

(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2007-538236

(P2007-538236A)

(43) 公表日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 29/02 (2006.01)		GO 1 N 29/02		2 GO 4 7
GO 1 N 29/00 (2006.01)		GO 1 N 29/18		
GO 1 N 29/24 (2006.01)		GO 1 N 29/24		
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543 5 9 3		
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/543 5 2 5 U		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2007-516969 (P2007-516969)	(71) 出願人	506388510
(86) (22) 出願日	平成17年5月20日 (2005.5.20)		アトノミックス アクティーゼルスカブ
(85) 翻訳文提出日	平成19年1月22日 (2007.1.22)		デンマーク デーコー2450 コペンハーゲン
(86) 国際出願番号	PCT/DK2005/000334		エスヴェー ヴェストレ テグル
(87) 国際公開番号	W02005/114166		ガーデ 10
(87) 国際公開日	平成17年12月1日 (2005.12.1)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	PA200400802		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成16年5月21日 (2004.5.21)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒドロゲルを含む表面弾性波センサ

(57) 【要約】

本発明は、一般的にタンパク質および核酸などの標的被検体を含有するテストサンプルを分析するための方法並びに組成物に関する。本発明は、ヒドロゲルとの組合わされた表面弾性波センサを使用することにより、超高感度の非-蛍光式の検出装置を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

テストサンプル溶液中の標的被検体の存在を検出するためのマイクロセンサであって、表面弾性波センサを含み、該センサは、その表面に位置するヒドロゲルおよび該標的被検体を検出することのできる、該ヒドロゲル内に固定化された少なくとも1種の分子認識成分を含むことを特徴とする、上記マイクロセンサ。

【請求項 2】

標的被検体が分子認識成分と結合した際に、ヒドロゲルの寸法上のおよび/または体積上の変化が生じる、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項 3】

2種の異なる分子認識成分が単一の標的被検体と結合することができる、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項 4】

ヒドロゲルが、酢酸ビニル、ビニルピロリドン、ビニルエーテル、オレフィン、スチレン、塩化ビニル、エチレン、アクリレート、メタクリレート、ニトリル、アクリルアミド、マレエート、エポキシ化合物、エポキシド、ラクトン、エチレンオキシド、エチレングリコール、エチルオキサゾリン、アミノ酸、サッカライド、タンパク質、無水物、アミド、カーボネート、フェニレンオキシド、アセタール、スルホン、フェニレンスルフィド、エステル、フルオロポリマー、イミド、アミド-イミド、エーテルイミド、イオノマー、アリールエーテルケトン、アミン、フェノール、酸、ベンゼン、シンナメート、アゾール、シラン、クロリド、およびエポキシド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミドエチレングリコール-ジメタクリレート、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、ポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)、ポリエチレングリコールジメタクリレート(PEGDMA)、ポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)、ポリエチレングリコールジメタクリレート(PEGDMA)、ポリ(ビニリデンフルオライド)(PVdF)を主成分とするポリマー、ポリアクリロニトリル(PAN)を主成分とするポリマー、ポリメチルメタクリレート(PMMA)を主成分とするポリマー、ポリ塩化ビニル(PVC)を主成分とするポリマー、および該ポリ(ビニリデンフルオライド)(PVdF)を主成分とするポリマー、ポリアクリロニトリル(PAN)を主成分とするポリマー、ポリメチルメタクリレート(PMMA)を主成分とするポリマー、およびポリ塩化ビニル(PVC)を主成分とするポリマーの混合物、およびこれらの混合物を含む、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項 5】

更に、架橋剤をも含み、該架橋剤が、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミドエチレングリコール-ジメタクリレート、および薬剤N,N'-メチレンビスアクリルアミドを含む、請求項4記載のマイクロセンサ。

【請求項 6】

表面弾性波センサが、表面弾性波共振器である、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項 7】

ヒドロゲルが、更にその中に帯電コロイド粒子のアレイをも含む、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項 8】

帯電コロイド粒子が、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、二酸化珪素、酸化アルミニウム、ポリテトラフルオロエチレンおよびポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を含む、請求項7記載のマイクロセンサ。

【請求項 9】

更に、基準表面弾性波センサをも含み、該基準表面弾性波センサが、その表面上に位置する基準ヒドロゲルを含み、該基準ヒドロゲルが、分子認識成分を含まず、かつマイクロセンサが、このセンサのシグナルから、基準センサのシグナルを引算することができる、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

分子認識成分が、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸類似体、例えばPNAおよびLNA分子、タンパク質、ペプチド、IgA、IgG、IgM、IgEを包含する抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害剤、膜受容体、キナーゼ、プロテインA、ポリU、ポリA、ポリリジン、トリアジン染料、ボロン酸、チオール、ヘパリン、膜受容体、多糖類、クーマシブルー、アズールA、金属結合ペプチド、糖、炭水化物、キレート剤、原核生物細胞および真核生物細胞からなる群から選択される、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項11】

ヒドロゲルが、重合したモノマーまたはヒドロゲル、架橋剤を含み、場合により化学的にまたはUV-光により活性化される誘発剤を含んでもよい、請求項1記載のマイクロセンサ。

10

【請求項12】

ヒドロゲルが、アクリルアミド、精製アガロース、N-ビニルピロリドン、メタクリレート、N-イソプロピルアクリルアミド、置換アクリルアミドおよびポリ(エチレングリコール)ジアクリレート(PEG-DA)を含む、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項13】

センサの表面が、更にインターデジタル電極を含み、電極間にチャンネルを有し、かつ該チャンネルがヒドロゲルの全体または一部を含む、請求項1記載のマイクロセンサ。

【請求項14】

チャンネルが、10nm～1μmなる範囲内の高さを持つ、請求項13記載のマイクロセンサ。

【請求項15】

チャンネルが、10nm～10μmなる範囲内の幅を持つ、請求項14記載のマイクロセンサ。

20

【請求項16】

以下の工程を含む、テストサンプル溶液中の標的被検体を検出する方法：

a) テストサンプルと請求項1記載のマイクロセンサの表面上に位置するヒドロゲル内の分子認識成分とを、該テストサンプル中に該標的被検体が存在するならば該標的被検体と該分子認識成分との結合を促進する条件下で、接触させる工程；および

b) センサの表面弾性波の位相シフトの変位または周波数における変動が生じたか否かを検出する工程、ここで、該変動が、該テストサンプルにおける該標的被検体の存在を示す。

【請求項17】

位相シフトの変位または周波数における変動を、コントロールと比較する、請求項16記載の方法。

30

【請求項18】

コントロールが、標的被検体を含まないサンプル溶液に関する該位相シフトの変位または周波数における変動の指標である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

コントロールが、分子認識成分を含まないヒドロゲルを含有する表面弾性波センサを用いたサンプル溶液の指標である、請求項16記載の方法。

【請求項20】

少なくとも2種の異なる分子認識成分が一つの標的被検体と結合できる、請求項16記載の方法。

40

【請求項21】

標的被検体が分子認識成分と結合した際にヒドロゲルの寸法上のおよび/または体積上の変化が生じる、請求項16記載の方法。

【請求項22】

分子認識成分が、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸類似体、例えばPNAおよびLNA分子、タンパク質、ペプチド、IgA、IgG、IgM、IgEを包含する抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害剤、膜受容体、キナーゼ、プロテインA、ポリU、ポリA、ポリリジン、トリアジン染料、ボロン酸、チオール、ヘパリン、膜受容体、多糖類、クーマシブルー、アズールA、金属結合ペプチド、糖、炭水化物、キレート剤、原核生物細胞およ

50

び真核生物細胞からなる群から選択される、請求項16記載の方法。

【請求項23】

標的被検体が、核酸、タンパク質、ペプチド、抗体、酵素、炭水化物、化学的化合物、およびガス類からなる群から選択される、請求項16記載の方法。

【請求項24】

標的被検体が、トロポニンIまたはトロポニンTである、請求項16記載の方法。

【請求項25】

標的被検体が、アレルゲンまたはIgEである、請求項16記載の方法。

【請求項26】

テストサンプル溶液が、血液、血清、血漿および尿からなる群から選択される、請求項16記載の方法。 10

【請求項27】

以下の工程を含む、表面弾性波センサの製造方法：

(a) 表面上に複数のインターデジタル電極を持つ表面弾性波デバイスの第一センサ表面に、 SiO_2 の層を付加する工程、

(b) 該 SiO_2 層にシラン基および第一モノマーを含むリンカーを結合する工程であって、該シラン基が反応することにより該リンカーと該 SiO_2 層とが結合する工程、

(c) 第一モノマーと、該第一モノマーおよび/または第二モノマーおよび分子認識成分を含有する媒体とを、インターデジタル電極間のチャンネルにおける SiO_2 層上でのヒドロゲルの生成をもたらす重合条件下にて、接触させる工程、ここで該分子認識成分は該ヒドロゲル内に固定化されている。 20

【請求項28】

工程(c)の媒体が、更に架橋剤をも含む、請求項27記載の方法。

【請求項29】

媒体が親水性である、請求項27記載の方法。

【請求項30】

ヒドロゲルが、イオンを含まないゲルである、請求項27記載の方法。

【請求項31】

第一または第二モノマーが、アクリルアミド、N-ビニルピロリドン、メタクリレート、N-イソプロピルアクリルアミド、置換アクリルアミドおよびポリ(エチレングリコール)ジ 30
アクリレート(PEG-DA)からなる群から選択される、請求項27記載の方法。

【請求項32】

架橋剤が、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミド、エチレングリコール-ジメタクリレートおよびN,N'-メチレンビスアクリルアミドからなる群から選択される、請求項28記載の方法。

【請求項33】

分子認識成分を、上記工程(c)の完了後に添加する、請求項27記載の方法。

【請求項34】

分子認識成分を、第一の結合分子によってヒドロゲルと結合する、請求項27記載の方法 40

【請求項35】

ヒドロゲルと結合している第二の結合分子と結合する第一の結合分子によって、分子認識成分がヒドロゲルに結合している、請求項27記載の方法。

【請求項36】

第一または第二結合分子がアビジンを含み、かつこれら結合分子の他方がビオチンを含む、請求項35記載の方法。

【請求項37】

更に、分子認識成分の添加前にヒドロゲルを加水分解する工程をも含む、請求項27記載の方法。

【請求項38】

重合を、UV光に対して暴露することによって行う、請求項27記載の方法。

【請求項39】

分子認識成分が、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸類似体、タンパク質、IgA、IgG、IgM、IgEを包含する抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害剤、膜受容体、キナーゼ、プロテインA、ポリU、ポリA、ポリリジン、トリアジン染料、ボロン酸、チオール、ヘパリン、多糖類、クーマシーブルー、アズールA、金属結合ペプチド、糖、炭水化物、キレート剤、原核生物細胞および真核生物細胞からなる群から選択される、請求項27記載の方法。

【請求項40】

表面弾性波デバイスが、共振器型のデバイスである、請求項27記載の方法。

10

【請求項41】

請求項1記載のマイクロセンサを含むことを特徴とする、標的被検体を検出するための、ハンドヘルドデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、分子認識成分を含有するヒドロゲルで被覆された、表面弾性波センサに関するものである。マイクロセンサは、多くの化学、環境および医学分野における用途が見出されている。

【背景技術】

20

【0002】

生物学的な被検体等の被検体の、高感度での検出が、解析的検出法における重大な挑戦として続けられている。しばしば、検出法は、莫大な数に及ぶサンプルの処理を要求する。更に、被検体分子の変性が、しばしばその検出に先立って必要とされる。更に、解析的検出法は、容易であり、迅速であり、かつ再現性のあるものである必要がある。これは、診断法等の高度に特殊化された方法並びに試薬が利用できない場合に、特に重要である。

従来 of 生体分析法は、特に幾つかの欠陥を持つ。例えば、核酸分子のハイブリダイゼーションは、一般的にハイブリダイゼーション用のプローブが放射性標識を含む場合には、オートラジオグラフィーまたはリン光体像の解析法により、あるいは該ハイブリダイゼーション用のプローブが、ビオチンまたはジゴキシン等のラベルを含む場合には、デンストメータによって検出される。該ラベルは、結果として、酵素-結合抗体またはリガンドによって認識することができる。最も新しい生体分子検出法は、DNAまたはRNAまたはタンパク質等の分子の変性を必要とし、これは従前の検出法を経費の掛かる、しかも多大な労力を要する方法としている。

30

【0003】

弾性波センサ技術は、物質の検出において、広範な用途を持つことが明らかにされている。弾性波センサは、弾性波を発生させ、かつこれを観測することにより、物質を検出する。該弾性波は、該物質の表面を介して、またはその上を伝播する際、該伝播路の特性におけるあらゆる変化が、該弾性波の速度および/または振幅に影響を与える。該センサの振幅、振動数、および/または位相特性を測定し、対応する物理量に相互に関連付けることができる。

40

幾つかの異なる型の弾性波デバイスが開発されているが、その全てが、水溶性または生物学的サンプルの測定において、限られた成功を収めているに過ぎなかった。バルクの弾性波(BAW)が、ある媒体を通して伝播する。最も一般的に使用されるBAWデバイスは、厚み剪断モード(thickness shear mode: TSM)共振器および剪断-水平音響プレートモード(shear-horizontal acoustic plate mode: SH-APM)センサである。逆に、基板の表面上を伝播する波は、表面波として知られている。最も広く使用されている表面波デバイスは、上記の表面弾性波センサおよび表面横波(STW)センサとしても知られている、剪断-水平表面弾性波(SH-SAW)センサである。全ての弾性波センサは、気相または真空環境内で機能するが、液体と接触した際に効果的に機能するのはその極少数であろう。

50

【0004】

液体検知用の公知の音響センサとしての、ラブ波(Love wave)センサ、特殊な組の剪断-水平SAWは、最大の感度を持つ。ラブ波センサを製造するためには、該剪断-水平波のエネルギーが、該被膜に集中されるように、誘電体導波路被覆を、SH-SAWデバイス上に配置する。次いで、生体認識被膜を、該導波路被覆上に配置し、完全な生体センサを完成する。ポリマー製のラブ導波路被膜を備えた、110MHzのYZ-カットSH-SAWを用いて、ng/mlなる範囲の濃度の、抗-ヤギIgGの上首尾の検出が、達成されている[E. Gizeli等, 1997, 「官能化された支持脂質層への抗体結合：直接型音響免疫センサ(Antibody Binding to a Functionalized Supported Lipid Layer: A Direct Acoustic Immunosensor)」, Anal. Chem., Vol. 69:4808-4813]。

10

異なるSAWセンサ間の比較が、最近報告された(バイオモレキュラーセンサ(Bio-molecular Sensors)), Electra Gizali & Christoffer R. Lowe編(2002))。彼らは、24MHzのラブ波センサが、1.92mg/cm²なる感度を持つことを記載している。生物学的な化合物を検出するための、このSAWセンサの使用は、例えばUS 5,478,756、W092011931およびW003019981に記載されている。これら文献の全体を、参考文献としてここに組み入れる。

【0005】

従来のSAWデバイスは、液体の検出には良くない選択肢である。というのは、該液体-空気のバリアによって、該伝播する波の垂直方向の成分が抑制されるからである。液体中で機能する一つの弾性波センサは、剪断-水平SAWセンサである。圧電結晶材料の切れ目が、適当に回転された場合には、波は、水平かつ液体表面に対して平行に伝播する。これは、液体が該伝播媒体と接触した際に、損失を大幅に減じ、該SH-SAWセンサが、バイオセンサとして動作することを可能とする。液体溶液被検体(例えば、生物学的な分子)を検出するための多くの努力が、該弾性波と固体/液体界面の特性との間の相互作用を定義すること、並びにGHz範囲において動作する、より高周波数のSAWデバイスを設計することに焦点が当てられていた。

20

本件出願は、SAWデバイスが、液体中に生体分子を含む被検体の測定を実施できないという問題の解決策を提供する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

30

発明の概要

本件出願は、サンプル溶液中の標的被検体の存在を検出するための、マイクロセンサの提供を目的とする。このマイクロセンサは、該センサ表面上に位置するヒドロゲルを含む、SAWセンサを含有する。このヒドロゲルは、更に該標的被検体を検出することのできる、固定化された分子認識成分を含む。

該マイクロセンサは、また基準表面上に位置するヒドロゲルを含む、基準の表面弾性波センサ表面を含むことができる。例えば、該基準表面上のヒドロゲルは、該分子認識成分を含まない。あるいはまた、このコントロールは、該標的被検体を含まない、サンプル溶液の指標であり得る。基準表面のシグナルと第一センサ表面のシグナルとの間の差が、該標的被検体の有無を決定する。

40

該分子認識成分の非-限定的な例は、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸類似体、例えばPNAおよびLNA分子、タンパク質、ペプチド、IgA、IgG、IgM、IgEを包含する抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害剤、膜受容体、キナーゼ、プロテインA、ポリU、ポリA、ポリリジン、トリアジン染料、ボロン酸(boronic acid)、チオール、ヘパリン、膜受容体、多糖類、クーマシーブルー、アズールA、金属結合ペプチド、糖、炭水化物、キレート剤、原核生物細胞および真核生物細胞を含む。

該標的被検体の非-限定的な例は、核酸、タンパク質、ペプチド、抗体、酵素、炭水化物、化学的化合物、およびガス類を含む。該標的被検体の他の例は、トロポニンI、トロポニンT、アレルゲン、またはIgE等の免疫グロブリンを含む。幾つかの用途においては、該標的被検体は、1種を越える分子認識成分と結合することができる。

50

【0007】

更に別の局面において、該ヒドロゲルは、重合したモノマーまたはヒドロゲル、架橋剤、および場合により化学的にまたはUV-光によって活性化される誘発剤を含む。該ヒドロゲルの例は、アクリルアミド、精製アガロース、N-ビニルピロリドン、メタクリレート、N-イソプロピルアクリルアミド、置換アクリルアミドおよびポリ(エチレングリコール)ジ

アクリレート(PEG-DA)を包含する。他の例示的なモノマーおよびダイマーは、酢酸ビニル、ビニルピロリドン、ビニルエーテル、オレフィン、スチレン、塩化ビニル、エチレン、アクリレート、メタクリレート、ニトリル、アクリルアミド、マレエート、エポキシ化合物、エポキシド、ラクトン、エチレンオキシド、エチレングリコール、エチルオキサゾリン、アミノ酸、サッカライド、タンパク質、無水物、アミド、カーボネート、フェニレン

オキシド、アセタール、スルホン、フェニレンスルフィド、エステル、フルオロポリマー、イミド、アミド-イミド、エーテルイミド、イオノマー、アリアルエーテルケトン、アミン、フェノール、酸、ベンゼン、シンナメート、アゾール、シラン、クロリド、およびエポキシド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミドエチレ

ングリコール-ジメタクリレート、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、ポリエチレングリ

コールジアクリレート(PEGDA)、ポリエチレングリコールジメタクリレート(PEGDMA)、ポ

リエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)、ポリエチレングリコールジメタクリレ

ート(PEGDMA)、ポリ(ビニリデンフルオライド)(PVdF)を主成分とするポリマー、ポリアクリ

ロニトリル(PAN)を主成分とするポリマー、ポリメチルメタクリレート(PMMA)を主成分と

するポリマー、ポリ塩化ビニル(PVC)を主成分とするポリマー、および該ポリ(ビニリデン

フルオライド)(PVdF)を主成分とするポリマー、ポリアクリロニトリル(PAN)を主成分とす

るポリマー、ポリメチルメタクリレート(PMMA)を主成分とするポリマー、およびポリ塩化

ビニル(PVC)を主成分とするポリマーの混合物、およびこれらの混合物を含む。

【0008】

例示的な架橋剤および/または化学的にまたはUV-光により活性化される誘発剤は、N,N'-

-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミドエチレングリコール-ジメ

タクリレート、および薬剤N,N'-メチレンビスアクリルアミド、イルガキュア(Irgacure)

2959(シバ(Ciba)); 2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、2-メトキシ-2-フェニル

アセトン、ベンジルジメチルケタール、硫酸アンモニウム、ベンゾフェノン、エチルベン

ゾインエーテル、イソプロピルベンゾインエーテル、 α -メチルベンゾインエーテル、ペ

ンゾインフェニルエーテル、2,2-ジエトキシアセトフェノン、1,1-ジクロロアセトフェノ

ン、2-ヒドロキシ-2-メチル-1-フェニルプロパン-1-オン、1-ヒドロキシシクロヘキシル

フェニルケトン、アンスラキノン、2-エチルアンスラキノン、2-クロロアンスラキノン、

チオキサントン、イソプロピルチオキサントン、クロロチオキサントン、2,2-クロロベン

ゾフェノン、ベンジルベンゾエート、およびベンゾイルベンゾエート、TEMED、および過

硫酸アンモニウム(APS)を含む。

【0009】

本件出願は、またサンプル溶液中の標的被検体を検出する方法をも提供するものである。

分子認識成分は、表面弾性波センサの表面上に位置するヒドロゲル中に固定化されている。

該サンプル中の該被検体の、該認識成分に対する結合を促進する条件下にて、このセ

ンサと該サンプルとを接触させる。次いで、表面弾性波の位相シフトの変位または周波数

における変動を検出する。この変動が、該サンプルにおける該被検体の存在を決定する。

他の局面において、該ヒドロゲルは、その内部で重合された、帯電粒子の結晶性コロイ

ドアレイをも含む。帯電したコロイド粒子の非-限定的な例は、コロイド状ポリスチレン

、ポリメチルメタクリレート、二酸化珪素、酸化アルミニウム、ポリテトラフルオロエチ

レンおよびポリN-イソプロピルアクリルアミドを含む。

標的被検体は、任意のサンプル中において検出することができる。サンプルの例は、血

液、血清、血漿および尿を包含する。この方法は、診断の目的で利用することができる。

【0010】

もう一つの局面において、本件特許出願は、SAWセンサの製造方法を目的とする。SAWセ

ンサは、以下の諸工程によって構築することができる：即ち表面弾性波デバイスの第一センサ表面に、 SiO_2 の層を付加する工程、(b) 該 SiO_2 層をリンカーと結合する工程、ここで該リンカーはシラン基および第一モノマーを含み、この工程においては、該シラン基が反応して、該リンカーと該 SiO_2 層とを結合する、および(c) 該第一モノマーと第二モノマーおよび分子認識成分を含有する媒体とを、該 SiO_2 層上での、ヒドロゲルの生成をもたらす重合条件下にて接触させる工程、この工程において、該ヒドロゲルが該分子認識成分を含む。該工程(c)の媒体は、更に架橋剤および重合開始剤をも含む。該媒体は、親水性であり得る。他の変形において、該ヒドロゲルは、イオンを含まないゲルであり得る。

該分子認識成分は、該ヒドロゲルと結合することができる。例えば、該分子認識成分は、第一の結合分子によって、該ヒドロゲルと結合することができる。

10

あるいはまた、該分子認識成分は、該ヒドロゲルと結合している第二の結合分子と結合する第一の結合分子によって、該ヒドロゲルと結合することができる。第一または第二結合分子の例は、アビジンおよびビオチンであり得る。

更に別の変形において、該ヒドロゲルは、該分子認識成分を添加する前に、加水分解することができる。

本件出願は、更に生物学的物質を検出するための、ここに記載した上記のマイクロセンサを含む、ハンドヘルドデバイスをも提供するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、マイクロセンサおよび液体サンプルにおける標的被検体の存在を検出するための、該マイクロセンサの使用方法を目的とする。該マイクロセンサは、SAWセンサの表面に位置する、ヒドロゲル内に固定化された、分子認識成分を含む。該分子認識成分が、標的被検体と結合した際に、該表面波の位相または周波数における変動が観測され、これによって該サンプル中の該標的被検体の存在を測定する。ここに記載する弾性波センサは、高い感度にて、しかも標識の不在下で、生物学的分子(例えば、核酸およびタンパク質)を包含する液体可溶性の被検体を検出するのに、容易に適合させ得る、検出方法を提供する。

20

【0012】

1. 表面弾性波センサ

ここに記載するマイクロセンサは、少なくとも一つの表面弾性波センサを含む。表面弾性波センサは、圧電層、または圧電基板、および入力および出力トランスデューサを含む。表面弾性波は、該圧電層内で発生し、かつインターデジタル電極によって検出される。以下においてより詳細に説明するように、該表面弾性波センサの表面を変更する結合事象が、該伝播する表面弾性波の特性における変化として検出できる。表面弾性波センサは、米国特許第5,130,257号、同第5,283,037号および同第5,306,644号；F. Josse等、「液体中の化学的および生化学的検出用の、案内された剪断水平表面弾性波センサ(Guided Shear Horizontal Surface Acoustic Wave Sensors for Chemical and Biochemical Detection in Liquids)」, Anal. Chem. 2001, 73:5937；およびW. Welsch等、「表面弾性波免疫センサの開発(Development of a Surface Acoustic Wave Immunosensor)」, Anal. Chem. 1996, 68:2000-2004に記載されている。これら文献各々を、特別に、その全体を、本発明の参考としてここに組み入れる。

30

【0013】

弾性波デバイスは、圧電性表面を介する、あるいはその上の波の伝播モードにより説明される。弾性波は、主としてその速度および変位の方向によって識別される。材料および境界条件に依存して、多くの組合せが可能である。各センサのインターデジタルトランスデューサ(IDT)は、該基板を変位するのに要する電場を与え、かくして弾性波を生成する。この波は、該基板を通して伝播し、そこで該IDTの対向する電極における電場に再度変換される。横方向の、または剪断の波は、波の伝播方向に対して直交する方向への、粒子の変位を生じ、しかも該粒子の変位が、該検知表面に平行または直交するように、偏波することができる。剪断水平波の運動は、該検知表面に対して平行に偏波された、横方向の

50

変位を表し、剪断垂直運動は、該表面に対して直交する横方向の変位を示す。

本発明は、「標準的な」SAWバイオセンサと、標的被検体に対して特異的な分子認識成分を含む、ヒドロゲルとを組み合わせる。該分子認識成分と標的被検体との結合は、該SAWの位相または周波数における測定可能な変化をもたらす。

【0014】

ここでは、「表面弾性波センサ」または「表面弾性波デバイス」なる用語によって、実質的に上記したように動作する任意のデバイスを意味するものとする。幾つかの態様において、表面弾性波センサとは、該表面変位が伝播の方向に対して直交し、かつ該デバイス表面に対して平行な表面横波デバイス、並びに該表面変位の少なくとも一部が、該デバイス表面に対して直交するような表面弾性波センサの両者を意味するものとする。表面横波デバイスは、一般的に流体中での良好な感度を持つが、十分な感度は、該表面変位の一部が、該デバイス表面に対して直交する場合においても達成できることが明らかにされている。例えば、M. Rapp等、「水中での現場測定用の免疫センサを意図した、市販品として入手できるLOW-LOSSのSAWデバイスの改良(Modification of Commercially Available LOW-LOSS SAW devices towards an Immunosensor for in situ Measurements in Water)」, 1995, IEEE国際超音波シンポジウム(IEEE International Ultrasonics Symposium), 1995, Nov. 7-10, シアトル、ワシントン; およびN. Barie等、「表面弾性波バイオセンサ上で共有結合した検知層(Covalent bonding sensing layers on surface acoustic wave biosensors)」, Biosensors & Bioelectronics, 16 (2001) 979を参照のこと。これら全てを、特に参考文献としてここに組み入れる。

