴をもたらす。先に説明した二次元的デザインの場合と同様に、BIND格子とER格子は異なる周期を有することができるので、相互に独立して決定される共鳴波長を有することができる。

【0108】

図28A~図28Cに示す「二段型」の「comBIND」は多数の反復単位セル500を含んでおり、各々の単位セルにおいては、X方向に延びる比較的浅いER格子502が、Y方向に延びる比較的深いBIND格子504に積み重ねられる。図28A~図28Cは、このデザインの1つの「単位セル」500を示しており、該単位セルをXY面上で複製させることによって完全な格子が形成される。

40

【0109】

単位セル500はUV硬化ポリマー層524から成り、該ポリマー層はマスター格子ウェーハを用いて基材支持体シート、例えば、PETフィルム(図示せず)上に塗布される。ポリマー層524はBIND格子504の構造、即ち、底部領域と高部領域がY方向に交互に延びた構造を有する。X方向においても、格子は交互に延びる低部領域と高部領域を有するが、X方向におけるUV硬化ポリマー524の低部領域に対する高領域の相対的

50

な高さは、Y方向における場合よりも低い。

【0110】

UV硬化ポリマー層上には TiO_2 又は SiO_2 若しくは Ta_2O_5 の層522が沈着される。図示する実施態様においては、この層は均一な厚さを有する。層522は上部の反復表面506、508、510及び512並びに下部の反復表面514、516、518及び519を有する。下部の反復表面514、516、518及び519はUV硬化ポリマー層の上部表面上に配置される。空気又は水の試料媒体520は、 TiO_2 又は SiO_2 若しくは Ta_2O_5 の層522の上部の反復表面506、508、510及び512上に接触して存在させる。

【0111】

図28A～図28Cから理解されるように、二段型の二次元的格子構造体は、Y方向に延びた比較的深いBIND格子504であって、上部の表面506/508と下部の表面510/512によって特徴付けられる該格子を具備する。従って、単体格子のBINDの観点によれば、より多くの試料物質を付与してより多くの物質を格子に付着させることによって、より大きな共鳴シフトをもたらすことができる。BIND(Y方向)における格子の深さが深いほど、生物学的物質を結合させるための表面積はより大きくなる。

【0112】

逆に、X方向に延びるER格子502は、高部領域506と低部領域508並びに高部領域510と低部領域512を含む比較的狭い格子パターンから成る。この格子は良好なBIND検出能をもたらすことに加えて、同時に、最適な幅を有する広いTEER共鳴をもたらす。

【0113】

図28A～図28Cに示すデザインの明らかな利点は、ER構造体とBIND構造体が相互に独立して作動することである。ER検出とBIND検出のそれぞれに対して最適化された構造の寸法は、図28A～図28Cに示すER/BINDセンサーの組合せに対しても適合すべきである。図28A～図28Cに示す単位セルを有する構造体の特定の寸法はもちろん可変的であるが、1つの代表的な実施態様においては、BIND格子504の周期は約260nm～約1500nmであり、また該格子の深さ(表面506と表面510との間の距離)は100nm～約3000nmである。ER格子502においては、周期は約200nm～約1000nmであり、また深さ(表面506と表面508との間のZ方向の距離及び表面510と表面512との間のZ方向の距離)は10nm～約300nmである。

【0114】

図28A～図28Cに示す構造体のコンピュータによるシミュレーションを、RCWAを用いておこない、ER格子構造をX方向に加える場合と加えない場合におけるシミュレート化反射スペクトルを得た。図29は、X方向にER格子502を含まない場合のBIND格子スペクトル(曲線592)及びER格子とBIND格子が組み合わされた格子スペクトル(曲線590)を示す。両方のスペクトルのシミュレーションには、バイオセンサーの表面上の水が含まれる。BIND格子上へER格子を加えた場合のスペクトル(曲線590)においては、CY5蛍光体のER励起に対して適当な幅と位置を有する付加的な共鳴ピーク(600及び602)が出現する。ER格子502(図28A～図28C)及び曲線590は全表面積を増大させるので、BINDシフトの改良の可能性をもたらす。BINDピーク波長値は図29におけるピーク606及び604に示す。

【0115】

抑制剤を使用するER+BINDバイオセンサーに対する別の用途

以下に説明する抑制剤結合シナリオについて検討した。次式に示すように、このシナリオにおいては、被検出物(例えば、タンパク質)の一部を格子の支持体(標識不存在)上へ直接結合させ、タンパク質の別の一部を、蛍光性標識を有する抑制剤へ結合させる。式中、 K_s 及び K_i は支持体及び抑制剤に対する平衡結合定数をそれぞれ示す。

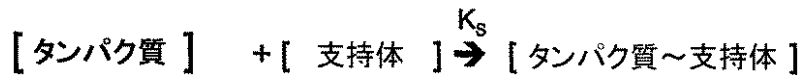
10

20

30

40

【化 1】



+

【抑制剤】

↓ K_i

【タンパク質～抑制剤】

10

【0116】

上記の典型的な抑制剤結合シナリオにおいては、濃度と平衡結合定数（ K ）に関する値と関係式を規定する下記の数学的方程式（1）及び（2）を定立することができる。

$$K_s = [\text{タンパク質} \sim \text{支持体}] / [\text{タンパク質}] \times [\text{支持体}] \quad (1)$$

$$K_i = [\text{タンパク質} \sim \text{抑制剤}] / [\text{タンパク質}] \times [\text{抑制剤}] \quad (2)$$

上記の2つの方程式を組合せて書き直すことによって、支持体へ結合した一部のタンパク質に関しては、容易に次の方程式を得ることができる：

【数 1】

20

$$\text{支持体に結合したタンパク質の量} = \frac{1}{2PX - \sqrt{(X^2 - 4PS)}}$$

式中、 $X = (K_s + (K_s / K_i) * I + S + P)$ であり、 K_i は抑制剤結合定数を示し、 K_s は支持体結合定数を示し、また、 P 、 S 及び I はタンパク質、支持体及び抑制剤をそれぞれ示す。

【0117】

新たな抑制剤に対する試験反応の準備に際しては、一般にオペレーターは結合した支持体の量のみを、例えば蛍光性標識を用いることによって測定するが、同時に抑制剤リガンドの結合性又は K_i を直接的に定量化することはできず、該結合性は推論される。本明細書に開示される ER と標識不使用方式が組み合わされたバイオセンサーによって提供される2つの相互に独立した定量化法と簡単な試験を実行することによって、上記の結合シナリオに関する全ての変数の値を知ることができる。換言すれば、このような結合特性のより完全な理解と特性決定は、本発明による ER / 標識不存在センサーを用いる単一の試験法を実行することによっておこなうことができる。

30

【0118】

蛍光性標識は格子の支持体表面上に存在させることができ、あるいは抑制剤上に存在させることができる。このことは、支持体と抑制剤のいずれか一方には標識を含めないことができるということの意味する。好ましい実施態様においては、第1の結合性分子（例えば、バイオセンサーの支持体であってもよい）と第2の潜在的な結合性分子（例えば、抑制剤分子）を使用する。この場合、第2の結合性分子は、生物学的物質（例えば、タンパク質）と第1の結合性分子との結合に影響を及ぼすか、又は該結合と競合してもよい。

40

【0119】

標識存在 / 標識不存在バイオセンサーにおける結合反応に影響を及ぼす抑制剤を使用する方法は、非常に強い相互作用を包含するように拡張することができ、この場合、より弱い結合親和性を有する既知の競合性抑制剤の使用によって、より強い結合性物質の摂動 / 観測が可能となる。

【0120】

一般に、本発明によるバイオセンサーを用いて検出してもよい特異的な結合性物質としては、下記のもものが例示される：核酸、ポリペプチド、抗原、ポリクローナル抗体、モノ

50

クローナル抗体、単鎖抗体 (scFv)、F(ab)フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、有機低分子、細胞、ウイルス、バクテリア、ポリマー、ペプチド溶液、タンパク質溶液、化合物ライブラリーの溶液、単鎖DNA溶液、二重鎖DNA溶液、単鎖DNA溶液と二重鎖DNAの溶液との組合せ、RNA溶液、及び生物学的試料。生物学的試料は、例えば、血液、血漿、血清、胃腸分泌物、組織又は腫瘍のホモジェネート、滑液、大便、唾液、痰、シスト液、羊水、髄液、腹膜液、肺洗浄液、精液、リンパ液、涙及び前立腺液等を含むことができる。

【0121】

本明細書に記載のバイオセンサーは、a) これらのタイプのいずれかの試料の成分のバイオセンサー表面への結合、b) 試料中の別の成分、例えば、試料中の蛍光体等への試料の結合、及びc) 試料中へ添加される第2試料への当該試料又は試料成分の結合を検出するために使用してもよい。結合b)の例として、センサー表面は試料中の一部の成分(例えば、ストレプトタビジン-ビオチン又は6His)と結合させてもよく、また、バイオセンサーは、試料中の結合成分と該試料中の付加的な成分群(例えば、ポリメラーゼ錯体)との相互作用を検出するために使用してもよい。結合c)の後者の例においては、試料は、バイオセンサーの表面上へ付着した成分、及びバイオセンサー上に存在する第2試料からの特異的に結合/付着する別の成分を含有していてもよい。

10

【0122】

天然の蛍光を使用する実施態様

別の実施態様として、ERと標識不使用方式を組み合わせたバイオセンサーは、生物学的分子の有する天然の蛍光を利用するアッセイ(即ち、結合された蛍光性標識の使用を必要としないアッセイ)であって、他の生物学的分子や低分子量の被験分子との相互作用に際してのこれらの折り畳み、積み重ね及び変化と変化速度に関する生物物理学的特性決定測定をおこなうアッセイに対して特に有用である。このような特性決定測定は結合した蛍光性標識を用いておこなうことはできるが、この種の結合標識は必ずしも必要ではなく、特に固有の蛍光特性を有する生物学的分子に対しては不要である。

20

【0123】

タンパク質、核酸成分及び補酵素の蛍光特性を以下の表1に示す。表中のFに示す値は、通常観測される最大値である。所定の場合、実際の値はかなり小さい。なお、この表のデータは次の文献から得た：チャールズ・R・キャンツール及びポール・R・シンメル著、「バイオフィジカル・ケミストリー：生物学的分子の挙動と研究」、第1部～第3部、第443頁、W・H・フリーマン・アンド・カンパニー(ニューヨーク)発行、1980年。

30

【0124】

【表 1】

表1

タンパク質と核酸の構成成分及び補酵素の蛍光特性							
被験物質	条件	吸収性		蛍光性 [*]		τ_F (nsec)	感度 $\epsilon_{\max}^{\theta F}$ $\times 10^{-2}$
		λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} $\times 10^{-3}$	λ_{\max} (nm)	θF		
トリプトファン	H ₂ O, pH7	280	5.6	348	0.20	2.6	11.
チロシン	H ₂ O, pH7	274	1.4	303	0.14	3.6	2.0
フェニルアラニン	H ₂ O, pH7	257	0.2	282	0.04	6.4	0.08
Y塩基	イーストtRNA ^{phe}	320	1.3	460	0.07	6.3	0.91
アデニン	H ₂ O, pH7	260	13.4	321	2.6×10^{-4}	<0.02	0.032
グアニン	H ₂ O, pH7	275	8.1	329	3.0×10^{-4}	<0.02	0.024
シトシン	H ₂ O, pH7	267	6.1	313	0.8×10^{-4}	<0.02	0.005
ウラシル	H ₂ O, pH7	260	9.5	308	0.4×10^{-4}	<0.02	0.004
NADH	H ₂ O, pH7	340	6.2	470	0.019	0.40	1.2

10

【0125】

20

この技術は、核酸ポリマー（DNA、RNA）（蛍光性ヌクレオシド塩基）の積み重ねとハイブリッド形成、タンパク質（蛍光性アミノ酸であるフェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）及び脂質膜（蛍光体を異なる区画内へ組み入れたときの増強効果と消光効果をもたらす）を用いる場合に特に重要である。1つの実施態様においては、標識を使用しないBINDの特徴によって、試料物質又はこれに結合したりガンドの量の定量化が可能となり、また、ERの特徴によって、生物物理学的変化の高感度追跡が可能となる。

【0126】

背景蛍光を低減させるための付加的な低蛍光性SiO₂層を具備するER/BINDバイオセンサー

30

本明細書に開示されるERとBINDを組み合わせたセンサーを結合蛍光体からの蛍光又は天然蛍光を検出するために使用する場合、バイオセンサーの構成物質の内部から放出される背景蛍光を低減させることは有用であり、これによって、信号対雑音比のより高い条件下での蛍光測定が可能となる。これを達成するための1つの方法は、付加的な低蛍光性SiO₂層をUV-硬化ポリマー層上へ沈着させた後、SiO₂層上にさらに屈折率の高い物質（例えば、TiO₂）から成る最上層を沈着させる。この種のバイオセンサーの断面図を図30に示す。このバイオセンサーは、UV-硬化ポリマー層524（該層は図示されていない支持体シート上に結合されている）、中間のSiO₂層700及び上部のTiO₂層522を具備する。空気又は水に基づく媒体中の試料はTiO₂層上に存在させる。付加的なSiO₂層の厚さは、格子の装荷率や要求される背景蛍光レベル等の要因によって左右されるが、一般的には、500～5000である。

40

【0127】

好ましくは、SiO₂層700は、バイオセンサーに問い合わせをするために使用される光源からの入射光に回答して低い天然蛍光を示す。SiO₂層中の蛍光レベルは該酸化物の調製法によって左右され、また、該酸化物の構造（非晶質構造及びナノ結晶質構造）もこれに影響を及ぼす役割を果たしてもよい。所謂「SiO_{1.95}」に比べた場合のSiO₂層中のSiO₂分子の完全な酸化も、蛍光性の低い層を形成させるために重要である。好ましくは、SiO₂層は、比較的低い天然蛍光性をもたらすような調製法によって調製され、また、このような天然蛍光性を示す構造を有する。

【0128】

50

中間の SiO_2 層の1つの使用例は、図28A～図28Cに示す構造体中における使用である。この場合、上部の TiO_2 層522の下部においては、低蛍光性の SiO_2 層がUV-硬化ポリマー層上に形成される。中間の SiO_2 層は、X方向とY方向において均一な厚さを有する。

【0129】

蛍光性の低い付加的な SiO_2 層は、本明細書において先に説明した他のセンサー中に存在させてもよい。

【0130】

図28と図30及び高屈折率を有する上部層を示すその他の図において、上部層522に対して TiO_2 は必須の物質でない。 Ta_2O_5 （五酸化タンタル）も機能を果たすことができる。高屈折率層として TiO_2 が一般的に使用されている理由は、 Ta_2O_5 に比べて TiO_2 がより高い屈折率を有するからである。 Ta_2O_5 を使用する場合、同じ光学的厚さを達成するためには、より大きな物理的厚さを必要とする。本明細書に記載の実施例においては、上部層522の厚さは、 TiO_2 又は Ta_2O_5 を使用する場合、約70nm～250nmである。

【0131】

1つの別の可能な実施態様においては、高屈折率層として、 TiO_2 又は Ta_2O_5 の代わりに酸化ハフニウム被覆層がバイオセンサーへ塗布される。赤外波長と可視波長においては、 TiO_2 又は Ta_2O_5 は吸収性を示さないが、低波長になると、これらの酸化物は吸収性を示し始め、これらの吸収性は波長の低下に伴って増大する。このような挙動は共鳴装置においては問題となる。何故ならば、吸収性は共鳴の低減効果（即ち、ピークが測定されなくなるか、又はピークが小さくなる）をもたらすからである。酸化ハフニウムは、400nmのような低い波長においても吸収性を示さない。酸化ハフニウム被覆層の厚さと格子の寸法は、関心のあるUV波長において共鳴をもたらされるように選択される。

【0132】

時間分解蛍光（TRF）と蛍光偏光（FP）測定のためのERセンサーの使用

本発明によるER/BINDセンサーの新規な用途の1つの別の実施例は、時間分解蛍光（TRF）と蛍光偏光（FP）を測定するための該センサーの使用である。TRFとFPは、本明細書に開示された標識不使用装置とERを組み合わせた装置から誘導される増強信号から大きな利点をもたらす2つの方法である。これらの2つの方法は、背景信号及び結合事象に関与しない分子からの結合事象に関する特定のER信号の分離に対して有用である。蛍光体は、センサーの波長増強能に適合させる必要がある。

【0133】

ERとFP及び/又はTRFを使用する方法の発明は、結合事象に含まれる蛍光体の存在を正確に検出する機会をユーザーに付与すると共に、このような検出を背景又は非関与分子から非常に高い感度で識別することを可能にする。

【0134】

FP及びTRFは、診断と薬学的試験に関連するタンパク質/化合物のスクリーニングの産業分野において広範囲に使用されている技術である。この点に関しては次の米国特許文献を参照されたい：第6432632号、第6207397号、第6159750号、第6448018号、第6455861号、第6566143号、第5504337号。これらの特許文献の開示内容も本願明細書の一部を成すものである。また、ブダッハらによる米国特許第6870630号と銅第6707561号及びノイエファーらによる米国特許第6078705号と同第6289144号の開示内容も参照されたい。このような方法は、望ましくない信号、例えば、背景や非結合分子からの結合信号の識別を可能にするために一般的に使用されている。本発明方法は、信号対雑音比（感度）を改善し、試薬の消費量の低減化を可能にする。このような改善は、感度と試薬が制限される「プロテオミクス（proteomics）」として知られている研究分野において特に有用である。さらに、一般的な生物物理学的決定法分野（折り畳み、他の分子への接近、サイズ等）におい

10

20

30

40

50

ても感度の増大がもたらされる。

【0135】

結合相互作用の決定における50～100倍の潜在的な感度増大に起因して、このような技術はいくつかの商業的な利点（例えば、試薬の消費量の低減化及び低信号における信頼性の限界の拡大等）ももたらす。

【0136】

清浄な底部プレートの下面からのFPを測定するために使用できるいずれの装置も、本明細書記載のER/BINDバイオセンサーのために機能させることができる。FPとTRFの両方を測定できる市販の装置、例えば、モレキュラー・デバイス社製の「スペクトラマックス M5」装置等が知られている。しかしながら、FP測定を検出するための装置は、TRF測定を可能にする装置と同じ装置である必要はない。信号対雑音比を大幅に改善することによってFP又はTRF測定に対してより多くの利点をもたらすERバイオセンサーの物理的特徴は、増大信号に対して共鳴効果をもたらす本明細書において詳述したバイオセンサーの格子構造である。FPとTRFは薬学的なスクリーニング活性に対して推薦される方法である。この理由は、これらの方法によれば、スクリーニングに供される化合物の天然蛍光から望ましくない信号（即ち、これらの化合物を用いるときのより高い雑音/背景）をユーザーが回避できるからである。

【0137】

ERとBINDセンサーを用いる試料量の調節とスポット形成過程

本発明によるバイオセンサーの1つの可能な用途においては、ERとBINDセンサーを使用することによって、多数の位置における試料の分析がおこなわれる。この場合、各々の位置は、直径が約10～500ミクロンのスポット（spot）のマイクロアレイ（microarray）を規定する。

【0138】

「スポット」という用語は、バイオセンサーの表面上載置された少量の試料物質を意味する。このようなスポットは、試料を含有する標的溶液の小滴をバイオセンサーの表面上へ沈着させた後、該小滴を乾燥させることによって形成される。小滴の大きさはスポットの大きさを決定する。このような小滴を沈着させる方法としては別の方法も知られており、この種の技術は当該分野においては一般的に知られている。1つの可能な実施方法においては、センサーの表面は多くのスポットのアレイ（即ち、スポットのマイクロアレイ）を保有し、大部分のこれらのスポットは異なる組成を有する。

【0139】

次いで、種々の複雑な組成を有する共通の試験物質を全アレイへ適用する。1つの実施例においては、この試験物質は蛍光的に標識化された試験物質を含有する。次いで、光を用いてセンサーに対して、試験物質とスポットとの間の結合に関して問い合わせをする。多数のスポットのマイクロアレイを保有するバイオセンサーを分析するために、全スポットを示すバイオセンサーの画像を得た後（後述する図25に示す実施態様における画像読み取り装置参照）、画像分析法又は各々のスポットからの分光データを別々に捕獲する方法を利用することによって、各々のスポットからの信号（ピーク波長値の強度とシフト）を決定する。各々のスポットは1つのデータ点を与える。画像は、スポットのサイズよりも小さな分解能ディメンジョン[ピクセルサイズ（pixel size）]を有していなければならない。

【0140】

アッセイ表面上への試料物質のスポット形成（例えば、DNAのスポット形成）中の過程の可変性によって、その後の試験試料の結合に対して不確定な結果がもたらされる。試料物質の密度とスポット間の調節できない可変性によって、蛍光信号による試験物質の結合頻度がかなり妨げられる。第2標識を適用することによる試料物質の定量化は一般的には実用的ではない。

【0141】

本明細書に開示されるER方式と標識不使用方式を組み合わせたバイオセンサーはこの

ような問題を解決する。特に、B I N D 信号は、スポット中の試料物質の量を非破壊的な方法で迅速に定量するために使用される。この場合、蛍光体又はその他の添加標識を必要としない。B I N D 測定は、蛍光体で標識化された試験物質に対して試料（スポット）を曝す前におこなわれる。E R 測定は、蛍光体で標識化された試験物質に対して試料を曝した後でおこなわれる。B I N D 測定によって、各々のスポットからの蛍光性信号に対して正規化量もたらされる。スポットのアレイのB I N D 画像もスポットの形態に関する情報をもたらし、また、スポット形成過程に対して定性的調節機能を果たす。

【 0 1 4 2 】

1つの代表的な実施態様について、図31～図33に基づいて説明する。図31は、7ミクロンの分解能を有する格子に基づくセンサー上に沈着されたスポットのマイクロアレイの画像を示す。該センサーはE R とB I N D の両方の測定に対して最適化されていてもよく、あるいは最適化されていなくてもよい。この画像はC C D カメラによって捕獲された（以下において説明する図25に示す実施態様参照）。D N A スポットの画像は種々のミクロンオーダー、例えば、7ミクロン、15ミクロン及び30ミクロン等の分解能（ピクセルサイズ）で得てもよい。図32は、センサー上に載置されたD N A 試料の存在に起因する図31に示すスポットの1つに関するピークシフトのグラフである。このシフトは、D N A スポットに対してピーク波長値が右側へ移動することを示す。このシフトの度合いは、スポット中に存在するD N A の量を示す定量的尺度である。図33はスポット列及び該列に沿った位置の関数としてのピーク波長値（P W V）のシフト（nm単位）の対応するグラフを示す。P W Vの変化は、該列のスポット上に位置するD N A 試料の量に関する定量的尺度である。D N A 試料物質のスポットが存在しないセンサー表面上の領域はスポット列の画像中の暗部で示され、また、消失スポットはグラフの下部領域に示される。従って、図33に示すグラフは、アレイ中のスポット上に存在するD N A に関する定量的/定性的尺度をもたらし。