10

20

【0015】

これらのセンサは、フォトリソグラフィー法により製造する。製造は、該圧電基板を注意して研磨かつ清浄化することによって開始する。次いで、金またはアルミニウム等の金属を、該基板上に均一に沈着させる。このデバイスに、フォトレジストをスピン塗布し、焼成してこれを硬化する。次いで、これを最終的なデバイスにおいて金属化すべき領域に対応する、不透明な領域をもつマスクを介して、UV光で露光する。該露光領域は、現像溶液による、その除去が可能となる、化学変化をこうむる。最後に、残りのフォトレジストを除去する。このデバイス上に残された金属のパターンは、インターデジタルトランスデューサ(IDT)またはインターデジタル電極(IDE)と呼ばれる。このIDTの長さ、幅、位置および厚みを変更することにより、このセンサの性能を最高のものとすることができる。

30

【0016】

A. 圧電層

本発明の表面弾性波センサは、圧電層または圧電基板を含む。圧電性とは、機械的な応力の適用によって、電気的な電荷を生じることの意味する。この現象は、相反的なものである。圧電性物質に、適当な電場を印加すると、機械的な応力を発生する。圧電性弾性波センサは、振動する電場を適用して、機械的な波を生成し、この波は該ヒドロゲルを通して伝播し、次いで測定用の電場に、再度変換される。

該圧電性基板は、石英、ニオブ酸リチウム(LiNbO_3)、または任意の他の圧電性物質から製造できる。該圧電性基板は、その結晶構造に関して、弾性波が、その表面に捕捉され、しかも該表面および該伝播する波(上記のような)に対する、物質の変位の所望の方向が達成されるように、切断すべきである。

40

弾性波センサおよびデバイスに対して使用できる、該圧電性基板材料のうち、最も一般的なものは、石英(SiO_2)、タンタル酸リチウム(LiTaO_3)、およびより低い頻度にて、使用されるのは、ニオブ酸リチウム(LiNbO_3)である。工業的に可能な他の材料は、ヒカガリウム(GaAs)、炭化珪素(SiC)、ランガサイト(Langasite; LGS)、酸化亜鉛(ZnO)、窒化アルミニウム(AlN)、チタン酸ジルコニウム鉛(PZT)、およびポリビニリデンフルオライド(PVdF)を含む。該圧電性基板は、石英、ニオブ酸リチウム(LiNbO_3)、または任意の他の圧電性物質から製造できる。

【0017】

該圧電性支持体は、任意の適当な圧電性物質から製造できる。一般的に、適当な材料は

50

、以下の諸特性を持つであろう：1. 大きな表面剪断水平変位、2. 大きな電気機械的結合定数、3. SAWおよび他のバルク波に対する、ゼロまたは小さな圧電カップリング性、4. 表面および本体両者における、ゼロまたは小さなビームステアリング性、5. ゼロまたは小さな遅延の温度係数。

この圧電性支持体の厚みは、一般に重要なものではなく、典型的には取扱いを容易にするために、0.5mm程度である。反射性の下部表面は、好ましくないプレート-モード(plate-mode)構成をもたらす恐れがある。この支持体は、また非-圧電性材料製のスラブを含むことも可能である。このスラブは、その表面上に被覆された、薄い圧電性材料の層を持つ。

【0018】

10

B. 電気絶縁被膜

該圧電基板および該電極の表面は、好ましくは該圧電性材料と一致する良好なインピーダンスおよび高い音響吸収性を持つ材料で被覆され、あるいは該材料との密な接触状態にある。これは、該圧電性材料を通して伝播する音響エネルギーが反射されて、このデバイスの活性表面に戻されないことを保証するためである。適当な材料は、プラスチック、ワックスおよびシリコンゴムを包含する。

該誘電体層は、任意の適当な絶縁物質から製造することができる。適当な材料は、該誘電体中の弾性波速度が、該圧電性基板における速度よりも低いという特性を持つであろう。適当な材料の例は、二酸化珪素および幾つかのポリマー、例えばポリメチルメタクリレート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレンおよびポリエチレンを含む。ポリマーを使用する場合、これらを架橋して、テスト中のサンプル由来の水分子による、該層の溶浸を減じることが好ましい。

20

該誘電体層の最適の厚みは、使用する特定の材料を含む、多くのファクタに依存するが、一般には、0.5~5 μ mなる範囲、典型的には1~3 μ mなる範囲の厚みによって、満足な結果が得られる。この誘電体層は、該支持体の運動と結合するように、機械的に剛性であり、また該支持体に対する波の喪失を最小化すべく、十分に緻密である。

【0019】

該誘電体層は、その上に、テスト中の被検体に対する、適当な結合試薬の固定化を容易にするために、誘導体化または活性化することができる。このような試薬は、生物学的サンプルに対しては、抗体または抗原を含み、また他の化学的用途に対しては、クラウンエーテル等の種(特定のイオン種の決定のため)を含む。

30

好ましい態様において、本発明の表面弾性波センサは、上記入力および出力トランスデューサおよび該圧電性表面の一部または全部を覆う、誘電体層を含むことができる。該誘電体層は、一般に2つの目的を果たす。その第一の目的は、該サンプル流体から、該入力および出力トランスデューサを遮断することである。その第二の目的は、導波路として機能して、伝播する表面弾性波を導くことである。該ポリマー層は、上記2つの目的を果たす任意の材料を含むことができる。好ましい態様において、該ポリマー層は、SiO₂またはポリイミドまたは金またはSiO₂と金との組合せを含む。

C. 入力および出力トランスデューサ

該入力および出力トランスデューサは、好ましくはインターデジタルトランスデューサである。一般に、2つのインターデジタルトランスデューサがある。該入力および出力トランスデューサの各々は、インターデジタルパターンで配列された2つの電極を含む。該入力トランスデューサの2つの電極間に適用された電位差は、上記の圧電基板内に表面弾性波の発生をもたらす。これらの電極は、一般に任意の導電性材料を含むことができ、アルミニウムまたは金が好ましい。

40

【0020】

該電極は、任意の公知の形状をとることができるが、該支持体の表面に沿った、波の伝播方向を横切る、長い金属化領域として、フォトリソグラフ技術によって、該表面上に沈着することが好ましい。該長い金属化領域は、同一の大きさの幅および間隔を持つことが好ましい。該幅は、典型的には、1~40 μ mなる範囲、好ましくは10~20 μ mなる範囲内に

50

ある。幾つかの態様においては、該幅は、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1 μ m、2 μ m、3 μ m、4 μ m、5 μ m、7.5 μ m、10 μ m、15 μ m、20 μ m、25 μ m、30 μ m、35 μ m、40 μ m、45 μ m、50 μ m、60 μ m、70 μ m、80 μ mまたは90 μ mよりも大きいか、あるいはこれに等しい。他の態様では、該電極間の間隔は、100 μ m、90 μ m、80 μ m、70 μ m、60 μ m、50 μ m、45 μ m、40 μ m、35 μ m、30 μ m、25 μ m、20 μ m、15 μ m、10 μ m、7.5 μ m、5 μ m、4 μ m、3 μ m、2 μ m、1 μ m、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、または75nmに等しいか、それよりも小さい。この間隔は、該デバイスの周波数と逆に変化することに注意すべきである。

幾つかの態様においては、該電極の高さは、その幅と同一である。他の態様では、該電極の高さは、例えば10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、75nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、または900nmよりも大きいか、あるいはこれに等しい。他の態様では、該電極間の間隔の大きさは、1 μ m、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、75nm、50nm、40nm、30nm、または20nmよりも小さいか、それに等しい。

【0021】

別の態様では、単一のインターデジタルトランスデューサがある。この態様では、該単一のインターデジタルトランスデューサが、入力および出力トランスデューサ両者として機能する。入力および出力トランスデューサ両者として機能する、単一のインターデジタルトランスデューサを使用する態様では、一般にリフレクタ構造が与えられて、該SAWセンサ内で1またはそれ以上の共鳴を発生する。該リフレクタ構造は、例えば薄いフィルム格子であり得る。この格子は、アルミニウムまたは他の導電性材料を含むことができる。この発生した共鳴は、例えば該単一のトランスフェクションにおいて、散逸する出力を測定することにより、検出することができる。この薄い構造における1またはそれ以上の結合事象が、これらの共鳴を変化させ、該結合事象の検出を可能とする。本態様によるセンサおよび技術の例は、一般的に米国特許第5,846,708号に記載されている。この特許を、本発明の参考文献としてここに組入れる。以下に記載するように、他の電子工学および/または回路を、ただ一つのインターデジタルトランスデューサのみを持つSAWセンサを使用する態様で、同様に使用することができる。

【0022】

分子認識分子は、自発的に形成された単分子層に、直接結合することができる。例えば、金電極を使用する場合、DNAプローブ分子は、SH基を利用して、該DNAの5'末端に結合することができる。ここでは、当分野において公知であり、また例えばK. Vijayamohan等、「バイオセンサ用途用の、同調性プラットフォームとしての、自発的に形成された単分子層(Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications)」, Biosensors & Bioelectronics, 2002, 17:1-12およびGeorge M. Whitesides等、「細菌接着の疎外に関する研究用の、自発的に形成された単分子層のアレイ(Array of Self-Assembled Monolayers for studying inhibition of Bacterial Adhesion)」, Anal. Chem. 2002, 74:1805-1810(これら両者を本発明の参考文献とする)に記載されているような、自発的に形成された単分子層を使用する。

【0023】

D. ヒドロゲル

本件出願のSAWセンサにおいて、分子認識成分はヒドロゲル内に固定化される。用語「ヒドロゲル」とは、粒子が水中に分散されており、かつ架橋されている、コロイド状のゲルを意味する。このヒドロゲルは、薄層、即ち約1nm～数mmなる範囲の厚みのフィルムを形成する。好ましい態様において、該ヒドロゲルは、IDTにおけるチャンネルの幅と同一の拡がりを持つ厚みを持つ。標的被検体が、分子認識成分と結合する場合、該ヒドロゲルの位相および/または周波数におけるある変化が起る。

幾つかの態様において、該ヒドロゲルは、該電極と同一の拡がりを持ち、該電極の高さを越えることはない。幾つかの態様において、該ヒドロゲルは、該電極の高さを越える。他の態様では、該ヒドロゲルは、該電極の高さに満たない。

特定のメカニズムに限定するものではないが、該ヒドロゲルにおける変化は、体積、寸法、または配座における変化であり得る。

【0024】

該ヒドロゲルは、任意の数の分子を含むことができる。例えば、該ヒドロゲルは、重合されたモノマーまたはヒドロゲル、架橋剤および場合により化学的またはUV-光で活性化される誘発剤を含むことができる。このようなモノマーまたはダイマーの非-限定的な例は、酢酸ビニル、ビニルピロリドン、ビニルエーテル、オレフィン、スチレン、塩化ビニル、エチレン、アクリレート、メタクリレート、ニトリル、アクリルアミド、マレエート、エポキシ化合物、エポキシド、ラクトン、エチレンオキシド、エチレングリコール、エチルオキサゾリン、アミノ酸、サッカライド、タンパク質、無水物、アミド、カーボネート、フェニレンオキシド、アセタール、スルホン、フェニレンスルフィド、エステル、フルオロポリマー、イミド、アミド-イミド、エーテルイミド、イオノマー、アリアルエーテルケトン、アミン、フェノール、酸、ベンゼン、シンナメート、アゾール、シラン、クロリド、およびエポキシド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミドエチレングリコール-ジメタクリレート、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、ポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)、ポリエチレングリコールジメタクリレート(PEGDMA)、ポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)、ポリエチレングリコールジメタクリレート(PEGDMA)、ポリ(ビニリデンフルオライド)(PVdF)を主成分とするポリマー、ポリアクリロニトリル(PAN)を主成分とするポリマー、ポリメチルメタクリレート(PMMA)を主成分とするポリマー、ポリ塩化ビニル(PVC)を主成分とするポリマー、および該ポリ(ビニリデンフルオライド)(PVdF)を主成分とするポリマー、ポリアクリロニトリル(PAN)を主成分とするポリマー、ポリメチルメタクリレート(PMMA)を主成分とするポリマー、およびポリ塩化ビニル(PVC)を主成分とするポリマーの混合物、およびこれらの混合物を含む。

10

20

【0025】

架橋剤および場合により化学的にまたはUV-光により活性化される誘発剤は、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミドエチレングリコール-ジメタクリレート、および薬剤N,N'-メチレンビスアクリルアミド、イルガキュア(Irgacure) 2959(シバ(Ciba)); 2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、2-メトキシ-2-フェニルアセトン、ベンジルジメチルケタール、硫酸アンモニウム、ベンゾフェノン、エチルベンゾインエーテル、イソプロピルベンゾインエーテル、 α -メチルベンゾインエーテル、ベンゾインフェニルエーテル、2,2-ジエトキシアセトフェノン、1,1-ジクロロアセトフェノン、2-ヒドロキシ-2-メチル-1-フェニルプロパン-1-オン、1-ヒドロキシシクロヘキシルフェニルケトン、アンスラキノン、2-エチルアンスラキノン、2-クロロアンスラキノン、チオキサントン、イソプロピルチオキサントン、クロロチオキサントン、2,2-クロロベンゾフェノン、ベンジルベンゾエート、およびベンゾイルベンゾエート、TEMED、および過硫酸アンモニウム(APS)を含むことができる。

30

【0026】

一局面において、該ヒドロゲルは、アクリルアミドである。アクリルアミド($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$; C.A.S. 79-06-1; アクリルアミドモノマー、アクリル酸アミド、プロペンアミド、および2-プロペンアミドとしても知られている)は、無臭で、自由流動性の、白色結晶性物質であり、ポリアクリルアミドの製造および合成における化学的中間体として使用される。これらの高分子量ポリマーは、様々な用途を持ち、更に特定の用途にとって、ノニオン性、アニオン性、またはカチオン性を最適化するために、変性することができる。

40

【0027】

分子認識成分は、該ヒドロゲルに、その製造前に添加される。該ヒドロゲルの濃度は、該ヒドロゲルを製造し得る任意の濃度であり得る。例えば、アクリルアミド重合溶液、即ち公称量の添加された開始剤を含む、19/1の水/グリセロール中に分散させた、0.6-0.7%のアクリルアミド/ビスアクリルアミドを使用する。この溶液は、紫外線(UV)照射(例えば、254nmの光で少なくとも約15分間、または包括的に「光重合」と呼ばれる、他の適当なU

50

V照射条件)により、あるいは高温(例えば、典型的には約40℃)における熱的開始によって、重合しかつ架橋される。重合は、電極間で行われる。該ゲルの孔径(または「篩別特性」)は、架橋剤の量および該モノマー溶液の固体含有率(%)を変更することにより調節される。孔径は、また該重合温度を変えることによっても調節することができる。

【0028】

例示的な孔径は、0.5nm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、7nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、75nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、1.25μm、1.5μm、1.75μm、2μm、2.5μm、または3μmよりも大きい、これに等しい。例示的な孔径は3μm、2.5μm、2μm、1.5μm、1μm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、75nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、7nm、5nm、4nm、3nm、2nm、または1nmに等しい、それよりも小さい。

該ヒドロゲルアレイの以下の製造法に従って、該ポリアクリルアミドを、引続き変性して、所定部分を結合するための官能基を含有せしめ、また該部分(例えば、DNA)は、後に結合される。

【0029】

E. 分子認識成分

任意の被検体を検出する分子認識成分は、該ヒドロゲル内に固定化される。

分子認識成分は、標的被検体と結合できる任意の分子であり得る。分子認識成分は、生物学的化合物の検出にとって特異的であり得る。例示的な分子認識成分は、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸類似体、例えばPNAおよびLNA分子、タンパク質、ペプチド、IgA、IgG、IgM、IgEを包含する抗体、酵素、酵素補助因子、酵素基質、酵素阻害剤、膜受容体、キナーゼ、プロテインA、ポリU、ポリA、ポリリジン、トリアジン染料、ボロン酸(boronic acid)、チオール、ヘパリン、膜受容体、多糖類、クーマシーブルー、アズールA、金属結合ペプチド、糖、炭水化物、キレート剤、原核生物細胞および真核生物細胞を含む。幾つかの態様では、多数の分子認識成分が含まれる。該標的被検体は、1種を越える分子認識成分と結合することができる。

一変形において、該分子認識成分は、上記の圧電性表面に共有結合的に結合できる。更に、半導体工業において公知のリトグラフィ技術の適用において、光を、ポリアクリルアミドヒドロゲル表面上の、不連続な位置に適用して、抗体または抗原、ホルモンまたはホルモン受容体、オリゴヌクレオチド、または多糖等の分子認識成分の、固体支持体(PCT国際特許出願WO 91/07087(ここに参考文献として組入れる)参照)の表面(例えば、ポリアクリルアミドヒドロゲル表面)への結合のために、これら特異的領域を活性化することができる。

【0030】

図16は、該SAW共振器表面上のIDTの模式的な図を示す。該IDT構造1a-1cは、金で構成されており、また酸化ケイ素被膜を有する。電極1bは、電極1aと1cとの間に配置されている。電極1aおよび1cは、電極1bに対して、周波数において互い違い(alternate in frequency)になる。該ヒドロゲル4は、その中に固定化された、分子認識粒子を含んでいる。表面弾性波2は、圧電物質4によって発生する。

図17は、該SAW共振器表面構造の、原子間力顕微鏡(AFM)写真を示す。ヒドロゲル/抗体溶液は、該IDT構造間で重合されるものと考えられる。というのは、酸素(重合阻害剤)の濃度が、この位置において低いからである。この態様において、該IDT構造間の間隔は、約1500nmである。本態様において、該IDT構造の高さは、図16に示したように、約200nmである。

図18は、該分子認識成分として固定化された抗体を含む、ヒドロゲルを含有する該IDTを図示したものである。電極4a-4cが、圧電性物質6上にある。酸化ケイ素被膜8が、該圧電性物質6および該電極4a-4c上に配置されている。ヒドロゲル1は、電極4a-4c上、かつその間に配置されている。本態様における分子認識成分としての抗体2は、このヒドロゲル1内に含まれている。図19は、このSAWセンサおよび該抗体2と結合した標的被検体10を含む、図18に示されたヒドロゲルを示す。

【0031】

II. SAWセンサの使用方式

一般に、単一の活性SAWセンサを含む場合、ある周波数および位相を持つ電子入力シグナルが、入力トランスデューサに適用される。第二の振幅、周波数、および位相を持つ出力シグナルが、出力トランスフェクションにおいて検出される。結合事象は、連続的にまたは所定の時間において、該標的被検体の結合前後の、該出力シグナルを追跡することによって検出することができる。この出力シグナルの周波数または位相におけるシフトが、結合事象の指標となる。

この検出方式は、2個以上のセンサを使用する場合に対する他の態様に拡張することができる。例えば、SAWセンサのシグナルを、基準センサのシグナルと比較することができる。

10

基準センサは、一般的に該ヒドロゲルマトリックス中に組み込まれて分子認識成分を含まないだけの、検知センサと同様に構成されるが、ただし結合事象が存在しないことの指標となる、ベースライン出力シグナルに相当する、基準出力シグナルを発生するように設計されている。

【0032】

基準センサは、1またはそれ以上の活性センサと一体化することができる。例えば、基準センサは、活性センサと同一の基板上に形成することができる。基準センサは、更に活性センサと同一の圧電層の上に形成することもできる。あるいはまた、基準センサは、如何なる活性センサに対しても独立に、また電子検出回路を介して、活性センサと単に機能的に結合した状態で、形成することもできる。表面弾性波フィルタが、市販品として入手できる。例えば、ムラタ(MuRaTa)社によって製造された、SAF380F型のSAWフィルタが、本発明における使用に適したものとして、特に好ましい。

20

他の態様では、1種またはそれ以上のセンサ出力シグナルを比較して、結合事象を表すことも可能である。上で論じたように、活性デバイス由来の1種またはそれ以上の出力シグナルを、更に基準センサからの出力シグナルと比較することも可能である。同様な入力シグナルを、活性および基準センサに適用した場合、出力シグナルの特性の直接的な比較は、信頼性良く結合事象を表すことができる。

【0033】

他の態様では、当業者は、様々なシグナル処理技術が、結合事象を高信頼度で同定するために、1種またはそれ以上の入力シグナルを設計し、かつ1種またはそれ以上のセンサから得た出力シグナルを処理するのに利用できることを理解しているはずである。

30

上記の入力および出力トランスデューサとの組合せで、適当な回路を設け、入力シグナルを発生させ、検出し、出力シグナルを比較することができる。この回路は、例えば差動増幅器、発振器、周波数決定素子として該SAWセンサを使用する発振回路、シグナル発生器、ネットワークアナライザ、電圧計、マルチメータ(multimeters)、並びに他の当分野において公知の増幅、周波数検出、状態調節、制御および差動回路を含む。適当な場合には、1種またはそれ以上のセンサを組み込むことができ、あるいは一個のセンサと動作可能な状態で結合することができる。

【0034】

40

好ましくは、本発明の表面弾性波センサは、例えば微量流動(microfluidic)デバイス内のチャンネルまたはチャンバー内に配置される。該チャンネルまたはチャンバーは、標的サンプルの分析のために、該チャンネルまたはチャンバーに、該サンプルを導入することを可能とする、入口および出口を持つ。一態様においては、該サンプルを、例えば別々の分析のために、異なるチャンネルまたはチャンバーに分けることができる。即ち、一態様においては、多数のサンプルを、同時に分析することができる。別の態様においては、多数の標的被検体を、単一のサンプルから分析することができる。即ち、複数の異なるマイクロセンサを、単一のチャンバー内に含めることができる。この態様において、個々のマイクロセンサは、単一のサンプルからの別々の標的被検体を、検出するのに使用する。

【0035】

50

III. 標的被検体

本発明の表面弾性波センサは、サンプル中の標的被検体を検出するのに使用される。ここで使用する「標的被検体」、「被検体」または「化学種」なる用語、その文法的に等価な用語によって、検出すべきあらゆる分子、化合物または粒子を意味する。以下において概説するように、標的被検体は、ここにおいて更に詳細に説明するように、分子認識成分と結合することが好ましい。好ましくは、該分子認識成分は、上記のヒドロゲルに固定化される。当業者には理解されるように、大多数の被検体が、本発明の方法を利用して検出でき、基本的には、分子認識成分の存在する、任意の標的被検体を、本発明の方法並びに装置を使用して検出することができる。

適当な被検体は、有機および無機分子、並びに生体分子を含む。好ましい態様において、該被検体は、環境汚染物質(重金属、農薬、殺昆虫剤、毒素等を含む)；化学物質(溶剤、ポリマー、有機物質等を含む)；治療用分子(治療用および乱用薬物、抗生物質等を含む)；生体分子(ホルモン、サイトカイン、タンパク質、脂質、炭水化物、細胞膜抗原および受容体(神経、ホルモン、栄養物、および細胞表面受容体)またはそのリガンド等を含む)(抗原-抗体相互作用の検出は、米国特許第4,236,893号、同第4,242,096号および同第4,314,821号(これらを、参考文献として、特にここに組入れる)に記載されている)；全細胞(原核生物(例えば、病原性バクテリア)および真核(哺乳動物の腫瘍細胞を含む)細胞等を含む)；ウイルス(レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス等を含む)；および孢子等であり得る。特に好ましい被検体は、環境汚染物質；核酸；タンパク質(酵素、抗体、抗原、成長因子、サイトカイン等を含む)；治療用および乱用薬物；細胞；およびウイルスである。

【0036】

好ましい態様において、該標的被検体および分子認識成分は、核酸である。「核酸」または「オリゴヌクレオチド」またはこれらの文法的に等価な用語は、ここでは共有結合的に相互に結合した少なくとも2つのヌクレオチドを意味する。

好ましい一態様において、本発明は、標的核酸を検出する方法を提供する。「標的核酸」または「標的配列」またはこれらの文法的に等価な用語は、ここでは核酸の一本鎖における核酸配列を意味する。該標的配列は、遺伝子、調節配列、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、rRNA、siRNA、を含むRNAおよびその他の一部であり得る。当業者は理解するであろうように、相補的標的配列は、多くの形状をとることができる。例えば、特に、大きな一つの核酸配列内に、即ち遺伝子またはmRNAの全てまたは一部、プラスミドまたはゲノムDNAの制限フラグメントに含まれるものであり得る。標的配列は、また増幅反応の結果物または生成物、即ちアンプリコンをも含む。

【0037】

本発明の核酸は、一般にホスホジエステル結合を含むが、以下に概説するように、幾つかの場合においては、交互主鎖を持つことのできる核酸類似体を使用することも可能である。好ましくは、該核酸標的被検体は、ポリヌクレオチドである。核酸類似体は、使用する場合には、マイクロセンサ表面上のヒドロゲル内の固定化されたプローブ(分子認識成分)として使用することが好ましい。このような核酸被検体は、交互主鎖を有し、例えばホスホルアミド(Beaucage等, Tetrahedron, 1993, 49(10):1925およびこれに含まれる文献；Letsinger, J. Org. Chem., 1970, 35:3800；Sprinzl等, Eur. J. Biochem., 1977, 81:579；Letsinger等, Nucl. Acids Res., 1986, 14:3487；Sawai等, Chem. Lett., 1984, p.805；Letsinger等, J. Am. Chem. Soc., 1988, 110:4470；およびPauwels等, Chemica Scripta 1986, 26:141)、ホスホロチオエート(Mag等, Nucl. Acids Res., 1991, 19:1437；および米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート(Briu等, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111:2321)、0-ホスホロアミダイト結合(Eckstein, オリゴヌクレオチドおよび類似体：実際の方法(Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach), Oxford University Press刊を参照のこと)、およびペプチド核酸の主鎖および結合(Egholm, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114:1895；Meier等, Chem. Int. Ed. Engl., 1992, 31:1008；Nielsen, Nature, 1993, 365:566；Carlsson等, Nature, 1996, 380:207を参照のこと；これ

ら全てを参考文献としてここに組入れる)を包含する。他の類似する核酸は、正の主鎖を含むもの(Denpcy等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92:6097; 非-イオン性主鎖(米国特許第5,386,023号、同第5,637,684号、同第5,602,240号、同第5,216,141号および同第4,469,863号; Kiedrowski等, Angew. Chem. Intl. Ed. English, 1991, 30:423; Letsinger等, J. Am. Chem. Soc., 1988, 110:4470; Letsinger等, Nucleoside & Nucleotide, 1994, 13:1597; 第2および3章、ASCシンポジウムシリーズ(Symposium Series) 580, 「アンチセンス研究における炭水化物の変性 (Carbohydrate Modifications in Antisense Research)」Y.S. Sanghui & P. Dan Cook編; Mesmaeker等, Bioorganic & Medicinal Chem. Lett., 1994, 4:395; Jeffs等, J. Biomolecular NMR, 1994, 34:17; Tetrahedron Lett., 1996, 37:743)および非-リボース主鎖(米国特許第5,235,033号および同第5,034,506号に記載されているもの、および第6および7章、ASCシンポジウムシリーズ(Symposium Series) 580, 「アンチセンス研究における炭水化物の変性 (Carbohydrate Modifications in Antisense Research)」Y.S. Sanghui & P. Dan Cook編に記載されているものを含む)を包含する。1種またはそれ以上の炭素環式糖類を含む核酸も、核酸の定義に含まれる(Jenkins等, Chem. Soc. Rev., 1995, pp. 169-176を参照のこと)。更に、ロックされた(locked)核酸(LNA)も本発明における用途がある。LNAは、Wengel等, J. Org. Chem., 1998, 63:10035-9においてより詳しく説明されている。これを参考文献として、特にここに組入れる。幾つかの核酸類似体が、Rawls, C & E News Jun. 2, 1997, p.35に記載されている。これら文献の全てを、参考文献として、本明細書に明確に組入れる。これらリボース-ホスフェート主鎖の変性は、標識の付加を容易にし、あるいは生理的な環境におけるこのような分子の安定性を高め、かつその半減期を延長するために、行うことができる。

10

20

【0038】

特に好ましいものは、米国特許第6,670,461号に記載されている、ロックされた(Locked)核酸(LNA)である。

当業者には理解されるであろうが、これら核酸類似体の全ては、本発明における用途を見出すことができる。更に、天然産の核酸および類似体の混合物を、作ることができる。あるいはまた、異なる核酸類似体の混合物、および天然産の核酸および類似体の混合物を作ることにも可能である。

特に好ましいのは、ペプチド核酸類似体を含む、ペプチド核酸(PNA)である。これらの主鎖は、天然産核酸の高度に帯電したホスホジエステル主鎖とは対照的に、中性条件下で実質上非-イオン性である。このことは2つの利点をもたらす。第一に、このPNAの主鎖は、改善されたハイブリダイゼーションの速度論を呈する。PNAは、誤対合の塩基対に対して、完全に適合した塩基対に関する、溶融温度(T_m)におけるより大きな変動を示す。DNAおよびRNAは、典型的に内部誤対合に対して、 T_m における2-4 の低下を示す。非-イオン性のPNA主鎖に関連して、この低下は7-9 近傍にある。これは、誤対合のより良好な検出を可能とする。同様に、その非-イオン性の特長により、これら主鎖に結合した塩基のハイブリダイゼーションは、塩濃度に対して比較的低感度である。

30

【0039】

標的核酸、プローブまたは伸張生成物、例えばポリメラーゼまたはリガーゼの伸張生成物の何れであれ、これらの核酸は、特定されているように、一本鎖または二本鎖であり得、あるいは二本鎖または一本鎖配列両者の一部を含むことができる。該核酸は、ゲノムDNAおよびcDNA両者を含むDNA、RNAまたはハイブリッドであり得、ここで核酸は、デオキシリボ-およびリボ-ヌクレオチドの任意の組合せ、およびウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサタニン(xanthine)、ヒポキサタニン(hypoxanthine)、イソシトシン、イソグアニン等を含む塩基の任意の組み合わせを含む。ここで使用する用語「ヌクレオチド」とは、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド類似体、および変性ヌクレオシド、例えばアミノ変性ヌクレオシドを包含する。更に、「ヌクレオシド」は、非-天然産の類似構造体を包含する。かくして、例えばペプチド核酸の個々の単位は、各々塩基を含み、ここではヌクレオシドと称することにする。

40

以下においてより完全に概説されるように、プローブ(増幅用のプライマを含む)を製造

50

し、標的配列にハイブリダイズし、サンプル中の該標的配列の有無を決定する。一般的に言えば、この用語は当業者には理解されるはずである。

【0040】

該標的配列は、また異なる標的ドメインの組合せを含むことができ、例えば以下において概説されるような「サンドイッチ」型のアッセイにおいて、該サンプルの標的配列の第一標的ドメインは、マイクロセンサ上の固定化されたプローブまたはプライマとハイブリダイズすることができ、また第二標的ドメインは、溶液相のプローブまたはプライマとハイブリダイズすることができる。更に、該標的ドメインは、隣接関係にあっても(即ち、連続状態)または分離関係にあってもよい。例えば、結合技術を用いた場合、第一のプライマは、第一標的ドメインとハイブリダイズすることができ、また第二のプライマは、第二標的ドメインとハイブリダイズすることができ、これらのドメインは隣接関係にあっても、また1またはそれ以上のヌクレオチドにより分離されていても、以下においてより完全に概説されるように、ポリメラーゼおよびdNTPを用いてカップリングすることも可能である。このような場合において、これらプライマの少なくとも1つは、該マイクロセンサのヒドロゲル内で固定化されており、またリガーゼを用いて、該プローブを共有結合によって結合する。

10

【0041】

もう一つの好ましい態様において、該標的被検体は、タンパク質である。当業者には理解されるように、本発明を利用して検出できる、多数の可能なタンパク質性の標的被検体がある。ここでは、「タンパク質」または文法的に等価な用語によって、タンパク質、オリゴペプチドおよびペプチド、誘導体および類似体を意味し、非-天然産のアミノ酸およびアミノ酸類似体を包含するタンパク質、およびペプチド模擬構造体を含む。以下に論じるように、分子認識成分としてタンパク質を使用する場合、サンプルの汚染による劣化を遅延するために、タンパク質類似体を使用することが望ましい。

20

これらの標的被検体は、多数の異なる型のサンプル中に存在することができ、該サンプルは、血液、リンパ液、唾液、膣および鼻の分泌物、尿、糞便、汗および涙、並びに肝臓、脾臓、骨髄、肺、筋肉、脳等の組織を包含するが、これらに限定されない。

【0042】

従って、本発明は、標的被検体を検出するための単一または複合型デバイスを提供する。上記のように、このデバイスは、検出チャンネルまたはチャンバーを含み、これは少なくとも一つの活性マイクロセンサを含み、また好ましくは少なくとも4、5、10、20、30、40、50または100個の活性なマイクロセンサを含むことができる。好ましい一態様において、該チャンバーは、少なくとも100個のマイクロセンサを含む。ここで説明したように、該マイクロセンサは、検出器と結合される。

30

一態様において、該デバイスは、標的核酸の増幅および検出用の単一のチャンネルまたはチャンバーを含む。あるいはまた、該デバイスは、2以上のチャンネルまたはチャンバーを含むことができ、例えば別の「検出」チャンネルまたはチャンバーとインターフェースした、「サンプル処理」または「サンプル調製」チャンネルまたはチャンバーが存在し得る。「チャンネル」なる用語によって、通路またはトラフを意味し、これを通して、一般的にはチャンネル間に、サンプルが流されるが、幾つかの態様においては、反応が、該チャンネル自体の内部で起り得る。「チャンバー」なる用語によって、微量流動デバイスの閉じたまたは閉じることのできる部分を意味し、その中でサンプルが操作されおよび/または検出される。以下の議論の多くにおいて、チャンバー内で起る反応を強調するが、これら反応または操作の何れも、チャンネル内でも起り得ることが理解される。

40

【0043】

一般に、核酸が検出され、また核酸がプローブまたはプライマとして機能する場合には、本発明においては、2つの一般的な反応を使用する。一態様において、該標的被検体は、アンプリコンを生成すべく、増幅される。次いで、アンプリコンを該マイクロセンサで検出する。もう一つの態様において、該標的被検体を、該マイクロセンサ上の該ヒドロゲルマトリックス内に固定化された、該プローブまたはプライマとハイブリダイズする。該

50

プローブまたはプライマは変性され、そして一般的には該ヒドロゲルの特性における変動を含むこの変性が検出される。当業者は理解できるように、「標的被検体」は、サンプル由来の標的物質または増幅反応の生成物、即ちアンプリコン両者を含むことができる。即ち、アンプリコンは、標的被検体として機能できる。次いで、固定化されたプローブを、該アンプリコンとのハイブリダイゼーションの結果として、変性することができる。あるいはまた、該センサ上での標的物質と該固定化されたプローブとの特異的なハイブリダイゼーションは、実際のまたは差動センサの出力シグナルにおける、検出可能な変化をもたらす。

【0044】

前に述べたように、標的被検体の検出は、標的物質と、該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されたプローブとのハイブリダイゼーションにより達成し得る。検出は、また該固定化されたプローブまたはプライマの変性の検出により達成できる。これは、「変性されたプライマ」の生成をもたらす。様々な型の変性があるが、本発明において用途が見出せる一般的な変性は、該固定化されたプローブまたはプライマの大部分における変化をもたらすものである。即ち、一般的に該プローブまたはプライマは、DNAポリメラーゼまたはリガーゼ等による伸張等に基づく変性であろう。サンドイッチアッセイも、標的被検体の検出における用途が見出される。

【0045】

ここで論じたように、該サンドイッチアッセイは、主な標的配列(例えば、患者サンプル由来の)検出のために、または上で概説したような増幅反応の生成物を検出する方法として利用することができ、従って例えば上で概説した、PCR、LCR、NASBA、SDA等を利用して新たに合成されたストランドの何れかを、サンドイッチアッセイにおける「標的配列」として使用することができる。サンドイッチアッセイは、U.S.S.No. 60/073,011および米国特許第5,681,702号、同第5,597,909号、同第5,545,730号、同第5,594,117号、同第5,591,584号、同第5,571,670号、同第5,580,731号、同第5,571,670号、同第5,591,584号、同第5,624,802号、同第5,635,352号、同第5,594,118号、同第5,359,100号、同第5,124,246号および同第5,681,697号に記載されている。これら全てを、参考文献として本発明に組入れる。更に、これらの標的配列は、該固定化されたプライマの変性をもたらす、他のアッセイ用の鋳型として使用することができる。

【0046】

単一塩基伸張(SBE)は、プライマ配列が、標的配列と相補的であるか、あるいはこれとハイブリダイズされる場合における、一個のヌクレオチドの、該プライマ配列への組込みをもたらす伸張アッセイである。該プライマに組込まれる該ヌクレオチドは、該標的核酸の対応する位置におけるヌクレオチドと相補的である。従って、該ヒドロゲル内の固定化されたプライマは、伸張され、即ち変性され、また本発明のデバイスによって検出される。故に、該固定化されたプライマにおける変化の検出は、該標的被検体の存在を示す指標である。

更に、プライマの伸張が、該マイクロセンサ上で検出できるように、配列決定は、このマイクロセンサ上で行うことができる。プライマの伸張を実施する場合、検出器は、ヌクレオチドの付加を示す、該ヒドロゲルの寸法における変化を検出する。配列決定を行う場合、該プライマに付加される各ヌクレオチドが、該マイクロセンサにおいて検出される。即ち、該検出器は、どのヌクレオチドが該プライマに付加されたかを検出する。従って、該標的の配列を得ることができる。幾つかの態様において、ヌクレオチドは、一度に該プライマ伸張反応に添加される。この態様において、該マイクロセンサ上の質量における増加を検出する際には、その配列も決定される。もう一つの態様では、これらのヌクレオチドには、特徴的な質量を持つ粒子、即ち金粒子でタグまたは標識を付ける。即ち、これらヌクレオチド各々は、該ヒドロゲルの特性(寸法)の特異的な変化により、該特定のヌクレオチドであることを示す、異なる質量を持つラベルで標識されている。

【0047】

幾つかの態様において、該タグが、後のプライマ伸張を妨害する場合、該標識された

10

20

30

40

50

ヌクレオチドは、標識されていないヌクレオチドとの組合せで添加される。このように、プライマのある一群が標識されたヌクレオチドで伸張される一方で、ある一群は追加の伸張を受ける可能性のある、未標識のヌクレオチドで伸張されるであろう。このように、該標的核酸の配列が得られる。

オリゴヌクレオチド-結合アッセイは、PCRに基づくスクリーニングの拡張であり、これは、該標的配列を含むPCR反応生成物を検出するために、ELISAに基づくアッセイ(OLA, Nickerson等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:8923)を利用する。簡単に言えば、このOLAは、2つの隣接するオリゴヌクレオチド:「レポーター」プローブおよび「アンカー」プローブを使用する。これら2つのオリゴヌクレオチドは標的DNAにアニーリングされ、そして、完全な相補性がある場合には、これら2つのプローブはDNAリガーゼによって結合される。この結合されたプローブは、次に該SAWセンサ上のプローブによって捕獲される。

10

【0048】

あるいはまた、該OLAプライマの一方は、該マイクロセンサ上の該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されている。結合の際に、該マイクロセンサ上の質量は増大する。この質量の増加は、該標的被検体の存在を示すものとして検出される。

このおよび他の態様において、加熱および/または冷却モジュールを使用することができ、これは該反応チャンバーの何れかであるか、あるいは該反応モジュールと分離されているが、これとは空間的に近接したものであり得る。適当な加熱モジュールは、米国特許第5,498,392号および同第5,587,128号、およびWO 97/16561(参考文献とする)に記載されており、また電気抵抗加熱器、パルス化レーザーまたは該反応器に向けられた電磁エネルギーの他の源を含むことができる。加熱要素を使用する場合、該反応チャンバーを比較的浅くし、熱伝達を容易にすることが望ましい。これについては、米国特許第5,587,128号を参照のこと。

20

【0049】

IV. 周辺部品

一態様において、本発明のデバイスは、分離した検出モジュールを含む。即ち、該反応チャンバーまたはチャンネルが、該マイクロセンサを含まない場合には、別の検出チャンバーまたはチャンネルが必要である。以下の検出モジュールに関する議論は、該マイクロセンサが、該反応チャンバーまたはチャンネル内に見出される場合の、該マイクロセンサにも適用できることに注意すべきである。

30

従って、本発明は、生物学的な標的被検体種、例えば核酸およびタンパク質を検出するのに有用な、方法および組成物を提供する。一般に、該検出モジュールは、ここに記載するような、SAWセンサに組込まれた結合相手または生物活性薬剤との結合に基づくものである。

即ち、各マイクロセンサは、生物活性薬剤を含む。ここで使用する「候補生物活性薬剤」または「生物活性薬剤」または「化学的官能性」または「分子認識成分」なる用語は、マイクロセンサと結合できる任意の分子、例えばタンパク質、オリゴペプチド、小さな有機分子、配位錯体、多糖、ポリヌクレオチド等を意味する。好ましい生物活性薬剤は、ペプチド、核酸、サッカライド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体、またはこれらの組合せを含む、生体分子を包含する。特に好ましいものは、核酸およびタンパク質である。

40

【0050】

好ましい一態様において、該生物活性薬剤は、天然産のタンパク質または天然産タンパク質のフラグメントである。従って、例えばタンパク質含有細胞抽出物、またはタンパク質性細胞抽出物のランダムなまたは所定の目的に沿った消化物を使用することができる。このように、原核細胞および真核細胞タンパク質のライブラリーを、ここに記載する系におけるスクリーニングのために作成することができる。この態様において特に好ましいものは、細菌、真菌、ウイルスおよび哺乳動物タンパク質であり、後者が好ましく、またヒトのタンパク質が特に好ましい。

好ましい態様において、該生物活性薬剤は、約5~約30個のアミノ酸を含むペプチドで

50

あり、約5～約20個のアミノ酸を含むペプチドが好ましく、また約7～約15個のアミノ酸を含むペプチドが特に好ましい。

好ましい一態様において、該生物活性薬剤は、上で定義したような核酸(一般的に、「プローブ核酸」、「プライマ」または「候補プローブ」と呼ばれる)である。一般に、タンパク質、核酸について上記したように、生物活性薬剤は、天然に産する核酸、ランダムな核酸、または「偏りのある(biased)」ランダム核酸であり得る。例えば、タンパク質について上に概説した如く、原核または真核細胞のゲノムを使用することができる。

【0051】

該生物活性薬剤が核酸である場合、これらは、標的配列に対して実質的に相補的であるように設計することができる。上記のように、ここで使用する用語「標的配列」またはその文法的に等価な用語は、核酸の一本鎖における核酸配列を意味する。

次いで、プローブ核酸(ここでは、プライマ核酸とも呼ばれる)を、該標的配列と接触させて、ハイブリダイゼーション複合体を形成する。一般的に、このプローブ核酸は、該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されている。「プライマ核酸」なる用語により、ここでは標的配列のある一部、即ちドメインとハイブリダイズするプローブ核酸を意味する。本発明のプローブは、標的配列(以下に説明するように、サンプルの標的配列または他のプローブ配列のいずれか)と、相補的であるように設計され、結果的に該標的配列と、本発明のプローブとのハイブリダイゼーションがおこる。以下に概説するように、この相補性は、完全である必要はなく、該標的配列と、本発明の該一本鎖核酸とのハイブリダイゼーションを妨害するであろう、任意の数の塩基対の誤対合があってもよい。しかし、突然変異の数が非常に多くて、最もストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件下においてさえ、ハイブリダイゼーションがおこり得ない場合には、その配列は相補的な標的配列ではない。このように、「実質的に相補的」なる用語は、ここでは該プローブが、該標的配列に対して十分に相補的であって、正常な反応条件化でハイブリダイズすることを意味する。

【0052】

様々なハイブリダイゼーション条件が、本発明において使用することができ、高度に、中程度におよび低度にストリンジェントな条件を含み、これに関しては、例えばManiatis等、モレキュラークローニング：アラボラトリーマニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第2版、1989およびショートプロトコルズインモレキュラーバイオロジー(Short Protocols in Molecular Biology), Ausubel等編(これらを、本発明の参考文献とする)を参照のこと。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、また異なる状況においては異なる。より長い配列は、より高い温度にて、特異的にハイブリダイズされる。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範な指針は、Tijssen, 生化学および分子生物学における技術--核酸プローブによるハイブリダイゼーション(Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes), 「ハイブリダイゼーション原理の概観および核酸アッセイの戦略(Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays)」(1993)に見出すことができる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度、pHにおける、特定の配列に関する融点(T_m)より約5-10 低くなるように選択される。この T_m は、該標的に対して相補的なプローブの50%が、平衡状態(T_m において、該標的配列は過剰に存在するので、該プローブの50%が、平衡状態において占有される)において該標的配列とハイブリダイズする温度(規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度の下で)である。ストリンジェントな条件は、pH7.0～8.3において、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオン未満、典型的には約0.01～1.0Mナトリウムイオン濃度(または他の塩)となり、かつ温度が、短いプローブ(例えば、10～50個のヌクレオチド)に対して少なくとも約30 、および長いプローブ(例えば、50個のヌクレオチド以上)に対して少なくとも約60 となるような条件である。ストリンジェントな条件は、また脱安定化剤、例えばホルムアミドを添加することによっても、達成できる。該ハイブリダイゼーション条件は、当分野において公知の如く、非-イオン性の主鎖、即ちPNAを使用する場合には変動し得る。更に、標的物質の結合後に、架橋剤を

添加して、該ハイブリダイゼーション複合体の2つのストランドを架橋、即ち共有結合により結合することも可能である。

【0053】

かくして、これらのアッセイは、一般に標的物質の存在する場合においてのみ、該ハイブリダイゼーション複合体の形成を可能とする、ストリンジェントな条件下で行われる。ストリンジェンシーは、温度、ホルムアルデヒド濃度、塩濃度、カオトロープ塩濃度、pH、有機溶媒濃度等を含む、熱力学的な変数としてのプロセスパラメータを変えることにより、調節できる。

これらのパラメータは、また米国特許第5,681,697号において一般的に説明されているように、非-特異的な結合を調節するのに使用できる。従って、幾つかの段階をより高度にストリンジェントな条件の下で行って、非-特異的な結合を減じることが望ましい場合がある。

10

該プローブまたはプライマ核酸のサイズは、当業者には理解されるように、変えることができ、一般的には長さにおいて5~500個のヌクレオチドなる範囲で変えることができ、プライマについては、以下において論じるように、検出および/または増幅のために何が必要とされるかに依存して、10~100なる範囲が好ましく、15~50なる範囲が特に好ましく、10~35なる範囲が、とりわけ好ましい。

好ましい一態様において、各マイクロセンサは、単一の型の生活性薬剤を含むが、複数の各生活性薬剤を、本明細書に記載するように、各マイクロセンサ上の該ヒドロゲルマトリックス内に結合することが好ましい。更に、上記のように、該マイクロセンサは、該標

20

【0054】

好ましい一態様において、本発明のデバイスは、反応モジュールを含む。これは、1種またはそれ以上のサンプル成分の、物理的、化学的または生物学的な変更を含むことができる。あるいはまた、該標的被検体が、第二の部分を変更し、その後これを検出できるような、反応モジュールを含むことも可能である。例えば、該標的被検体が、酵素である場合、該反応チャンバーは基質を含み、これは、該標的被検体により変性された際に、マイクロセンサと結合することにより、検出できる。この態様において、該反応モジュールは、必要な反応試薬を含むことができ、あるいは貯蔵モジュール内に保存し、ここで説明するように、また必要に応じて、ポンプ輸送することができる。

30

あるいはまた、該標的被検体は、ポリメラーゼまたはリガーゼ伸張反応等の酵素反応の基質として機能するが、該標的物質自体は変更されず、あるいは消耗されない。寧ろ、該マイクロセンサ内の該固定化されたプローブまたはプライマが、鋳型または標的被検体に依存する様式で、変性される。

【0055】

好ましい一態様において、該反応モジュールは、被検体の検出前またはその最中に、該サンプルの一部または全ての化学的な変性のためのチャンバーを含む。即ち、一態様において、別々の反応モジュールおよび別々の検出モジュールがある。もう一つの態様において、該反応は、該検出モジュールにおいて起る。これは、被検体を同時に変性かつ検出することを可能とする。

40

化学的な変性は、サンプル成分の化学的な開裂(タンパク質のCNBr開裂等)、または化学的架橋を含むが、これらに限定されない。PCT US97/07880(これを、本発明の参考文献とする)は、本発明のデバイスで実施できる、多数の可能な化学反応を列挙しており、その例はアミドの形成、アシル化、アルキル化、還元的アミノ化、ミツノブ(Mitsunobu)、ディールスアルダー&マンニッヒ反応(Diels Alder and Mannich reactions)、スズキ&スチルカップリング(Suzuki and Stille coupling)等を含む。同様に米国特許第5,616,464号および同第5,767,259号は、種の「化学的な結合」を利用する、様々な連鎖結合反応(LCR; しばしばオリゴヌクレオチド結合増幅またはOLAとも呼ばれる)を記載している。

【0056】

好ましい一態様において、該反応モジュールは、被検体の検出前またはその最中に、該

50

サンプルの一部または全ての生物学的な変性のためのチャンバーを含む。例えば、酵素的加工は、核酸の増幅、および結合、開裂、環化、超コイル形成、メチル化、アセチル化を含む他の核酸の変性；サンプル成分の加水分解、または標的酵素による基質の加水分解、検出可能なラベルの付加または除去、リン酸基の付加または除去、タンパク質の変性(アシル化、グリコシル化、脂質、炭水化物の付加等)、小分子の合成/変性等を含む。

あるいはまた、該変性または変更は、該標的分子とのハイブリダイゼーションの結果として、該固定化されたプライマ内で起る可能性がある。

【0057】

好ましい一態様において、該標的被検体は、核酸であり、また生物学的反応チャンバーは、該標的核酸の増幅を可能とする。適当な増幅技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素PCR(RT-PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、およびインベダー(Invader)™技術を含む。これらの方法を含む技術は、当分野において周知である。この態様において、反応試薬は、一般的に少なくとも1種の酵素(一般には、ポリメラーゼ)、プライマおよび必要によりヌクレオシドトリホスフェートを含む。ここに記載するように、該増幅反応は、検出チャンバーとは別の、チャンバーまたはチャンネル内で起り得る。あるいはまた、この増幅は、該検出チャンバー内で起る可能性もある。増幅が進行するにつれて、生成するアンプリコンは、該検出チャンバー内の該マイクロセンサ上の、該ヒドロゲルマトリックス内の固定化されたプローブとハイブリダイズし、ここに概説するような、該マイクロセンサの特性における、検出可能な変化をもたらす。

10

【0058】

あるいはまた、該アンプリコンは、該固定化されたプライマの変性をもたらす、後の反応の鑄型として機能する。このような変性は、以下においてより完全に議論され、またプライマの伸張をもたらす、プライマ伸張処理を包含する。また、該プライマを、別のプローブまたはプライマと結合して、該固定化されたプライマの長さを伸長することも可能である。

20

核酸増幅の一般的な技術を、以下に論じる。多くの場合において、二本鎖標的核酸を変性して、これらを一本鎖とし、結果として該プライマと本発明の他のプローブとのハイブリダイゼーションを可能にする。好ましい一態様は、一般的には該反応の温度を約95℃まで高めることによる、熱的段階を利用するが、pHの変化およびその他の技術、例えば追加のプローブまたは核酸結合タンパク質の使用等を、利用することもできる。一態様においては、等温増幅が好ましい。

30

更に、以下においてより完全に説明するように、これらの異なる技術は、該プライマに関する更なる要件を必要とする可能性がある。

【0059】

一旦、該プライマと該標的配列との間のハイブリダイゼーション複合体が形成されると、しばしば「増幅酵素」と呼ばれる酵素を使用して、該固定化されたプライマを変性する。ここに概説した方法の全てに関連して、該酵素は、このアッセイの任意の時点において添加することができ、該プライマの添加前、その添加の際、またはその後に添加できる。該酵素の同定は、以下においてより完全に説明するように、使用した増幅技術に依存するであろう。同様に、該変性は、該増幅技術に依存するが、一般的にはここに記載する反応全ての最初の段階は、該プライマの伸張であり、即ちヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、プライマの長さを伸ばすためにこれに添加される。

40

幾つかの態様において、該酵素が、一旦該プライマを変性して、変性プライマを形成すると、該ハイブリダイゼーション複合体は、解離される。「変性プライマ」とは、検出可能な様式で変化または変更された、プライマを意味する。一般に、変性プライマは、少なくとも一つのヌクレオチドの付加によりその長さが伸長される。

【0060】

別の態様では、タンパク質が標的分子であり、また増幅すべき核酸を含む、タンパク質アフィニティー試薬によって検出される。「アフィニティー試薬」とは、該標的タンパク質に、高いアフィニティーにて結合する分子を意味する。アフィニティー試薬は、アプタ

50

マー、抗体、リガンド、アダプタンパク質、レクチン等を含むが、これらに限定されない。この態様において、該アフィニティー試薬は、核酸と結合される。

該タンパク質標的と該アフィニティー試薬との結合反応後に、未結合のアフィニティー試薬は除去される。該試薬は、当分野において公知の方法、例えば洗浄法により除去できる。この態様において、該複合体が固定化されて、該未結合分子の洗流しが可能であることが好ましい。一旦除去されると、該核酸は増幅され、得られたアンプリコンは、ここに記載するように、該SAWセンサ上に固定化されたプローブと、ハイブリダイズすることにより検出される。あるいはまた、該核酸それ自体は増幅されないが、環状のプローブとハイブリダイズするように機能する。この環状のプローブは、ローリングサークル型増幅に対する鋳型である。これは、Nature Biotechnology, 2002(4月), vol.20, pp.359-365により詳細に記載されている。この文献を、ここに明確に参考文献として組入れる。このローリングサークル型増幅に引続き、再度、該アンプリコンは、ここに記載するように、該SAWセンサ上で検出される。

10

【0061】

このように、タンパク質の検出および核酸の検出両者のために、核酸の増幅は、該標的分子の検出前に行うことができる。増幅中、一般に、該増幅段階は、元の標的配列のコピー数および検出感度に依存して、1~数千回に及ぶサイクル数で、ある期間に渡り繰返され、そのサイクル数は、10~100サイクルが好ましく、また20~50サイクルが、特に好ましい。

一態様において、適当な時間または増幅の後、該アンプリコンを検出モジュールに移し、以下においてより完全に説明するように、マイクロセンサ表面上の、該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されたプローブとのハイブリダイゼーション複合体として一体化される。このハイブリダイゼーション複合体は、以下において説明するように、マイクロセンサと結合し、かつ検出される。

20

【0062】

もう一つの態様において、増幅は、該検出チャンバー(以下においてより完全に説明する)内で起る。即ち、増幅および検出が、同一のチャンバー内で起る。一態様において、増幅は、少なくとも2種の溶液層のプライマを使用することにより進行する。増幅に伴って、アンプリコンは、該マイクロセンサの該ヒドロゲルマトリックス内に固定化された、プローブまたはプライマとハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション複合体を生成する。該固定化プローブとのハイブリダイゼーションの際に、該標的被検体の有無が検出される。好ましい態様において、該ハイブリダイゼーション複合体は、該固定化されたプローブの変性をもたらす、更なる反応用の鋳型として利用される。このような反応は、ここにおいてより詳細に説明する、伸張反応、例えば単一塩基伸張(SBE)、鋳型依存性核酸合成またはオリゴヌクレオチド結合アッセイ(OLA)を含む。