10

20

【 0 1 4 3 】

この開示内容によるスポット形成によれば、ナノメートルサイズの構造化光学的表面、例えば、標識を使用しないB I N D 法において使用される光学的表面上のD N A スポット（又は、いずれかの生物学的物質、例えば、R N A、タンパク質、炭水化物、及びペプチド等）の厚さ、均一性及び形態の分析法が提供される。この方法は、ナノメートルサイズの構造化光学的表面、例えば、本明細書に記載のE R 方式と標識不使用方式を組み合わせたセンサーの両方を利用するために適している。また、該方法は、1つの技術又は他の技術に対して設計される格子構造体上のスポットの分析にも使用することができる。

30

【 0 1 4 4 】

印刷されたマイクロアレイの品質の調節は、マイクロアレイのメーカーとユーザーの双方にとって重要である。印刷されたD N A スポットは識別可能な標識又は該スポットに装着されるタグ（tag）（例えば、蛍光、量子ドット、放射能等）を有しない場合が多い。このため、アッセイを実施する前に、品質保証のための印刷スポットの画像形成を迅速かつ確実に定量的におこなうことは困難である。スポット上に印刷されたD N A の量の変化はハイブリッド形成アッセイの結果に大きな効果をもたらし、特に診断に関連する用途においては重大な影響をもたらし、これらの点を考慮するならば、本明細書に開示される本発明によるスポット形成法によって、ナノメートルサイズの構造化光学的表面（センサー表面）上に印刷されたD N A スポットの画像を非破壊的で非接触的に形成させる方法が提供される。この発明は、D N A スポットの印刷法の特徴と信頼性を確認して欠陥のあるマイクロアレイを除去することによって、この種のマイクロアレイの製造コストを低減させるために使用することができる。また、この発明は、最初にスポットされた物質の量に関してこれらのチップ（蛍光等を介在させるチップ）を用いておこなわれる標識化アッセイから得られる最終的な結果を正規化させることによって、他の手段によっては従来は得ることができなかった結合の親和性/効率に関する情報を提供するために使用することができる。

40

【 0 1 4 5 】

50

本明細書に開示された方法は、好ましくは、非接触的で非破壊的な態様でおこなわれる。即ち、スポットの画像形成は光学的手段を介しておこなわれ、定量的情報と定性的情報は、図31～図33に関連して説明したように、スポットに関連して得られる。この方法は、チップの表面上に存在する単鎖DNAへ弱く結合した標識化末端（例えば、蛍光性タグ）を有するランダム配列の短鎖オリゴヌクレオチドを使用する従来法よりも優れていると考えられる。結合スポットからの蛍光信号は、該スポット中に存在するDNAの量を示す。これらの方法は、種々の問題の影響を受ける場合が多い。この種の問題としては、ランダム標識化オリゴマー/DNA錯体の低融点に起因する室温での解離、ストリーキング（streaking）、スポット形成、基質に対する非特異的結合とこれに伴う背景の増大、及びこれらのQC試験における洗剤の使用に起因して発生することがあるスポットからの結合DNAの完全な除去等が例示される。パーキン・エルマー社製の反射撮像装置を使用してスポットの存否を非破壊的に測定した。この場合、DNAスポット中に存在する塩結晶からの反射レーザー光を用いた。この方法は、スポットの存否を測定する完全に定性的な方法であり、また、印刷溶液が塩を含有しない場合や塩結晶がスポットのアレイから洗い流されるときには使用できない。

【0146】

本明細書に開示されたこの点に関連する画像形成技術の機能的な利点は、構造化光学表面に結合した物質の量の定量的分析法を提供することである。この分析法は、非破壊的な非接触測定法である。さらに、この発明によれば、マイクロアレイのメーカーとユーザーは、マイクロアレイ表面上のスポットの特性（均一性、スポットの形態及び結合した物質の量）を確認することができる。さらに、この分析においては従来法において必要とされているかなり長い時間は不要であり、分析に要する時間は約1分間である。従って、この分析法によれば、少量の試料に制限されることなく、全てのマイクロアレイにおける分析をおこなうことができる。

【0147】

標識不使用検出と蛍光増幅（ER）を組み合わせたバイオセンサー用読取りシステム

ER法と標識不使用法を組み合わせたバイオセンサーに関する上記の説明を参酌しながら次の実施態様について説明する。即ち、センサーに問い合わせをした後で、検出器上の単一の結合サイトから標識不使用データとERデータの両方を獲得するために有用な読取り/検出システムのいくつかの実施態様について説明する。

【0148】

読取/検出システム300の第1の実施態様を図25に模式的に示す。図25に示す読取/検出システム300は画像化（imaging）読取システムである。バイオセンサー100は、光学スペクトルにおいては標識不使用検出法に対して鋭い共鳴ピークを示すと共に、バイオセンサーのエパネッセント領域においては蛍光信号の顕著な増大に対して高電磁場を発現させるように設計される。この読取りシステムは、これらのバイオセンサーの特性を利用することによって、これらの効果の両方を読み取る。この開示内容によれば、バイオセンサーからの一方又は両方の信号の測定能を有する新規な画像化読取りシステムが提供される。

【0149】

「comB I N Dセンサー」で示されるバイオセンサー100は、該バイオセンサーの底部側から光学的に問い合わせを受ける。バイオセンサー100の上部側においては、該バイオセンサーは水又はその他の液体中に浸漬されていてもよく、あるいは空気に曝されていてもよい。いずれかの分子又は細胞の結合相互作用は、該相互作用を検出できるように設計されたバイオセンサー100の上部面側でおこなわれる。バイオセンサー100は、液体保有容器、例えば、各列がウェル（例えば12個のウェル）を有する8列のウェルを備えたマイクロウェルプレートを具備するより大きなアッセイ装置の一部であってもよい。このバイオセンサーはマイクロアレイのスライド（slide）の構成要素であってもよい。図25に示す構成態様においては、単一ウェル（検出サイト）302は断面図で示されており、この種の検出サイトは数十個、数百個又は数千個存在していてもよい。

【0150】

画像化読取り/検出システム300は、レーザー（例えば、HeNeレーザー等）形態のER光源340、ハロゲン白色光を含む広帯域スペクトルBIND光源350又はLED352、及び連続的な画像におけるERデータと標識不使用データの両方を捕獲するための共通の検出器として機能するCCDカメラシステム338を具備する。該システム300は、光学ビームを合体させるサブシステムを具備する。該サブシステムは、光源340/352からバイオセンサーへの入射光の合体と誘導をおこなうダイクロイックミラー（dichroic mirror）364/330を具備する。ダイクロイックミラー330は検出用信号光を捕集し、これをレンズ336へ誘導し、該レンズを通過した信号光はCCDカメラ338によって撮像される。

10

【0151】

バイオセンサー100の下部に存在する光ビーム370は照射光372と反射光374から成る。反射光374は直接反射光の他に、バイオセンサー上に蛍光物質が存在するときには該物質から放射される蛍光を含む。

【0152】

レンズシステム336を通過後にCCDカメラによって検出される信号は、電子的処理又はコンピュータによるアルゴリズムによって処理されてBIND（標識不使用）データ380又はERデータ382となる。この種のデータは、読取りシステム300のユーザーにより、分析装置を用いて記憶/表示させて分析してもよい。分析装置としては、図25に示すような計測化に使用されるコンピュータ又はワークステーション等であって該データ382/380にアクセスできる装置（図示せず）が例示される。さらに、ユーザーは、BINDデータ380とERデータ382を組み合わせることによって、新規なバイオセンサー100による特有の情報であって、結合相互作用又は細胞相互作用に関する情報を得ることが可能となる。

20

【0153】

図示する構成態様においては、光学的構成要素340/350/330は、入射される単一ビーム372が発生されるように配設され、バイオセンサーはX方向とY方向に移動し、これによって、バイオセンサー100の表面上に存在する全てのウェル302又は結合サイトからデータを連続的に得ることができる。このようなバイオセンサーの移動は、当業者には周知の手法、即ち、X方向とY方向に移動可能なステージ（図示せず）上にバイオセンサーを載置させる手法を用いておこなってもよい。所定のウェル又は結合サイト302がビーム372に適合するように配設される場合の1つの実施態様においては、光源340/350を連続的に（又はバイオセンサー上への直接的放射を可能とするように選択的に）作動させ、第1画像と第2画像（一方の画像はER画像であり、他方の画像はBIND画像である）をCCDカメラによって捕獲する。CCD画像の連続的捕獲は、ビーム選択機構360（例えば、シャッター）を使用することによって促進させることができる。該ビーム選択機構は光源340又は光源350からの光を選択的に通過させて該光をダイクロイックミラー330へ誘導させた後、バイオセンサー上へ反射させる。ビームの選択も電子的におこなうことができる。例えば、光源340/350の作動時間と停止時間を電子的に制御することによっておこなうことができる。あるいは、両方の光源を同時に作動させ、ビーム選択機構360を両方のビームが通過するように作動させることによって、入射ビームが両方の光源からの光を含むようにしてもよい。この場合、CCDカメラ338はER情報とBIND情報を含む単一画像を捕獲する。CCDカメラ338から得られる画像を画像処理法により処理することによって、複合画像の中からBIND成分とER成分が抽出される。

30

40

【0154】

ER光源340はレーザー、例えば、ヘリウム/ネオン（HeNe）レーザー等であってもよい。レーザービーム341はさらにビーム調整装置342、例えば、ビーム拡大器等を通過させる。ビーム拡大器342は小さな直径を有するレーザービームを大きな直径を有するレーザービームへ拡大させる。出力ビーム343は平行化された後、直線状に偏

50

光される。バイオセンサーは、特定の偏光における入射光に应答してER効果をもたらす。偏光は、直線状に偏光された出力レーザービームを発生するように設定されたレーザーを用いておこなってもよい。

【0155】

BIND(標識不使用)光源350は、ハロゲン又はLED光源352、及び波長調整機構356を有するモノクロメーター354から成ってもよい。光源352から放射される光ビーム353は本来的に広帯域であり、モノクロメーター354のの出口部における光ビーム355は単色性である。

【0156】

モノクロメーター354からの出力光ビーム355はビーム調整装置358によって調整される。該ビーム調整装置はコリメーターであってもよい。ミラー365は、ビーム調整装置358の出力からダイクロイックミラーへの光ビーム349を検出する。光源340/350からの合成光366はビームの分割/合成アセンブリー330へ誘導された後、バイオセンサー100の底部表面上へ誘導される。

【0157】

BIND光源350は波長可変レーザーから成ってもよい。この場合、ビーム調整装置358はビーム拡大器である。BIND測定とER測定の両方に対して波長可変レーザー又は閃光電灯(flash lamp)を単一の照射源として使用してもよいことに留意すべきである。

【0158】

さらに、偏光はBIND信号の検出を促進するので、光源352の内部に偏光子を設置することによって、光363を直線状に偏光させてもよい。あるいは、光検出素子365は偏光ビームのスプリッターであってもよく、これにより、ランダム偏光359を直線状偏光363へ変換させてもよい。