30

別の態様では、増幅およびプライマ伸張は、溶液相-プライマおよび該マイクロセンサの表面上に固定化されているプライマを使用することにより、進行する。

【0063】

更に別の態様において、増幅は、該マイクロセンサの該ヒドロゲルマトリックス内に固定化された、プライマ対を使用することによって進行する。即ち、両方の増幅プライマは、該マイクロセンサの該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されている。故に、該標的被検体の増幅に際して、該アンプリコンも、該マイクロセンサの該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されている。

40

好ましい一態様では、該増幅は標的の増幅である。標的の増幅は、検出すべき該標的配列の増幅(複製)を含み、結果的に該標的配列のコピー数を増大する。適当な標的の増幅技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA)、および拡散配列を基本とする増幅(NASBA)およびリガーゼ連鎖反応(LCR)を含むが、これらに限定されない。

【0064】

好ましい一態様において、該標的の増幅技術は、PCR法である。このポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法は、広く利用され、かつ記載されており、熱的な環化との組合せでプライマ

50

伸張を利用して、標的配列を増幅する工程を含む。これについては、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号、並びにPCRエッセンシャルデータ(PCR Essential Data), J.W. Wiley & sons, C.R. Newton編, 1995を参照されたい。ここに、これら全てを、参考文献として組入れる。更に、多数のPCRの変法があり、そこでも本発明の用途が見出され、これらは、特に「定量的競合的PCR」または「QC-PCR」、「任意的に感作した(primed)PCR」または「AP-PCR」、「イムノ-PCR」、「Alu-PCR」、「PCR一本鎖配座多形性」または「PCR-SSCP」、「逆転写酵素PCR」または「RT-PCR」、「ピオチン捕獲PCR」、「ベクトレット(vectorette) PCR」、「パンハンドル(panhandle) PCR」、および「PCR選択cDNA消去」を包含する。

【0065】

一般に、PCRは、大まかに、以下のように説明されている。二本鎖標的核酸を、一般には温度を上げることにより変性し、次いで過剰量のPCRプライマの存在下で冷却し、該第一標的ストランドとハイブリダイズする。次に、DNAポリメラーゼを作用させて、該プライマを伸張させ、ハイブリダイゼーション複合体を形成する、新たなストランドを合成する。このサンプルを、次に再度加熱し、該ハイブリダイゼーション複合体を解離させ、この工程を繰り返す。該相補的標的ストランドに対する第二のPCRプライマを使用することによって、迅速かつ、指数的な増幅が起る。このように、PCR段階は、変性、アニーリングおよび伸張である。PCR法の詳細は周知であり、熱安定性のポリメラーゼ、例えばTaqIポリメラーゼおよび熱的環化の使用を含む。もう一つの態様においては、等温増幅を利用する。

従って、このPCR反応は、少なくとも一つのPCRプライマとポリメラーゼを必要とする。メソスケール(mesoscale) PCRデバイスは、米国特許第5,498,392号および同第5,587,128号、およびWO 97/16561に記載されている。これらを本発明の参考文献とする。

【0066】

好ましい一態様において、該増幅は、RT-PCRである。好ましくは、この反応は、二段階のRT-PCR法または固相RT-PCR法の何れかを含む。この態様において、RT-PCRは、上記したように、溶液相プライマまたは固定化プライマの何れかを使用して実施する。本態様において、mRNAが、cDNAに逆転写され、かつPCRが、DNAポリメラーゼを使用して行われる。ここでも、PCRプライマは、上記したように、溶液相プライマまたは固定化プライマの何れかであり得る。

追加の好ましい態様においては、cDNAの再増幅(多重PCR系)を行う。mRNAから合成されたcDNAは、1回以上使用することができる。好ましくは、このcDNAは、その安定性が増すので、固定化される。この固定化は、異なるまたは同一の標的配列を、多数回に渡り増幅できるように、該同一の固定化cDNAの再増幅を可能とする。上記のように、増幅は、溶液相プライマまたは固定化プライマを使用することができ、またアンプリコンの検出は、該マイクロセンサ上の該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されたプローブと、アンプリコンとのハイブリダイゼーション後に進行する。

好ましい一態様において、該RT-PCR増幅法は、高い処理能力を有するRT-PCR系である。

【0067】

好ましい一態様において、該増幅技術は、LCR法である。この方法は、異なる2つの方法で行うことができる。第一の態様では、標的配列の唯一つのストランドを、結合用の鋳型として使用し、あるいはまた両方のストランドを使用することもできる。一般的には、米国特許第5,185,243号および同第5,573,907号；EP 0 320 308B1；EP 0 336 731B1；EP 0 439 182B1；WO 90/01069；およびWO 89/09835並びにU.S.S.第60/078,102号および同第60/073,011号を参照されたい。これら全ての文献を、本発明の参考文献としてここに組入れる。

増幅の好ましい一態様では、一本鎖標的配列は、第一の標的ドメインと第二の標的ドメインとを含む。該各標的ドメインに対して相補的で、従って該標的ドメインとハイブリッド形成する、第一のLCRプライマおよび第二のLCRプライマ核酸を添加する。これら標的ドメインは、直接隣接、即ち連続しているか、あるいはある数のヌクレオチドにより分離さ

10

20

30

40

50

れていてもよい。これらが不連続である場合、ヌクレオチドを、これを接合する手段、例えばポリメラーゼと共に添加するが、これは該プライマの一方に、該ヌクレオチドを付加するであろう。次いで、これら2つのLCRプライマを、例えば当分野において公知のもの等のリガーゼ酵素を用いて、共有結合的に結合する。これにより、該結合プローブと該標的配列とを含む、第一のハイブリダイゼーション複合体が生成する。このハイブリダイゼーション複合体を、次に変性(解離)し、またこの工程を繰返して、結合プローブ、即ちアンプリコンのプールを生成する。該結合プローブまたはアンプリコンは、次に該マイクロセンサの該ヒドロゲルマトリックス内に固定化されたプローブで検出される。

【0068】

好ましい一態様では、LCRを、二本鎖標的配列の2つのストランドに対して行う。該標的配列を変性し、2組のプライマを添加するが、その1組は、該標的の1ストランドに対する、上に概説したものであり、別の組(即ち、第三および第四プライマ核酸)は、該標的の他のストランドに対するものである。好ましい一態様において、該第一および第三のプライマは、ハイブリダイズし、また第二および第四のプライマはハイブリダイズされ、結果として増幅が起る。即ち、該第一および第二のプライマは、結合されており、その結合性生物は、該第二の標的配列に加えて、該第三および第四プライマの結合用の鋳型として使用することができる。同様に、該結合された第三および第四の生成物は、該第一の標的ストランドに加えて、該第一および第二のプライマ結合用の鋳型として機能するであろう。このように、直線状という程度ではなく、指数的な増幅が起る。

再度、上に概説した如く、LCR生成物の検出は、該プライマの一方または両者が、該マイクロセンサの該ヒドロゲル内に固定化されたプライマと、単にハイブリダイズされている場合には、直接行うことができ、ハイブリダイゼーションは、ここに記載するようにして検出される。あるいはまた、LCR生成物の検出は、追加のプローブの使用を介して、サンドイッチアッセイを使用して、間接的に行うことができ、即ち該結合された生成物は、標的配列として機能し、また検出は該マイクロセンサ表面上に固定化されたプローブまたはプライマに対するハイブリダイゼーションを介して進行する。

【0069】

更に、該デバイスは、他のモジュール、例えばサンプル調製チャンバーを含むこともできる。この態様において、粗製サンプルは、該サンプル処理チャンネルまたはチャンバーに添加され、検出用のサンプルを調製すべく操作される。該操作されたサンプルは、該サンプル処理チャンネルまたはチャンバーから除去し、該検出チャンバーに添加される。該デバイスを取り付ける、追加の機能性要素があり、例えば加熱要素を、PCR等の反応を行うための、該サンプルチャンネルまたはチャンバーと接触状態で配置することができる。幾つかの場合において、該デバイスの一部は、取外すことができ、例えば該サンプルチャンバーは、取外すことのできるチャンバーを持つことができ、結果として該サンプルチャンバーの全体は、該検出装置と接触状態にはない。これについては、例えば米国特許第5,603,351号およびPCT US96/17116を参照でき、これらを本発明の参考文献とする。

異なるチャンネルまたはチャンバーに加えて、該デバイスは、チャンバー間でのサンプルの移動を可能とする、1またはそれ以上の流動セルまたは流動チャンネルを含むことができる。流動チャンネルに加えて、分離されたチャンバーの入口および出口を備えることができる。このような口は、交差汚染の危険性無しに、異なるチャンバー内にサンプルを含めることを可能とする。

【0070】

幾つかの態様においては、該デバイスは、またこのデバイスから流体力学的に該サンプルを汲出す、ポンプ機構をも含む。あるいはまた、真空デバイスを使用する。

好ましい一態様において、微量流動デバイスは、広範囲に及ぶ材料を用いて作ることができ、その例は、例えばシリコンウエハ等のシリコン、二酸化珪素、窒化珪素、ガラスおよび溶融シリカ、ヒ化ガリウムインジウムリン、アルミニウム、セラミックス、ポリイミド、石英、プラスチック、樹脂およびポリマー、例えばポリメチルメタクリレート、アクリル系樹脂、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリスチ

10

20

30

40

50

レン、および他のスチレンコポリマー、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、超合金、ジルカロイ、鋼、金、銀、銅、タングステン、モリブデン、タンタル、コパー (KOVAR)、ケブラー (KEVLAR)、カプトン (KAPTON)、マイラー (MYLAR)、黄銅、サファイア等を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 7 1 】

本発明の微量流動デバイスは、当業者には理解されるように、様々な方法で作ることができる。例えば、液密式電線管の製造を目的とする WO 96/39260、封止を目的とする米国特許第 5,747,169 号、および EP 0637996B1、EP 0637998B1、WO 96/39260、WO 97/16835、WO 0 98/13683、WO 97/16561、WO 97/43629、WO 96/39252、WO 96/15576、WO 96/15450、WO 97/37755 および WO 97/27324；および米国特許第 5,304,487 号、同第 5,071,531 号、同第 5,061,336 号、同第 5,747,169 号、同第 5,296,375 号、同第 5,110,745 号、同第 5,587,128 号、同第 5,498,392 号、同第 5,643,738 号、同第 5,750,015 号、同第 5,726,026 号、同第 5,35,358 号、同第 5,126,022 号、同第 5,770,029 号、同第 5,631,337 号、同第 5,569,364 号、同第 5,135,627 号、同第 5,632,876 号、同第 5,593,838 号、同第 5,585,069 号、同第 5,637,469 号、同第 5,486,335 号、同第 5,755,942 号、同第 5,681,484 号 および 同第 5,603,351 号を参照のこと。これら全てを、本発明の参考文献とする。ここでも、適当な製造技術は、基板の選択に依存するが、好ましい方法は、様々なマイクロマシン製造 (micromachining) およびマイクロ製造 (micro-fabrication) 技術、例えば スピン塗布法、化学気相蒸着法等のフィルム沈着法、レーザー製造法、フォトリソグラフィおよび湿式化学法またはプラズマ法を用いる他のエッチング技術、エンボス加工、射出成型、および結合技術 (例えば、米国特許第 5,747,169 号を参照のこと) を含むが、これらに限定されない。更に、所定の流体案内通路を製造するための印刷技術もあり、即ち印刷された材料のパターンが、方向性の流体輸送を可能とする。

【 0 0 7 2 】

好ましい一態様において、本発明のデバイスは、複数の標的被検体を含むことのできる、単一のサンプルを取扱うように構成される。即ち、単一のサンプルを該デバイスに添加するが、ここで該サンプルは該被検体検出用の並行した処理のために、アリコート化されるか、または該サンプルを、順次処理して、個々の標的物質を周期的に検出することも可能である。

好ましい態様において、該固体基質は、多数のサンプルを取扱うように構成されており、その各々は、1種またはそれ以上の標的被検体を含むことができる。一般に、この態様において、各サンプルは、別々に取扱われ、即ち操作および分析は、好ましくはこれらの間の接触または汚染が生じないように、並行して行われる。あるいはまた、共通する幾つかの段階があり、例えば異なるサンプルの別々の処理が望ましい場合があるが、以下に説明するように単一の検出アレイによって、全ての標的被検体を検出することができる。

【 0 0 7 3 】

かくして、本発明のマルチチャンバーデバイスは、サンプル導入口から、該装置の他の部品またはモジュールまでの、該サンプルの流動を可能とする、少なくとも一つのマイクロチャンネルまたは流動チャンネルを含む。マイクロチャンネルまたはウエルの集合を、当分野においては、しばしば「メソスケール流動装置」と呼ぶ。当業者には理解されるように、該流動チャンネルは、該チャンネルの用途に応じて、極めて広範な方法で構成できる。例えば、該サンプル導入口にて開始する、単一の流動チャンネルは、様々な異なるチャンネルに分離して、元のサンプルを並行的処理または分析のための、別々のサブサンプルに分離することができる。あるいはまた、異なるモジュール由来の幾つかの流動チャンネル、例えば該サンプル導入口および試薬保存モジュールを、混合チャンネルまたは反応チャンバー内に、一緒に与えることが可能である。当業者には理解されるように、多くの可能な構成があり、重要なことは、該流動チャンネルが、該デバイスの一つの部分から他の部分への、サンプルおよび試薬の移動を可能にすることにある。例えば、該流動チャンネルの流路の長さは、必要に応じて変えることができ、例えば混合並びに時間調節した反応が必要な場合には、より長い、しばしば湾曲した流動チャンネルを使用することができ

、同様に分離の目的で長さのより長いものが望ましい場合もある。

【0074】

一般に、本発明の微量流動デバイスは、「メソスケール」デバイスと呼ばれる。これらデバイスは、本明細書では、典型的には、微小体積のサンプルを分析するように設計されているが、幾つかの態様においては、大量のサンプル(例えば、cc単位のサンプル)を、後の分析のために、該デバイス内で微小体積に減じることにも可能である。即ち、個々で使用する「メソスケール」とは、 $0.1 \sim 500 \mu\text{m}$ なる範囲程度の断面寸法を持つ、チャンバーおよびマイクロチャンネルを意味する。これらのメソスケール流動チャンネルおよびウエルは、 $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$ なる範囲、典型的には $2 \sim 50 \mu\text{m}$ なる範囲程度の好ましい深さを持つ。これらのチャンネルは、 $2.0 \sim 500 \mu\text{m}$ なる範囲、より好ましくは $3 \sim 100 \mu\text{m}$ なる範囲の、好ましい幅を持つ。多くの用途に対して、 $5 \sim 50 \mu\text{m}$ なる範囲のチャンネルが有用である。しかし、多くの用途にとって、mm規模の大きな寸法を使用することができる。同様に、該支持体中のチャンバーは、しばしば数mm規模の大きな寸法を持つであろう。

10

【0075】

この流動チャンネル装置に加えて、該微量流動(マイクロ)デバイスは、用途に応じて任意の与えられたデバイスに存在する、ここで「モジュール」と呼ぶような、1種またはそれ以上の様々な構成部品を含むように構成し得る。これらモジュールは、サンプル導入口；サンプル導入または捕集用モジュール；細胞処理モジュール(例えば、細胞溶解、細胞の除去、細胞の濃縮、細胞の分離または捕獲、細胞融合、細胞の成育等のためのモジュール)；分離モジュール(例えば、電気泳動、ゲル濾過、沈降のためのモジュール)；該サンプルの化学的または生物学的な変更のための反応モジュール、これは、該標的被検体の増幅(例えば、該標的被検体が核酸である場合、増幅技術が使用され、その例はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(SDA)を含むが、これらに限定されない)、該標的被検体の化学的、物理的または酵素的開裂または変更または該標的の化学的な変性を含み；流体ポンプ；流体バルブ；加熱モジュール；アッセイ試薬用の保存モジュール；混合チャンバー；および検出モジュールを含むが、これらに限定されない。

20

【0076】

好ましい態様において、本発明のデバイスは、該サンプルを該デバイスに導入するための、少なくとも一つのサンプル導入口を含む。これは、サンプル導入または捕集モジュールの一部またはこれとは別のものであり得る。即ち、該サンプルは、該サンプル導入口から分離チャンバーに直接供給でき、あるいはサンプル捕集ウエルまたはチャンバー内で予備処理できる。あるいは、例えば単一のチャンバーがある場合、該サンプル導入口は、サンプルが増幅および/または検出用の単一のチャンバー内に導入されるように、構成することができる。

30

好ましい態様において、本発明のデバイスは、サンプル収集モジュールを含み、これは必要ならば、該サンプルを濃縮し、あるいはエンリッチでき、これについては、例えば米国特許第5,770,029号を参照でき、これは濃縮チャンネルおよび濃縮手段に関する議論を含む。

【0077】

好ましい態様において、本発明のデバイスは、細胞処理モジュールを含む。これは、該サンプルが、標的被検体を含むか、あるいは該標的被検体を検出する目的で除去されている細胞を含む場合における、特別な用途である。即ち、例えば血液中の特定の抗体の検出は、効率的な分析を行うために赤血球を除去し、あるいは検出に先立って、該細胞の溶解を必要とする。これに関連して、「細胞」は、分析に先立って処理する、例えば標的配列の検出に先立って、ウイルス粒子から核酸を放出させる必要がある、ウイルス粒子を含む。更に、細胞処理モジュールは、また細胞の有無を決定するための、下流域における手段を利用することができる。適当な細胞処理モジュールは、細胞溶解モジュール、細胞除去モジュール、細胞濃縮モジュール、細胞分離または捕集モジュールを含むが、これらに限定されない。更に、本発明のモジュール全てに関連して、該細胞処理モジュールは、流体チャンネルを介して、本発明の少なくとも一つの他のモジュールと流体接続関係にある。

40

50

【0078】

好ましい態様において、該SAWバイオセンサ表面に結合した該ヒドロゲルは、血液濾過装置として機能し、そこには如何なる赤血球も入れないが、あらゆる異なる特定の化学種も、該ヒドロゲルの三次元構造に入ることができ、該ヒドロゲル内に固定化された、該特定の分子認識成分を見出すことができる。

好ましい態様において、該ヒドロゲルは、また非-特異的な結合を減じるように機能するが、その理由は、該標的サンプルにおける全ての分子が、該ヒドロゲルマトリックスに入りおよび/またはこれを通過できる。該ヒドロゲル内への該標的分子の侵入は、該ヒドロゲルの孔径に大きく依存する。該孔径の変更により、該SAWセンサ表面に対する非-特異的な結合を生じる、幾分かの望ましからぬ分子の排除を可能にする。

10

好ましい態様において、該細胞取り扱いモジュールは、細胞溶解モジュールを含む。当分野において公知の如く、細胞は、その型に依存して、様々な方法で溶解できる。一態様において、EP 0 637 998B1および米国特許第5,635,358号(これらを、本発明の参考文献とする)に記載されているように、該細胞溶解モジュールは、該細胞取り扱いモジュールの表面から伸びた、細胞膜穿孔突起を含むことができる。流体を、このデバイスに通す際に、該細胞は破壊される。同様に、このことは、該細胞取り扱い領域内にトラップされた、鋭い端部を有する粒子を使用することにより達成できる。あるいはまた、該細胞溶解モジュールは制限された断面を持つ領域を含むことができ、その結果、加圧した際に細胞が溶解する。

【0079】

20

好ましい態様によれば、該細胞溶解モジュールは、細胞溶解剤、例えば洗浄剤、NaOH、酵素プロテイナーゼK、グアニジウムHCL等を含む。幾つかの態様において、例えば赤血球に関して、水またはバッファーによる単なる希釈は、低張性溶解をもたらす可能性がある。該溶解剤は、溶液状態にあり、該細胞溶解モジュール内に、または保存モジュール内に保存され、かつ該溶解モジュール内にポンプ輸送することができる。あるいはまた、該溶解剤は、該サンプルを導入する際に、溶液状態にされる、固体状態にあってもよい。温度を適用しあるいは混合操作を行うこともできる。

該細胞溶解モジュールは、また必要に応じて、細胞残渣を除去するための、濾過モジュールを、内部または外部に含むこともできる。このフィルタは、該細胞溶解モジュールと、その後のモジュールとの間に微小形状で作成することができ、該溶解された細胞膜および他の細胞残渣成分を除去することができ、適当なフィルタの例は、EP 0 637 998B1(これを、本発明の参考文献とする)に示されている。

30

【0080】

サンプル調性の一態様では、細胞は、フィルタ膜上に均等に配置または分配され、また溶解バッファーは、該細胞の機械的な均質化無しに、該フィルタ膜上の細胞層を通過する。これは、上記のようにサンプル調性チャンバー内で行うことができる。あるいはまた、該サンプルを該チャンバーに添加する前に行うことができる。

上記説明において、該細胞溶解物は、遠心分離、真空、または正の圧力によって発生する力によって、該フィルタプレートの該膜を通過することができる。該フィルタプレートの膜または該フィルタは、ガラス繊維、ポリプロピレンまたはポリオレフィンメッシュ、ウール、および該膜からの如何なる細胞の漏れをも生じること無しに、標的細胞をトラップできるが、サイトゾルmRNAを通すことのできるような孔径を持つ他の膜を含むが、これらに限定されない。例えば、ガラス繊維(Grade 934AH、ケンブリッジテクノロジー社(Cambridge Technology, Inc.))、ウォータータウン、マサーチュセッツ)またはファットマン(Whatman) GFIFグレードのガラス繊維膜を使用して、殆どの培養細胞および白血球をトラップすることができる。上記の例においては、ガラス繊維プレートが好ましい。

40

該溶解バッファーは、細胞膜を溶解するための洗浄剤、RNアーゼ活性を阻害し、またはRNアーゼを不活化しもしくは破壊するためのRNアーゼ阻害剤、およびpH調節剤並びにハイブリダイゼーション用の塩を含むことができる。次に、単離された標的サンプルを、ここに記載したように分析することができる。

50

【0081】

従って、迅速な、経費の掛からない、高い処理量の、かつ容易に自動化できる装置を実現できる。

好ましい一態様では、該細胞取扱いモジュールは、細胞分離または破壊モジュールを含む。この態様は、細胞捕獲領域を利用し、該領域は細胞表面分子を可逆的に結合し得る結合サイトを含み、細胞の特定の型を、該サンプル集団から選択的に単離(または除去)することができる。これらの結合部分は、物理的な吸収または共有結合により、該モジュールの該ヒドロゲルマトリックス内に、または該モジュール内にトラップされた粒子上に、固定化することができる。適当な結合部分は、単離すべきまたは除去すべき細胞の型に依存し、また一般には抗体および他の分子認識成分、例えば細胞表面受容体に対するリガンド等を包含する。このように、特定の細胞型は、更に取扱う前に、サンプルから除去することができ、あるいは該アッセイは、所定の細胞型と特異的に結合し、望ましからぬ細胞型を洗流し、次いで試薬または溶媒の添加により該結合細胞を放出させ、物理的に除去(即ち、高い流量または圧力)し、または現場での溶解さえも行えるように設計される。

10

あるいはまた、細胞「篩」を使用して、そのサイズまたは形状に基いて細胞を分離することができる。これは、様々な方法で行うことができ、その例は、サイズ排除分離を可能にする、表面からの突出物、一連の狭いチャンネル、またはダイアフィルトレーション型の構成の利用を含む。

【0082】

好ましい一態様において、該細胞取扱いモジュールは、細胞除去モジュールを含む。これは、該サンプルが、該アッセイにおいて不必要な細胞を含む場合に、利用することができる。一般に、細胞の除去は、該細胞にとっては小さ過ぎる、該細胞取扱いモジュールから出ているチャンネルによる、上記の「篩作用」と関連するサイズ排除作用に基いて、行われ、また濾過および遠心分離も実施することができる。

20

好ましい一態様においては、該細胞取扱いモジュールは、細胞濃厚化モジュールを含む。当業者には理解されるように、これは、例えば溶解前に大量のサンプル流体から、該細胞を濃厚化するために、「篩別」法を利用して、あるいは遠心分離法を利用して行われる。

好ましい一態様において、本発明のデバイスは、分離モジュールを含む。これに関連して、分離とは、該サンプルの少なくとも一つの成分が、該サンプルの他の成分から分離されることを意味する。これは、該アッセイに依存して、該標的被検体の分離または単離、あるいは該標的被検体の分析を妨害する汚染物の除去を含むことができる。

30

【0083】

好ましい一態様において、該分離モジュールは、クロマトグラフィー型の分離媒体、例えば吸収性の相材料を含み、その例は逆相材料(C_8 または C_{18} 被覆材料等)、イオン交換材料、アフィニティークロマトグラフィー材料、例えば結合性リガンド等を含むが、これらに限定されない。これについては、米国特許第5,770,029号を参照されたい。

好ましい一態様において、該分離モジュールは、細胞分離または被検体の検出に関して、ここに一般的に記載されているように、結合性リガンドを使用する。

該結合性リガンドと結合した該サンプルの成分が、該標的被検体である場合には、pH、塩濃度、温度等における変化、あるいは競合リガンドの添加等を包含する、結合的相互作用の強さに依存して、任意の数の公知技術を使用して、必要により、検出の目的で該被検体を解離することができる。

40

【0084】

好ましい一態様において、該分離モジュールは、米国特許第5,770,029号、同第5,126,022号、同第5,631,337号、同第5,569,364号、同第5,750,015号および同第5,135,627号(これらを、本発明の参考文献とする)に一般的に記載されているように、電気泳動モジュールを含む。電気泳動において、分子は、主としてそれらの異なる分子サイズ、形状および/または電化によって生じる、電気泳動移動度の差によって分離される。マイクロキャピラリーチューブが、最近マイクロキャピラリーゲル電気泳動(高速キャピラリー電気泳動(

50

HPCE))において使用されている。HPCEの一つの利点は、適用された電場によって発生する熱が、大きな表面積のために効率よく散逸され、結果として迅速な分離を可能とすることにある。この電気泳動モジュールは、電場の適用によってサンプル成分を分離するように機能し、該サンプル成分の移動は、その電荷、または該マイクロチャンネルの表面化学的特性に依存して、電気浸透流動(EOF)の結果としてのバルク流体流によって起る。

当業者には理解されるように、該電気泳動モジュールは、様々な形状を採ることができ、また一般に電気泳動用マイクロチャンネルおよび関連する電極を含み、該電気泳動用マイクロチャンネルに電場を印加することができる。必要により、排液出口および流体貯蔵槽が存在する。

【0085】

該電極は、一对の、または米国特許第5,126,022号および同第5,750,015号に記載されているように、複数対の電極対を含む。単一对の電極は、一般に電気泳動路の各端部に一つの電極を持つ。多数の電極対は、サンプル成分の運動を正確に制御して、該サンプル成分が、同時にまたは周期的に複数の電場を、連続的にこうむるように、使用することができる。このような装置は、米国特許第5,858,195号(これを、本発明の参考文献とする)に略述されている。

好ましい一態様では、本発明のデバイスは、少なくとも一つの流体ポンプを含む。ポンプは、一般的に「オンチップ(on chip)」および「オフチップ(off chip)」なる2つのカテゴリーに分けられる。即ち、該ポンプ(一般には、シリンジポンプまたは電極に基くポンプ)は、該デバイス自体内に収容でき、あるいはこれらは該デバイスの取付けられた装置上に含められ、結果的に必要な流動チャンネルの整列を行い、流体のポンプ輸送を可能とすることができる。