【0159】

レーザーで励起された蛍光信号を検出するためには、一組の光学フィルター332/334をビームの分割/合成アセンブリー330に組み入れてもよい。フィルター332はダイクロイックフィルターであり、該フィルターはレーザー光を反射させると共に、試料からの蛍光を透過させる。フィルター332はBIND波長範囲内においてビームスプリッターとしても機能する。1つの好ましい設計における該波長範囲は830nm~900nmである。フィルター334は2つの波長範囲(レーザーで励起された蛍光とBINDの波長範囲)において光の透過のみをおこなう。結像レンズ336を使用することによって、バイオセンサー表面上の蛍光を捕獲し、該蛍光をCCDカメラ338の焦点面上へ集束させてもよい。

【0160】

図25に示す設計態様には、ER検出をおこなうために、入射ビーム372に対してバイオセンサーを回転させる回転装置も配置させる。1つの可能な実施態様においては、回転装置331はビームの分割/合成アセンブリー330へ装着され、該アセンブリーを図中の矢印で示す方向に回転させ、これによって、入射ビームを約の角度で回転させる。別の実施態様においては、回転装置331は省略され、その代わりに、回転装置333がXY方向への移動ステージに装着される。図26の回転装置333の左側の矢印で示すように、該回転装置はXY方向への移動ステージとこれに装着されたバイオセンサー10を固定された入射ビーム372に対して回転させる。

【0161】

所望の性能を達成するために、付加的なレンズ、ミラー及び光学フィルターを上記の読取りシステムへ組み入れてもよい。適当に設計された光学フィルターを使用することによって、BIND検出とER検出との間の望ましくないクロストーク(cross-talk)を排除してもよい。さらに、電子的又は機械的なシャッター360の形態のビーム選択機構を使用することによって、2つのチャンネルの検出と光照射を適当に同期させてもよい。この結果、1つの光源のみを用いてバイオセンサーを所定時間照射することによってクロスト

10

20

30

40

50

ークを排除することができる。

【0162】

図25に示すバイオセンサーの読取りシステムの重要な利点は、同じバイオセンサーの位置においてBINDのデータとERのデータを同時に又は立て続けに入手できることである。高分解能画像形成法は多量のバイオアッセイ、例えば、セルに基づくアッセイ又はマイクロアレイを用いるアッセイに対して有用である。

【0163】

積分型の単一点検出器によってCCDカメラ338を置き換えてもよい。この場合、該システムは、検出器の出力を伴う入射放射線372の位置にわたって、センサーの動きを同期することによって画像をもたらす。

【0164】

バイオセンサーからERのデータを得るためにCCDカメラを使用することに関するさらに詳細な事項は、例えば、下記のような技術文献に記載されており、この文献の開示内容も本明細書の一部を成すものである：ディーター・ノイエファー及びウォルフガング・ブダッハら、「バイオセンサーズ&バイオエレクトロニクス」、第18巻、2003年、第489頁～第497頁。

【0165】

読取り/検出装置300の第2の実施態様を図26に示す。図25に示す実施態様は画像化読取りシステムであるのに対して、図26に示す実施態様は画像化システムではない。前述のように、バイオセンサー100は、標識を使用しない検出のための光学スペクトルにおいて鋭い共鳴ピークを示すと共に、蛍光信号を著しく増大させるためのバイオセンサーのエパネッセント領域において高い電磁場を示すように設計される。バイオセンサーのこのような特性に起因して、これらの効果の両方を読取るシステムが必要となる。図26には、バイオセンサーからの一方又は両方の信号を測定する別の新規な読取りシステムを示す。

【0166】

バイオセンサー100に対しては、結合サイト(例えば、ウェル302)の位置における底部側から光学的な問い合わせがなされる。バイオセンサー100の上部は水又はその他の液体中に浸漬されていてもよく、あるいは空気に曝されていてもよい。バイオセンサーによって検出されるいずれかの生体分子又は細胞の結合性の相互作用はバイオセンサーの上部においておこなわれる。ここに記載されたいずれの測定システムも、必要な場合には適当な集束装置を用いてバイオセンサー100を上部(結合側)から読取る。

【0167】

先に言及したように、センサー100は、液体保有容器(例えば、マイクロウェル具有プレート)を具備するより大きなアッセイ装置の一部であってもよい。また、バイオセンサーは、マイクロアレイ具有スライドの構成要素であってもよい。

【0168】

読取りシステム300はBIND光源402、BIND検出器400、ER光源406及びER検出器404を具備する。光学システム430は、光源406/402からの光を合成し、該合成光を入射ビームとしてバイオセンサー100の底部表面上へ誘導する。光学システム430は、バイオセンサーからの反射光452をさらに捕集し、該反射光を検出器400/404へ誘導する。光学システム430は4つの光ビーム分割/合成装置432/434/436/438から成り、装置432はBIND検出器用の装置であり、装置434はBIND光源用の装置であり、装置436はER検出器用の装置であり、また装置438はER光源用の装置である。バイオセンサーの下方に存在する光ビーム450は入射光452と反射光454から成る。反射光454は反射光の他に、バイオセンサー上に蛍光性物質が存在する場合には該物質が発光する蛍光も含む。

【0169】

BIND(標識不使用)検出器400によって検出される信号は電子的に処理されるか、又はコンピュータによる演算によってBINDデータ380へ変換され、該データは、

10

20

30

40

50

当該読取りシステムを操作するユーザーにより、コンピュータへ記憶されて表示／解析される。同様に、ER検出器404によって検出された信号は、ユーザーのために処理されてERデータ382へ変換される。さらに、ユーザーは、BINDデータ380とERデータ382を組み合わせることによって、当該新規なバイオセンサーに特有の情報である結合性相互作用又は細胞相互作用に関する情報を得ることができる。

【0170】

図26に示す実施態様においても、入射光ビーム452をバイオセンサー100に対して回転させるための回転装置331又はXYステージとバイオセンサー100を入射光452に対して回転させるための回転装置333が含まれる。回転装置331は、アセンブリ430の全体の回転がもたらされるように配置してもよい。

10

【0171】

図27においては、図26に示すシステムと類似する読取りシステムを、図26の場合よりもより詳細に示す。BIND光源402はタングステンハロゲン電球であってもよく、あるいは発光ダイオード(LED)であってもよい。ER検出器404は光検出器、例えば、光電子増倍管(PMT)を具有していてもよい。ER光源406は、好ましくは、バイオセンサーと共に使用される蛍光体の励起帯域内の波長を有するビームを発生するレーザーである。例えば、CY5蛍光体の励起に対してはヘリウム／ネオン(HeNe)である。

【0172】

BIND光源402からの光ビーム456は、BIND信号を検出するための平行光である。従って、光源402はコリメーターレンズを具有していてもよい。さらに、BIND信号の検出は偏光の使用によって改善されるので、光源402は、光456を偏光させる偏光子を具有していてもよい。あるいは、ビームスプリッター434は偏光性のビームスプリッターであってもよく、これによってランダム偏光456を直線状の偏光に変換させてバイオセンサー100の底部へ入射させることができる。

20

【0173】

レーザー406からの光ビーム458は平行ビームである。レーザービームが直線状に偏光されると、ER性能が改善される。直線状の偏光をもたらしように設計されたレーザーを使用して偏光を達成してもよい。

【0174】

バイオセンサー100からのレーザーで励起された蛍光信号を検出するためには、一組の光学フィルター472/474/476をビーム分割／合成アセンブリ436に組み入れてもよい。フィルター472はレーザー源406からの入射レーザービーム458のビーム分割／合成アセンブリ436内の透過を可能にする。フィルター476はダイクロイックフィルターであり、該フィルターは、光源406からのレーザー光を透過させると共に、バイオセンサー100からの蛍光を光検出器404の方向へ反射させる。フィルター474は、蛍光を透過させて光検出器404へ誘導する。結像レンズ478を使用することによって、バイオセンサー表面上からの蛍光をより効果的に捕集してもよい。

30

【0175】

所望の性能を達成するために、付加的なレンズ、ミラー及び光学フィルターを上記の読取りシステムへ組み入れてもよい。適当に設計された光学フィルターを使用することによって、BIND検出とER検出との間の望ましくないクロストークを排除してもよい。さらに、電子的又は機械的なシャッターを使用することによって、2つのチャンネルの検出と光照射を適当に同期させてもよい。この結果、1つの光源のみを用いてバイオセンサーを所定時間照射することによってクロストークを排除することができる。

40

【0176】

図25に示す実施態様においては、図26と図27に示す光学的構成要素は、1つの位置において入射するビーム452が発生すると共に、XY方向への移動ステージがバイオセンサーをX方向とY方向へ移動させることによって、バイオセンサー100の表面上に存在する全てのウェル302又は結合サイトからデータが連続的に得られるように構成し

50

て配置させることができる。1つの実施態様においては、光源402/406を連続的に作動させることによって、ビーム452が照射される所定のウェル又は結合サイト302からのデータを検出器400/404において連続的に発生させる。ERデータとBINDデータの連続的な捕集は、シャッターのようなビーム選択機構(図26には示されていない)の使用又は光源402/406の電子的制御によって促進させることができる。あるいは、両方の光源を同時に作動させることによって、入射ビーム452が両方の光源からの光を含むようにすることができる。この場合、検出器400/404はデータを同時に得る。

【0177】

ここに示すバイオセンサーの読取りシステムの重要な利点は、同じバイオセンサーの位置においてBINDのデータとERのデータを同時に又は立て続けに入手できることである。BIND検出器400とER検出器404は、1つの結合サイト又はウェルあたりの単一点からのデータを比較的広い領域にわたって得る積分型検出器、又はユーザーによって規定される分解能における画素単位のデータを捕集する画像化検出器(例えば、CCD検出器)であってもよい。高分解能画像化法は多量のバイオアッセイ、例えば、セルに基づくバイオアッセイ又はマイクロアレイを用いるバイオアッセイに対して有用である。

10

【0178】

さらに、図25~図27に示す光学的構造体は、例えば、図3に示す態様を利用することにより、バイオセンサー100上に存在する多数のウェル又は結合サイトに対して同時に問い合わせをしてデータが得られるように反復して配設させることができる。

20

【0179】

単一光発生源を備えた読取りシステム

図25に示す実施態様と図26に示す実施態様においては次の点に留意すべきである。即ち、前者においては、BIND測定用光源350とER測定用光源340が別々に配設されており、後者においては、BIND測定用光源402とER測定用光源406が別々に配設されている。1つの可能な変形態様においては、BIND測定とER測定の両方に対して単一光源を使用してもよい。このような光源としてはいくつかの光源が使用可能であり、例えば、波長可変レーザー、又は広帯域スペクトルを示す高強度閃光電灯等が挙げられる。光源からの出力は所望により平行化し、ビーム拡大器を用いて拡大し(光源として波長可変レーザーを使用する場合)、モノクロメーター又はフィルターを通過させ(閃光電灯を使用する場合)、次いでバイオセンサーの表面上へ誘導される。ER信号とBIND信号を検出するために使用される光学装置(optics)は図25~図27に示す態様及び前述の態様の装置であってもよい。

30

【0180】

1つの実施態様においては、バイオセンサー中の所定の結合サイトからBINDデータとERデータの両方を得るために、光源を2回作動させることにより、照射用の異なる波長範囲を選択することができる。即ち、一方の波長範囲はBIND測定用であり、他方の波長範囲はER測定用である。例えば、光源の第1活性化においてはBIND検出器によってBINDデータが得られ、一方、光源の第2活性化においてはER検出器によってERデータが得られる。

40

【0181】

1つの可能な変形態様においては、広帯域光源(例えば、キセノン閃光電灯)を使用する場合、広帯域スペクトルを用いてバイオセンサーを照射し、反射信号を分割して2つの異なるフィルターを通過させて方向転換させることによって、BINDデータとERデータを同時に捕集することができる。BIND/ERに係る同時の照射とデータ捕集を実施するためには、プレート面に対する入射角に多少の差異を設けて照射をおこなう必要がある。鏡面からの直接的な反射成分はBINDピークを含んでおり、該ピークのスペクトル位置はモノクロメーターによって決定される。入射角以外の角度で表面から離反する光のみを集めるレンズ系又は積分球は、問題となる蛍光体の発光の範囲を選択するフィルター又はモノクロメーターを通過した後、比較的鮮明な信号をもたらす。

50

【 0 1 8 2 】

上記の説明においては、例示的な観点と実施態様について議論したが、当業者であれば、これらに関連する特定の修正、変更、追加及び下位概念的組合せが上記の開示内容に含まれることを認識できる。従って、特許請求の範囲によって規定される技術的思想と技術的範囲にはこれらの全ての修正、変更及び下位概念的組合せも含まれる。

【 0 1 8 3 】

特許請求の範囲において使用される「エバネッセント共鳴 (E R) 検出」又は「エバネッセント共鳴 (E R) 検出方式」という用語には、蛍光、燐光、化学発光、電界発光及び、例えば、次の特許文献に記載されているようなその他のタイプの発光の検出が含まれる：ブダッハら、米国特許第 6 7 0 7 5 6 1 号。この種の発光は、試料物質の天然発光又は結合物質（例えば、蛍光標識）、あるいは量子ドット（発光性金属）に起因する。この種の結合物質は被験試料、バイオセンサーの表面又はこれらの双方に結合していてもよい。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 8 4 】

【 図 1 】 図 1 は、従来技術によるバイオセンサーの部分的な模式的断面図である。

【 図 2 】 図 2 は、従来技術によるバイオセンサー / 検出システムであって、該バイオセンサーを照明すると共に、該バイオセンサーからの反射光のピーク波長のシフトを測定するための該システムの模式的構成図である。

【 図 3 】 図 3 は、底のないマイクロタイタープレートの基底部へ固定された図 1 に示す構造を有するバイオセンサー装置のウェルの全列を読み取る 8 個の照明ヘッドを具備する装置の模式的構成図である。

20

【 図 4 】 図 4 は、 E R / 標識不使用混成検出バイオセンサーの第 1 態様の断面図である。

【 図 5 】 図 5 は、 E R / 標識不使用混成検出バイオセンサーの第 2 態様の断面図である。

【 図 6 】 図 6 は、従来技術による E R バイオセンサー「ノヴァチップ」における入射角の関数としての透過率を比較するグラフである。

【 図 7 】 図 7 は、水性媒体環境下における標識不使用検出方式による図 4 に示す態様に対する波長の関数としての反射率を比較するグラフである。

【 図 8 】 図 8 は、標識不使用検出方式による図 4 に示す態様に対する波長の関数としての反射率のグラフを示す。

30

【 図 9 】 図 9 は、標識不使用 / E R 検出方式による図 5 に示す態様に対共鳴ピークを示す波長の関数としての反射率のグラフを示す。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、図 5 に示す態様に対する の関数としての透過率のグラフである。

【 図 1 1 】 図 1 1 A 及び図 1 1 B は、専ら E R 検出用に設計された一次元的な直線状格子構造体であって、ブダッハらによる従来技術文献に開示されている E R チップとほぼ類似するようにモデル化された格子構造体の斜視図及び断面図をそれぞれ示す。

【 図 1 2 】 図 1 2 A 及び 1 2 B は、波長の関数としての反射効率のグラフ及び入射角の関数としての反射効率のグラフをそれぞれ示す。

【 図 1 3 】 図 1 3 A ~ 図 1 3 C は、図 1 1 A 及び図 1 1 B に示す構造体 ($Z = 110 \text{ nm}$) の下部表面に対応する X Y 平面における電界振幅の X 成分、 Y 成分及び Z 成分のプロットを示し (入射波長 : 632 nm)、また、図 1 3 D ~ 図 1 3 F は、図 1 3 A ~ 図 1 3 C に示す同じ X Y 平面における磁界振幅の X 成分、 Y 成分及び Z 成分のプロットを示す (入射波長 : 632 nm)。

40

【 図 1 4 】 図 1 4 A ~ 図 1 4 C は、図 1 1 A 及び図 1 1 B に示す構造体 ($Z = 110 \text{ nm}$) の上部表面に対応する X Y 平面における電界振幅の X 成分、 Y 成分及び Z 成分のプロットを示し (入射波長 : 632 nm)、また、図 1 4 D ~ 図 1 4 F は、図 1 4 A ~ 図 1 4 C に示す同じ X Y 平面における磁界振幅の X 成分、 Y 成分及び Z 成分のプロットを示す (入射波長 : 632 nm)。

【 図 1 5 】 図 1 5 A 及び図 1 5 B は、格子構造中の周期的なホールによって特徴付けられる 2 次元格子の形態の斜視図及び断面図をそれぞれ示す。

50

【図16】図16は、Y軸方向の偏光を図15A及び図15Bに示す構造体上へ入射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフを示す。

【図17】図17は、Y軸方向の偏光を図15A及び図15Bに示す構造体上へ入射させたときに得られたグラフであって、入射角(632.5nm)の関数としてのグラフを示す。

【図18】図18A~図18Cは、図15A及び図15Bに示す構造体(Z=78nm)の下部表面に対応するXY平面における電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示し(入射波長:632.5nm)、または、図18D~図18Fは、図18A~図18Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す(入射波長:632.5nm)。

【図19】図19A~図19Cは、図15A及び図15Bに示す構造体(Z=433nm)の上部表面に対応するXY平面における電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示し(入射波長:632.5nm)、また、図19D~図19Fは、図19A~図19Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す(入射波長:632nm)。

【図19G】図19Gは、X軸方向の偏光を図15に示す構造体上へ照射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフを示す。

【図20】図20A及び図20Bは、格子構造中の周期的なポストによって特徴付けられる2次元格子の形態の斜視図及び断面図をそれぞれ示す。

【図21】図21A及び図21Bは、Y軸方向の偏光を図20A及び図20Bに示す構造体上へ入射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフ及び入射角(波長:633nm)の関数としてのグラフをそれぞれ示す。

【図22】図22A~図22Cは、図20A及び図20Bに示す構造体(Z=70nm)の下部表面に対応するXY平面における電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示し(入射波長:633nm)、または、図22D~図22Fは、図22A~図22Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す(入射波長:633nm)。

【図23】図23A~図23Cは、図20A及び図20Bに示す構造体(Z=430nm)の上部表面に対応するXY平面における電界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示し(入射波長:633nm)、また、図23D~図23Fは、図23A~図23Cに示す同じXY平面における磁界振幅のX成分、Y成分及びZ成分のプロットを示す(入射波長:632nm)。

【図24】図24は、X軸方向の偏光を図20に示す構造体上へ照射させたときに得られたグラフであって、波長の関数としての反射効率のグラフを示す。

【図25】図25は、ER方式と標識不使用方式を組み合わせた格子に基づくセンサーに関する画像読取りシステムの模式図である。

【図26】図26は、ER方式と標識不使用方式を組み合わせた格子に基づくセンサーに関する第2の画像読取りシステムの模式図である。

【図27】図27は、図26に示す実施態様のより詳細な模式図である。

【図28】図28A~図28Cは、ER方式と標識不使用方式を組み合わせたセンサーのさらに別の実施態様における2段型の二次元的格子構造体を示す3種の単位セルの斜視図である。

【図29】図29は、図28A~図28Cに示す構造体のコンピュータシミュレーションによって得られた反射スペクトル(反射光の波長の関数としての相対強度)のグラフである。

【図30】図30は、ERとBINDを組み合わせた格子に基づくセンサーの断面図である。

【図31】図31は、格子に基づくセンサー上に沈着されたスポットの微小配列の画像を示す。

【図32】図32は、センサー上に載置されたDNA試料の存在に起因する図31に示す

10

20

30

40

50

スポットの1つに関するピークシフトを示すグラフである。

【図33】図33は、位置の関数としてのピーク波長値のnm単位のシフト及び消失スポットを示すスポット列を表示するグラフである。

【符号の説明】

【0185】

- 10 バイオセンサー
- 12 低屈折率材料
- 14 高屈折率材料
- 20 ウェル
- 30 照明装置
- 32 光ファイバー
- 34 コリメーターレンズ
- 100 バイオセンサー
- 200 ポスト
- 210 ホール
- 300 読み取り検出システム
- 338 CCDカメラ
- 400 BIND検出器
- 404 ER検出器
- 500 単位セル