【0086】

好ましい一態様では、本発明のデバイスは、少なくとも一つの流体バルブを含み、該バルブはこのデバイスのモジュール内へのまたはそこからの流体の流れを調節できる。様々なバルブが、当分野において公知である。例えば、一態様において、該バルブは、一般的にPCT US97/07880(本発明の参考文献とする)に記載されている如く、キャピラリーバリアを含むことができる。本態様において、該チャンネルは、開口部におけるメニスカス等の、エネルギーを最小化する液体表面の形成を好ましいものとするように設計された、大きな空間に対して開放している。好ましくは、キャピラリーバリアは、チャンバー等の大きな空間に対して開放する直前に、該チャンネルの垂直方向の高さを高める、セキ板を含む。更に、米国特許第5,858,195号(これを、本発明の参考文献とする)に記載されているように、「バーチャル(virtual)バルブ」型のものを使用できる。

好ましい一態様では、本発明のデバイスは、サンプルを包含する流体の導入を可能とする封止部分を、本発明のモジュールの何れかにおいて含み、該サンプルの喪失を回避するために、後に口を閉じることを可能とする。

V. 用途

一旦製造すると、本発明のデバイスは、様々な用途における利用が見出される。好ましい用途は、法医学、化学、突然変位検出、微生物または病原体の検出等を含む。

【0087】

法医学、法化学に関連して、DNA配列の変動のレベルにおける各個人の同定は、指紋、血液型、または物理的な特徴等といった、従来の基準を越える多くの実際上の利点をもたらす。殆どの表現型マーカーとは対照的に、DNA解析は、容易に実父確定検査等に必要とされるような個人間の関連性の推定を可能とする。遺伝的な分析は、骨髄移植において著しく有用であることが立証されており、そこでは密接に関連したドナーとレシピエント細胞との間の識別が必要とされる。2種の型のプローブが、今やDNAプロット法によるDNA指紋照合のために利用されている。多形性ミニサテライトDNAプローブは、異なる個体中に、様々な形状で存在する、多数のDNA配列を同定し、結果として、個体間で複雑かつ著しく変動性のパターンを生成する。VNTRプローブは、ゲノムにおける単一の配列を同定するが、これらの配列は、該同定されたフラグメントのサイズによって識別されるように、人

10

20

30

40

50

類においては、30種までの異なる形状で存在し得る。無関係の個体同士が、多重VNTRに対して同一のハイブリダイゼーションパターンを持つ確率は、極めて低い。DNAプロット法に対して必要とされるよりも少量の組織、一本の毛髪程度でさえも、遺伝子マーカーのPCRに基づく分析に関して十分なDNAを与える。また、分析のために、部分的に分解された組織を使用することもできる。というのは、ほんの少量のDNAフラグメントのみが必要とされるからである。法医学、法化学的なDNA分析は、最終的には、OLA等の簡単な自動化し得るアッセイによって研究できる、多形DNA配列について行われるであろう。各々が2つの異なる形状で該集団中に存在する、22個の異なる遺伝子の分析は、1010個の異なる結果を生成する可能性があり、これはヒト各個人の固有の同定を可能とする。固有の遺伝子、エキソン/イントロン協会、SNPs、mRNA等の検出の結果としての、質量増加の固有のパターンは、固体の固有の同定をもたらす。 10

【0088】

好ましい別の態様では、該デバイスは、腫瘍の診断における用途が見出される。ウイルスまたは細胞発ガン遺伝子の検出は、核酸診断法のもう一つの重要な分野である。ウイルス発ガン遺伝子(v-発ガン遺伝子)は、レトロウイルスによって伝達され、一方その細胞性の片割れ(c-発ガン遺伝子)は、正常な細胞内に既に存在する。しかし、該細胞性発ガン遺伝子は、点突然変異(例えば、膀胱癌および結腸直腸癌におけるc-K-ras癌遺伝子)、プロモータ誘発、遺伝子増幅(例えば、神経芽細胞腫瘍におけるN-myc癌遺伝子)または染色体の再配列(例えば、慢性骨髄性白血病における、染色体9乃至染色体22のc-abl癌遺伝子の転座)等の特定の変性によって、活性化される恐れがある。これら活性化過程の各々は、付随的な縮重過程との関連において、高いかつ制御不能な細胞成長に導く。腫瘍形成(例えば、網膜芽腫(Rb遺伝子)および骨肉腫における)のためには、活性化される必要のある、所謂「潜在性(劣性)の癌遺伝子」は、DNAプローブの助けを借りて検出することもできる。免疫グロブリンおよびT-細胞レセプタ遺伝子に対するプローブを用いて、B-細胞リンパ腫およびリンパ芽球白血病の検出が可能である。故に、本発明は、これらの型の腫瘍を検出するための方法並びにデバイスを提供する。様々な腫瘍マーカーとしての核酸プローブまたは抗体は、腫瘍マーカー検出用の、生活性薬剤として使用できる。 20

【0089】

追加の好ましい態様において、該デバイスは、移植分析における用途が見出される。移植された組織の拒絶反応は、特定の組の組織適合性抗原(HLA)によって、決定的に制御される。これらは、抗原-提示血液細胞、例えばマクロファージの表面上で発現される。HLAと外部抗原との間の複合体は、該細胞表面上の対応するT-細胞レセプタを介して、T-ヘルパー細胞により認識される。HLA、抗原およびT-細胞レセプタ間の相互作用は、複雑な防御反応を開始させ、これは身体上でカスケード状の免疫応答に導く。異なる外来抗原の認識は、抗体反応に類似する該T-細胞レセプタの、可変抗原-特異的領域によって媒介される。移植片の拒絶において、該外来抗原と適合する、特異的T-細胞レセプタを発現するT-細胞は、従って該T-細胞のプールから排除できる。このような分析は、PCRによって増幅され、従って選択的に増大した、抗原-特異的可変DNA配列の同定により可能となる。この特異的な増幅反応は、特異的なT-細胞レセプタの、単一細胞-特異的同定を可能とする。同様な分析は、若年性糖尿病、動脈硬化症、多発性硬化症、リュウマチ関節炎、または脳脊髄炎等の自己免疫性疾患の同定のために、現在実施されている。 30 40

【0090】

追加の好ましい態様において、本発明のデバイスは、ゲノム診断における用途が見出される。全新生児の4%が、遺伝子に欠陥を持って誕生しており、唯一つの遺伝子における変性によって引起される、これまでに記述されている遺伝性の諸疾患3,500例の内の、約400について、主な分子的な欠陥が知られているに過ぎない。遺伝病は、長い間表現型分析(既往症、例えば血液障害：タラセミア)、染色体分析(核型、例えば蒙古症：トリソミー21)または遺伝子生成物の分析(変性タンパク質、例えばフェニルケトン尿症：高濃度のフェニルピルビン酸をもたらす、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ酵素欠乏)によって診断されてきた。核酸検出法の付随的な利用は、ゲノム診断の範囲を著しく広げる。 50

【0091】

幾つかの遺伝病の場合、2つの対立遺伝子の一方の変性が、疾患を起こすに十分であり(支配的に伝達される単一遺伝子欠陥)、多くの場合においては、対立遺伝子両者が、変性される必要がある(劣性伝達単一遺伝子欠陥)。第三の型の遺伝子欠陥において、該疾患の発症は、遺伝子の変性のみならず、食習慣(糖尿病または動脈硬化症の場合)あるいは生活スタイル(癌の場合)等の因子によって決定される。極めて高頻度にて、これらの疾患は、高齢者において起る。精神分裂病、躁うつ病、または癲癇等の疾患も、本発明において述べるべきであり、これらの場合における該疾患の発症が、環境的なファクタ並びに異なる染色体位置における幾つかの遺伝子の変性に依存するか否かを、研究している最中である。直接および間接的なDNA分析を利用した、一連の遺伝病の診断が可能となっている。該

10

【0092】

追加の好ましい態様において、本発明のデバイスは、薬理遺伝学における用途が見出される。薬理遺伝学は、学究的科学から、薬剤の研究および開発のための重要な道具に進化した。従って、新たなパラダイムが、療法に対する好ましい応答を予測する、特別な遺伝的プロフィールによって、患者に標的薬物を与えるまでに進化した。幾つかの遺伝子における特異的なSNPの異なる遺伝子発現レベルが、癌、糖尿病および心臓血管障害の治療にとって有用であり得る。これらの候補遺伝子は、患者およびその疾患のプロフィール作成のために使用して、特定の遺伝子多形性の有無に基いた、最適の治療を施すことを可能とすることができる。疾患の発症を予測するものと思われる遺伝子座に注目して、疾患の進行を止めるように設計された新たな化合物が介入してくるであろうことが、製薬会社の望みである。薬理遺伝学および、薬物研究と組合わせた場合、製薬会社は、遺伝的な背景に基いて、患者の人口を層別化することを可能とする。薬物の開発中、これら同一のマーカーは、新たな薬理化合物の効能または疾患に対する感受性とを結合するのに使用できる。単一遺伝子、多数の遺伝子に置け津古のような変化、例えばSNPまたは発現レベルにおける単純な変化の測定を可能とするためには、測定前のDNA等の生物学的な物質の変性という課題を克服し、広範囲の基本となるアッセイにおけるサンプルの処理数を高め、かつ高度に特殊化された、また高価な装置の使用という課題を克服するのに利用できるように説明された方法を必要とする。

20

30

【0093】

追加の好ましい態様において、本発明のデバイスは、感染症における用途が見出される。感染性疾患の診断のための、組換えDNA法の適用は、ウイルス感染に関して最も広範に探索されており、そこでは、従来の方法は、厄介であり、またその結果が得られるのが遅い。組織または培養細胞の現場でのハイブリダイゼーションは、急性および慢性ヘルペス感染の診断を可能とする。新鮮な、ホルマリンで定着した組織は、侵襲性の子宮頸癌におけるパピロマウイルスの検出およびHIVの検出において適したものであることが報告されているが、培養細胞サイトメガロウイルスおよびエプシュタイン-バーウイルスの検出において使用されている。細菌性疾患の診断に対する組換えDNA法の適用は、コスト-有効性、速さ、および正確性に関する要件が、満たされた場合には、従来の細菌生育法に取って代り得る能力を持つ。組換えDNA手法が、適用され始めた臨床的な状況は、トランスポゾンの存在による、ペニシリン-耐性淋菌の同定、培養条件の難しいクラミジアの生育、食品における微生物、およびある集団による感染の広がり後の簡単な手段の必要性を含む。リーシュマニアおよびマラリア原虫等の寄生虫の関与する疾患の、世界的な疫学的要求は、既に組換え的方法によって満たされつつある。

40

【0094】

追加の好ましい態様において、本発明のデバイスは、遺伝子発現解析における用途が見出される。ここに記載する発明の一つは、単一の測定における、多数の遺伝子の発現(1-1

50

00)を測定するための、高い処理量をもたらす方法である。この方法は、またプロセス当たり100サンプルを越えるサンプルを、並行して処理する能力を持つ。この方法は、薬物のスクリーニング、発生生物学、分子的医薬研究等に適用することができる。従って、本発明の一面において、選択された生物サンプルから、遺伝子の発現パターンを分析するための方法を提供し、この方法は以下のような諸工程を含む：(a) 生物学的サンプル由来の核酸を露出させ；(b) 該露出した核酸と、各々特定のマイクロセンサ上に配置された1種またはそれ以上の選択された核酸プローブとを、該プローブが該核酸とハイブリダイズするのに十分な条件および時間結合させる。ここで、該ハイブリダイゼーションは、特定の核酸プローブと相関性を持ちかつ該DNA-増幅/マイクロセンサ技術により検出可能となる。

10

【0095】

追加の好ましい態様において、本発明のデバイスは、微生物、特異的な遺伝子発現または核酸中の特異的配列の検出において、用途が見出される。該DNA-増幅/マイクロセンサ技術との組合せによる、DNAプローブの使用は、任意の型のサンプルまたは検体中の微生物の有無を検出するのに利用できる。検出可能な核酸は、mRNA、ゲノムDNA、プラスミドDNAまたはRNA、rRNA、ウイルスDNAまたはRNAを含むことができる。

追加の好ましい態様において、本発明のデバイスは、突然変異検出技術における用途が見出される。疾病の検出は、予防並びに治療において、益々重要になっている。多因子遺伝病は、その遺伝子テストを工夫することが困難であるが、200種を越えるヒトの疾患が、単一遺伝子における欠陥、またはしばしば単一にアミノ酸残基の変化により生じている(0 Isen, Biotechnology: 一工業が、年齢から生じる(An industry comes of age), National Academic Press, 1986)。これら突然変異の多くが、変更されたアミノ酸をもたらし、これが疾患状態を生じる。

20

【0096】

これらの点突然変異は、該点突然変異が、ある遺伝子のコード領域に位置している場合には、しばしば単一-ヌクレオチド多型(SNP)またはcSNPと呼ばれる。

感受性突然変異の検出技術は、突然変異のスクリーニングに対して、尋常でない可能性を与える。例えば、分析は、受精卵の移植前においてさえ行うことができる(Holding and Monk, Lancet, 1989, 3:532)。益々効率的になる遺伝子テストは、健康診断に関連する、気道または膀胱から剥ぎ取った細胞の癌性突然変異に関するスクリーニングをも可能にし得る(Sidransky, Science, 1991, 252:706)。また、未知の遺伝子が、遺伝病を引き起こす場合、DNA配列の変異を追跡する方法は、遺伝的な結合分析による疾患の遺伝の研究にとって有用である。しかし、個々の遺伝子の突然変異を検出し、診断することは、技術的並びに経済的な課題をもたらす。幾つかの異なる方法が追求されたが、何れも、真に広く応用されるに十分に、効率的かつ経済的なものではなかった。

30

単一のヌクレオチドの関与する突然変異は、物理的、化学的または酵素学的手段によって、サンプル中で同定できる。一般に、突然変異の検出法は、以前には未知の突然変異に対して適した、走査技術、および既知の配列変異を検出し、識別し、もしくは定量するように工夫された技術に分割でき、後者において、本発明は既知の技術と比較して、多大な進展を示す。

40

【0097】

突然変異は、ゲノムDNAにおける単一の塩基対変化である。本発明の範囲内において、このような変化の殆どは、問題とする配列に相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることによって、容易に検出される。ここに記載する装置においては、2種のオリゴヌクレオチドを使用して、突然変異を検出する。一つのオリゴヌクレオチドは、野生型の配列を持ち、また他方のオリゴヌクレオチドは、該突然変異配列を持つ。これら2種のオリゴヌクレオチドを、野生型標的ゲノム配列上のプローブとして使用した場合には、該野生型のオリゴヌクレオチドは、完全な塩基対型を生成し、また該突然変異オリゴヌクレオチド配列は、単一の塩基対の誤対合を持つ二重螺旋を生成するであろう。

上で論じたように、野生型と誤対合二重螺旋の T_m における6~7 なる差は、これら2つ

50

の型の二重螺旋を、容易に同定または識別することを可能とする。この識別を行うために、ハイブリダイゼーションを、各ハイボトロピック(hybotropic)溶液における該誤対合二重螺旋の T_m において行う。次いで、該オリゴヌクレオチドプローブの組に対する、ハイブリダイゼーションの程度を測定する。該野生型プローブ対該誤対合プローブに関するハイブリダイゼーションの程度における比を測定した場合、10/1~20/1以上なる値が得られる。これらの型の結果は、突然変異検出のための強力なアッセイの開発を可能とする。

【0098】

他の高感度のハイブリダイゼーションプロトコルを使用することもできる。本発明の方法は、細胞、サンプル等に存在するものと推定される、突然変異を含む核酸、即ち、標的核酸について、容易にアッセイすることを可能とする。該「標的核酸」は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)のヌクレオチド配列を含み、その存在が興味の対象であり、またその有無をこのハイブリダイゼーションアッセイにおいて検出することになる本発明のハイブリダイゼーション法は、核酸(RNAおよび/またはDNA)の複合生物学的混合物にも適用することができる。このような複合生物学的混合物は、広範囲に及ぶ原核細胞および真核細胞を含み、原形質体、および/またはポリヌクレオチド核酸を含んでいる他の生物学的物質を包含する。従って、本発明の方法は、組織培養細胞、動物細胞、血液細胞(例えば、網状赤血球、リンパ球)、植物細胞、バクテリア、酵母、ウイルス、マイコプラズマ、原生動物、真菌等に適用できる。既知起源の核酸プローブ間の特異的なハイブリダイゼーションを検出することにより、標的核酸の特異的な存在を立証することができる。

【0099】

核酸の複合集団における標的核酸を検出するための例示的ハイブリダイゼーションアッセイプロトコルは、以下のように説明される：3'末端にSNPを含むプローブを、その5'末端において、1種の活性なマイクロセンサ上のヒドロゲル内に固定化する(プローブ1)。該第一のマイクロセンサの周辺に、第二のマイクロセンサを、野生型の配列を含むプローブと共に固定化する(プローブ2)。2種のプライマを、該潜在的SNPサイトを含むPCR生成物のPCR増幅のために工夫する。通常、該プローブサイトは、これらプライマサイトの一方に近接して位置している。以下の事象が、このチャンパー内で同時に起る可能性がある：1) 上記2種のプライマを用いた、溶液中の標的核酸分子のDNA増幅、2) 増幅された標的核酸分子の、2種の異なるヒドロゲルマトリックス(マイクロセンサ)上に固定化された該プローブ1およびプローブ2とのハイブリダイゼーション。該標的核酸分子は、該固定化されたプローブ配列の3'領域とハイブリダイズすることができ、これにより3'末端を持つハイブリダイゼーション複合体を生成し、3) 変性されたプライマを生成するための、該センサ表面上の固定化された該プローブとハイブリダイズされた該DNAストランドの3'伸張。テストした該DNAが、該SNPサイトを持つ場合、3'誤対合が、該ヒドロゲルマトリックス内の該固定化されたプローブとハイブリダイズした、該DNAストランドの該3'伸張反応を阻害するはずの、プローブ2と比較して、プローブ1は、より一層効率的に、該DNAとハイブリダイズする。テストした該DNAが、SNPサイトを含まない(野生型)場合、3'誤対合が、該センサの表面上の該固定化されたプローブとハイブリダイズした、該DNAストランドの該3'伸張反応を阻害するはずの、プローブ1と比較して、プローブ2は、より一層効率的に、該DNAとハイブリダイズする。これらの観測は、各マイクロセンサの出力シグナル間の周波数の差、または各センサの入力および出力シグナル間の周波数の差によって、直接観測することができる。

【0100】

以下の例は、上記本発明の利用方法をより完全に説明し、並びに本発明の様々な局面を実施するための最良の態様を示すのに役立つ。これらの例は、本発明の真の範囲を何ら限定するものではなく、寧ろ例示の目的で与えられるものである。ここに引用される資料は、全て本発明の参考文献としてここに組入れる。

【0101】

追加の好ましい態様において、本発明のデバイスは、アレルギー(タイプI、タイプII、タイプIIIおよびタイプIV)のインビトロ診断における用途が見出される。ヒト免疫系に関

10

20

30

40

50

する支配的な研究は、内因性および外因性の物質間の識別を行い、また適当な場合には、該外因性の物質の破壊を開始することである。過去の免疫学的方法の開発における発展は、新規な診断および治療上の可能性を繰り返し明らかにした。従って、例えば高度に特異的なモノクローナル抗体は病原性ウイルス、バクテリアおよび寄生体に対する、または病理的な細胞上の変更を検出するための検出器として使用される。更に、最近多くの慢性的疾患が、該免疫系の病理的反応によるものであることが立証された。筋無力症、リウマトイド関節炎、あるいはまた若年性糖尿病等の、所謂自己免疫性疾患においては、その免疫応答が、内因性の細胞および物質に向けられる。同様に病理的なものと分類されているものとして、外因性物質と接触した結果として、身体が過度の免疫応答を開始する場合がある。アレルギーと呼ばれる、それ自体は無害である物質に対するこれらの過敏症は、身体全体に渡る皮膚および粘膜の膨潤を引起し、重篤な場合には、アナフィラキシーショックと関連する、生命を脅かす反応を誘発する可能性がある。

10

【0102】

個々の免疫学的機能の過程の解明は、とりわけ個々の患者の特定のアレルゲンに対する特異的反応の診断は、特に近年において、医学において益々重要になりつつある、研究分野である。

全く共通点のない大多数の方法が、アレルギー反応の検出のために知られている。即ち、例えば血液サンプルをルーチンで採取する。該血液サンプルを採取した後は、これらは、栄養分に枯渇し、即座に死滅する。適当な染色法および免疫学的標識法を用いて、形態学的な変化および特定の抗原の検出から幾つかのアレルギー反応に関する結論を導くことが可能である。しかし、これらの組織病理学的方法は、迅速なアレルギー反応を誘発(タイプI反応と呼ばれる)する、該物質に関する如何なる結論を導くこともできない。同様に、免疫細胞の通常の機能化に関して述べることもできない。本質的に、2つの異なるテスト法が、今日のこれらタイプIアレルギーの診断のために利用されている：即ちIgE、IgGおよびIgAの全量および特定量を測定するための、「皮膚テスト」および「血液テスト」。

20

【0103】

最も広く利用されているものは、皮膚テストである。これらは、存在すると思われるアレルゲンを含む抽出液を、スクラッチまたはプリックにより皮膚に導入するか、あるいはこれらを皮膚上に配置することを要する。次いで、局所的に刺激されたアレルギー反応が、作用を受けた皮膚領域の赤班形成および膨潤として現れる。この皮膚テストは、各時点において均一に行うことが難しく、またその結果は、しばしばこのテストを実施した医師に依存する。これは、誤った正/負の反応を生じる可能性があり、また有害な全身的な反応(アナフィラキシー)を生じる可能性もある。その上、該皮膚テストは、子供および/または皮膚に発疹を持つヒトに対して行うことは困難である。この皮膚テストは、患者に症状が出ている間に行うことは不可能である。幾分かの人々は、引掻いた際に膨れを生じる反応を示し、またそのために、テストする全てのアレルゲンに反応する可能性もある。これらの人々に対しては、この皮膚テスト利用することは不可能である。というのは、皮膚に対してプリックを行った際の作用が、膨れを生じ、また該作用がアレルギー反応によるものではない可能性がある。これらの理由から、科学界では、しばしばこの皮膚テストを、タイプIアレルギーテストに関して利用される他の方法である血液テストに代えることが推奨されている。

30

40

【0104】

今日、多くの医師が、IgE抗体の存在を指摘する補助的手段として、該皮膚テストを利用している。包括的な診断を行うために、既往症の情報および血液サンプルを、更なる分析の目的で採取する。100種を越える異なるアレルゲンに関してテストすることは可能であるが、ルーチンおよび標準的なテストとしては、僅かに10種のアレルゲンのみがテストされる。今日の血液テストは、中規模乃至大規模の研究所において行われている。ファルマーシアダイアグノスティック(Pharmacia Diagnostic)は、ELISA技術に基いた血液テストを行うための、機器並びに試薬を提供している。血液サンプル由来の血清は、ファルマ

50

ーシアユニキャップ(Pharmacia UniCAP)装置を稼動する、地方のまたは地域的なテスト研究施設に送られる。該ユニキャップ100装置は、単一の実験において、最大4種の異なる方法で、48種のテストを行え、これは3時間を要する。IgE媒介アレルギーに関連して、該ユニキャップ装置でテストを実施するためには、以下のテストが必要となる：段階1：アトピー性および非-アトピー性疾患同士の識別を行うこと(アトピー性アレルギーは、喘息、枯草熱および慢性湿疹である)。段階2：次のテストは、血液サンプル中の全IgEを測定することであり、これは全アレルギー負荷および/または該患者のアトピー状態の概観に関する価値ある情報を与える。段階3：正確な診断を行うために、このアレルギー反応の原因となる、特異的なIgEを決定する必要がある。アレルギーによる全抗体および特異的抗体は、インビトロ法、例えば放射性アレルギー吸着テスト(RAST)またはELISAテストにより測定できる。該ヒドロゲル内に、特定のアレルゲンと共に固定化された、表面弾性波センサ技術を使用することにより、今日のELISAテスト等の励起法および他の標識に基く技術と比較して、5-30分以内に特異的なアレルギー(タイプI)テストを行うことが可能である。

10

【0105】

好ましい一態様においては、テストサンプル内の標的アレルゲンの有無を決定するために、該マイクロセンサを使用することができ、その使用方法是、血液、血清または血漿中の特異的標的IgE分子と、固定化されたアレルゲンを有するヒドロゲル表面を含むマイクロセンサとを接触させ、該アレルゲンを該特異的標的IgE分子とハイブリダイズさせて、ハイブリダイゼーション複合体を生成し；入力シグナルを、入力トランスデューサに適用して、該表面弾性波センサ内に表面弾性波を発生させ；出力トランスデューサにおいて、該表面弾性波を受け取り；電子出力シグナルを発生し；および該特異的標的IgE分子が、該テストサンプル内に存在するか否かに関する指標を与える、出力シグナルのパラメータを測定する工程を含む。

20

好ましい一態様においては、テストサンプル内の標的アレルゲンの有無を決定するために、該マイクロセンサを使用することができ、その使用方法是、空気中で生じた標的IgE分子と、該特異的な標的IgE分子とハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション複合体を生成する、固定化されたアレルゲンを有するヒドロゲル表面を持つ該マイクロセンサと接触させ；入力シグナルを、入力トランスデューサに適用して、該表面弾性波センサ内に表面弾性波を発生させ；出力トランスデューサにおいて、該表面弾性波を受け取り；電子出力シグナルを発生し；および該特異的標的IgE分子が、該テストサンプル内に存在するか否かに関する指標を与える、出力シグナルのパラメータを測定する工程を含む。

30

【0106】

好ましい一態様では、テストサンプル内の全IgEの有無を決定するため、該マイクロセンサを使用することができ、その使用方法是、血液、血清または血漿中の全標的IgE分子と、固定化された抗-IgE分子を持つヒドロゲル表面を含むマイクロセンサとを接触させ、該抗-IgE分子を該全標的IgE分子とハイブリダイズさせて、ハイブリダイゼーション複合体を生成し；入力シグナルを、入力トランスデューサに適用して、該表面弾性波センサ内に表面弾性波を発生させ；出力トランスデューサにおいて、該表面弾性波を受け取り；電子出力シグナルを発生し；および該全標的IgE分子が、該テストサンプル内に存在するか否かに関する指標を与える、出力シグナルのパラメータを測定する工程を含む。

40

【0107】

好ましい一態様においては、該マイクロセンサは、抗原の有無を特異的に決定するのに利用でき、ここでは以下のような特異的抗原が、分子認識成分として、食品；アワビ、オールスパイス、アーモンド、アニス、 α -ラクトアルブミン、アンチョビ、アニス、リンゴ、アプリコット、アスパラガス、ナス、アボカド、筍、バナナ、オオムギ、バジル、ローリエ、ビーフ、ビートの根、 β -ラクトアルブミン、クロイチゴ、黒胡椒、クロフサスグリ、ブルーベリー、ブルーベッチ(Blue vetch)、ムール貝、ウシラクトフェリン、ブラジルナッツ、ブロッコリー、メキャベツ、蕎麦、キャベツ、ゴレンシ、キャラウエー、カルダモン、イナゴマメ、ニンジン、カゼイン、カシューナッツ、カリフラワー、セロリ、チ