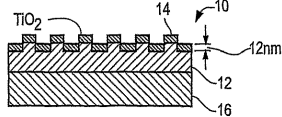
10

20

【図1】

Fig. 1

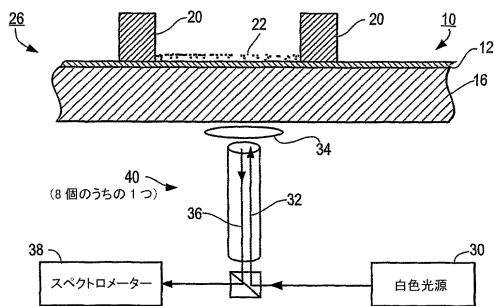
従来技術



【図2】

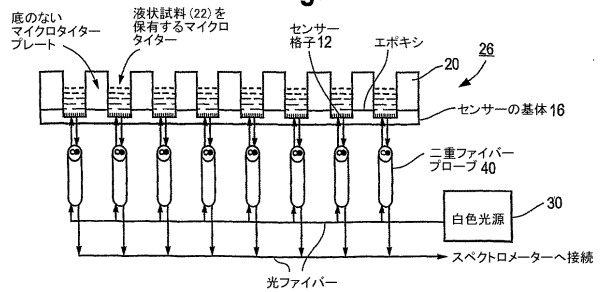
Fig. 2

従来技術



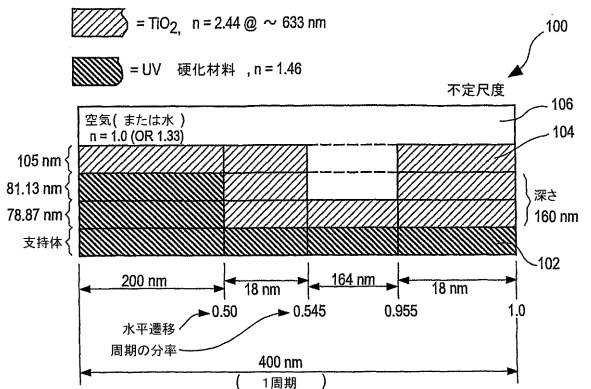
【図3】

Fig. 3

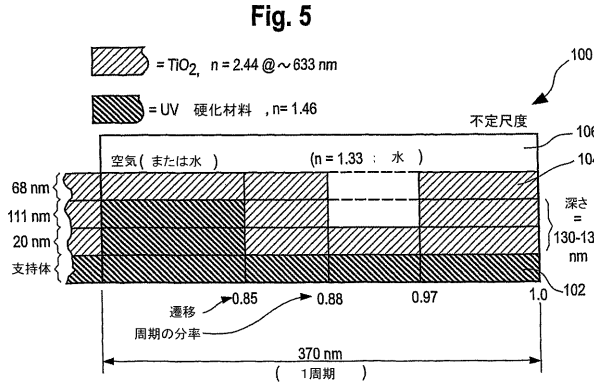


【図4】

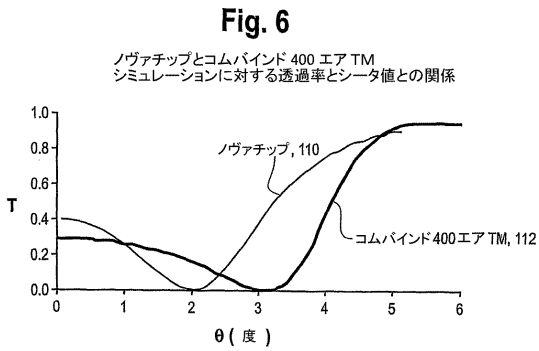
Fig. 4



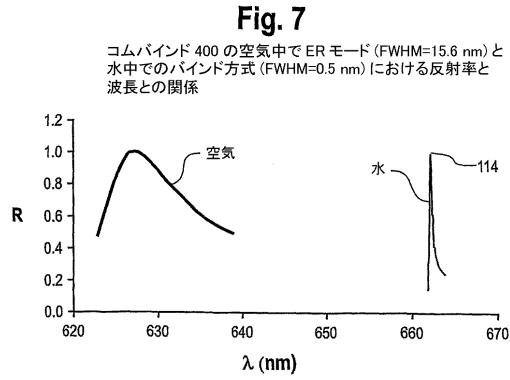
【 図 5 】



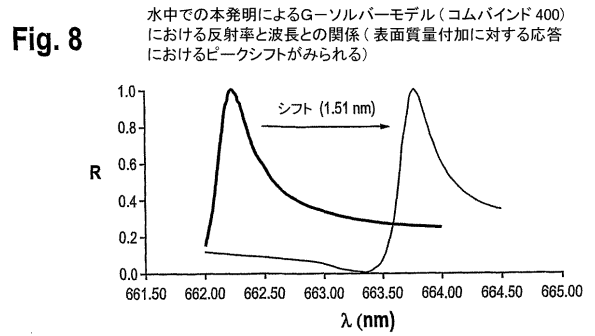
【 図 6 】



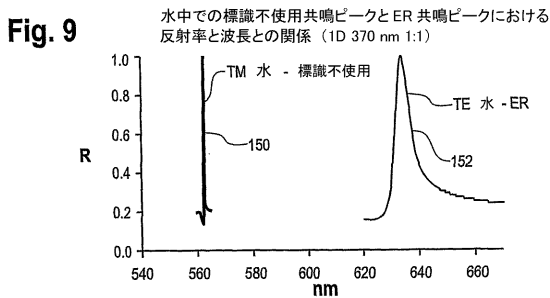
【 図 7 】



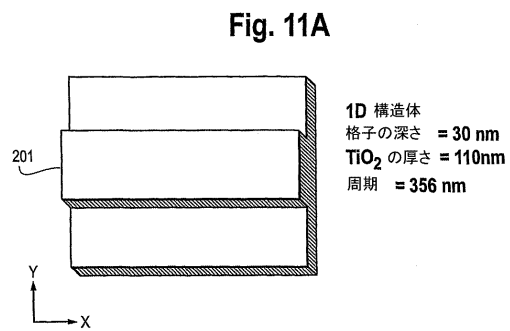
【 図 8 】



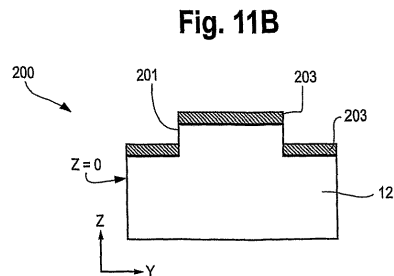
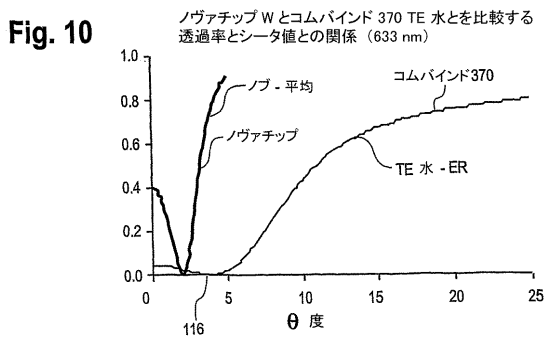
【 図 9 】



【 図 1 1 】



【 図 1 0 】



【 図 1 2 】

Fig. 12A
従来技術

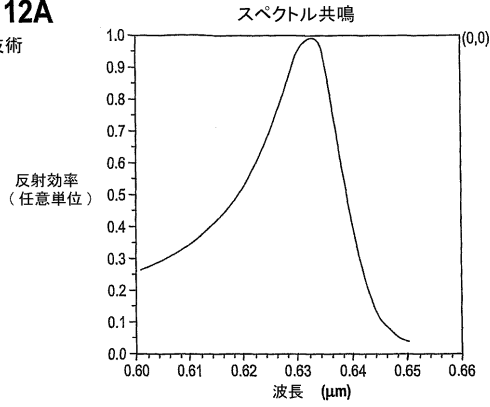
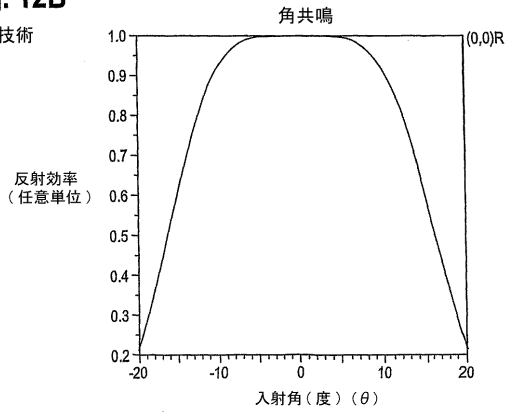
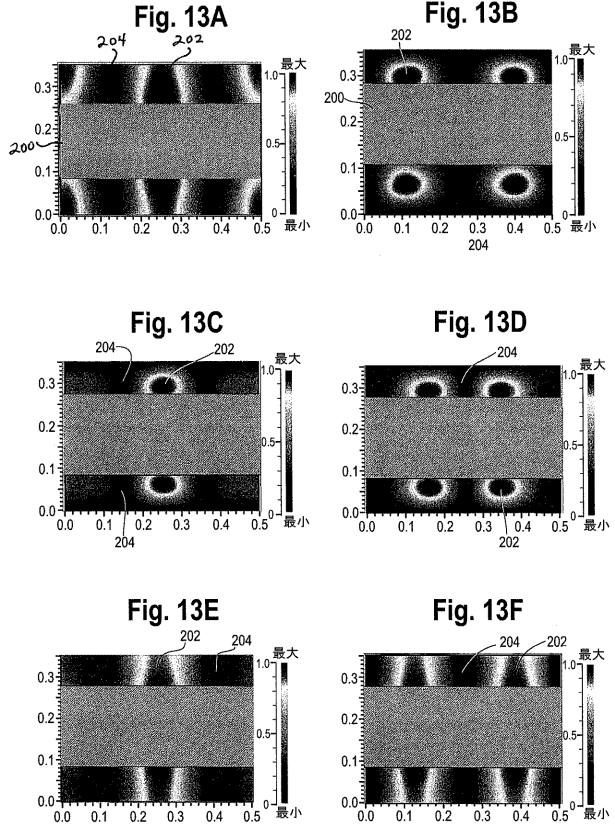