50

ーズ(カマンベール)、チーズ(チェダー)、チーズ(エダム(Edam))、チーズ(ヤギ)、チーズ(ゴーダ)、チーズ(モールド(Mould))、チーズ(パルミザン)、チーズ(ロクフォール)、チェリー、栗、スイート(sweet)、ヒヨコマメ、鶏肉、チリ、チャブサバ(Chub mackerel)、シナモン、食用二枚貝、クローブ、コチニール抽出液(Dactylophus coccus)、ココア、ココナッツ、タラ、コーヒー、コンアルブミン、キビ(Common millet)、コーン(トウモロコシ)、コリアンダー、牛乳、牛乳(煮沸)、カニ、ツルコケモモ、ザリガニ、キュウリ、カレー粉(サンタマリア(Santa Maria))、ナツメヤシ、イノンド、アヒル、卵、卵白、卵黄、ウナギ、ヘラジカの肉/アメリカヘラジカの肉、ウイキョウの実、生ウイキョウ、コロハ、イチジク、アワ、ガーリック、ショウガ、グルテン、ヤギ乳、グレープ、グレープフルーツ、グリーンピース、アマトウガラシ、グアー[シアモプシステトラゴノロバス(Cyamopsis tetragonolobus)]、グアバ、アラビアガム、

10

【0108】

メルルーサ、オヒョウ、ヘーゼルナッツ、ニシン、ハチミツ、ホップ(フルーツコーン)、馬肉、バラミツ、マアジ属の魚[トラチュラスジャポニカス(Trachurus japonicus)]、ヒエ、ナツメの実、キーウイー、ラングスト(Langust)、ラム/マトン、レモン、ヒラマメ、レタス、ライム、アマ、レイシ、ロブスター[ホマラスガマラス(Homarus gammarus)]、ロバージ(Lovage)、ルピナス種子、マカダミアンナッツ、メース、サバ[スコンバースコンブラス(Scomber scombrus)]、トウモロコシ、モルト、マンダリン、マンゴ果実、ロバのミルク、マヨラナ、ヒラメ、メロン、ミルク、ミルク(煮沸)、粉ミルク(アルフェア(Alfare)、ネスレ(Nestle))、ミント、マッシュルーム、マスタード、マトン、ナツメグ、カラスムギ、タコ、オリーブ[ブラックフレッシュ(black fresh)]、オレアユーロパエア(Olea europaea)、オニオン、オレンジ、オレガノ、オボアルブミン、オボムコイド、牡蠣、太平洋スミイカ(Pacific squid)、パパイア、パプリカ、パセリ、パッションフルーツ、エンドウ、モモ、ピーナッツ、ナシ、ペカンナッツ、柿[ジオスピロスカキ(Diospyros kaki)]、松の実、パインアップル、ピスタチオナッツ、プレース(Plaice)、プラム、ポピー種子、ポーク、ポテト[ソランバムチューバーサム(Solanum tuberosum)]、カボチャ、カボチャ種子、キノア(Quinoa)、ウサギの肉、菜種、ラズベリー、アカフサスグリ、赤インゲン豆、米、バラの実、ライ麦、サフラン、セージ、サーモン、イワシ[サージノップスメラノスティクタ(Sardinops melanosticta)]、イワシ[サージニアピルカルダス(Sardinia pilchardus)]、ホタテ貝、ゴマ、ヒツジのミルク、ヒツジのホエー、シュリンプ、カタツムリ、舌平目、大豆、ハウレンソウ、イカ[ロリゴ(Loligo) spp]、ストロベリー、ヒマワリ種子、テンサイ種子、メカジキ、サツマイモ[イポメアバタタス(Ipomea batatas)]、タラゴン、茶、タイム、トマト、トラガカンスゴム、トラウト、マグロ、七面鳥の肉、バニラ、クルミ、スイカ、小麦、ホエー(ミルクが凝乳を形成した後の液状生成物)、ホワイトビーン、ワイン(赤)、ワイン(白)、酵母、ヨーグルト、

20

30

【0109】

動物のフケおよび上皮；BSA(ウシ血清アルブミン)、セキセイインコの糞、セキセイインコの羽根、セキセイインコの血清タンパク質、カナリアの羽根、ネコのフケ、ネコの血清アルブミン、鶏の糞、鶏の羽根、鶏の血清タンパク質、チンチラの上皮、ウシの糞、鹿の上皮、イヌの糞、イヌの上皮、イヌの血清アルブミン、アヒルの羽根、フェレットの上皮[プトリウスプトリウス(Putorius putorius)]、フィンチの羽根、狐の上皮、アレチネズミの上皮、ヤギの上皮、ガンの羽根、モルモットの上皮、ハムスターの上皮、ウマの糞、ウマの血清タンパク質、ミンクの上皮、マウス、マウス上皮、マウスの尿タンパク質、マウスの血清タンパク質、オウムの羽根、ハトの糞、ハトの羽根、ウサギの上皮、ウサギの血清タンパク質、ウサギの尿タンパク質、ラット、ラットの上皮、ラットの尿タンパク質、ラットの血清タンパク質、トナカイの上皮、ヒツジの上皮、ブタの上皮、ブタの血清アルブミン、ブタの尿タンパク質、七面鳥の羽根、

40

【0110】

樹木の花粉；アカシア、アメリカブナ、オーストラリア松、カンバ、ネグンドカエデ、ヒマラヤスギ、クリ、コモンシルバービーチ(Common silver birch)、ハヒロハコヤナギ、

50

ナツメヤシ、ダグラスモミ、ニワトコ、ニレ、ユーカリ (*Eucalyptus* spp)、ハンノキ (*Grey alder*)、ハシバミ、シデ、マロニエ、セイヨウヒノキ [クプレッサスセンパービレンス (*Cupressus sempervirens*)]、スギ、シナノキ、[チリアコルダータ (*Tilia cordata*)]、ロンドンプラタナス、メラルーカ (*Melaleuca*) [カジェプットツリー (*Cajeput tree*)]、メスキート (*Mesquite*)、ビャクシン (*Mountain juniper*)、クワ、オーク、オリーブ、パロバーディ (*Palo verde*)、ペカン、胡椒の木、松、プリビット (*Privet*) [リグストラムブルガーレ (*Ligustrum vulgare*)]、ジョオウヤシ、トウヒ、モミジバフウ、バージニア産オーク、クルミ、ヤナギ、アメリカトネリコ、ストロブマツ、

【 0 1 1 1 】

樹木花粉 (組換え体) ; Bet v1ピーチ花粉 (組換え体)、Bet v2プロフィリンピーチ花粉 (組換え体)、Bet v4プロフィリンピーチ花粉 (組換え体) ; 草本 : カミツレ、オナモミ、コモンピッグウィード (*Common pigweed*)、ブタクサ (*Common ragweed*)、セイヨウタンポポ、オオバコ [リブウォート (*Ribwort*)]、ニセブタクサ (*False ragweed*)、ファイアブッシュ (*Fir ebush*)、オオブタクサ (*Giant ragweed*)、アキノキリンソウ、アカザ (シロザ)、ハウチワマメ、マーガレット、ヨモギ、イラクサ、パリエタリアオフィシナリス (*Parietaria officinalis*)、バナナ、セイヨウアブラナ、ラフ (*Rough*) テマリカンボク、オカヒジキ [ロシアンシスル (*Russian thistle*)]、リンブン (*Lenscale*)、ギシギシ (*Sheep sorrel*)、テンサイ、ヒマワリ、ヒカゲミズ [パリエタリアオフィシナリス (*Parietaria officinalis*)]、ヒカゲミズ [パリエタリアユダシア (*Parietaria judacia*)]、セイヨウブタクサ、ニガヨモギ、

【 0 1 1 2 】

草本花粉 ; バヒアグラス (*Bahia grass*) [パスパルムノタタム (*Paspalum notatum*)]、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、ギョウギシバ (*Cynodon dactylon*)、コスズメノチャヒキ (*Bromus inermis*)、クサヨシ (*Phalaris arundinacea*)、カモガヤ (*Dactylis glomerata*)、アシ (*Phragmites communis*)、ニセエンバク (*False oat grass*; *Arrhenaatherum elatius*)、セイバンモロコシ (*Sorghum halepense*)、トウモロコシ / コーン (*Zea mays*)、ヒロハノウシノケグサ (*Festuca elatior*)、オオスズメノテッポウ (*Alopecurus pratensis*)、ナガハグサ (*Poa pratensis*)、栽培エンバク (*Avena sativa*)、ホソムギ、コヌカグサ、ベントグラス (*Agrostis stolonifera*)、栽培ライムギ (*Secale cereale*)、ライグラス (*Lolium perenne*)、塩生草 (*Distichlis spicata*)、ハルガヤ (*Anthoxanthum odoratum*)、チモシー (*Phleum pratense*)、ベルベット (*Holcus lanatus*)、栽培用小麦 (*Triticum sativum*)、野生ライグラス (*Elymus triticoides*) ; 草本花粉 (組換え体および精製された天然産品) : rPhl p1チモシー花粉 (組換え体)、rPhl p2チモシー花粉 (組換え体)、rPhl p4チモシー花粉 (天然体)、rPhl p5チモシー花粉 (組換え体)、rPhl p6チモシー花粉 (組換え体)、rPhl p7チモシー花粉 (組換え体)、rPhl p11チモシー花粉 (組換え体)、rPhl p12チモシー花粉 (組換え体)、

【 0 1 1 3 】

カビ ; アルテルナリアアルテリナータ (*Alternaria alternata*; *A. tenuis*)、アスペルギルスフミゲータス (*Aspergillus fumigates*)、アスペルギルスニガー (*Aspergillus niger*)、オーレオバシジウムブルランス (*Aureobasidium pullulans*)、ボトリティスシネレア (*Botrytis cinerea*)、カンジダアルビカンス (*Candida albicans*) (酵母)、セファロスפורウムアクレモニウム (*Cephalosporium acremonium*)、ケトミナムグロボスム (*Chaetomium globosum*)、クラドスפורウムヘルバラム (*Cladosporium herbarum*)、クルブラリアルナータ (*Curvularia lunata*)、エピコッカムパープラッセンス (*Epicoccum purpurascens*)、フサリウムモニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*)、ヘルミントスפורウムハロデス (*Helminthosporium halodes*)、ムコールラセモサス (*Mucor racemosus*)、ペニシリウムフリーケンタンス (*Penicillium frequentans*)、ペニシリウムノーテータム (*Penicillium notatum*)、フォーマベタエ (*Phoma betae*)、ピチロスポラムオルビキュラレ (*Pityrosporum orbiculare*)、リゾパスニグリカンス (*Rhizopus nigricans*)、スタフィロコッカルエンテロトキシン (*Staphylococcal enterotoxin*)、スタフィロコッカルエンテロトキシンA、スタフィロコッカルエンテロトキシンB、スタフィロコッカルエンテロトキシンC、スタフィロコッカルエンテロトキシンD、ステンフィリウムボトリオサム (*Stemphylium botryosum*)、トリコデ

10

20

30

40

50

ルマピリデ(*Trichoderma viride*)、トリコフィトンメントパールインテルディジタル(*Trichophyton ment. var. interdigitale*)、トリコフィトンメントパールケジー(*Trichophyton ment. Var. goetzii*)、トリコフィトンルブラム(*Trichophyton rubrum*)、トリコスポロンブルーランス(*Trichosporon pullulans*)、ウロクラジウムカルタルム(*Ulocladium chartarum*)、ウスチラゴヌダ/トリチシ(*Ustilago nuda/tritici*)、

【0114】

カビ(組換え体)；rASP f1アスペルギルス(組換え体)、rASP f2アスペルギルス(組換え体)、rASP f3アスペルギルス(組換え体)、rASP f4アスペルギルス(組換え体)、rASP f6アスペルギルス(組換え体)；昆虫および蜂毒：ベルリンカブトムシ(*Berlin beetle*)、アカムシ、マルハナバチ、ゴキブリ[ブラテラジャーマニカ(*Blatella germanica*)]、ゴキブリ[ブラテラオリエンタリス(*Blatella orientalis*)]、ゴキブリ[ペリプラネタアメリカーナ(*Periplaneta Americana*)]、ヨーロッパスズメバチ、ファイアーアント(*Fire ant*)、グリーン(*Grain*)コクゾウ、グリーンニミッティ(*Green nimitti*)、ミツバチ、ウシアブ[タバヌス(*Tabanus*) spp.]、ウマバエ[ガステロフィルスインテスティナリス(*Gasterophilus intestinalis*)]、チチュウカイフラワミス(*Mediterranean flour mite*)、蚊(*Mosquito* spp.)、蛾、ポリステス(*Polistes*) spp.(ペーパーワスプ(*Paper wasp*))、ベスプラ(*Vespula*) spp.[コモンワスプ(*Common wasp*)、イエロージャケット(*Yellow jacket*)]、ジガバチ(*Wasp*)、クロスズメバチ(*White-faced Hornet*)、キロスズメバチ、

10

【0115】

家ダニ；グリア(*Greer*) Labs, Inc、ホリスタ-スチア(*Hollister-Stier*) Labs、ホコリダニ；ドメスティック(*Domestic*)：プロミアトロピカリス(*Blomia tropicalis*)、デルマトファゴイデスファリナエ(*Dermatophagoides farinae*)、デルマトファゴイデスマイクロセラ(*Dermatophagoides microceras*)、デルマトファゴイデスプテロニシヌス(*Dermatophagoides pteronyssinus*)、ユーログリファスマイネイ(*Euroglyphus maynei*)、ホコリダニ；ストレージ(*Storage*)、アカルスシロ(*Acarus Siro*)、グリコファガスドメスチカス(*Glycophagus domestucus*)、レピドグリファスデストラクタ(*Lepidoglyphus destructor*)、チロファガスブトレッセンチアエ(*Tyrophagus putrescentiae*)、寄生虫；アニサキス(*Anisakis*)、アスカリス(*Ascaris*)、エキノコッカス(*Echinococcus*)、オキュパチオナルス(*Occupationals*)、化学物質；アバチウッドダスト(*Abachi wood dust*)、アルカラーゼ(*Alkalase*)、 α -アミラーゼ、ブゲインビレア(*Bougainvillea*) spp、プロメリン、トウゴマ、綿実、クロラミンT、エチルオキシド、フィカス(*Ficus*) spp、ホルムアルデヒド/ホルマリン、生コーヒー豆、ヘキサヒドロフタル酸無水物、ヒスタミン、イソシアネートHDI、イソシアネートMDI、イソシアネートTDI、イスパグラ(*Ispaghula*)、ラテックス、リソチーム、無水マレイン酸、マキサターゼ(*Maxatase*)、メチルテトラヒドロフタル酸無水物、パパイーン、ペプシン、ホスホリパーゼ、フタル酸無水物、サビナーゼ(*Savinase*)、天然シルク、廃シルク、ヒマワリ種子、トリメリット酸無水物(*TMA*)、

20

30

【0116】

薬物；ACTH(副腎皮質刺激ホルモン)、アモキシシリン、アンピシリン、セファクロル、キモパバイン、ウシインスリン、ヒトインスリン、ブタインスリン、ペニシリンG、ペニシリンV、プロタミン、スキサメトニウム(サクシニルコリン)、テタヌストキソイド、その他；アルテミシアサリナ(*Artemisia salina*)(魚の餌)、粗製コットン、ダフィナ(*Duphina*)(魚の餌)、ミールワーム(*Mealworm*)[テネブリオモリタ(*Tenebrio molitor*)]、テトラミン(*Tetramin*)(魚の餌)、タバコの葉、精液からなる群から選択されるが、これらに限定されない。

40

好ましい一態様において、該マイクロセンサは、水系病原体、例えばE.コリ0157:H7、リステリア菌およびサルモネラ菌を検出するために利用できる。

好ましい一態様において、該マイクロセンサは、バイオ戦術的検出装置用のハンドヘルド機器におけるセンサ装置として利用できる。

【0117】

VII. 他のバイオセンサ

50

本発明は、SAWの使用に限定されない。カンチレバーまたは表面プラスモン共鳴 (SPR) を、標的被検体と結合した際に、配座変化を示すヒドロゲルとの組合せで、使用することができる。

例示的な態様において、溶液中の化学種の有無を検出するためのバイオセンサは、表面に結合したヒドロゲルを含む、カンチレバーセンサを含有し；該ヒドロゲルは、測定条件下で帯電するペンダント部分を持ち；該ヒドロゲルは、該化学種を検出できる、ヒドロゲル構造内に固定化された、分子認識成分を含み；該カンチレバーセンサは、該ヒドロゲル内に固定化された、該分子認識成分と結合した遊離化学種に起因する、該ヒドロゲル内の体積、寸法または配座変化を検出できる。

好ましい一態様においては、該ヒドロゲルが、該化学種に応答して、体積、寸法または配座変化を引起す、あらゆるバイオセンサを説明する。該ヒドロゲルの体積、寸法または配座が変化した場合、該カンチレバーセンサ表面の変化を、測定された変化と比較して、該化学種の存在を決定するが、ここで該変化は、該化学種と、該分子認識成分との接触により引起され、また該変化は、該化学種の存在と相関している。

10

【0118】

好ましい一態様において、溶液中の化学種の有無を検出するためのバイオセンサは、表面上に設けられたヒドロゲルを含む、表面プラスモン共鳴 (SPR) センサを含み；該ヒドロゲルは、測定条件下で帯電するペンダント部分を持ち；該ヒドロゲルは、該化学種を検出できる、ヒドロゲル構造内に固定化された、分子認識成分を含み；該 SPR センサは、該ヒドロゲル内に固定化された、該分子認識成分と結合した遊離化学種に起因する、該ヒドロゲル内の体積、寸法または配座変化を検出できる。

20

好ましい一態様において記載されるバイオセンサでは、該ヒドロゲルは、該化学種に応答して、体積、寸法または配座変化を引起す。該ヒドロゲル内の体積、寸法または配座が変化した場合、該 SPR センサ表面も変化を受ける。該溶液への暴露に伴うこれらの変化を測定する。これらの変化が、該標的被検体の存在を決定する。

様々な型の標的被検体を検出することができ、これらは、化学物質、溶液中のガス、様々な医学的状态の存在に対応する被検体、生物学的な分子、および医学的診断の分野において重要な被検体を包含する。

【0119】

特定の外的刺激に対して、幾つかのポリマーは、その配座を可逆的に変える。例えば、殆ど全てのポリマーは、溶媒における変化に伴って、幾つかの可逆的な配座変化を生じ、またポリ N-イソプロピルアクリルアミド等の幾つかのポリマーは、温度変化に応答して、配座変化を生じる。該ポリマー主鎖上の側鎖基と相互作用する溶質も、配座変化を誘発し得る。従って、該ポリマーの主鎖に対するイオン化した基の導入は、該ポリマー配座の、イオン強度における変化に対する感度を高める。従って、単一の、特異的な溶質の濃度に応答して、配座を変えるポリマーが、これに、この単一の溶質と選択的に相互作用する官能基を付加することにより、調製することができる。このようなポリマーは、更に架橋剤と混合して、ゲルを製造し、該ゲルは、その製造に使用したポリマーと同様な刺激に対する応答を示す。例えば、これらのゲルは、該構成ポリマーの鎖が、配座変化を生じた際の条件において、体積変化を起こす可能性がある。本発明においては、0.1~50%なる範囲、またはそれ以上の体積変化を意図している。

30

40

【0120】

もう一つの局面において、本発明はセンサデバイスの提供を目的とし、これは特定の化学種に応答して体積変化を起こす性質によって特徴付けられる、ヒドロゲルを含む。本発明の一態様において、このヒドロゲルは、一般に架橋剤、ゲル成分および分子認識成分を含む。該架橋剤は、該ヒドロゲルの他の成分と相溶性の任意の架橋剤であり得る。適当な架橋剤の例は、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、メチレンビスメタクリルアミドおよびエチレングリコールジメタクリレートを含む。N,N'-メチレンビスアクリルアミドが好ましい。CCAにおけるポリマーネットワークの形成に加えて、この段階で使用する架橋剤は、また該ヒドロゲルの生成をも助け、また自己支持性のフィルムをもたらすように、

50

得られるヒドロゲルを強化する。ヒドロゲルは、モノマー混合物100質量部当たり1質量部程度の低い量で、該架橋剤を使用した場合に生成し得る。一般に、架橋剤の量の増大は、該ゲルの、検出すべき被検体に対する感度を低下する。好ましくは、架橋剤は、モノマー質量の約4~15%なる範囲、より好ましくはモノマー質量の約5%なる量で使用する。

【0121】

該ヒドロゲルの相転移特性は、このヒドロゲルを、標的被検体を特異的に結合する試薬で官能化することによって、変えられる。従って、このゲルは、この分子認識成分による刺激の有無を検出するように、変更される。より具体的には、特定の溶質と選択的に相互作用できるモノマーを、該ヒドロゲルに配合する。典型的には、存在する該分子認識成分が多いほど、該デバイスの所定の被検体に対する感度は高い。しかし、この関係は、該分子認識成分のある濃度まで観測されるに過ぎず、その後は、該ゲルの感度は低下する。該所定の溶質に対する分子的識別能力を持つ任意のモノマーを使用することができる。

10

該被検体が該ゲルマトリックスに結合した場合、該マトリックスの親水性における変動を生じ、結果として該ゲルの膨潤特性を変更する。該ヒドロゲルが収縮および膨潤するにつれて、該ヒドロゲル内に包埋されたCCAが、これに続く。

【0122】

更に、第三のモノマー成分を添加して、利用者のニーズによって望まれた場合には、該ヒドロゲルをより一層疎水性または親水性とすることによって、該デバイスの感度を変えることができる。該ゲルが疎水性であればある程、該ゲルはより一層圧潰または収縮された状態になる傾向がある。例えば、NIPAよりも一層親水性の、アクリルアミドを添加することができ、あるいはNIPAよりも一層疎水性の、N-ブチルアクリルアミドを添加して、該ヒドロゲルの特性を調節することができる。

20

本発明のデバイスの製法は、一般に、帯電した粒子が、自発的に結晶性のコロイドアレイを組み立てることを可能とする段階；ゲルモノマーである第一のコモノマー、架橋剤、分子認識成分である第二のコモノマーを、該結晶性のコロイドアレイおよび重合開始剤を含む媒体に添加する工程；および該混合物を重合して、ヒドロゲル内に包埋された結晶性のコロイドアレイを生成する工程を含む。

【0123】

本発明のデバイスを製造するためのもう一つの方法は、一般に、帯電した粒子が、自発的に結晶性のコロイドアレイを組み立てることを可能とする段階；架橋剤、ゲルモノマーおよび重合開始剤を添加する工程；該混合物を重合して、ヒドロゲル内に包埋された結晶性のコロイドアレイを生成する工程；および該ヒドロゲルと結合できる分子認識成分を添加する工程を含む。

30

任意の適当な粒子を使用することができる。例えば、該CCAを製造するのに使用される粒子は、コロイド状ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、二酸化珪素、酸化アルミニウム、ポリテトラフルオロエチレン、または一般的にサイズおよび表面電荷において均一である、任意の他の適当な物質であり得る。コロイド状ポリスチレンが好ましい。該粒子は、最適の整列度および特定の用途にとって望ましい、得られる格子間隔に依存して、選択される。該粒子は、好ましくは約50~500nmなる範囲の径を持ち、また以下に論じるようにして合成するか、あるいは市場から入手できる。

40

【0124】

単分散性粒子コロイドは、乳化重合法または任意の他の方法で製造できる。例えば、エマルションポリマーコロイドは、該所定のモノマーと、架橋剤と、該エマルションを生成するのに役立つ界面活性剤、該溶液のpHを一定に維持し、かつ粒子の凝結を防止するバッファーおよび重合を開始するための遊離基開始剤を混合することにより製造できる。好ましい態様において、該モノマーは、スチレンであり、該架橋剤は、ジビニルベンゼンであり、該界面活性剤は、ナトリウムジ(1,3-ジメチルブチル)スルホサクシネートであり、該開始剤は、好ましくは過硫酸カリウムであり、イオン性コモノマーも添加し、該コモノマーは、好ましくは1-ナトリウム,1-アリルオキシ-2-ヒドロキシプロパンスルホネートである。相溶性の問題が起らない限り、他の適当な化合物を、該エマルションポリマーコロイ

50

ドの製造に利用することができる。次いで、これらの粒子は、遠心分離、透析および/またはイオン交換樹脂を使用して、精製すべきである。市販品として入手できる粒子の精製も、必要とされる。

【0125】

重合に引続き、該粒子は、イオン交換樹脂内で、好ましくはイオン交換樹脂の10%懸濁液、例えばカリフォルニア州、リッチモンドのバイオ-ラド社(Bio-Rad)から市販品として入手できる、分析グレードのAG51X8混合床樹脂の浴内で、保存することができる。好ましくは、このイオン交換樹脂は、その使用に先立って、Vanderhoff等, J. Colloid & Interface Sci., 1968, 28:336-337に記載されたような、適当な手順によって、清浄化すべきである。

10

次いで、これらの電氣的に帯電した粒子を、自発的な組立てにより、結晶性のコロイド状アレイを生成させる。このアセンブリーは、適当な溶媒、好ましくは水中で行われる。次いで、このCCA媒体に、ゲルモノマー、分子認識成分、架橋剤および重合開始剤を添加する。任意の適当な開始剤、例えば熱的開始剤、または光開始剤を使用することができる。好ましくは、UV光開始剤を使用する。この用途にとって好ましい、UV光開始剤は、2,2'-ジエトキシアセトフェノンである。上に論じた、任意の架橋剤、ゲルモノマーおよび分子認識成分を使用することができる。

【0126】

製造後、引続き該混合物を重合する。その重合法がCCAを破壊しない、さもなければ不規則化しない限り、任意の当分野において公知の手段を利用して重合を開始することができる。好ましくは、この重合は、この混合物を、二枚のプレート、好ましくはパラフィルムスペーサで分離された石英プレート間に配置することにより、約0-10 °Cなる範囲の温度にて行われる。次いで、これらのプレートを、UV光に暴露する。このUV光への暴露は、約15分後に完全な重合を行う。この重合の完了時点において、該プレートを取外し、安定な重合されたCCA(PCCA)を得る。このフィルムの厚みは、約150 μm (0.15mm)であり、またユーザーの要求に応じて更に薄くすることも可能である。

20

厚み約150 μm を持つ、好ましい態様としての該ヒドロゲルの応答速度は、典型的には約5分未満である。応答速度は、該ヒドロゲルの厚みを減じることによって、改善することができる。この応答速度は、該ゲルへのカチオンの物質輸送によって、部分的に決定され、また部分的に錯化速度によって決定される。該ゲルの厚みおよび該ゲルのモノマー含有率を減じると、該ゲル上の活性サイトへの、被検体の質量輸送率が著しく増大し、および結果として応答時間が減少する。応答速度は、また使用する分子認識成分によっても影響され、その幾つかは、他のものよりも一層選択的である。約1-5分間の応答速度は、厚み150 μm のゲルによって達成でき、また秒のオーダーの応答速度は、より薄いゲルによって達成できる。この応答速度は、該ゲルの厚みに対して反比例する。

30

【0127】

本発明のもう一つの態様では、該CCAが重合されている該ヒドロゲルは、架橋剤、ゲルモノマーおよび生体分子識別成分を含む。この生体分子識別成分は、その生物学的機能の一部として、特定の化学種と、選択的に結合する生体分子である。この成分は、直接または1種またはそれ以上の結合分子によって、該ゲルと結合することができる。このような生体分子識別成分の例は、酵素、抗体、抗原、ポルフィリン、フェリチンまたはフェロモンレセプタを含むが、これらに限定されない。これら天然の識別成分は、簡単な化学種に対して、または特定のタンパク質の存在に対して応答できる。従って、これらのセンサデバイスは、更に該生体分子識別成分を、該ゲルモノマーに結合する、1種またはそれ以上の結合分子を含むことができる。更に、該生体分子識別成分は、該結合剤または該ゲル自体と結合できる分子と、反応させることにより、変性することができる。特に好ましい結合分子は、5-(ピオチンアミド)ペンチルアミンであり、また該生体分子識別成分との反応にとって好ましい分子は、アビジンであり、アビジンは、卵白から抽出されたタンパク質であり、またピオチンに対する4つの結合サイトを持つ。本態様のセンサデバイスは、疾患のマーカー検出分野における、例えばトロポニンI抗体の有無を検出する上で、特別な

40

50

用途を持つ。このゲルは、該識別要素が、高い結合定数を持つ場合には、種の極めて低い濃度に対して、高感度であり得る。

【0128】

例えば、抗原をゲルモノマーに添加して、トロポニンI、トロポニンT、結核細胞、癌細胞等の抗体と結合する、ヒドロゲルを製造する。該抗原は、どのような医学的状態を検出するかに基いて選択される。医学的な診断の目的で、酵素を、該ゲルに結合することも可能である。例えば、該ヒドロゲルへのグルコースオキシダーゼの結合は、グルコースの検出を可能とするであろう。従って、このような本発明の態様は、医学的診断手段としての用途を持つ。上記の如く、該センサの感度は、ゲルモノマー対認識成分の比、架橋度および該ゲルモノマーの疎水性の度合いを変えることによって、所定の濃度に調節することができる。疎水性の度合いは、ユーザーの要求に応じて、該ゲルモノマーの疎水性よりも高い、または低い疎水性を持つ、別のモノマーを添加することによって、上記のように調節することができる。

10

該抗体および抗原に基くセンサは、上で論じた化学的センサと、極めて類似する様式で機能する。

【0129】

酵素に基くセンサの場合、該酵素は、まず被検体基質と結合し、次いで開裂し、あるいは該被検体基質と反応することにより、該被検体の化学的性質を変更する。この酵素を基本とするセンサのゲルは、該ゲルの内部が、高濃度の反応生成物および低濃度の被検体基質を含むので、膨潤し、一方該ゲルを取巻く液体は、逆の特徴を持つ。これは、該ゲルの内側と外側との間に、浸透圧の不均衡を生じる。溶媒、好ましくは水は、該ゲル内に拡散して、この圧力の不均衡を軽減するが、そのため溶媒過剰となり、該ゲルは膨潤する。該基質の新たな溶液に浸漬した場合、該センサは、再度膨張する。従って、該センサのこの応答は、その直に接する環境内の基質の濃度および量に依存する。

20

【0130】

本発明の更に別の態様では、相互侵入ネットワーク(IPNs)を利用して、PCCAへの重合に先立って、該CCAの所定の自発的組立てとは、通常非-相溶的である、認識要素を含むヒドロゲルを生成し得る。例えば、幾つかの分子識別機能を持たされたコモノマーをイオン性のものとし、またCCAの自発的な組立てに必要とされる、コロイド粒子の静電的反発相互作用を遮断することができる。この場合、該センサは、2段階において製造される。まず、緩く架橋されたPCCAが、該分子認識要素無しに形成される。このPCCAの生成後に、該認識要素を含む官能化されたモノマーが、該既存のPCCAネットワーク内に拡散する。次いで、第二の重合が起り、そこで該第二のネットワークのポリマー鎖が、該第一ネットワークの空洞内に相互侵入ネットワークを生成する。該IPNの第二のネットワークは、該被検体の存在にตอบสนองして収縮または膨潤し、また該PCCAは、これら2つのネットワークの物理的な絡み合いによって、該第二のネットワークと共に膨張し、あるいは収縮する。

30

本発明は、また体積変化に対して静電的な相互作用を利用しないが、代わりにNIPA-様のヒドロゲルの、非-イオン性の体積性相転移現象を利用する。

以下の実施例は、上記本発明の利用法をさらに完全に説明するのに役立つ、しかも様々な本発明の局面を実施するのに最良の態様を提示するのに役立つ。これら実施例は、本発明の真の範囲を何ら限定するものではなく、寧ろ例示の目的で提示されるものである。ここに引用する全ての資料は、本発明の参考文献とする。

40

【実施例】

【0131】

以下の非-限定的な実施例は、上記本発明の利用法をさらに完全に説明するのに役立つ。これら実施例は、本発明の範囲を限定するものではなく、寧ろ例示の目的で提示されるものである。

実施例I：機器の組立てにおける単一成分の簡単な説明

SAWセンサの設計：特別に設計し、構築した610MHzのSAW共鳴共振器は、図10、11緒12に示すような構成を有していた。インターデジタル電極は、リチウムタンタライトを含む圧

50

電式支持体上に設けた。これらのインターデジタル金電極間の間隔は、約 $1\mu\text{m}$ (図12)である。各SAWセンサは、電気的な絶縁および化学的な結合を目的として、厚み50nmの SiO_2 で被覆した。図12に示すように、この SiO_2 の薄層を見ることができる。

【0132】

カートリッジの設計：2つのSAWセンサを組立てて、図5～9に示したような、特別なカートリッジとした。このカートリッジは、特別に設計したプリントカードからなり、ここで該2つのSAWセンサは、標準的なフリップ-チップ技術(図5～8)によって結合された。該2つのSAWセンサからの全ての電気的な接続は、図5～6に示すような構成であった。2つの特別に変性したPMMAブロックを、該プリントカードの各サイドと結合させて、図8に示すように、該2つのSAWセンサと接続する流動チャンネルを生成した。このカートリッジの収縮は、流動実験および非-流動実験両者の実施を可能にする。

10

電子的設計：各SAWセンサを、図13に示すような電子回路によって、作動させた。各SAWセンサ回路の出力部を、2-チャンネル周波数計数器HP[アジレント(Agilent)] 53131Aに接続した。別の特別な設計の電子回路は、この周波数計数器をバイパスするように組立てた。

ソフトウェア：周波数計数器HP[アジレント(Agilent)] 53131Aを使用して、該SAWセンサ(検知)とSAWセンサ(基準)との間の差を測定する、特別なプログラムを、アジレント製のソフトウェアVEE内に組込んだ。X-軸上の時間対Y-軸上の Δ 周波数の曲線が表示された。同社の作成したソフトウェアおよびナショナルインスツルメンツ(National Instruments)社から入手したLabVIEWソフトウェアの何れかを使用した。これら2つのSAWセンサ間のシグナルにおける差を、以下のようにして記録した。

20

Δ 周波数 = SAWセンサ(基準) - SAWセンサ(検知)

【0133】

実施例II：二本鎖 λ DNAを用いた空の表面弾性波センサ表面の変性

本実施例の目的は、10.000ds-DNA分子を、該表面弾性波センサ表面に結合した効果を明らかにすることである。

SAWセンサの清浄化：真空蒸着チャンバーから取出された任意の SiO_2 表面が清浄であるとは、全く考えられず、従ってこれを清浄化するために、幾分かの努力を必要とする。このマイクロセンサ系の極めて高い感度は、全ての測定を、該SAWセンサ表面への物質の結合および該表面からの物質の離脱を、厳密に制御する条件の下で行うことを要求する。該SAWセンサ表面を清浄化して、シグナルの妨害を最小化することは極めて重要である。というのは、該SAW表面にランダムに結合した、または該表面から離れる可能性のある不純物が、該意図するシグナルを妨害するからである。0.1M NaOHおよび1% Triton X-100溶液を、該カートリッジ内に注入して、少量の表面汚染物質を効率よく除去した。該カートリッジをその後水洗した。

30

該 SiO_2 表面のスルフィドリル-シリル化：95%エタノール/5%水溶液を、酢酸でpH 5.0に調節する。3-(メルカプトプロピル)トリメトキシシラン溶液を、攪拌しつつ添加して、最終濃度2%の溶液を得る。この溶液を5分間攪拌して、加水分解し、かつシラノールを生成させた。各SAWセンサを、この溶液と5分間接触させる。このSAWセンサを、エタノール中で濯ぎ、また室温にて一夜放置して、硬化させる。

40

【0134】

遊離SH基へのGMBSの結合：DNA分子上の遊離アミノ基を結合するために、該アミノおよびスルフィドリル反応性クロスリンカー分子GMBSを、遊離の表面に結合したスルフィドリル基と結合させる。該検知用のSAWセンサを、1Xカップリングバッファー(5Xカップリングバッファー；100mMのHepes、750mMのNaCl、50mMのEDTA, pH 7.1)中の19mM GMBSと、90分間接触させる。該検知用のSAWセンサを、水で濯ぎ、室温にて一夜放置して、硬化させる。その構成を図2Aに示す。この場合の分子認識剤は、該DNA分子である。

アミノ基で変性された両末端を持つ、10,000bpの二本鎖 λ DNAフラグメントを、5'アミノ変性プライマ：アミノ-5'-ATA TAC CGA AGA GGC GCA GA-3'および「マングラー(mangler)」を用いたPCR法を利用して構築した。

50

該λ DNAフラグメントは、13Bg1I内部サイトを含む。このDNAフラグメントを、PCR増幅後に、キアゲン(Qiagen) PCR精製キットを用いて精製した。該DNAフラグメントの濃度を、0.1 μg/mlに調節した。

この10,000bpのDNAフラグメントを、両SAWセンサを収縮する該カートリッジ内に注入する。1時間後に、>500,000HzのΔ周波数における変化が、観測された。

標準的な濃度の制限酵素Bg1Iを含む混合物を、これら2つのSAWセンサを接触させるための該カートリッジ内に注入した。この酵素は、図2Bに示すように、該DNAフラグメントを、13の異なる内部位置において切断する。1時間後に、これら2つのSAWセンサ間の、Δ周波数シグナルが、以下の表1に示すように、ベースラインレベルに戻された。

10

【0135】

【表1】

	実験開始時点におけるΔ周波数	10,000bpのDNAフラグメント注入後のΔ周波数	BgI制限酵素混合物注入後のΔ周波数
Δ周波数シグナル	安定なベースラインシグナル	>+500,000Hz	ベースラインレベルへの復帰

20

【0136】

実施例III：オリゴヌクレオチドアクリダイトリンクを介して、表面弾性波センサ表面に結合した、重合アクリルアミドを利用する、空の該表面弾性波センサ表面の変性

清浄化、スルフヒドリル-シリル化およびSAWセンサ表面へのクロスリンカー分子GMBSの結合に関して、実施例IIと同一の手順を用いた。

内部HinP1 Iサイト、5'末端のアクリルアミド基(アクリダイト)および3'末端のアミノ基を持つ、特別に設計した25塩基を含むオリゴヌクレオチドは、インテグレートDNA テック社(Integrated DNA Tech Company)から購入した。

このオリゴヌクレオチドは、該検知SAWセンサのみと接触する上記カートリッジに注入し、室温にて90分間インキュベートした。このSAWセンサ表面を、水で濯ぎ、次いで風乾した。

30

5% (w/v)アクリルアミド/ビスアクリルアミドモノマー、UV開始剤(2,2'-ジエトキシアセトフェノン)を、PBSバッファー中に含有する共重合混合物の溶液(2×10 μl)を、図3Aに示したように、該カートリッジにおける2つの注入口を介して、これら2つのSAWセンサに、重層した。

これら2つのSAWセンサを、UV光に暴露し、同時にΔ周波数シグナルを検出した。

以下の表2に示すように、このΔ周波数は、上記のポリアクリルアミド光重合法によって、著しい影響を受けた。

【0137】

【表2】

	実験開始時点におけるΔ周波数	ポリアクリルアミド光重合工程後のΔ周波数	HinP1 I制限酵素混合物注入後のΔ周波数
Δ周波数シグナル	安定なベースラインシグナル	>+500,000Hz	ベースラインレベルへの復帰

40

【0138】

標準的な濃度の、制限酵素HinP1 Iを含む混合物(2×10 μl)を、上記2つのSAWセンサに重層した。この制限酵素は、該プライマーを、ポリアクリルアミドアンカーが、図3Bに示

50

したように、該SAWセンサ表面から遊離するように、切断した。1時間経過後、これら2つのSAWセンサ間の Δ シグナルは、表2に示したように、ベースラインレベルに復帰した。

実施例IV：抗体/抗原リンクを介して表面弾性波センサ表面に結合した、重合アクリルアミドを用いた、空の該センサ表面の変性

図4Aに示したように、該SAW検知センサ表面は、該GMBSクロスリンカー分子に結合したアミノ基を介して、特異的な抗体と結合している。メタクリル酸-変性抗原は、該表面に結合した抗体とハイブリダイズされる。既に結合しているメタクリル酸-変性抗原が、重合工程に関与している、重合されたポリアクリルアミドのフィルムを、図4Aに示したように、該SAWセンサの上部に配置する。あらゆる遊離の抗原被検体は、該結合したメタクリル酸-変性抗原と競合し、結果として、図4Bに示したように、該SAWセンサ表面由来の該ポリアクリルアミドのフィルムを遊離する。この遊離は、 Δ 周波数のシフトをもたらし、また結果的に特定の特異的な抗原の存在を示す指標となる。

10

【0139】

該被検体に対する該抗原は、A.Yu. Rubina等, Bio Techniques, 2003, 34(5):1009に記載されているように、以下の本質的な手順の後の、メタクリル酸-変性される。タンパク質溶液(0.01Mのホウ酸塩バッファ中にて、濃度20 μ Mの溶液100 μ L、pH 9.3)を、ジメチルホルムアミド(DMF)に分散させた、6-メタクリルアミノヘキサン酸のN-ヒドロキシサクシンイミドエステル、0.1-10mM溶液29 μ Lと混合し、この混合物を室温にて1/2~2時間攪拌した。このタンパク質：変性剤のモル比は、1:1~1:100なる範囲内で変えた。この変性されたタンパク質を、セファデックスG25を使用した、マイクロバイオ-スピン(micro bio-spin)カラム上で精製するか、あるいは精製することなく、該反応混合物中での共重合のために使用した。

20

【0140】

実施例V(理論上の実施例)：アクリルアミド/シラン含有分子を介して、表面弾性波センサ表面に結合した、フォトリソニック結晶検知モチーフ(PHOTONIC CRYSTAL SENSING MOTIF)を用いた、空の該センサ表面の変性

本実施例は、重合された結晶性コロイド状アレイを用いた、SAWセンサがどのように機能するかに関する、理論上の実施例である。

一端にアクリルアミド基(アクリライト)を、および他端にシラン基を持つ、特別に設計した分子(以下においては、結合分子と呼ぶ)を設計すべきである。

30

該結合分子を、SiO₂で覆われた該SAWセンサ表面と接触する、該カートリッジ内に注入し、室温にてx分間インキュベートした。該結合分子は、該シラン基を介してSiO₂表面と結合するであろう。該SAWセンサ表面を、洗浄剤溶液中で濯ぎ、次いで風乾した。

高度に帯電した単分散ポリスチレンコロイド、アクリルアミド/ビスアクリルアミドモノマー、UV開始剤(2,2'-ジエトキシアセトフェノン)およびメタクリル酸-変性抗体を含む共重合混合物の溶液を、該検知SAWセンサ表面へのアクセスを可能とする注入用の入口を介して、該検知SAWセンサ表面に重層した。

【0141】

高度に帯電した単分散ポリスチレンコロイド、アクリルアミド/ビスアクリルアミドモノマー、UV開始剤(2,2'-ジエトキシアセトフェノン)を含むが、メタクリル酸-変性抗体を添加されていない、共重合混合物の溶液を、該基準SAWセンサ表面へのアクセスを可能とする注入用入口を介して、該基準SAWセンサ表面に重層した。

40

該検知表面は、図1Aに示されている。

これら2つのSAWセンサ表面は、UV光に暴露することにより、光重合させた。

これら2つのSAWセンサの頂部にこの特異的な抗原を添加することによって、該抗原は、該ヒドロゲルマトリックス内を拡散し、また図1Bに示すように固定化酵素と結合する。この事象は、該ヒドロゲルの配座変化を引起し、結果的に該検知SAWセンサを動作させる。

この配座変化は、大きな Δ 周波数シフトをもたらし、結果として該特定の抗原の有無の指標となる。

【0142】

50

実施例VI：一つのSAWセンサに及ぼす水効果(減衰)

水の存在下または不在下で、一つのSAWセンサについて簡単な測定を行った。図14に示したように、水を該カートリッジに注入した後には、殆ど減衰作用は見られなかった。

結果および論考

実施例Iは、完全な作業性SAWに基く検出機器の構成を示した。実施例IIおよび実施例IIIは、弾性層表面上のインターデジタル金電極が、該電極間のDNA架橋等の表面変性の著しい影響下にあり、また該電極がポリアクリルアミドフィルムで上塗りされていることを明らかにした。実施例IVおよびVにおいては、理論上の実施例によって、インターデジタル電極の変性に基く、センサ装置の組立てのために、これらの特徴をどのように利用し得るかを示している。実施例VIにおいては、水の存在下における、該SAWセンサの優れた性能を示した。

10

【0143】

実施例VII：スタフィロコッカスオーレウス(STAPHYLOCOCCUS AREUS由来の、少量のプロテインAの測定

本例は、SAW共鳴センサユニットの製法を説明するものであり、この方法は、センサ表面に、ヒドロゲルマトリックスおよび/または抗体溶液を適用し、該ヒドロゲルマトリックスおよび/または抗体溶液を重合させ、PBSバッファー中のプロテインAの濃度8pg/mlにおいて、該抗体/ヒドロゲルマトリックスと抗原との間で相互作用させる工程を含む。

センサユニットは、2つのSAW共鳴体からなり、図15に示すように、その一つは基準(抗体を検出することはない)として機能し、また他の一つは、検知センサ(抗体の検出を行う)として機能する。

20

【0144】

一つのセンサユニットを構成するこれら2つのSAW共鳴体は、610MHzにて振動し、また図15に示すように、フリップ-チップ技術を利用して、特別な金被覆基板上で、電子的に組み立てられる。

このセンサユニットは、2つの別々の段階で作成される：

段階1：該センサユニットに、ヒドロゲル/抗体マトリックスを適用する。

段階2：該重合された抗体/ヒドロゲルマトリックスと、抗原(本例ではプロテインA)との間の検出段階。

段階1においては、別々の溶液が、該センサ表面に直接添加される。

30

段階2においては、該センサユニットは、流動系内で組立てられ、また被検体は、流量25μl/分にて、該2つのセンサ表面に注入される。

【0145】

段階1：該センサユニットへの、抗体/ヒドロゲルマトリックスの適用

プロテインA(ab7243, アブカム(abcam))に対する、アクリレート化ヤギポリクローナル抗体の調製：100μlの抗体溶液(濃度：1mg/ml)の、エッペンドルフ(Eppendorf)チューブへの添加。

更に、90μlのPBSおよび10μlのN-アクリルオキシサクシンイミド溶液(濃度：1μg/ml)の添加。

37 における1時間のインキュベーション。

40

そのまま使用可能、4 にて保存。

0.25%の光開始剤溶液の調製：1.0gのイルガキュア(Irgacure) 2959[チバススペシャルティケミカルズ(Ciba Specially Chemicals)]の、400mlのPBSバッファー(標準)への添加。

該光開始剤が、溶解するまで、攪拌下で80-90 まで昇温。

4 にて保存。

ヒドロゲル溶液の調製：100μlのポリ(エチレングリコール)ジアクリレート(アルドリッチ(Aldrich) 437441)の、9.9mlの標準PBSバッファーへの添加。

8.0mlの上記溶液と、2.0mlの0.25%光開始剤溶液との混合。該ヒドロゲル溶液は、今や直ぐに使用できる状態にある。

50

【0146】

抗体/ヒドロゲル溶液の調製：80 μ lのヒドロゲル溶液と、20 μ lのプロテインAに対するアクリレート化ヤギポリクローナル抗体(濃度：500 μ g/ml)との混合。該抗体の最終濃度：100 μ g/ml。この溶液を、「抗体/ヒドロゲル溶液」と呼ぶ。

80 μ lのヒドロゲル溶液と、20 μ lのPBSとを混合。この溶液を「ヒドロゲル溶液」と呼ぶ。

4 μ lの該抗体/ヒドロゲル溶液の、該検知用SAW共鳴体への添加(図15(1))。

4 μ lの該ヒドロゲル溶液の、該基準SAW共鳴体への添加(図15(2))。

このセンサユニットの200秒間のインキュベーション。

波長365nmのUV光源の、200秒間に渡る稼動(ビルバーロアマット(Vilber Lourmat) M03 5950)。

該センサユニットの2つのSAW共鳴体表面に、3 $\times$ 4 μ lのPBSバッファをピペットで適用することによる、各SAW共鳴体の3度に渡るPBSバッファでの洗浄。

図21は、矢印で表示された該検知用SAW共鳴体に適用された、該抗体/ヒドロゲル溶液を示す。理解されるように、周波数は、約250,000Hzに減少する。これは、該SAW共鳴体構造への、該抗体/ヒドロゲル溶液の吸収によるものであると考えられる。重合反応を、該抗体/ヒドロゲル溶液について示す。波長365nmの該UV光源による暴露は、時間0秒において開始される。例示可能であるように、約150,000なる特性周波数の降下は、約80秒後に観測される。これは、該IDT構造間での、該抗体/ヒドロゲル溶液の重合反応の主要部分によるものと考えられる。

【0147】

段階2：該重合された抗体/ヒドロゲルマトリックスと、抗原(本例ではプロテインA)との間の検出段階

1. プロテインA溶液(濃度：8pg/ml)の調製：5mgのプロテインAを溶解する。
2. 5mlのPBSバッファ中の(シグマ(Sigma) P60319)。
3. 2 μ lの上記溶液の、998 μ lのPBSバッファへの添加。
4. 2 μ lの上記溶液の、998 μ lのPBSバッファへの添加。
5. 2 μ lの上記溶液の、998 μ lのPBSバッファへの添加。
6. PBSバッファ中の、プロテインAの最終濃度：8pg/ml。

このセンサユニットは、図15に示されているように、流動系において組立てられ、またPBSバッファの流れは、25 μ l/mlなる流量で開始される。安定なベースラインが得られた後に、該被検体(プロテインA)を、該センサ表面上に、濃度：8pg/mlにて注入される。

図18は、上記抗体/ヒドロゲルマトリックスを含むIDTを示す。図19には、被検体(プロテインA)との相互作用が示されている。該抗体と被検体との直接的な相互作用(質量負荷)および抗体/被検体間に相互作用が生じた際の、ヒドロゲル構造の変化両者が、極めて低い被検体濃度において、極めて高感度での周波数応答が得られる理由であると、考えられる。

【0148】

図22は、該2つのSAW共鳴体上でのプロテインAの応答を示す。左Y-軸には、実際の周波数応答を観測することができる。右Y-軸には、これら2つのSAW共鳴体間の差分周波数応答を観測することができる。X-軸上の時間は、秒単位である。プロテインAサンプルは、約230秒後に注入する。

ここにおいて引用したあらゆる刊行物、特許、および特許出願は、これら各刊行物、特許、および特許出願具体的に、かつ個々に参考文献であることが明記された場合と全く同じように、あらゆる目的に対して、その全体を、参考文献として、本明細書に組入れる。

上記の発明は、その理解の明確化を目的として、例示および実施例として幾分詳細に説明してきたが、当業者には、本開示の精神並びに範囲を逸脱すること無しに、本発明の教示に照らして、上記した本発明に幾分かの変更並びに改良を施し得ることは容易に理解される。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 1 4 9 】

【図 1 A】図 1Aは、結合された薄い3次元フィルム構造を持つ、SAWセンサ表面を模式的に示す図であり、該構造は、分子認識成分を含有するヒドロゲル内で重合された、帯電した粒子の結晶性コロイド状アレイを含む。(1) SAWセンサ表面；(2) 該表面上の金 IDT；(3) 一端にシラン基を有し、また他端にアクリルアミド基を持つアンカー分子；(4) 該コロイド状帯電粒子；(5) 該重合されたアクリルアミド網状構造；(6) 分子認識成分。

【図 1 B】図 1Bは、帯電粒子の結晶性コロイド状アレイを含有する、結合したヒドロゲルを含む、SAWセンサ表面を模式的に示す図である。

【図 2 A】図 2Aは、各 DNA 分子内のアミノ基の、クロスリンカー分子 GMBS とのカップリングを通して、該 SAW 表面上の SiO_2 薄層に結合した、分子認識成分を含む、該 SAW センサ表面を模式的に示す図である。(1) SAW センサ表面；(2) 該表面上の金 IDT；(3) 3-(メルカプトプロピル)トリメトキシシラン；(4) GMBS クロスリンカー；(5) 該アミノ基を介して該 SAW 表面に架橋された、該分子認識成分。 10

【図 2 B】図 2Bは、各 DNA 分子内のアミノ基の、クロスリンカー分子 GMBS とのカップリングを通して、該 SAW 表面上の SiO_2 薄層に結合した、10,000bp の DNA 分子を含む、該 SAW センサ表面を模式的に示す図である。本図において、該 10,000bp の DNA 分子(5)は、制限酵素 BglI によって切断されており、この特定の酵素は、該 DNA フラグメントの幾つかの内部位置を切断した。

【図 3 A】図 3Aは、内部 HinP1 I サイト、5'末端におけるアクリルアミド基(アクリダイト)および3'末端におけるアミノ基を持ち、リンカー分子(3)および(4)を介して SAW 表面に結合した、特別に設計された25塩基を持つオリゴヌクレオチドを有する、SAW センサ表面を模式的に示す図である。この特別なオリゴヌクレオチドは、アクリルアミド重合過程(6)に関与する。(1) SAW センサ表面；(2) 該表面上の金 IDT；(3) 3-(メルカプトプロピル)トリメトキシシラン；(4) GMBS クロスリンカー；(5) 内部 HinP1 I サイト、5'末端におけるアクリルアミド基(アクリダイト)および3'末端におけるアミノ基を持つ、特別に設計された25塩基を持つオリゴヌクレオチド；(6) ポリアクリルアミドフィルム。 20

【図 3 B】図 3Bは、図 3A と同一であるが、(5) オリゴヌクレオチドは、制限酵素 HinP1 で切断されて、該 SAW 表面から、該重合されたアクリルアミド網状構造を開放する。

【図 4 A】図 4Aは、リンカー分子(3)および(4)を介して結合した抗体(5)を有する、SAW センサ表面を模式的に示す図である。この抗体は、メタクリル酸-変性抗原(6)とハイブリダイズされる。このメタクリル酸-変性抗原は、重合過程(7)に関与する。(1) SAW センサ表面；(2) 該表面上の金 IDT；(3) 3-(メルカプトプロピル)トリメトキシシラン；(4) GMBS クロスリンカー；(5) 抗体；(6) メタクリル酸-変性抗原；(7) ポリアクリルアミドヒドロゲル。 30

【図 4 B】図 4Bは、図 4A と同一であるが、競合非-変性抗原(8)が、該 SAW 表面から、該重合されたアクリルアミド網状構造を開放している。

【図 5 A】図 5Aは、標準的なフリップ-チップ技術を利用して、2つの SAW センサが結合されている、プリントカードの前面を示す写真である。(1) SAW 基準センサ；(2) SAW 検知センサ；(3)-(8) 該2つの SAW センサからの電氣的接続；(9) プリントカード基板(酸化アルミニウム)；(10) 特別設計のガスケット。 40