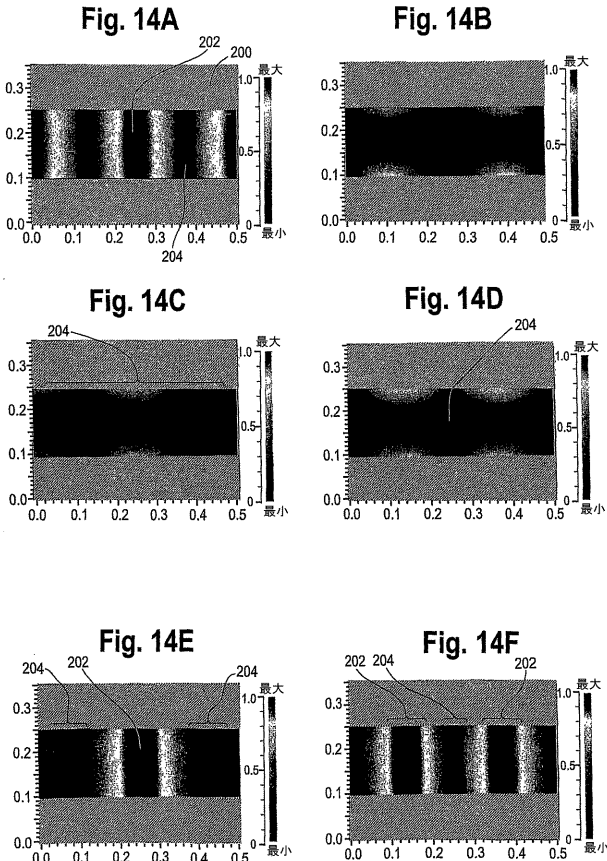
Fig. 12B
従来技術



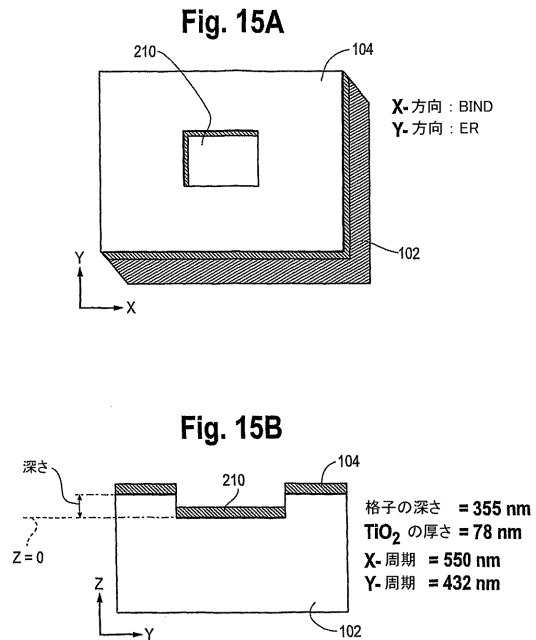
【 図 1 3 】



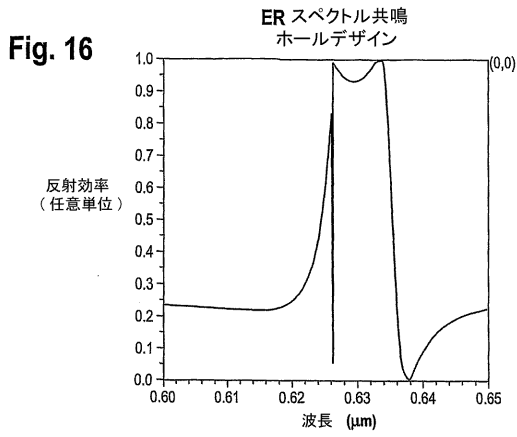
【 図 1 4 】



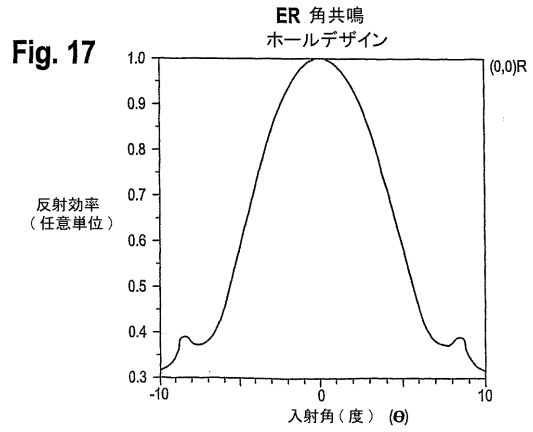
【 図 1 5 】



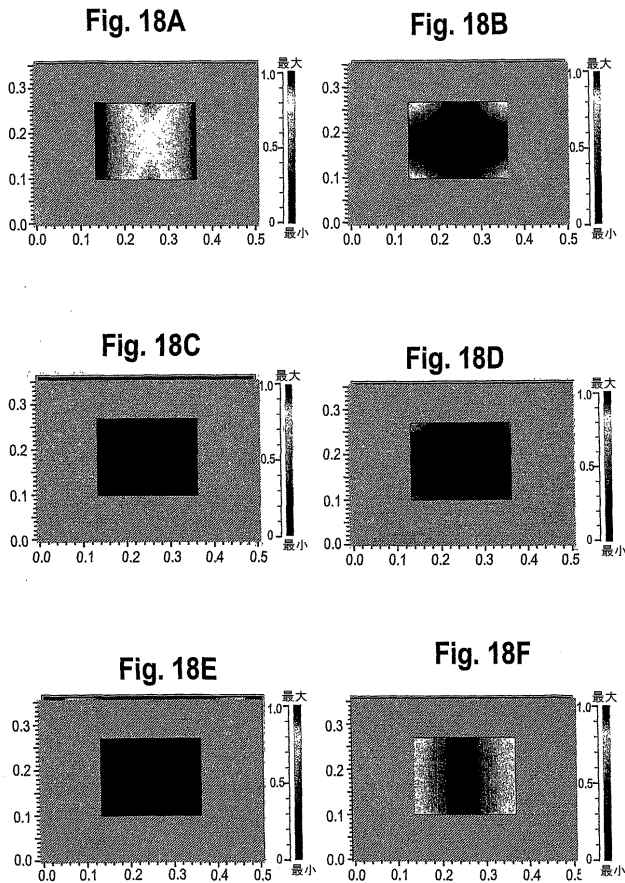
【 図 1 6 】



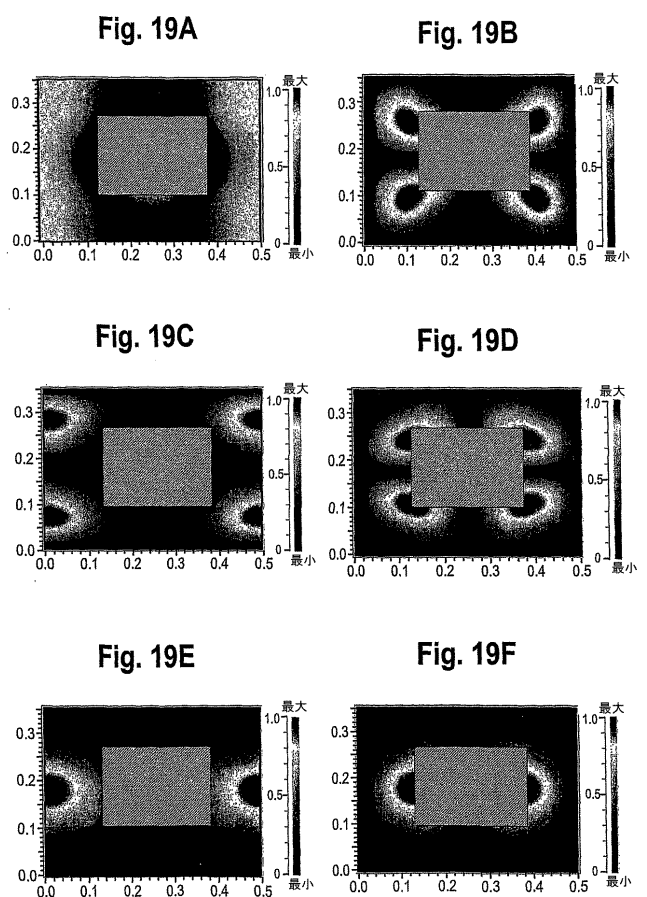
【 図 1 7 】



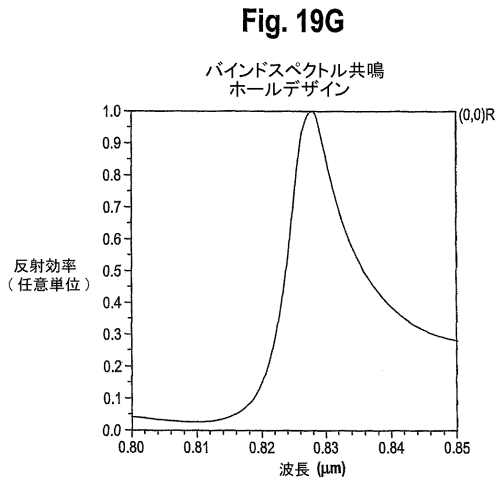
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 1 9 G 】



【 図 2 0 】

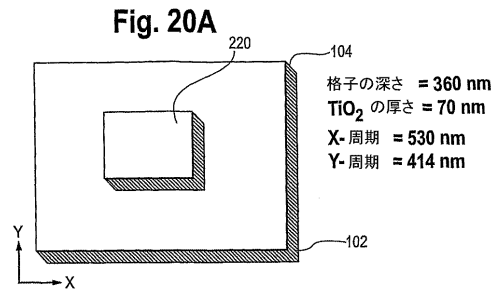
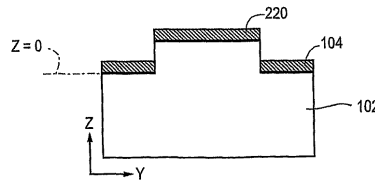
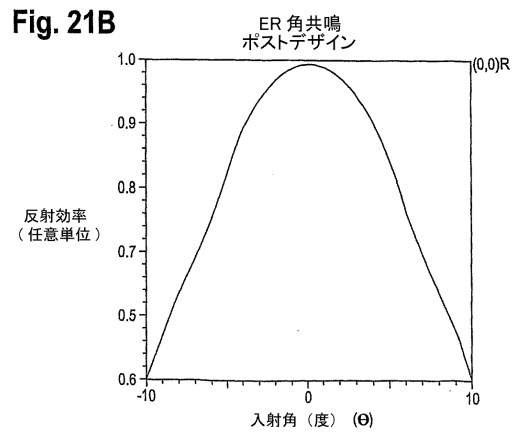
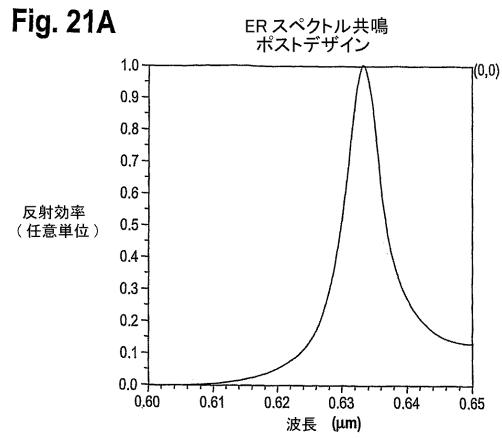


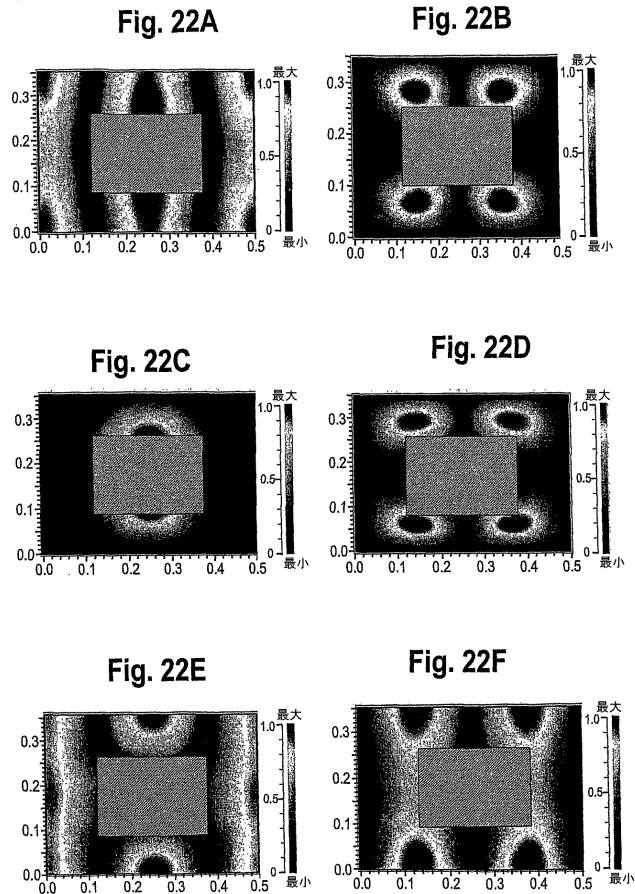
Fig. 20B



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 7 】

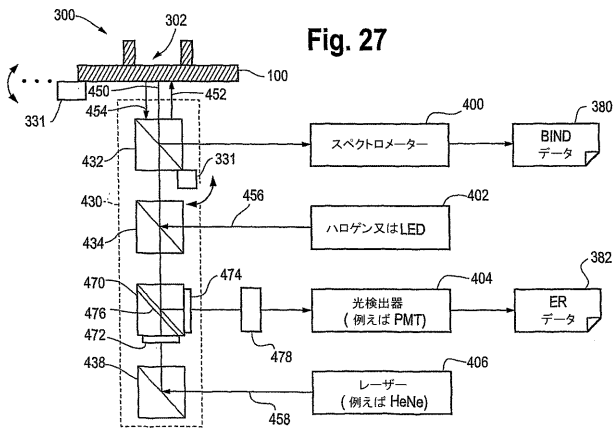


Fig. 27

【 図 2 8 】

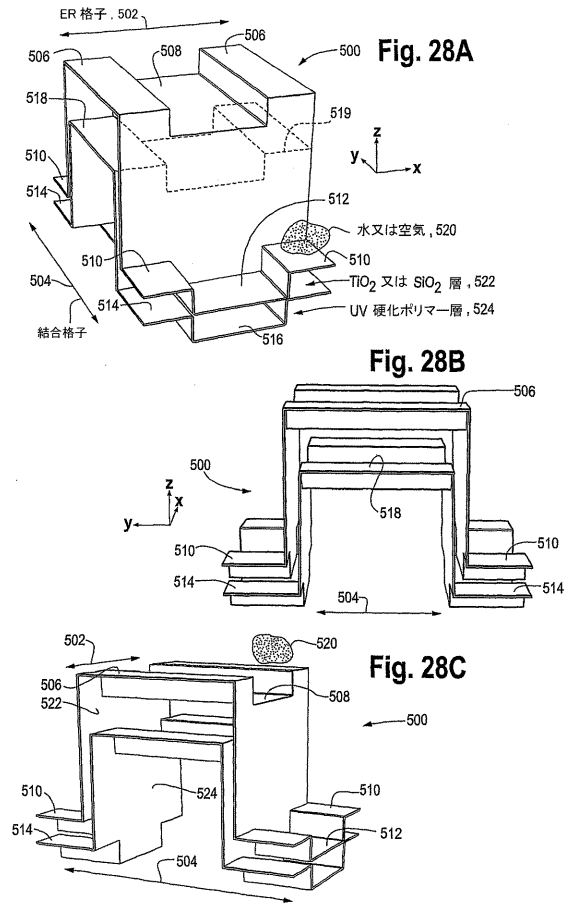


Fig. 28A

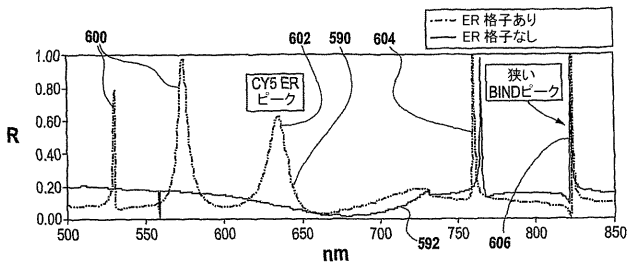
Fig. 28B

Fig. 28C

【 図 2 9 】

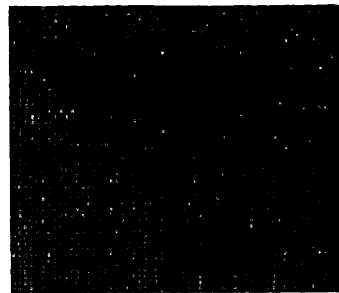
Fig. 29

ER 格子を重ねるか、又は重ねないときのシミュレート化反射スペクトル (背景: 水)