【図 5 B】図 5Bは、図 5A と同一の写真であり、ここで該ガスケット(10)は、該プリントカードの上部に配置されている。

【図 6 A】図 6Aは、標準的なフリップ-チップ技術を利用して、2つの SAW センサが結合されている、該プリントカードの裏面の写真である。(1) SAW 基準センサ表面は小さなチャンネル内に見ることができ；(2) SAW 検知センサは小さなチャンネル内に見ることができ；(3)-(8) 該2つの SAW センサからの電氣的接続は、雌型プラグを装置に差し込むことの出る状態にあり；(9) 該電氣的接続材料；(10) 特別設計のガスケット。

【図 6 B】図 6Bは、図 6A と同一の写真であり、ここでガスケット(10)がプリントカード(10)の上に配置されている。

【図 7】図 7は、図 6A と同一の写真であり、ここで特別設計の PMMA ブロック(1)は、該ガス 50

ケット(10)の上部に配置されていて、完全なカートリッジを生成する。

【図 8】図8は、図7の模式図であり、ここでは全ての部品を見ることができる。(1) 上部のPMMAブロック；(2) 底部のPMMAブロック；(3)-(10) 電気コネクタ；(11) 2つのガスケットの内の一つ；(12)および(13) 上記2つのSAWセンサ；(14)および(15) サンプル導入口。

【図 9】図9は、該2つのSAWセンサを支持するための交互のカートリッジを示す写真および図面である。(1) 2つのSAWセンサを支持するように設計された流動カートリッジ；(7) PMMAで製造したカートリッジ；(8) サンプル導入口；(9) 第一SAWセンサの局在化、SAWセンサ両者は、この構成において、各々4つのスプリングブロープで接続されている；(10) 第二のSAWセンサの局在化；(11) 外部ポンプに接続するためのチューブ；(2) 標準的なフリップ-チップ技術を利用して、2つのSAWセンサが結合されている、該カートリッジの前面の写真である；(3) 各SAWセンサ用の4つの接続を見ることができる、該カートリッジの裏面の写真であり；(4) 該カートリッジの図面；(5) 基準SAWセンサのサンプル導入口であり、該SAWセンサは、この図では見ることができず；(6) 検知SAWセンサのサンプル導入口、このSAWセンサは、本図では見ることができない。

10

【図 10】図10は、 μm 単位での、該SAWセンサの寸法を示す図である。(1) SAW検知領域；(2)-(5) コンタクトパッド。

【図 11】図11は、該SAWセンサ表面の拡大写真である。(1)-(3) 該コンタクトパッド；(4) 検知領域；(5) 圧電基板；(6) インターデジタルトランスデューサ(IDT)またはインターデジタル電極(IDE)パターン。

20

【図 12】図12は、IDTに関する断面の拡大写真である。(1) 該2つの電極間の間隔 $1\mu\text{m}$ ；(2) 金表面；(3) 50nm の SiO_2 表面。

【図 13】図13は、電子回路設計の模式的図であり、各SAWセンサは、図13に示す電子回路によって作動させた。各SAWセンサ回路の出力は、2-チャンネル周波数計数器HP[アジレント(Agilent)] 53131Aと接続した。別の特別に設計された電子回路を、該周波数計数器をバイパスするように組立てた。

【図 14】図14は、測定結果を示す図であり、空気中および水中で稼動する該SAWセンサを示す。

【図 15】図15は、2つのSAW共鳴体からなるセンサ装置の写真である。(1) 該検知共鳴体用の導入孔；(2) 該基準共鳴体用の導入孔；(3) 金-被覆基板であり、その上には2つの共鳴体が結合している；(4) 該センサ装置の裏面；(5) 該検知共鳴体の裏面；(6) 該基準共鳴体の裏面。

30

【図 16】図16は、該IDT構造の模式図である。(1) IDT構造；(2) 表面弾性波。

【図 17】図17は、該IDT構造のAFM走査の写真である。(1) 該IDTは、金で作られており、該金構造体の頂部に、 50nm の SiO_2 層を持つ。

【図 18】図18は、該IDT構造の模式図であり、該構造間に適用された抗体/ヒドロゲルマトリックスを有する。(1) ヒドロゲル溶液；(2) 抗体。

【図 19】図19は、該IDT構造の模式図であり、該構造間に適用された抗体/ヒドロゲルマトリックスおよび相互作用する被検体を有する。(1) ヒドロゲル溶液；(2) 抗体；(3) 被検体。

40

【図 20】図20は、該検知共鳴体構造上に重層した、該ヒドロゲル/抗体溶液の周波数曲線を示す図である。該ヒドロゲル/抗体溶液を、図15(2)に示した孔に適用する。該ヒドロゲル/抗体溶液を、矢印で示した時点において、該SAW共鳴体に適用する。

【図 21】図21は、該ヒドロゲル/抗体を重層した該共鳴体構造上での、重合反応の周波数曲線を示す図である。時間0において、 365nm のUV光を適用する。

【図 22】図22は、被検体としてのプロテインAと、プロテインAに対する抗体との間の相互作用を示す周波数曲線を示す図である。左Y-軸には、実際の周波数応答を観測することができる。右Y-軸には、これら2つのSAW共鳴体間の差分周波数応答を観測することができる。X-軸上の時間は、秒単位である。プロテインAサンプルは、約230秒後に注入する。青色の曲線は、表面に適用された該ヒドロゲル溶液のみを含む該基準SAW共鳴体からのシグ

50

ナルを表す。赤色の曲線は、表面に適用された該ヒドロゲル抗体溶液を含む該検知SAW共鳴体からのシグナルを表す。緑色の曲線は、これら2つのSAW共鳴体曲線間の差分シグナルを表す。

【図 1 A】

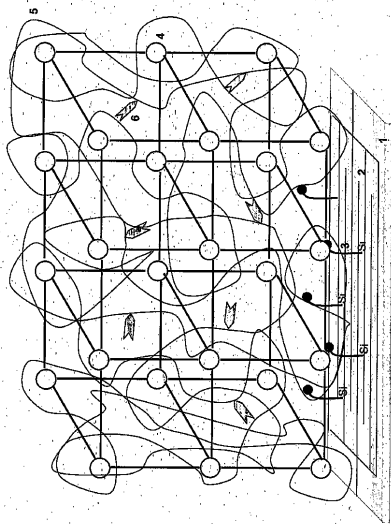


Fig. 1 A

【図 1 B】

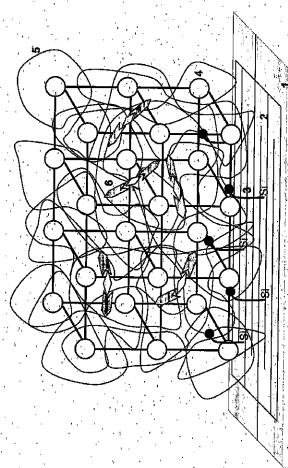


Fig. 1 B

【図 2 A】

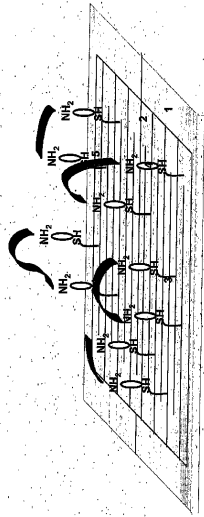


Fig. 2 A

【図 2 B】

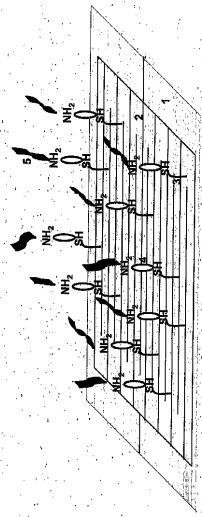


Fig. 2 B

【図 3 A】

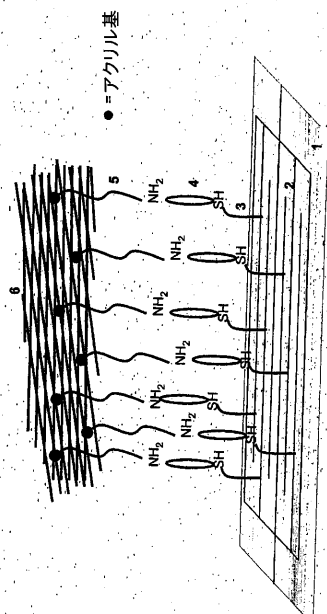


Fig. 3 A

【図 3 B】

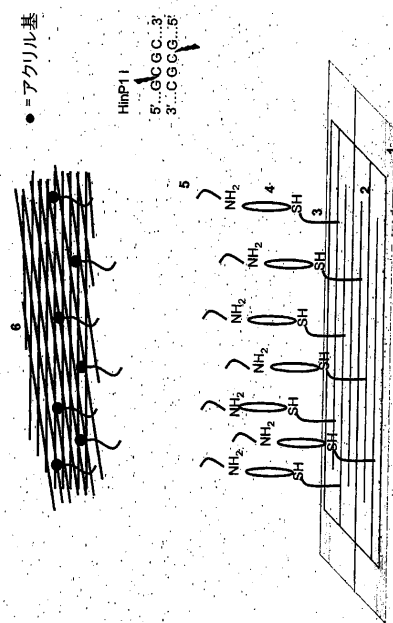


Fig. 3 B

【図 4 A】

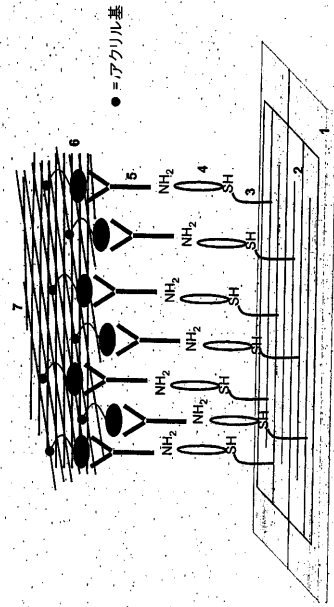


Fig. 4 A

【図 4 B】

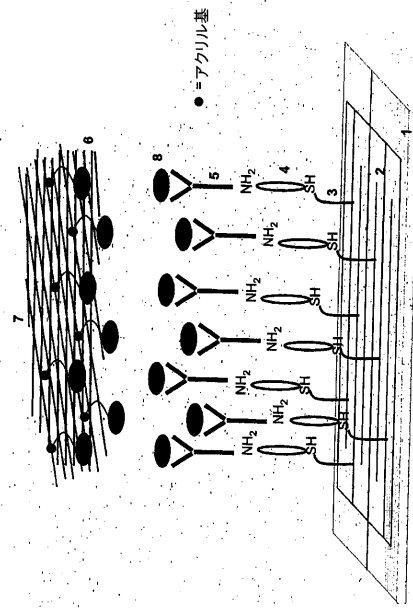


Fig. 4 B

【図 5 A】

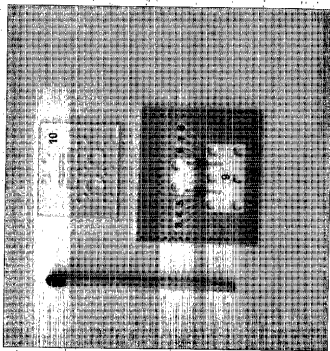


Fig. 5 A

【図 5 B】

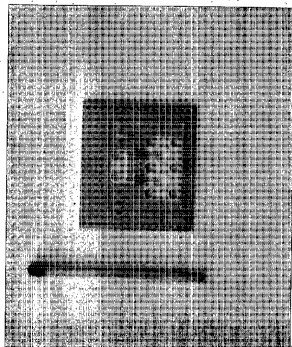


Fig. 5 B

【図 6 A】

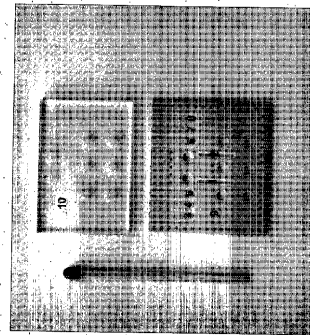


Fig. 6 A

【図 6 B】

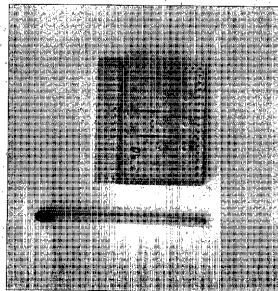


Fig. 6 B

【図 7】

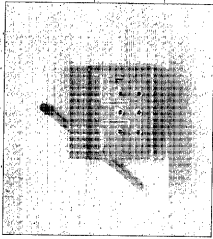


Fig. 7

【図 8】

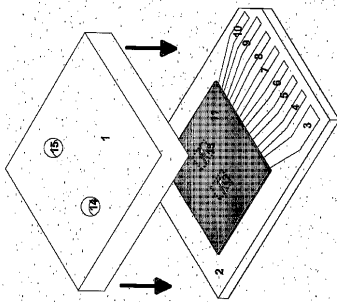


Fig. 8

【図 9】

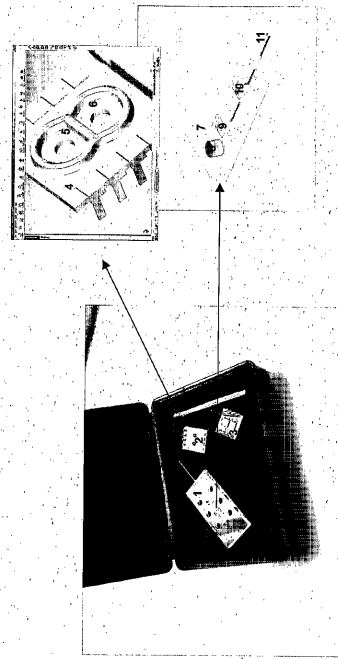
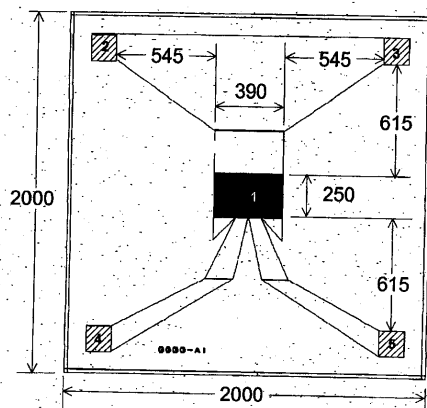


Fig. 9

【図 10】



SAWチップ (2x2mm) 単位 (um)

Fig. 10

【図 11】

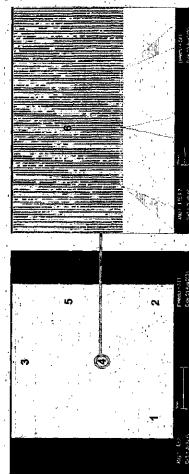


Fig. 11

【図 1 2】

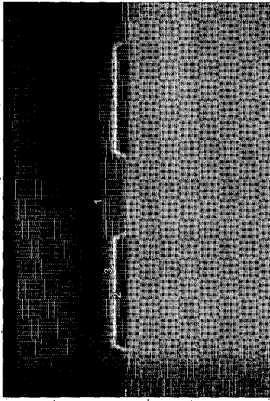


Fig. 12

【図 1 3】

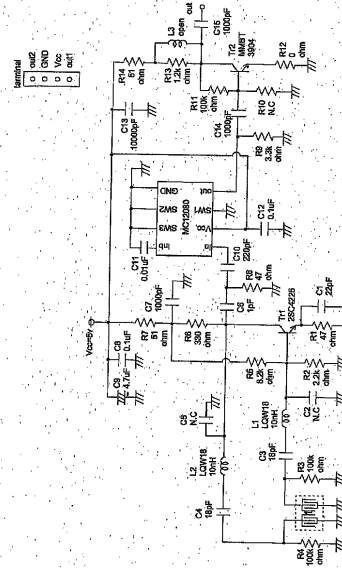


Fig. 13

【図 1 4】

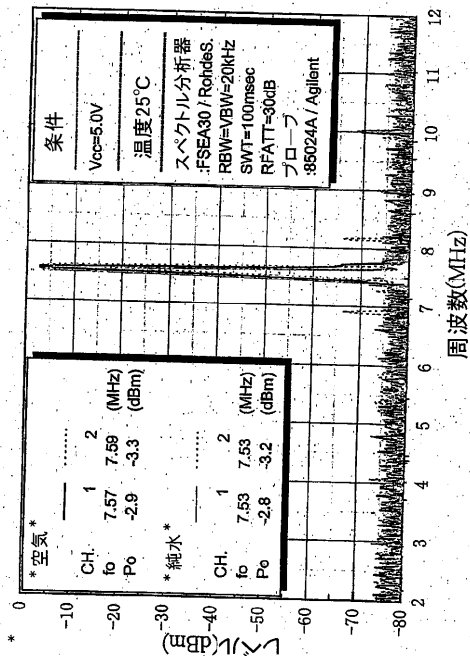


Fig. 14

【図 1 5】

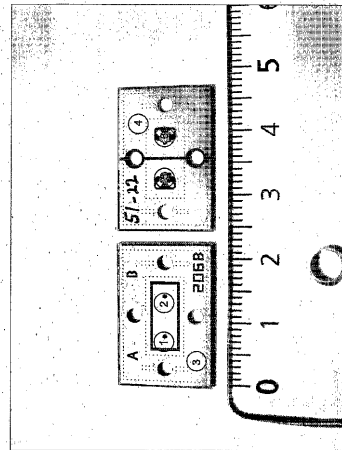


Figure 15

【図 16】

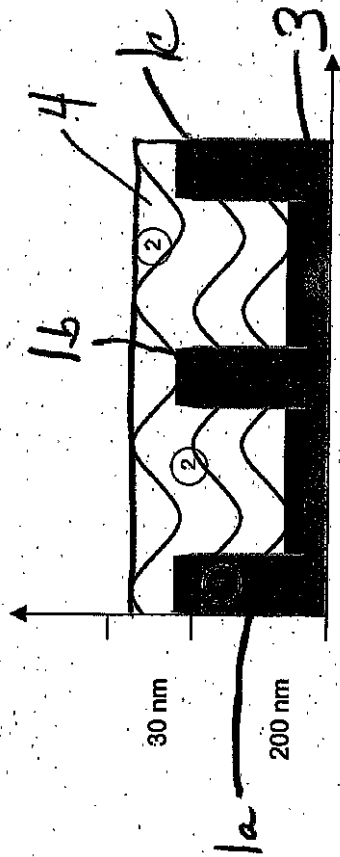


Figure 16

【図 17】

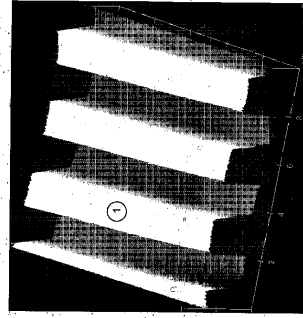


Figure 17

【図 18】

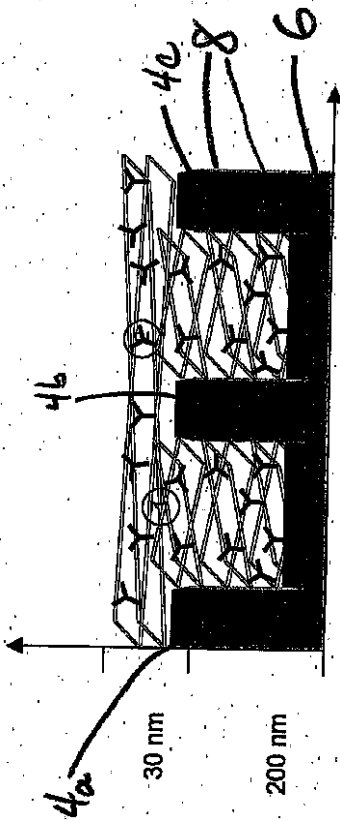


Figure 18

【図 19】

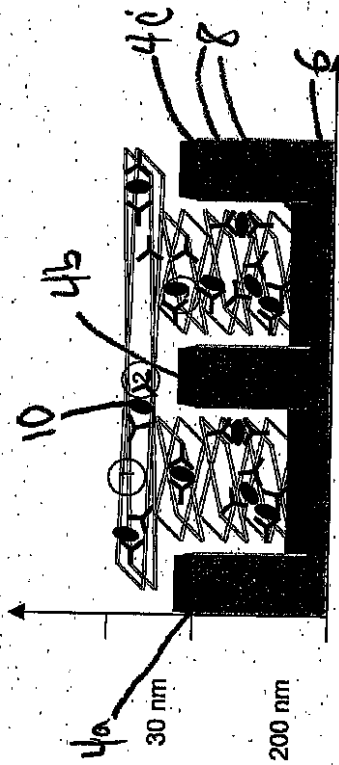


Figure 19

【図 20】

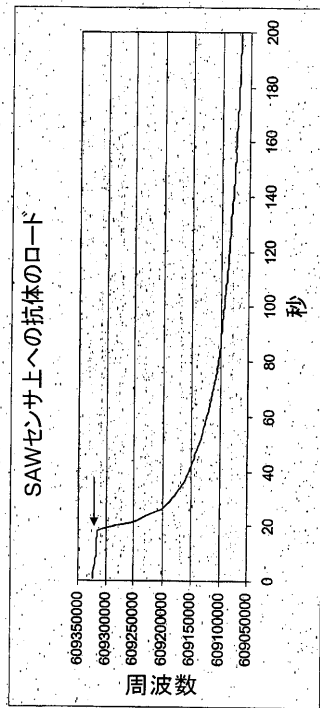


Figure 20

【図 21】

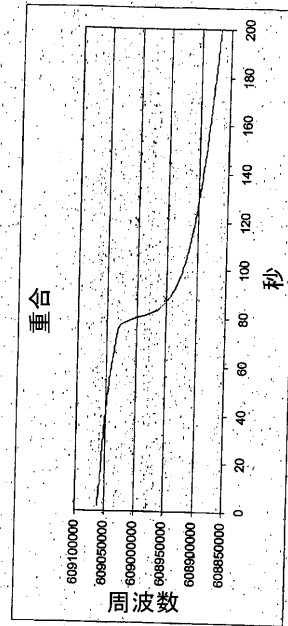


Figure 21

【図 22】

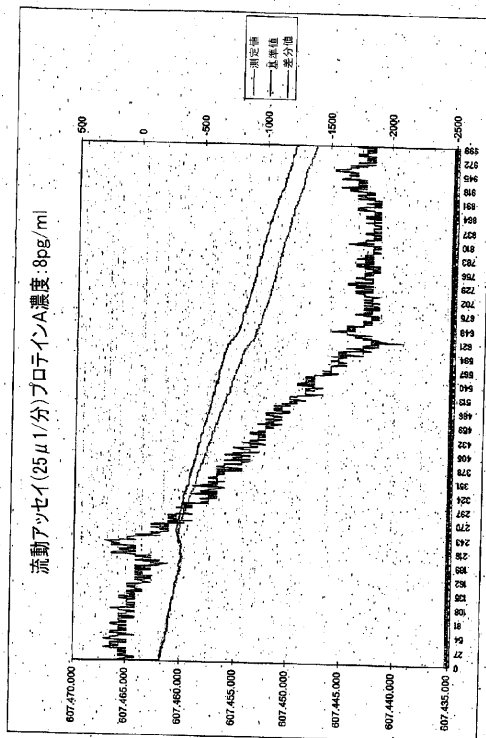


Figure 22

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DK2005/000334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N29/02		
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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PYUN J C ET AL: "Development of a biosensor for E. coli based on a flexural plate wave (FPW) transducer" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS ELSEVIER UK, vol. 13, no. 7-8, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 839-845, XP002342141 ISSN: 0956-5663 the whole document page 840, column 1, paragraph 2; figure 2	1,2,6, 13, 16-18, 26,41
X	US 2002/068157 A1 (WISCHERHOFF ERIK) 6 June 2002 (2002-06-06) abstract; claims 13,14,22,25,26 -/-	1,2,6, 16,17,41
☒ 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 doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" 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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 August 2005		Date of mailing of the international search report 07/09/2005
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) 340-3018		Authorized officer Kouzelis, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DK2005/000334

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 199 16 638 A1 (BIOTUL AG I.K; JANDRATEK GMBH) 23 November 2000 (2000-11-23) page 1, lines 5-8	1,2,6,9, 13-21, 26,41
Y	STUBBS D D ET AL: "Gas phase activity of anti-FITC antibodies immobilized on a surface acoustic wave resonator device" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS ELSEVIER UK, vol. 17, no. 6-7, June 2002 (2002-06), pages 471-477, XP002342142 ISSN: 0956-5663 page 473, column 2, paragraph 2 page 474, column 2, paragraph 2 - page 475, column 1, line 7; figures 3,4	1,2,6,9, 13-21, 26,41
A	US 5 242 828 A (BERGSTROEM ET AL) 7 September 1993 (1993-09-07) column 5, line 42 - line 62	1-41

International Application No. PCT/DK2005/000334

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Present claims 4, 5, 10, 12 and 22 relate to an extremely large number of possible compounds and methods. In fact, the claims contain so many options, variables, possible permutations and provisos that a lack of clarity (and conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those claims which do appear to be clear (and concise).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK2005/000334**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK2005/000334

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002068157	A1	06-06-2002	AU 1440402 A 06-05-2002
			CA 2427033 A1 02-05-2002
			EP 1348125 A1 01-10-2003
			WO 0235230 A1 02-05-2002
DE 19916638	A1	23-11-2000	NONE
US 5242828	A	07-09-1993	SE 462454 B 25-06-1990
			AT 136651 T 15-04-1996
			DE 68926255 D1 15-05-1996
			DE 68926255 T2 31-10-1996
			EP 0589867 A1 06-04-1994
			JP 2815120 B2 27-10-1998
			JP 4501605 T 19-03-1992
			SE 8804073 A 10-11-1988
			WO 9005303 A1 17-05-1990
			US 5436161 A 25-07-1995

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 33/552 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/53	Q
	G 0 1 N 33/552	

(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, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ヴァルトエ ペーテル

デンマーク デーコー 1 3 0 2 コペンハーゲン ドクトル トヴェルガーデ 1 2

(72)発明者 セーレンセン イベン

デンマーク デーコー 2 2 0 0 コペンハーゲン エン オーブールヴァルド 4 4 テーヴェー

Fターム(参考) 2G047 AA01 BC02 BC15 CA01 CB03 EA08 GB21 GB32 GB33 GB36

GB38 GG29 GG33

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2007538236A5	公开(公告)日	2008-07-10
申请号	JP2007516969	申请日	2005-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	ATONOMICS		
申请(专利权)人(译)	阿托卢武铉混合ACTY洛杉矶萝卜		
[标]发明人	ヴァルトエペーテル セーレンセンイベン		
发明人	ヴァルトエ ペーテル セーレンセン イベン		
IPC分类号	G01N29/02 G01N29/00 G01N29/24 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/552		
CPC分类号	G01N29/022 G01N29/226 G01N29/2462 G01N29/30 G01N2291/0255 G01N2291/0256 G01N2291/0422 G01N2291/0423 G01N2291/0427		
FI分类号	G01N29/02 G01N29/18 G01N29/24 G01N33/543.593 G01N33/543.525.U G01N33/53.M G01N33/53.Q G01N33/552		
F-TERM分类号	2G047/AA01 2G047/BC02 2G047/BC15 2G047/CA01 2G047/CB03 2G047/EA08 2G047/GB21 2G047/GB32 2G047/GB33 2G047/GB36 2G047/GB38 2G047/GG29 2G047/GG33		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	200400802 2004-05-21 DK		
其他公开文献	JP2007538236A		

摘要(译)

本发明一般涉及用于分析含有包括蛋白质和核酸的靶分析物的测试样品的方法和组合物。本发明使用表面声波传感器与水凝胶组合以获得超灵敏的非荧光检测系统。