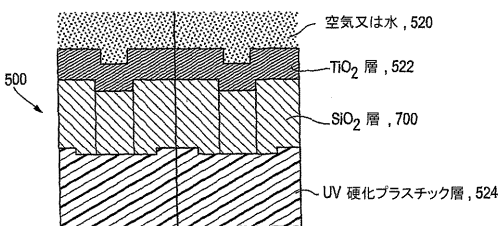
【 図 3 1 】

Fig. 31



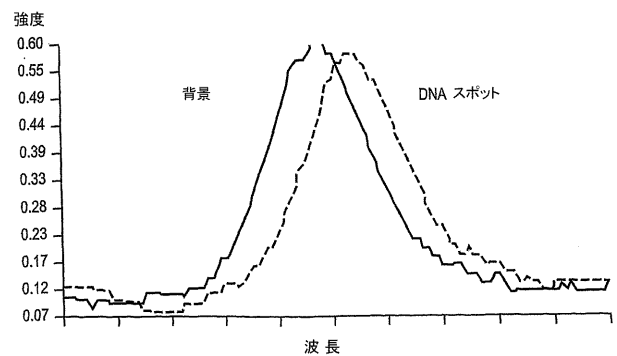
【 図 3 0 】

Fig. 30



【 図 3 2 】

Fig. 32



【 図 3 3 】

Fig. 33

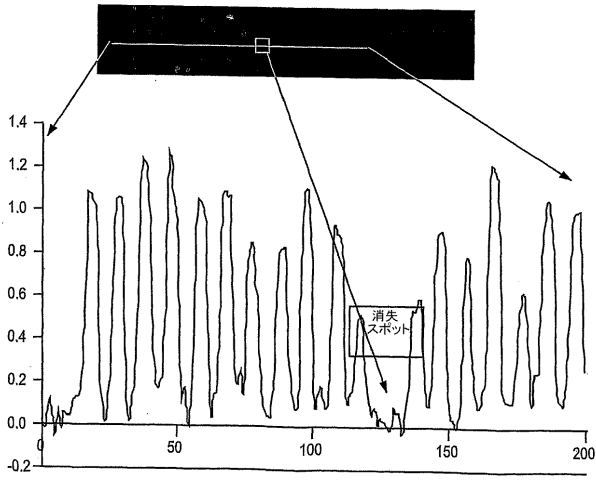


Fig. 22A

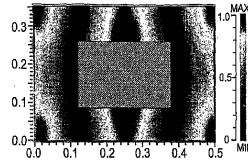


Fig. 13B

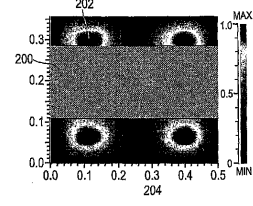


Fig. 13C

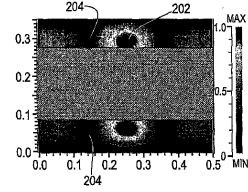


Fig. 13D

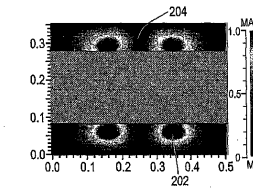


Fig. 13E

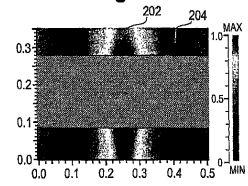
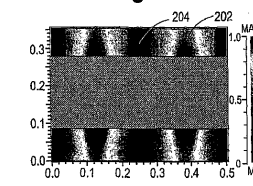


Fig. 13F



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/028473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N21/55 G01N21/64		
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) 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, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CUNNINGHAM B ET AL: "A plastic colorimetric resonant optical biosensor for multiparallel detection of label-free biochemical interactions" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 85, no. 3, 25 July 2002 (2002-07-25), pages 219-226, XP004368813 ISSN: 0925-4005	1,26,52, 57,62
A	page 219, column 1, paragraph 1 - page 212, column 2, paragraph 2; figures 1,2	2,3,7, 9-11,13, 20,21, 25,27, 28,38, 47,51
	----- -/-	
<input checked="" 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 *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 January 2007		Date of mailing of the international search report 01/02/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stuebner, Benno

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/028473

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/046724 A (BIACORE AB [SE]; REVERSE PROTEOMICS RES INST CO [JP]; INAGAWA JUNICHI) 3 June 2004 (2004-06-03) page 9, line 6 - page 10, line 7; claims 13,14	1,26,52, 57,62
A	US 2002/110839 A1 (BACH DAVID [US] ET AL) 15 August 2002 (2002-08-15) paragraph [0002] paragraph [0058] - paragraph [0062]; claims 1-6,19	1-4,7, 20, 25-30, 52,57,62
A	US 2005/025421 A1 (CARACCI STEPHEN J [US] ET AL) 3 February 2005 (2005-02-03) paragraph [0022] - paragraph [0030]; figures 1-4	1,26,52, 57,62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/028473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004046724 A	03-06-2004	AU 2003269751 A1	15-06-2004
		JP 2004170195 A	17-06-2004
		JP 2006511791 T	06-04-2006
		US 2006014232 A1	19-01-2006
US 2002110839 A1	15-08-2002	NONE	
US 2005025421 A1	03-02-2005	EP 1660872 A1	31-05-2006
		WO 2005015185 A1	17-02-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	21/39	
		G 0 1 N	33/543	5 9 5
		G 0 1 N	33/543	5 7 5
		G 0 1 N	33/53	D

(31) 優先権主張番号 60/790,207

(32) 優先日 平成18年4月7日(2006.4.7)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ブライアン・ティ・カニンガム
アメリカ合衆国 6 1 8 0 1 イリノイ州シャンペン、ブライトン・コート 1 7 0 5 番

(72) 発明者 ランス・ジー・ライング
アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州ベルモント、レスリー・ロード 1 2 番

(72) 発明者 ビーター・ワイ・リ
アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州アンドーバー、コプリー・ドライブ 1 番

(72) 発明者 ブラント・バインダー
アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州チェスナット・ヒル、シングル・トリート・ロード 4 0 番

(72) 発明者 ガンガダール・ジョギカルマト
アメリカ合衆国 0 2 1 4 0 マサチューセッツ州ケンブリッジ、クレイトン・ストリート 5 7 番

(72) 発明者 アレックス・ポーソディ
アメリカ合衆国 0 1 8 5 1 マサチューセッツ州ローウェル、ワイルダー・ストリート 3 4 8 番

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 BA17 CA03 DA02 DA06 EA01 HA05 HA07 HA09
JA04 KA07 KA09 LA02 LA03 NA05 NA06
2G059 AA05 BB12 BB14 CC16 DD03 EE02 EE05 EE07 EE12 GG01
GG02 GG04 HH01 HH06 JJ01 JJ05 JJ07 JJ11 JJ17 JJ19
JJ23 KK04 MM01 MM04 MM09 MM10 PP04

【要約の続き】

するためのスペクトロメーター及び E R データを収集するための光電子増倍管の形態である。別の実施態様においては、波長可変レーザーのような単一光源又は広帯域光源が使用される。

专利名称(译)	基于光栅的传感器和传感器读取系统在没有标签的情况下结合结合检测和荧光扩增		
公开(公告)号	JP2009505065A	公开(公告)日	2009-02-05
申请号	JP2008526030	申请日	2006-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	SRU生物系统公司		
申请(专利权)人(译)	ES伯爵宇生物系统公司		
[标]发明人	ステイーブンシーシュルツ ブライアンティカニンガム ランスジーライング ピーターワイリ ブラントバインダー ガンガダールジョギカルマト アレックスポーソディ		
发明人	ステイーブン・シー・シュルツ ブライアン・ティ・カニンガム ランス・ジー・ライング ピーター・ワイ・リ ブラント・バインダー ガンガダール・ジョギカルマト アレックス・ポーソディ		
IPC分类号	G01N21/64 G01N21/35 G01N21/21 G01N21/39 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/648 G01N21/552 G01N21/6428 G01N21/7743 Y10S435/808 Y10S436/805 Y10T436/143333		
FI分类号	G01N21/64.G G01N21/64.A G01N21/64.F G01N21/35.Z G01N21/21.Z G01N21/39 G01N33/543.595 G01N33/543.575 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/BA17 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/HA05 2G043/HA07 2G043/HA09 2G043/JA04 2G043/KA07 2G043/KA09 2G043/LA02 2G043/LA03 2G043/NA05 2G043/NA06 2G059/AA05 2G059/BB12 2G059/BB14 2G059/CC16 2G059/DD03 2G059/EE02 2G059/EE05 2G059/EE07 2G059/EE12 2G059/GG01 2G059/GG02 2G059/GG04 2G059/HH01 2G059/HH06 2G059/JJ01 2G059/JJ05 2G059/JJ07 2G059/JJ11 2G059/JJ17 2G059/JJ19 2G059/JJ23 2G059/KK04 2G059/MM01 2G059/MM04 2G059/MM09 2G059/MM10 2G059/PP04		
优先权	60/707579 2005-08-11 US 60/713694 2005-09-02 US 60/778160 2006-02-28 US 60/790207 2006-04-07 US		
其他公开文献	JP4864088B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种基于栅格的传感器，其具有设计成适合渐逝共振（ER）荧光检测和检测的两种应用而无需标记的结构。公开了几个实施方案，其中样品被优化用于在干燥状态下以空气模式进行ER检测。还公开了另一个实施方案，其中该实施方案针对液体模式中的ER检测进行了优化，其中样品悬浮在液体介质如水中。还公开了一维晶格和二维晶格。这种晶格包括晶格，晶格的特征在于具有中心柱或中心孔的晶胞，以及两级二维晶格。还公开了一种用于这种传感器的读取系统。一个实施例包括优化用于收集没有标记的检测数据的第一光源和第二光源以及至少一个优化用于收集ER荧光放大数据的检测器。在一个实施例中，检测器是成像系统并且包括CCD相机，用于收集ER数据和数据而无需标记。在另一个实施例中，所述至少一个检测器是用于在无标签下收集数据的光谱仪和用于收集ER数据的光电倍增器的形式。在另一个实施例中，使用单个光源，例如可调谐激光器或宽带光源。

